



**Ana Paula de Souza Caetano**

**“CONTRIBUIÇÃO DA EMBRIOLOGIA NA SISTEMÁTICA E NA ELUCIDAÇÃO  
DA APOMIXIA EM MELASTOMATACEAE JUSS.”**

**Campinas**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**ANA PAULA DE SOUZA CAETANO**

**“CONTRIBUIÇÃO DA EMBRIOLOGIA NA SISTEMÁTICA E NA  
ELUCIDAÇÃO DA APOMIXIA EM MELASTOMATACEAE JUSS.”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da Tese defendida pela candidata

***Ana Paula de Souza Caetano***

*Teixeira*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
UNICAMP para obtenção do Título de  
Doutora em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira  
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

CAMPINAS,  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C116c Caetano, Ana Paula de Souza, 1985-  
Contribuição da embriologia na sistemática e na elucidação da apomixia em  
Melastomataceae Juss / Ana Paula de Souza Caetano. – Campinas, SP : [s.n.],  
2014.

Orientador: Simone de Pádua Teixeira.  
Coorientador: Sandra Maria Carmello-Guerreiro.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anatomia vegetal. 2. Apomixia. 3. Melastomataceae. 4. Antera. 5. Óvulos  
(Plantas). I. Teixeira, Simone de Pádua. II. Carmello-Guerreiro, Sandra  
Maria, 1963-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The contribution of embryology to the systematic and apomixis  
elucidation in Melastomataceae Juss

**Palavras-chave em inglês:**

Plant anatomy

Apomixis

Melastomataceae

Anther

Ovules

**Área de concentração:** Biologia Vegetal

**Titulação:** Doutora em Biologia Vegetal

**Banca examinadora:**

Simone de Pádua Teixeira [Orientador]

André Olmos Simões

Daniela Guimarães Simão

Juliana Lischka Sampaio Mayer

Karen Lúcia Gama de Toni

**Data de defesa:** 18-08-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal

Campinas, 18 de agosto de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Daniela Guimarães Simão



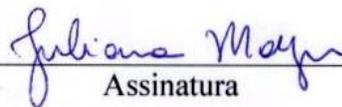
Assinatura

Dra. Karen Lúcia Gama De Toni



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões



Assinatura

Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Assinatura

Profa. Dra. Angela Borges Martins

Assinatura



## *Dedicatória*

Dedico esta tese aos meus pais Paulo e Ilzete, minha irmã Kátia e minha avó Francisca, pelo amor e apoio incondicionais que me permitiram caminhar até aqui.



"Mas na profissão, além de amar tem de saber.

E o saber leva tempo pra crescer"

Rubem Alves



"Aqueles que passam por nós não vão sós,  
não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si,  
levam um pouco de nós"

Antoine de Saint-Exupéry



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus, pela vida e por todas as oportunidades que me foram concedidas;

À Capes e a Fapesp (processos n° 2010/15077-0 e 2013/08945-4) pelo apoio financeiro;

À Simone de Pádua Teixeira, por sua contribuição profissional e pessoal. Pelo incentivo, participação e dedicação ao meu trabalho;

À Sandra Maria Carmello-Guerreiro, pela confiança depositada em mim desde o mestrado, agradeço pelo apoio incondicional;

Ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, pelo apoio e oportunidades concedidos;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto e ao Jardim Botânico de Nova York (NYBG), pela infraestrutura que possibilitou a realização deste estudo;

Aos professores André Olmos Simões, Diana Sampaio e Juliana Mayer, membros da pré-banca, pelas sugestões prévias que de fato contribuíram na melhoria do trabalho;

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da defesa e pela leitura da tese;

Ao professor Renato Goldenberg e ao pesquisador Fabian Michellangeli, pela contribuição e participação neste trabalho;

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal da Unicamp, pela inspiração e formação profissional;

Ao técnico Edimárcio da Silva Campos – Laboratório de Botânica FCFRP/USP – pelo auxílio em laboratório e nas diversas coletas de campo;

Aos funcionários do departamento de Biologia Vegetal, em especial a secretária de pós graduação, Maria Roseli, por sua paciência e eficiência;

Aos meus queridos amigos “melastomólogos” João Paulo Basso-Alves e Priscila Andressa Cortez, pela ajuda nas coletas de campo e pelas diversas discussões que geraram ideias e inspirações que contribuíram de forma ímpar para o trabalho e para meu crescimento profissional.

Aos meus amigos e colegas de laboratório e de profissão: Bárbara Biazotti, Camila Devicaro, Cristina Marinho, Giseli Pedersoli, Juliana Milani, Juliana Paulino, Liana Capucho, Marina Costa, Thais Barros e Viviane Leite, pela ajuda em muitas coletas, pela contribuição em ideias e pelos diversos momentos de descontração;

À Carla Vaccari Ferreira, Gerson Ferreira, João Vaccari Ferreira e Morgana Vaccari Ferreira, pela amizade sincera, carinho e disponibilidade em me acolher em sua casa;

À Rubens Teixeira Queiroz, por sua amizade e companheirismo;

À minha irmã Kátia, pelo apoio incondicional;

Aos meus pais Ilzete e Paulo, pelo amor, educação e dedicação a mim concedidos. E pelo exemplo de perseverança, trabalho e caráter, que contribuiu na minha formação pessoal e profissional.

## RESUMO

Melastomataceae, com cerca de 4.500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, é a sexta maior família entre as angiospermas no Brasil. O grupo destaca-se pela elevada proporção de espécies apomíticas, concentradas em Miconieae. Apesar do monofiletismo da família, a evolução de caracteres morfológicos, as relações e a própria delimitação das tribos permanecem em debate. Este trabalho teve dois objetivos gerais. O primeiro, investigar o tipo de apomixia e verificar a ocorrência de reprodução sexuada em seis espécies de Miconieae: *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* e *O. confertiflora*, por meio de análises anatômicas da esporogênese, gametogênese, embriogênese e mensuração da viabilidade e da germinação dos grãos de pólen. O segundo, testar a importância sistemática de dois caracteres embriológicos em Melastomataceae: ocorrência de drusas na parede da antera madura e número de camadas no tegumento externo do óvulo, a partir de 180 e 144 espécies, respectivamente. As amostras foram obtidas de espécimes herborizadas ou preservadas em álcool e analisadas anatomicamente. Os resultados revelam que alterações na meiose e heterocronia no desenvolvimento dos grãos de pólen levam à inviabilidade polínica. Apomixia do tipo gametofítica diplospórica é observada nas seis espécies analisadas e, como consequência, a formação de sacos embrionários reduzidos é comprometida. Adicionalmente, em *C. hirta* observa-se apomixia gametofítica apospórica e em *L. melastomoides*, embrionia adventícia. A reprodução sexuada parece ser um evento pouco comum nas espécies investigadas, que podem ser classificadas como apomíticas obrigatórias, ou seja, que se reproduzem apenas por apomixia. Drusas na parede da antera madura são relatadas em 89 dos 180 representantes analisados e pode ser útil na delimitação de alguns clados. A ocorrência destes cristais parece

distinguir o clado *Blakea* + *Topobea* (Blakeeae), a tribo Henrietteae e um subclado dentro de “*Conostegia* s.l.” (Miconieae) de grupos proxivamente relacionados. O tegumento externo do óvulo, formado por duas camadas celulares está presente em 11 dos 14 grupos amostrados. Variação é observada em Melastomeae, Merianieae e Miconieae. Em Melastomeae, no clado “*Marcetia* & allies” a ocorrência de óvulos com tegumento externo formado por três camadas de células é apontada como uma sinapomorfia para o grupo. Em Miconieae, a ocorrência de três camadas no tegumento externo do óvulo é o estado de caráter mais comum, mas a ocorrência de mais de três camadas foi observada em linhagens com sementes grandes. Na tribo, a espessura do tegumento externo pode estar relacionada com a presença de frutos endozoóricos. Ainda em Miconieae, o gênero *Physeterostemon* e um subclado dentro de “*Conostegia* s.l.” foram delimitados pela ocorrência de duas camadas no tegumento externo do óvulo. A comparação dos dados embriológicos obtidos em diferentes linhagens de Melastomataceae evidencia a importância deste tipo de estudo para a sistemática da família e fornece informações para futuras discussões evolutivas.

## ABSTRACT

Melastomataceae comprise about 4,500 species found in tropical and subtropical regions. This is the sixth largest family of flowering plants in Brazil. The group has been highlighted for its high proportion of apomictic species, concentrated in Miconieae. Despite of the supported monophyly of the family, their intrafamily relationships and morphological evolution are still now poorly understood. The objectives of this study were twofold. First, to investigate the apomixis type and to verify the occurrence of sexual reproduction in six species of Miconieae, *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* and *O. confertiflora*. Sporogenesis, gametogenesis and embryogenesis anatomy, and pollen grain viability and germination measurements were used. Second, to test the systematic importance of two embryological characters in Melastomataceae: druses occurrence in the anther wall cells and the thickness of the outer ovule integument from 180 and 144 species, respectively. For this purpose, we used anatomical analyses from herborized and spirit samples. The results show abnormal meiosis and heterochrony as main causes of pollen inviability. Diplosporic apomixis was observed in all species and thus, the sexual embryo sac development is affected. Furthermore, aposporic apomixis was observed in *C. hirta* and adventitious embryony in *L. melastomoides*. Sexual reproduction appears to be an uncommon event in the investigated species, which can be classified as obligate apomitics. Druses in the anther wall cells were observed in 89 from 180 analysed species. The druses occurrence delimits the clade *Blakea* + *Topobea* (Blakeeae), Henrietteae and a subclade in “*Conostegia* s.l.” (Miconieae). The bi-layered outer ovule integument was observed in 11 from 14 sampled groups. Variations were detected in Melastomeae, Merianieae and Miconieae. The three-layered outer integument

is pointed as a synapomorphy for “*Marcetia* & allies” (Melastomeae) and it is a character state most common in Miconieae, although more than three layers were observed in lineages with large seeds. We propose that the outer ovule integument may be related to the endozoochorous fruits in Miconieae. A bi-layered outer integument delimits *Physeterostemon* and a subclade in “*Conostegia* s.l.” (Miconieae). The embryological data comparison for different groups of Melastomataceae highlights the importance of this kind of study in the systematic works and provides information for future evolutionary discussions.

## SUMÁRIO

Resumo.....	xv
Abstract .....	xvii
Introdução geral.....	1
A família Melastomataceae Juss. ....	1
Embriologia de Melastomataceae .....	4
Apomixia em Melastomataceae .....	6
A Apomixia .....	11
Objetivos Gerais.....	13
Justificativas .....	15
Ilustrações .....	17
Referências Bibliográficas .....	31
CAPÍTULO 1. INVIABILIDADE POLÍNICA EM ESPÉCIES APOMÍTICAS DE MICONIEAE, MELASTOMATACEAE: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS.....	41
Resumo.....	41
Abstract .....	43
Introdução .....	45
Material e Métodos.....	46
Espécies investigadas e locais de coleta .....	46
Desenvolvimento do grão de pólen .....	47
Viabilidade e germinação polínica .....	48
Resultados .....	50
Discussão .....	53
Ilustrações .....	59
Referências Bibliográficas .....	79

CAPÍTULO 2. APOMIXIA GAMETOFÍTICA COMO PRINCIPAL MODO DE REPRODUÇÃO EM ESPÉCIES DE MICONIEAE, MELASTOMATACEAE .....	85
Resumo.....	85
Abstract .....	87
Introdução .....	89
Material e métodos.....	90
Resultados .....	92
Discussão .....	97
Ilustrações .....	107
Referências Bibliográficas .....	139
CAPÍTULO 3. CRYSTALS IN THE ANTHWER WALL PROVIDES MORPHOLOGICAL MARKERS WITH POTENTIAL USE FOR MELASTOMATACEAE SYSTEMATICS.....	145
Abstract .....	145
Introduction.....	147
Material and Methods .....	148
results.....	149
Discussion .....	158
Figures.....	161
References.....	173
APPENDIX.....	179
CAPÍTULO 4: O TEGUMENTO EXTERNO DO ÓVULO E SEU VALOR NA SISTEMÁTICA DE MELASTOMATACEAE.....	187
Resumo.....	187
Abstract .....	189
Introdução .....	191

Material e Métodos .....	192
Resultados .....	193
Discussão .....	202
Figuras .....	209
Referências Bibliográficas .....	229
Apêndice .....	235
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	241

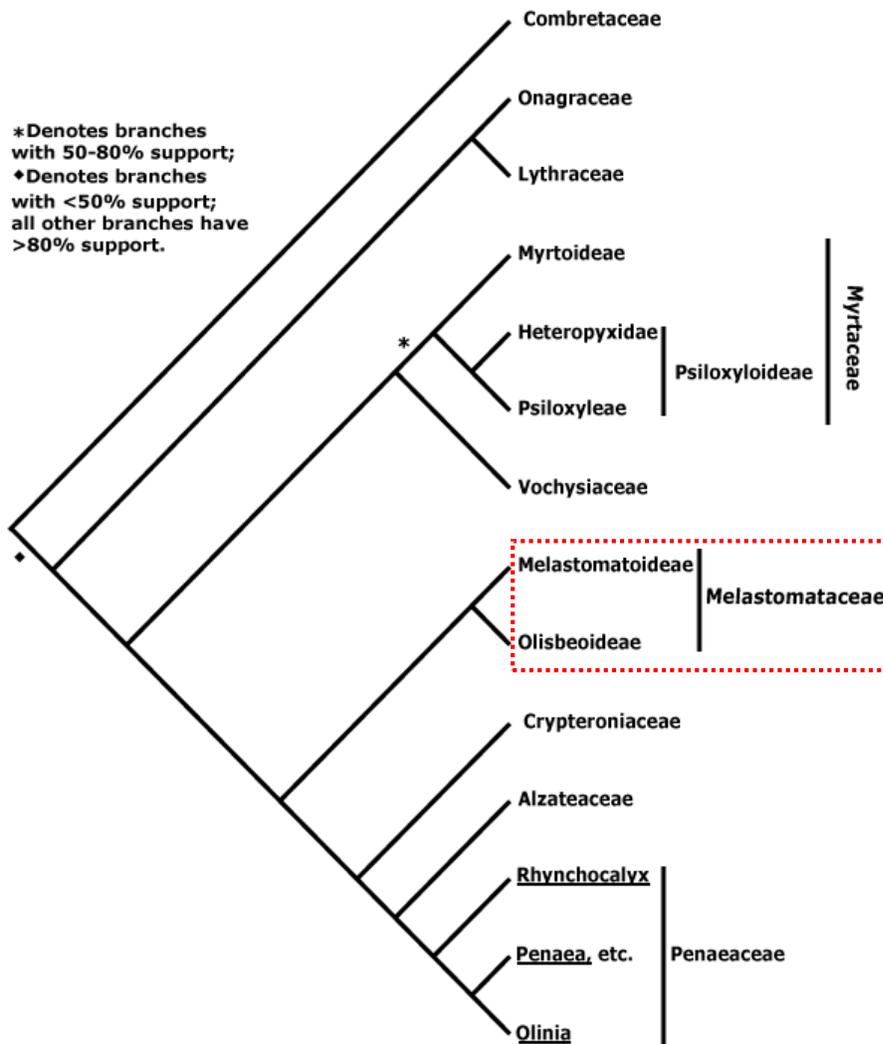


## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **A família Melastomataceae Juss.**

Melastomataceae é representada por cerca de 170 gêneros e aproximadamente 4.500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, das quais cerca de 3.000 são registradas para o Novo Mundo (Renner 1993, Clausen & Renner 2001). No Brasil, é considerada a sexta maior família em número de espécies entre as angiospermas, com 1.360 espécies que ocorrem em praticamente todas as formações vegetacionais (Romero & Martins 2002, Goldenberg *et al.* 2012a, Baumgratz *et al.* 2014).

Juntamente com outras nove famílias, Melastomataceae está incluída na ordem Myrtales Juss. ex Bercht. & J. Presl (APG III 2009) (Fig. 1), um grupo monofilético (Conti *et al.* 1996). Em Myrtales, há uma estreita relação entre Alzateaceae S.A. Graham, Crypteroniaceae A. DC. ex DC. & A. DC., Melastomataceae e Penaeaceae Sweet ex Guill., que formam um clado dentro da ordem (APG III 2009) (Fig. 1).



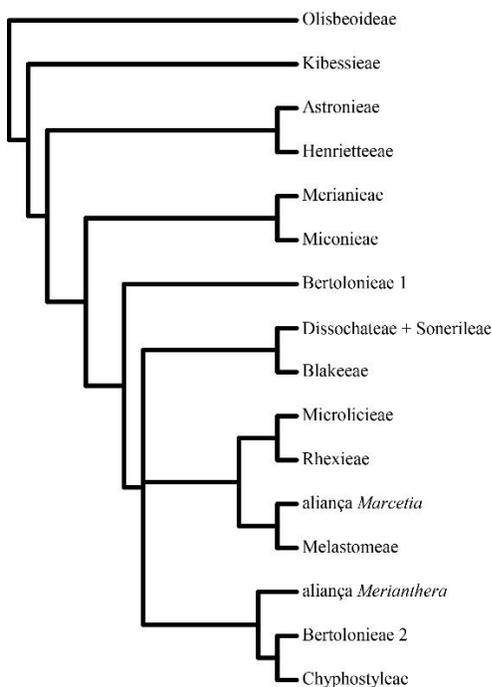
**Figura 1.** Árvore filogenética evidenciando as relações dentro da ordem Myrtales e destacando o posicionamento de Melastomataceae.

Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/myrtalesweb2.htm>

Acesso em 29/04/2014.

Melastomataceae destaca-se em Myrtales por exibir o maior número de espécies. Quanto a sua circunscrição, apesar dos debates em relação ao posicionamento de Olibeioideae (ou Memecyloideae) como uma família autônoma (Memecylaceae), os trabalhos têm reconhecido este grupo como uma subfamília de Melastomataceae (Clausing & Renner 2001, Stone 2005, APG III 2009).

Apesar de seu monofiletismo (Clausing & Renner 2001), a evolução de caracteres morfológicos, as relações e a própria delimitação das tribos dentro de Melastomataceae ainda estão sob discussão (Clausing & Renner 2001, Fritsch *et al.* 2004, Michelangeli *et al.* 2004, Penneys *et al.* 2010, Goldenberg *et al.* 2012b, Michelangeli *et al.* 2013). Na classificação mais recente são reconhecidas nove tribos: Kibessieae, Astronieae, Sonerileae, Merianieae, Rhexieae, Microlicieae, Melastomeae, Blakeeae e Miconieae (Renner 1993). No entanto essa delimitação deve ser brevemente revista, uma vez que já foram propostas a criação de duas novas tribos, Henrietteae (Penneys *et al.* 2010) e Cyphostyleae (Michelangeli *et al.* 2011), além de mudanças na delimitação de outras, como em Blakeeae (Penneys & Judd 2011), Melastomeae (Michelangeli *et al.* 2013), Merianieae (Goldenberg *et al.* 2012b), Miconieae (Michelangeli *et al.* 2004, Goldenberg *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009), Microlicieae (Fritsch *et al.* 2004) e Rhexieae (Michelangeli *et al.* 2013) (Fig. 2).



**Figura 2.** Árvore filogenética evidenciando os clados atualmente reconhecidos em Melastomataceae e suas relações. Figura modificada de Clausing & Renner (2001) e atualizada segundo Goldenberg *et al.* (2012b) e Michelangeli *et al.* (2013). Créditos: J.P. Basso-Alves.

## **Embriologia em Melastomataceae**

O valor sistemático dos caracteres embriológicos tem sido frequentemente ressaltado e utilizado para esclarecer as relações em determinados grupos de angiospermas (Davis 1966, Herr 1984, Johri 1984, Tobe 1989, Johri *et al.* 1992). Em Myrtales, uma combinação de sete estados de caráter embriológicos é utilizada para definir morfologicamente a ordem: 1. tapete do tipo glandular, 2. óvulo crassinucelado, 3. tegumento interno formado por duas camadas de células, 4. micrópila formada por ambos os tegumentos, 5. antípodas efêmeras ou ausentes, 6. formação nuclear do endosperma e 7. sementes exalbuminosas (Tobe & Raven 1983).

Por sua vez, dentro de Myrtales, o clado formado pelas famílias Alzateaceae, Crypteroniaceae, Melastomataceae (exceto Olisbeoideae) e Penaeaceae, compartilha a ausência de espessamentos secundários na parede das células do endotécio, camada geralmente efêmera (Conti *et al.* 1997, Clausen & Renner 2001, Schonenberger & Conti 2003).

Em Melastomataceae, as células uninucleadas do tapete da antera são um estado de caráter utilizado para distinguir a família das demais da ordem, que apresentam células tapetais bi ou multinucleadas (Davis 1966, Johri *et al.* 1992, Tobe & Raven 1983, Cortez *et al.* 2014).

A família apresenta, em geral, anteras tetrasporangiadas (Davis 1966, Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Medeiros e Morretes 1996, Medeiros e Ross 1996, Cortez *et al.* 2014). Entretanto, anteras polisporangiadas foram relatadas em *Microlicia* (Baumgratz *et al.* 1996, Lima 2013) e bisporangiadas em *Miconia latecrenata* (Cortez *et al.* 2014). A parede da antera é formada por epiderme, endotécio, uma ou mais camadas média e tapete secretor com células uninucleadas (Davis 1966, Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Medeiros e Morretes 1996, Medeiros e Ross 1996, Lima 2013, Fernandes 2011, 2014,

Cortez *et al.* 2014). A citocinese da célula-mãe de micrósporos é simultânea, formando tétrades tetraédricas de micrósporos (Davis 1966, Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Medeiros e Morretes 1996, Medeiros e Ross 1996, Lima 2013, Fernandes 2011, 2014, Cortez *et al.* 2014). O grão de pólen é liberado em mônades no estágio bicelular (Tobe & Raven 1984, Medeiros e Morretes 1996, Medeiros e Ross 1996, Fernandes 2011, Lima 2013, 2014, Cortez *et al.* 2014).

Em melastomataceae, grande parte das espécies estudadas apresentam óvulos anátropos (Subramanyam 1942, 1944, 1948, 1951, Davis 1966, Etheridge & Herr 1968, Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Caetano 2010, Nardi 2011, Caetano *et al.* 2013), mas os tipos campilótropo (Tobe & Raven 1983), ana-anfitropo (Medeiros & Morretes 1996) e átropo (ortótropo) (Etheridge & Herr 1968) também podem ser encontrados. Os óvulos são crassinucelados e bitegmentados, com tegumento interno formado por duas camadas celulares e hipóstase diferenciada (Davis 1966, Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Medeiros & Morretes 1996, Cortez & Carmello-Guerreiro 2008, Nardi 2011, Caetano *et al.* 2013a). A espessura do tegumento externo é variável, podendo ser formado por duas ou mais camadas de células (Ziegler 1925, Subramanyam 1942, 1944, 1948, 1951, Etheridge & Herr 1968, Tobe & Raven 1983, Medeiros & Morretes 1996, Caetano *et al.* 2013). Após a meiose, a célula-mãe de megásporos dá origem a tétrades de megásporos lineares ou em forma de “T” e o megásporo calazal dá origem a um saco embrionário do tipo *Polygonum* (Davis 1966, Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Medeiros & Morretes 1996, Caetano 2010, Nardi 2011).

O desenvolvimento do endosperma é do tipo nuclear e os núcleos permanecem livres até serem consumidos pelo embrião em desenvolvimento (Davis 1966, Johri 1992, Medeiros & Morretes 1996, Caetano 2010, Nardi 2011). A embriogênese pode ser do tipo onagráceo (Davis 1966, Tobe & Raven 1983, Johri 1992) ou, mais raramente, do tipo

solanáceo (Medeiros & Ross 1996) e o embrião apresenta um suspensor curto e massivo (Tobe & Raven 1983, Johri 1992, Medeiros & Ross 1996).

Os estudos embriológicos realizados em Melastomataceae (Subramanyam 1942, 1944, 1948, 1951, Venkatesh 1955, Tobe & Raven 1983, 1984, Borges 1991, Medeiros & Morretes 1996, Medeiros & Ross 1996, Cortez 2007, Cortez & Carmello-Guerreiro 2008, Caetano 2010, Fernandes 2011, 2014, Nardi 2011, Cortez *et al.* 2012, Ribeiro 2012, Caetano *et al.* 2013a,b, Lima 2013, Cortez *et al.* 2014), são escassos frente à grande diversidade de espécies na família e se concentram em determinadas tribos, como Melastomeae, Microlicieae e, principalmente, Miconieae. Além disso, a associação entre dados embriológicos e moleculares ainda é pouco utilizada. Em conjunto, estes dados permitiriam detectar estados de caráter de importância sistemática, além de ajudar a esclarecer a história evolutiva da família.

Além das questões relacionadas à sistemática do grupo, outro aspecto importante a ser ressaltado em Melastomataceae é a grande proporção de espécies apomíticas (Sobrevila & Arroyo 1982, Renner 1984, 1989, Ramirez & Brito 1990, Borges 1991, Dent-Acosta & Breckon 1991, Almeda & Chuang 1992, Melo & Machado 1996, Saraiva *et al.* 1996, Goldenberg & Shepherd 1998, Melo *et al.* 1999, Sousa-Silva 2000, Goldenberg & Varassin 2001, Santos 2003, Santos *et al.* 2010, 2012), mecanismo relativamente incomum em angiospermas (Carman 1997, Hojsgaard *et al.* 2014).

### **Apomixia em Melastomataceae**

O sistema reprodutivo de diferentes espécies de Melastomataceae tem sido investigado e os estudos revelam uma grande diversidade reprodutiva na família, com espécies apomíticas, autocompatíveis e autoincompatíveis em variados graus (Sobrevila & Arroyo 1982, Renner 1984, 1989, Ramirez & Brito 1990, Borges 1991, Dent-Acosta &

Breckon 1991, Melo & Machado 1996, Saraiva *et al.* 1996, Goldenberg & Shepherd 1998, Melo *et al.* 1999, Sousa-Silva 2000, Goldenberg & Varassin 2001, Santos 2003, Fracasso & Sazima 2004, Montoro & Santos 2007, Santos *et al.* 2010, Santos *et al.* 2012, Brito & Sazima 2012). Embora a presença de poros amplos em algumas espécies possa facilitar a autopolinização espontânea (Santos *et al.* 2010), o sistema de polinização predominante neste grupo é o xenógamo, favorecido pela separação espacial entre pólen e estigma nas flores (hercogamia) e pela ocorrência de anteras poricidas que necessitam ser manipuladas para que o pólen seja liberado (Renner 1989).

A apomixia tem sido reportada com frequência em Melastomataceae e já foi descrita em representantes de Dissochateae + Sonerileae, Henrietteae, Melastomeae, Merianieae, Miconieae, Microlicieae e Rhexieae (Tabela 1). Embora os estudos de biologia reprodutiva sejam relativamente escassos frente ao grande número de espécies da família, os dados disponíveis revelam uma elevada proporção de apomixia em Miconieae, onde aproximadamente 68% das espécies estudadas são apomíticas.

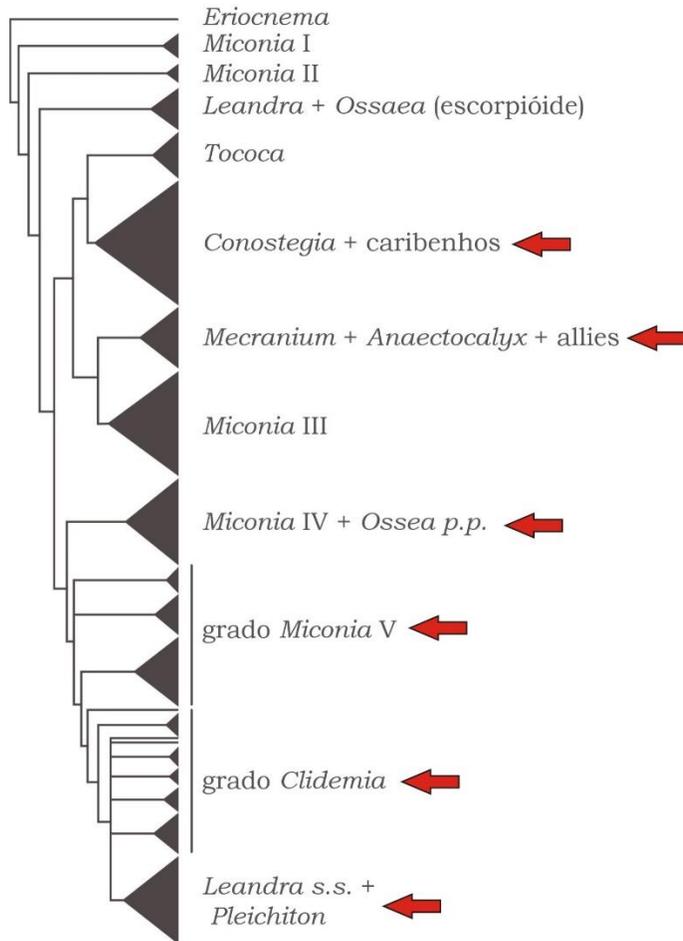
Miconieae é um grupo monofilético e inclui quase metade dos representantes de Melastomataceae (Goldenberg *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008). A delimitação dentro da tribo ainda não é clara e apenas alguns dos 30 gêneros atualmente reconhecidos são monofiléticos (Goldenberg *et al.* 2008). *Miconia*, *Leandra*, *Clidemia* e *Ossaea*, os maiores gêneros da tribo são reconhecidamente parafiléticos (Goldenberg *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008), embora a maioria das espécies localizadas no leste do Brasil pertence a dois clados (*Leandra* s.s., *Miconia* IV + *Ossaea*) e dois grados (*Clidemia* e *Miconia* V) (Goldenberg *et al.* 2008). A apomixia surgiu em diferentes linhagens dentro de Miconieae, e já foi relatada em diversos representantes dos clados e grados citados acima (Tabela 1, Fig. 3).

A apomixia em Miconieae parece estar relacionada a eventos de hibridação, poliploidia e baixa viabilidade polínica (Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano *et al.* 2013b). Trabalhos recentes sobre o desenvolvimento do grão de pólen, do saco embrionário e do embrião em espécies apomíticas e sexuadas da tribo (Caetano *et al.* 2013a,b, Cortez *et al.* 2012) têm ajudado a entender a apomixia e suas implicações neste grupo.

**Tabela 1.** Listagem das espécies descritas como apomíticas em Melastomataceae.

<b>Tribos</b>	<b>Clados/Grados</b>	<b>Espécies</b>	<b>Referência</b>
<b>Henrietteae</b>		<i>Henriettea succosa</i> (Aubl.) DC.	1
<b>Merianieae</b>		<i>Meriania urceolata</i> Triana	2
	<b>Conostegia s.l.</b>	<i>Miconia ferruginata</i> DC.	3
	<b>Mecranium,</b>	<i>Miconia ciliata</i> (Rich.) DC.	2
	<b>Anaectocalyx &amp; allies</b>	<i>Miconia spinulosa</i> Naudin	4
		<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana	5
		<i>Miconia argyrophylla</i> DC.	6
		<i>Miconia discolor</i> DC.	7
		<i>Miconia fallax</i> DC.	5
	<b>Miconia IV + Ossaea</b>	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	6
		<i>Miconia leucocarpa</i> DC.	5
		<i>Miconia ligustroides</i> (DC.) Naudin	5
		<i>Miconia petropolitana</i> Cogn.	8
		<i>Miconia rubiginosa</i> (Bonpl.) DC.	5
		<i>Miconia stenostachya</i> DC.	5
		<i>Miconia alata</i> (Aubl.) DC.	6
		<i>Miconia aplostachya</i> (Bonpl.) DC.	2
		<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Triana	9
	<b>Miconia V</b>	<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.	6, 10
		<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	11
		<i>Miconia tomentosa</i> (Rich.) D.Don	6
		<i>Miconia trianae</i> Cogn.	6
<b>Miconieae</b>		<i>Clidemia capitellata</i> (Bonpl.) D.Don	12
		<i>Clidemia epibaterium</i> DC.	6
		<i>Clidemia fendleri</i> Cogn	4
		<i>Clidemia hirta</i> (L.) D.Don	13
	<b>Clidemia</b>	<i>Clidemia novemnervia</i> (DC.) Triana	6
		<i>Clidemia pustulata</i> DC.	2
		<i>Clidemia rubra</i> (Aubl.) Mart.	6
		<i>Clidemia sericea</i> D.Don	2
		<i>Miconia campestris</i> Benth. & Triana	6
		<i>Leandra australis</i> (Cham.) Cogn.	8
		<i>Leandra aurea</i> (Cham.) Cogn	5
		<i>Leandra melastomoides</i> Raddi	8
	<b>Leandra s.s. + Pleiochiton</b>	<i>Leandra purpurascens</i> (DC.) Cogn.	8
		<i>Maieta guianensis</i> Aubl.	6
		<i>Maieta poeppigii</i> Cogn.	6
		<i>Ossaea amygdaloides</i> (DC.) Triana	8
		<i>Ossaea confertiflora</i> (DC.) Triana	8
		<i>Clidemia bullosa</i> DC.	13
	<b>Posição filogenética não conhecida</b>	<i>Clidemia ruddae</i> Wurdack	14
		<i>Leandra involucrata</i> DC.	11
		<i>Miconia egensis</i> Cogn	6
		<i>Miconia stephananthera</i> Ule	12
<b>Dissochateae + Sonerileae</b>		<i>Sonerila wallichii</i> Benn.	15
<b>Microlicieae</b>		<i>Microlicia benthamiana</i> Triana	2
		<i>Microlicia fasciculata</i> Mart. ex Naudin	3
		<i>Trembleya parviflora</i> (D.Don) Cogn.	16
<b>Rhexieae</b>		<i>Rhexia mariana</i> L.	6
		<i>Aciotis acuminifolia</i> (Mart. ex DC.) Triana	6
	<b>Marcetia &amp; allies</b>	<i>Comolia microphylla</i> Benth.	2
		<i>Macairea parvifolia</i> Benth.	2
		<i>Macairea theresiae</i> Cogn.	6
		<i>Sandemania hoehnei</i> (Cogn.) Wurdack	6
<b>Melastomeae</b>		<i>Melastoma malabathricum</i> L.	17
	<b>Core Melastomeae</b>	<i>Osbeckia hispidissima</i> Wight	18
		<i>Pterolepis glomerata</i> (Rottb.) Miq.	12
		<i>Tibouchina fraterna</i> N.E.Br.	2

1. Melo & Machado 1996; 2. Mendoza-Cifuentes & Fernández-Alonso 2012. 3. Santos *et al.* 2012; 4. Sobrevila & Arroyo 1982; 5. Goldenberg & Shepherd 1998; 6. Renner 1989; 7. Borges 1991; 8. Goldenberg & Varassin 2001; 9. Goldenberg 1994; 10. Dent-Acosta & Breckon 1991; 11. Saraiva *et al.* 1996; 12. Ramirez & Brito 1990; 13. Melo *et al.* 1999; 14. Almeda & Chuang 1992; 15. Subramanyan 1944; 16. Sousa-Silva 2000; 17. Subramanyan 1948; 18. Subramanyan 1942.



**Figura 3.** Clados e grados reconhecidos atualmente em Miconieae e suas relações filogenéticas. Setas vermelhas indicam os grupos onde há relatos de espécies apomíticas. Árvore modificada de Goldenberg *et al.* 2008. Créditos: J.P. Basso-Alves.

## **A Apomixia**

O termo apomixia foi introduzido por Winkler (1908), como sinônimo de reprodução assexuada, e era utilizado para descrever qualquer forma de reprodução em que não ocorresse fusão de gametas, incluindo diferentes formas de propagação vegetativa e a agamospermia (reprodução assexuada por sementes). Atualmente, os autores utilizam apomixia como sinônimo de agamospermia (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992, Crane 2001, Koltunow & Grossniklaus 2003, Whitton *et al.* 2008, Talent 2009), sendo o conceito adotado no presente estudo.

A apomixia pode ser descrita como um processo de formação assexuada de sementes a partir de células do nucelo, tegumento ou do saco embrionário, resultando no desenvolvimento de pelo menos um embrião viável (Bicknell & Koltunow 2004, Koltunow & Grossniklaus 2003). Este processo parece resultar, originalmente, de uma desregulação, em tempo e espaço, do desenvolvimento sexual, levando a mudanças no destino de células e omissão de eventos críticos no processo sexual (Koltunow & Grossniklaus 2003, Carman 2007, Tucker & Koltunow 2009).

A apomixia é relatada em aproximadamente 78 famílias de angiospermas (Hojsgaard *et al.* 2014), sendo marcadamente mais frequentes em alguns grupos de plantas como Asteraceae, Poaceae, Rosaceae, Rutaceae (Richards 1997, Naumova 2008) e Melastomataceae (Renner 1989, Goldenberg & Shepherd 1998, Goldenberg & Varassin 2001, Santos *et al.* 2012). A ocorrência de espécies apomíticas em diferentes grupos de angiospermas indica que a apomixia surgiu diversas vezes durante a evolução das plantas com flores, e que pode ter sido determinada por oportunidades genéticas apropriadas, favorecidas por circunstâncias ecológicas (Whitton *et al.* 2008, Hörandl & Hojsgaard 2012).

A apomixia pode ser classificada de acordo com a origem do embrião em apomixia esporofítica ou embrionia adventícia e apomixia gametofítica (diplosporia e aposporia). Na embrionia adventícia, o embrião origina-se a partir de células nucleares ou tegumentares do óvulo (Nogler 1984, Koltunow 1993, Bicknell & Koltunow 2004). Na apomixia gametofítica o desenvolvimento do embrião ocorre no interior de um saco embrionário não reduzido, ou seja, cujas células apresentam número cromossômico somático. Entretanto, enquanto na diplosporia o saco embrionário não reduzido origina-se da célula-mãe de megásporos por supressão ou alterações na meiose, na aposporia ele origina-se de uma ou mais células somáticas do óvulo, geralmente do nucelo (Nogler 1984, Bicknell & Koltunow 2004).

Nas espécies apomíticas, o desenvolvimento do endosperma pode ser autônomo ou, pode ser dependente da fecundação, em um fenômeno conhecido como pseudogamia (Asker & Jerling 1992, Koltunow 1993). Ainda, há um relato em *Garcinia hombroniana* Pierre (Clusiaceae), na qual o embrião aparentemente se desenvolve sem a presença de um endosperma (Richards 1990).

Nem sempre há exclusão da reprodução sexual nas espécies apomíticas. Os chamados apomíticos facultativos retêm a capacidade de se reproduzir sexualmente, sendo o fenômeno mais comumente encontrado nas angiospermas (Nogler 1984). Testes de progênie utilizando ferramentas moleculares têm demonstrado que os apomíticos obrigatórios são uma exceção e não uma regra (Savidan 2007) e a existência de plantas totalmente apomíticas na natureza tem sido até mesmo questionada (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992).

A apomixia está quase sempre associada a espécies aloploplóides, ou seja, poliplóides formados após evento de hibridação (Carman 1997, 2007, Savidan 2007). Acredita-se que a apomixia pode ser originada pela expressão assincrônica de genes

duplicados, que leva a mudanças importantes em etapas do programa sexual: iniciação precoce do saco embrionário e embriogênese a partir de locais e momentos atípicos durante a reprodução sexuada (Carman 1997; 2007; Tucker & Koltunow 2009). A combinação entre hibridação e poliploidia seria responsável por estas alterações em processos importantes durante estágios da megasporogênese, megagametogênese e fecundação, levando à apomixia (Carman 1997; 2007; Bicknell & Koltunow 2004). De fato, muitos apomíticos poliploides são formados após eventos de hibridação (Darlington 1939; Nogler 1984), além disso, é conhecida a ocorrência de mudanças em padrões de expressão de genes após eventos de cruzamento interespecífico seguido por poliploidização (Chen 2010; Chen *et al.* 2008; Carvalho *et al.* 2010; Gaeta *et al.* 2009).

## **Objetivos Gerais**

Este trabalho teve por objetivos gerais:

1. Investigar o tipo de apomixia e verificar a ocorrência de reprodução sexuada em seis espécies de Miconieae, Melastomataceae, previamente descritas como apomíticas em estudos de biologia reprodutiva (Goldenberg & Shepherd 1998, Melo *et al.* 1999, Goldenberg & Varassin 2001).
2. Testar a importância sistemática de dois caracteres embriológicos em Melastomataceae: ocorrência de drusas na parede da antera madura e número de camadas no tegumento externo do óvulo;

Para tal, as seguintes questões foram levantadas:

- Qual a origem dos embriões apomíticos?

- As espécies apomíticas analisadas produzem grãos de pólen viáveis e sacos embrionários reduzidos?
- Há evidências de formação de um embrião sexuado?
- Os caracteres embriológicos testados - ocorrência de drusas na parede da antera madura e número de camadas no tegumento externo do óvulo - podem ser utilizados para delimitar grupos dentro da família?

As seguintes hipóteses foram propostas:

- As espécies apresentam irregularidades no processo meiótico durante a microsporogênese, resultando em uma baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis formados;
- Apesar das espécies produzirem uma baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis, a formação de determinada quantidade de grãos viáveis e sacos embrionários reduzidos permite que estas espécies também se reproduzam sexualmente, mesmo de forma esporádica, garantindo, assim, alguma variabilidade genética nas populações. Este resultado corroboraria a ideia de que as espécies apomíticas são, em sua maioria, facultativas.
- A ocorrência de drusas na parede da antera madura e a espessura do tegumento externo do óvulo podem ser utilizados na delimitação de grupos monofiléticos em Melastomataceae.

Cada um destes objetivos foi abordado em quatro capítulos, a saber:

**Capítulo 1:** Inviabilidade polínica em espécies apomíticas de Miconieae, Melastomataceae: causas e consequências;

**Capítulo 2:** Apomixia gametofítica como principal modo de reprodução em Miconieae, Melastomataceae;

**Capítulo 3:** Crystals in the anther wall provides morphological markers with potential use for Melastomataceae systematics;

**Capítulo 4:** O tegumento externo do óvulo e seu valor na sistemática de Melastomataceae.

### **Justificativas**

Os estudos que investigam o sistema reprodutivo em Miconieae têm apontado para a necessidade de informações anatômicas. Esse tipo de dado permitiria verificar a origem dos embriões apomíticos e a possibilidade da reprodução sexuada ocorrer em paralelo, de forma a interpretar mais aprofundamente este mecanismo tão frequente na tribo. Estudos como este são comuns em espécies com importância econômica, como em Asteraceae e Poaceae, principalmente as herbáceas de clima temperado, sendo relativamente raros em espécies tropicais. Segundo Goldenberg & Shepherd (1998), se os dados de sistema reprodutivo em Melastomataceae são de fato representativos e, se a proporção de espécies apomíticas é constante, Miconieae seria um dos maiores complexos apomíticos de angiospermas. Neste contexto, a tribo oferece uma oportunidade ímpar de discutir o processo apomítico em um cenário diferente do que já foi estudado até agora.

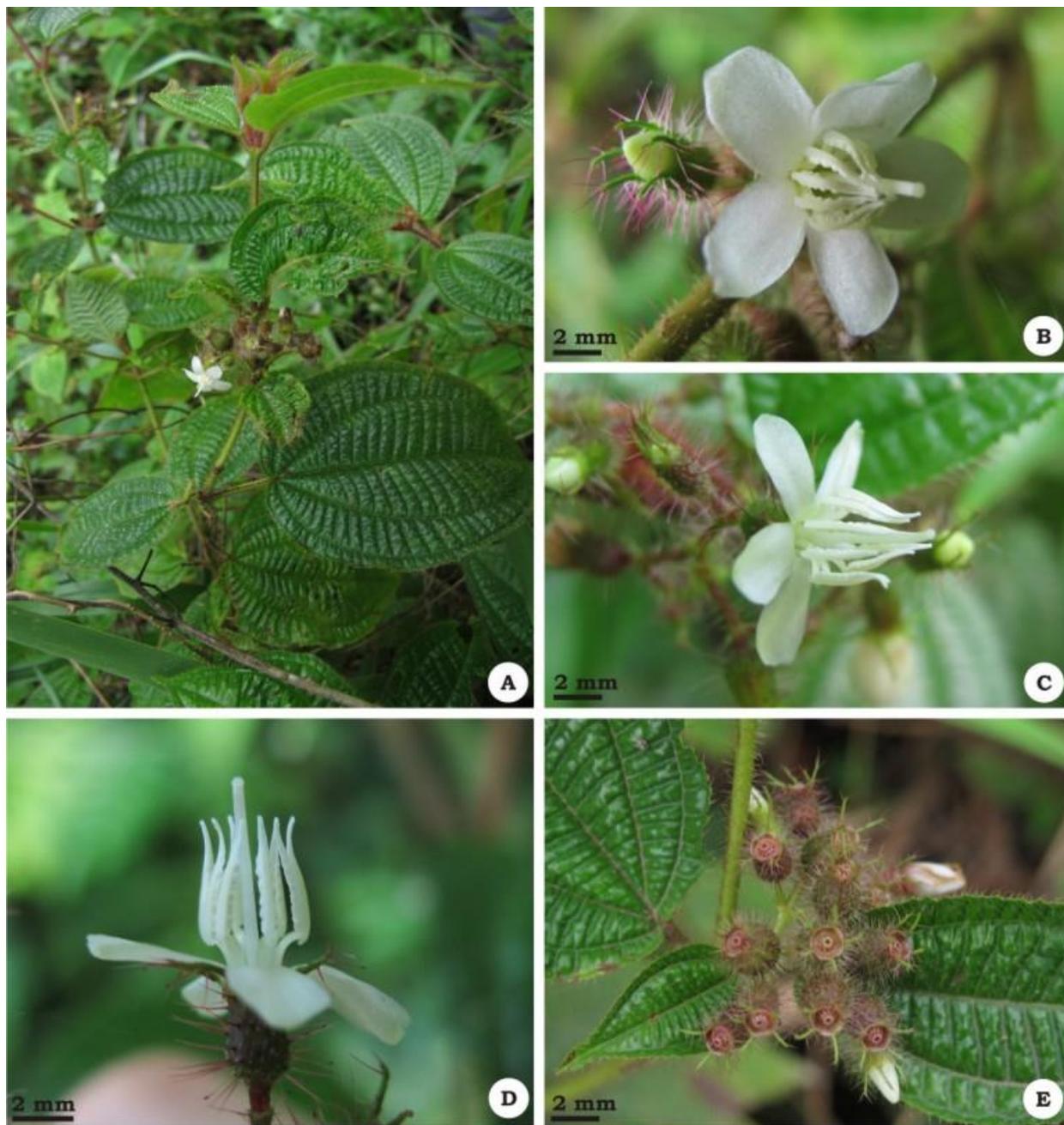
As espécies apomíticas utilizadas pertencem a quatro gêneros e três diferentes grupos informais dentro de Miconieae: grupo “*Clidemia*”: *Clidemia hirta* D.Don (Fig. 4); clado “*Leandra* s.s. + *Pleiochiton*”: *Leandra aurea* Cogn. (Fig. 5), *L. melastomoides* Radd (Fig. 6), *Ossaea amygdaloides* (DC.) Triana (Fig. 7) e *O. confertiflora* (DC.) Triana (Fig. 8)

e clado “*Miconia* IV + *Ossaea*”: *Miconia leucocarpa* DC (Fig. 8). As espécies foram escolhidas de forma a amostrar diferentes grupos de Miconieae onde a apomixia tenha sido relatada, e que ocorrem no estado de São Paulo.

Por fim, estudos que levantem estados de caráter embriológicos em um grande número de espécies distribuídas em todas as tribos de Melastomataceae e a utilização destes dados em conjunto com outros moleculares já publicados podem esclarecer a evolução de características reprodutivas na família, além de apontar sua possível utilização para a sistemática.

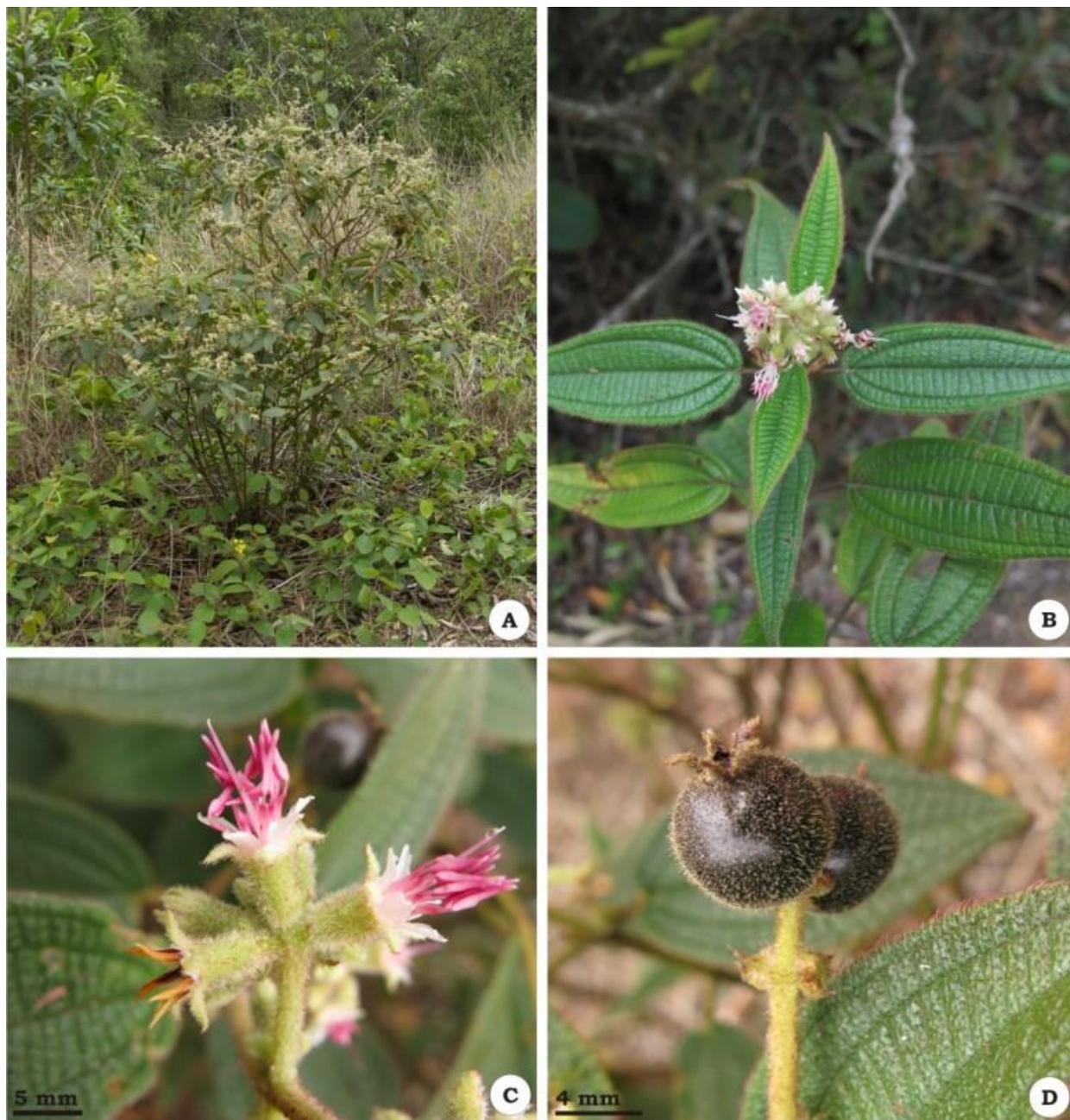
# **ILUSTRAÇÕES**





**Figura 4.** Aspectos morfológicos dos ramos reprodutivos de *Clidemia hirta*. **A.** Visão geral de alguns ramos; **B-D.** Detalhes dos botões e flores; **E.** Detalhe de um ramo com botões e frutos jovens.





**Figura 5.** Aspectos morfológicos de *Leandra aurea*. **A.** Indivíduo em fase reprodutiva; **B.** Ramo com botões e flores; **C.** Detalhe das flores; **D.** Detalhe dos frutos maduros.





**Figura 6.** Aspectos morfológicos dos ramos reprodutivos de *Leandra melastomoides*. **A.** Ramo com botões florais; **B.** e **C.** Detalhe de parte da inflorescência com botões e flores; **D.** Fruto maduro.





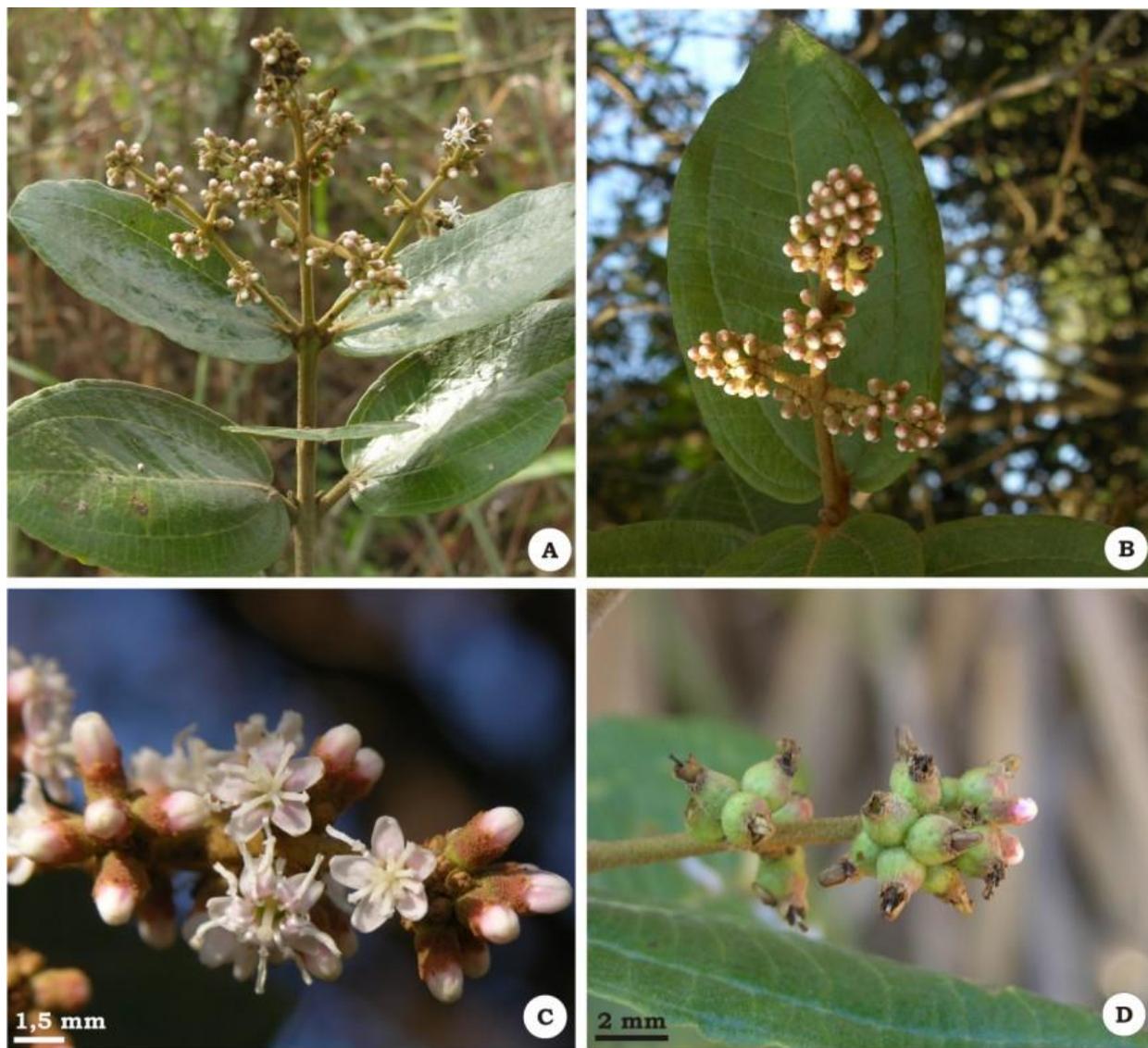
**Figura 7.** Aspectos morfológicos de *Ossaea amygdaloides*. **A.** Indivíduo em fase reprodutiva; **B.** Detalhe de um ramo; **C.** Detalhe da flor e fruto em início de desenvolvimento; **D.** Frutos em diferentes estádios de desenvolvimento.





**Figura 8.** Aspectos morfológicos dos ramos reprodutivos de *Ossaea confertiflora*. **A.** Ramo com botões florais e frutos; **B-E.** Detalhe da flor; **F.** Frutos em início de desenvolvimento e fruto maduro (púrpura nigrescente).





**Figura 9.** Aspectos morfológicos dos ramos reprodutivos de *Miconia leucocarpa*. **A.** Ramo com botões florais e flores; **B.** Inflorescência com botões; **C.** Detalhe de parte da inflorescência com botões e flores; **D.** Frutos em início de desenvolvimento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeda, F. & Chuang, T.I. 1992. Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. *Systematic Botany* 17(4): 583-593.
- Amorim, A.M., Goldenberg, R. & Michelangeli, F.A. 2009. A new species of *Physeterostemon* (Melastomataceae) from Bahia, Brazil, with notes on the phylogeny of the genus. *Systematic Botany* 34(2): 324-329.
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2): 105-121.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Baumgratz, F.A., Souza M.L.D.R., Woodgyer, E.M. & Lughadha, E.M. 1995. Polysporangiate anthers: described for the first time in Melastomataceae. *Kew Bulletin* 51(1): 133-144.
- Baumgratz, J.F.A., Rodrigues, K.F., Chiavegatto, B., Goldenberg, R., Kriebel, R., Martins, A.B., Reginato, M., Romero, R., Souza, M.L.D.R., Woodgyer, E., Caddah, M.K., Koschnitzke, C., Lima, L.F.G., Rosa, P., Rocha, M.J.R., Guimarães, P.J.F. & Michelangeli, F.A. Melastomataceae. *In* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB161>>. Acesso em: 17 Out. 2014
- Bicknell, R.A. & Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* 16: S228-S245.
- Borges, H.B.N. 1991. Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Brito, V.L.G. & Sazima, M. 2012. *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae): reproductive biology of a tree species at two sites of an elevational gradient in the Atlantic rainforest in Brazil. *Plant systematics and Evolution* 298(7): 1271-1279.

- Caetano, A.P.S. 2010. Apomixia e reprodução sexuada em espécies de *Miconia* Ruiz & Pavón, Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Caetano A.P.S., Simão, D.G., Carmo-Oliveira, R. & Oliveira, P.E. 2013a. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. *Plant Systematics and Evolution* 299(7):1253–1262.
- Caetano, A.P.S., Teixeira, S.P., Forni-Martins, E.R. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2013b. Pollen insights into apomictic and sexual *Miconia* (Miconieae, Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences* 174(5):760–768.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperm may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61(1): 51-94.
- Carman, J.G. 2007. Do duplicate genes cause apomixis? *In* Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives (Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J., Sharbel, T., eds). ARG-Gantner, Ruggell. Pp. 169–194.
- Carvalho, A., Delgado, M., Barão, A., Frescatada, M., Ribeiro, E., Pikaard, C.S., Viegas, W. & Neves, N. 2010. Chromosome and DNA methylation dynamics during meiosis in the autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Sexual Plant Reproduction* 23(1): 29-37.
- Chen, Z.J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15(2): 57-71.
- Chen, M., Ha, M., Lackey, E., Wang, J. & Chen, Z.J. 2008. RNAi of met1 reduces DNA methylation and induces genome-specific changes in gene expression and centromeric small RNA accumulation in *Arabidopsis* allopolyploids. *Genetics* 178(4): 1845-1858.
- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany* 88(3): 486-498.

- Conti, E., Litt, A. & Sytsma, K.J. 1996. Circumscription of Myrtales and their relationships to other rosids: evidence from rbcL sequence data. *American Journal of Botany*, 83(2):221-233.
- Conti, E., Litt, A., Wilson, P.G., Graham, S.A., Briggs, B.G. Johnson, L.A.S. & Sytsma, K.J. 1997. Interfamilial relationships in Myrtales: Molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany* 22(4): 629-647.
- Cortez, P.A. 2007. Embriologia de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), espécie agamospérmica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Cortez, P.A. & Carmelo-Guerreiro, S.M. 2008. Ontogeny and structure of the pericarp and the seed coat of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) from “cerrado”, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 31(1): 71-79.
- Cortez, P.A., Carmello-Guerreiro, S.M. & Teixeira, S.P. 2012. Understanding male sterility in *Miconia* species (Melastomataceae) – a morphological approach. *Australian Journal of Botany* 60(6): 506-516.
- Cortez, P.A., Caetano, A.P.S., Carmello-Guerreiro, S.M. & Teixeira, S.P. 2014. Anther wall and pollen development in neotropical species-rich *Miconia* (Melastomataceae). *Plant Systematics and Evolution*, *online*.
- Crane, C.F. 2001. Classification of apomictic mechanisms. *In* The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering (Savidan, Y., Carman, J.G. & Dresselhaus, T., eds). CIMMYT, IRD, European Commission D.G VI, Mexico, D.F. Pp. 24–43.
- Darlington, C.D. 1939. The evolution of genetic systems. UK, Cambridge University Press.
- Davis, G.L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. John Wiley, New York.
- Dent-Acosta, S.R. & Breckon, G.J. 1991. Reproductive biology of six species of Melastomataceae in western Puerto Rico. First International Melastomataceae Symposium, Smithsonian Institution, Washington D.C.

- Fernandes, W.P. 2011. Desenvolvimento da parede da antera e do grão de pólen em três espécies de Melastomataceae. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Fernandes, W.P. 2014. Ontogenia da antera em espécies da tribo Melastomeae (Melastomataceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Fracasso, C.M. & Sazima, M. 2004. Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) DC. (Melastomataceae): sucesso reprodutivo *versus* diversidade, comportamento e frequência de visitas de abelhas. *Revista Brasileira de Botânica* 27(4): 797-804.
- Fritsch, P.W.; Almeda, F.; Renner, S.S.; Martins, A.B. & Cruz, B.C. 2004. Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). *American Journal of Botany* 91(7): 1105-1114.
- Gaeta, R.T., Yoo, S.Y., Pires, J.C., Doerge, R.W., Chen, Z.J. & Osborn, T.C. 2009. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70mer oligo microarrays. *PLoS ONE* 4(3): e4760.
- Goldenberg, R. 1994. Estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae de Cerrado em Itirapina, SP. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211(1): 13-29.
- Goldenberg, R. & Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24(3): 283-288.
- Goldenberg, R., Penneys, D.S., Almeda, F., Judd, W.S. & Michelangeli, F.A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. *International Journal of Plant Sciences* 169 (7): 963-979.
- Goldenberg, R., Baumgratz, J.F.A & Souza, M.L.D.R. 2012a. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. *Rodriguésia* 63(1):145-161.

- Goldenberg, R., Fraga, C.N. de, Fontana, A.P. & Nicolas, A.N. 2012b. Taxonomy and phylogeny of *Merianthera* (Melastomataceae). *Taxon* 61(5):1040-1056.
- Herr, 1984. Embryology and taxonomy. *In* Embryology of Angiosperms (Johri, B.M., ed.). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 647-796.
- Hojsgaard, D., Klatt, S., Baier, R., Carman, J.G. & Hörandl, E. 2014. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 414-427.
- Hörandl, E. & Hojsgaard, D. 2012. The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems* 146(3): 681-693.
- Johri, B.M. 1984. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. Comparative embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5(10): 1425-1437.
- Koltunow, A.M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574.
- Lima, J.F. 2013. Padrões de desenvolvimento da antera em espécies de Microlicieae (Melastomataceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Martin, C.V., Little, D.P., Goldenberg, R. & Michelangeli, F.A. 2008. A phylogenetic evaluation of *Leandra* (Miconieae, Melastomataceae): a polyphyletic genus where the seeds tell the story, not the petals. *Cladistics* 24(3): 315-327.
- Medeiros, J.D. & Morretes, B.L. 1996. The embryology of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Cytologia* 61(1): 83-91.
- Medeiros, J.D. & Roos, A.L. 1996. Aspectos do microsporângio, da microsporogênese e do gametófito masculino de *Tibouchina cerastifolia* (Naud.) Cogn. (Melastomataceae). *Biotemas* 9(2): 5-14.
- Melo, G.F.A. & Machado, I.C.S. 1996. Biologia da reprodução de *Henriettea succosa* DC. (Melastomataceae). *Revista Brasileira de Biologia* 56(2): 383-389.

- Melo, G.F., Machado, I.C. & Luceño, M. 1999. Reproducción de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. *Revista de Biología Tropical* 47(3): 359-363.
- Michelangeli, F.A., Penneys, D.S., Giza, J., Soltis, D., Hils, M.H. & Skeeon, D.J.D. 2004. A preliminary phylogeny of the tribe Miconieae (Melastomataceae) based on *nrITS* sequence data and its implications on inflorescence position. *Taxon* 53(2): 279-290.
- Michelangeli, F.A., Nicolas, A.N., Morales-Puentes, M.E. & David, H. 2011. Phylogenetic relationships of *Allomaieta*, *Alloneuron*, *Cyphostyla*, and *Wurdastom* (Melastomataceae) and the resurrection of the tribe Cyphostyleae. *International Journal of Plant Sciences* 172(9): 1165-1178.
- Michelangeli, F.A., Guimarães, P.J.F., Penneys, D.S., Almeda, F. & Kriebel, R. 2013. Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171(1): 38-60.
- Montoro, G.R. & Santos, M.L. 2007. Fenologia e biologia reprodutiva de *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae) no Parque Estadual da Serra dos Pirineus, Goiás. *Revista de Biologia Neotropical* 4(1): 21-29.
- Nardi, K.O. 2011. Desenvolvimento do óvulo e da semente em *Miconia pseudonervosa* (Miconieae, Melastomataceae). Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Naumova, T.N. 2008. Apomixis and amphimixis in flowering plants. *Cytology and Genetics* 42(3): 179-188.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. In *Embryology of angiosperms* (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 475-518.
- Penneys, D.S. & Judd, W.S. 2011. Phylogenetics and morphology in the Blakeeae (Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences* 172(1): 78-106.
- Penneys, D.S., Michelangeli, F.A., Judd, W.S. & Almeda, F. 2010. Henrietteae (Melastomataceae): A new neotropical berry-fruited tribe. *Systematic Botany* 35(4): 783-800.
- Ramirez, N. & Brito, Y. 1990. Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *American Journal of Botany* 77: 1260-1271.

- Renner, S.S. 1984. Pollination and breeding systems in some central Amazonian Melastomataceae. *Les Colloques de INRA* 21: 275-280.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76(2): 496-518.
- Renner, S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany* 13(5):519-540.
- Ribeiro, R.C. 2012. Morfoanatomia de sementes de Microlicieae Triana (Melastomataceae): abordagem cladística e ecofisiológica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.
- Richards, A.J. 1990. Studies in *Garcinia*: tropical dioecious fruit trees: agamospermy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 103(3): 233-250.
- Richards, A.J. 1997. Plant breeding systems. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Romero, R. & Martins, A.B. 2002. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25(1): 19-24.
- Santos, A.P.M., Romero, R. & Oliveira, P.E. 2010. Biologia reprodutiva de *Miconia angelana* (Melastomataceae), endêmica da Serra da Canastra, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica* 33(2): 333-341.
- Santos, A.P.M., Fracasso, C.M., Santos, M.L., Romero, R., Sazima, M. & Oliveira, P.E. 2012. Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. *Annals of Botany* 110(3): 667-679.
- Santos, M.L. 2003. Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque Estadual dos Pirineus, Goiás. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília.
- Saraiva, L.C., Cesar, O. & Monteiro, R. 1996. Breeding systems of shrubs and trees of a Brazilian Savanna. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 39: 751-763.
- Savidan, Y. 2007. Apomixis in higher plants. *In Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives* (Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J., Sharbel, T., eds). ARG-Gantner, Ruggell. Pp 15–22.

- Schönenger, J. & Conti, E. 2003. Molecular phylogeny and floral evolution of Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae and Alzateaceae (Myrtales). *American Journal of Botany* 90(2): 293-309.
- Sobrevila, C. & Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution* 140(1): 19-37.
- Sousa-Silva, S.C.S. 2000. Biologia reprodutiva e polinização em Melastomataceae no Parque do Sabiá, Uberlândia, MG. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília.
- Stone, R.D. 2005. Phylogeny of major lineages in Melastomataceae, subfamily Oliboideae: utility of nuclear glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GapC) gene sequences. *Systematic Botany* 31: 107-121.
- Subramanyam, K. 1942. Gametogenesis and embryogeny in a few members of Melastomataceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 21: 69-85.
- Subramanyam, K. 1944. A contribution to the life-history of *Sonerila wallachii* Benn. *Proceedings of the Indian Academy Of Sciences* 19: 115-120.
- Subramanyam, K. 1948. An embryological study of *Melastoma malabathricum* L. *Journal of the Indian Botanical Society* 27: 11-19.
- Subramanyam, K. 1951. Embryology of *Oxyspora paniculata*. *Phytomorphology* 1:205-212.
- Talent, N. 2009. Evolution of gametophytic apomixis in flowering plants: an alternative model from Maloid Rosaceae. *Theory in Biosciences* 128(2): 121-138.
- Tobe, H. 1989. The embryology of angiosperms: its broad application to the systematic and evolution study. *The Botanical Magazine* 102(2):351-367.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1983. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70(1):71-94.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984. The number of cells in the pollen of Melastomataceae. *Botanical Gazette* 97(1):131-136.
- Tucker, M.R. & Koltunow, A.M.G. 2009. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biology* 36(6):490-504.

- Venkatesh, C. 1955. The structure and dehiscence of the anther in *Memecylon* and *Mouriria*. *Phytomorphology* 5:435-440.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J. & Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169(1): 169-182.
- Winkler, H. 1908. Über parthenogenesis und apogamie im pflanzenreiche. *Prog. Rei. Bot.* 2: 293-454.



**CAPÍTULO 1. INVIABILIDADE POLÍNICA EM ESPÉCIES APOMÍTICAS DE MICONIEAE,  
MELASTOMATACEAE: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS.**

**RESUMO**

A tribo Miconieae, Melastomataceae, destaca-se pela elevada proporção de espécies apomíticas com baixos níveis de viabilidade polínica. O presente trabalho objetiva investigar as causas da baixa viabilidade polínica e verificar a produção de grãos de pólen viáveis em seis representantes apomíticos de Miconieae: *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* e *O. confertiflora*, por meio de estudos de desenvolvimento e viabilidade do pólen. As análises indicam que há formação de uma pequena porcentagem de grãos viáveis em *C. hirta*, *L. aurea* e *O. confertiflora*. Em *L. melastomoides*, *M. leucocarpa* e *O. amygdaloides* todos os grãos formados são inviáveis. Anormalidades durante a meiose são observadas em todas as espécies investigadas. A presença de micrósporos e de grãos de pólen imaturos em anteras maduras decorre do atraso no processo de microgametogênese e ambos os processos contribuem para a alta ou total inviabilidade polínica observada. O estudo indica que as espécies avaliadas se reproduzem majoritariamente por apomixia, uma vez que a formação de grãos de pólen viáveis é severamente comprometida.



## **ABSTRACT**

Miconieae, Melastomataceae, is a tribe with a high proportion of apomictic species with low pollen viability levels. This work aims to verify the development of viable pollen grains and to investigate the causes of low pollen viability in six apomictic species of Miconieae, *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *O. amygdaloides* and *O. confertiflora*, using developmental studies and pollen viability and germination tests. The data indicate a low production of viable pollen grains in *C. hirta*, *L. aurea* and *O. confertiflora*. In *L. melastomoides*, *M. leucocarpa* and *O. amygdaloides*, only sterile pollen grains are produced. All species presented abnormalities during meiosis. The heterochrony observed by the occurrence of immature microspores and pollen grains in mature anthers is a consequence of delay on the microgametogenesis process. Both processes contribute to the high level or total sterility in pollen grains observed in the species. The study indicates that the apomixis is the primary reproduction form in analysed species, since formation of viable pollen grains is severely affected.



## INTRODUÇÃO

A apomixia pode ser brevemente descrita como reprodução assexuada por meio de sementes (Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003, Savidan 2007). Neste processo o embrião se desenvolve por partenogênese de uma oosfera não reduzida ou a partir de uma célula somática do nucelo ou do tegumento do óvulo (Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003).

De acordo com a necessidade ou não de polinização, as espécies apomíticas são classificadas em pseudogâmicas ou autônomas (Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003). Nas espécies pseudogâmicas, a polinização é necessária seja para desencadear o desenvolvimento partenogenético da oosfera, seja para a fecundação da célula média e formação do endosperma, assegurando a produção de sementes viáveis, mesmo que o embrião se desenvolva independentemente (Asker & Jerling 1992). Nestes casos, a necessidade de polinização seleciona a manutenção de alguma viabilidade polínica (Whitton *et al.* 2008). Por outro lado, nos ditos apomíticos autônomos, nos quais não há necessidade de polinização para o desenvolvimento das sementes (Asker & Jerling 1992), a produção de pólen viável tende a ser menor e, em alguns casos, essas plantas podem não produzir grãos de pólen (Asker & Jerling 1992, Meirmans *et al.* 2006, Thompson & Whitton *et al.* 2006, Thompson *et al.* 2008, Whitton *et al.* 2008). Desta forma, diferentes tipos de apomixia podem estar associados a diferentes probabilidades de formação de uma progênie sexual, diferentes pressões seletivas para manter a fertilidade masculina e, conseqüentemente, diferentes níveis de variabilidade genética nas populações (Whitton *et al.* 2008).

Miconieae DC. (Melastomataceae Juss.), tem se destacado por apresentar uma elevada proporção de espécies apomíticas (Renner 1989, Goldenberg & Shepherd 1998,

Goldenberg & Varassin 2001, Santos *et al.* 2012), embora não seja citada em trabalhos tradicionais de revisão sobre apomixia (ver Koltunow 1993, Carmam 1997, Koltunow & Grossniklaus 2003, entre outros). Nesta tribo, quase 70% das espécies estudadas até o momento são apomíticas autônomas (Sobrevila & Arroyo 1982, Renner 1989, Ramirez & Brito 1990, Borges 1991, Dent-Acosta & Breckon 1991, Almeda & Chuang 1992, Saraiva *et al.* 1996, Goldenberg & Shepherd 1998, Melo *et al.* 1999, Goldenberg & Varassin 2001, Santos *et al.* 2012) e, se os dados existentes forem de fato representativos, seria um dos maiores complexos apomíticos nas angiospermas (Goldenberg & Shepherd 1998).

As espécies apomíticas de Miconieae geralmente apresentam menores níveis de viabilidade polínica quando comparadas às espécies sexuadas da tribo (Goldenberg & Shepherd 1998, Goldenberg & Varassin 2001, Cortez *et al.* 2012, Caetano *et al.* 2013a, b). Nesta tribo, a baixa viabilidade polínica parece ocorrer devido a irregularidades no processo de divisão meiótica, provavelmente relacionadas a eventos de hibridação e poliploidia (Goldenberg & Shepherd 1998, Melo *et al.* 1999, Cortez *et al.* 2012, Caetano *et al.* 2013b).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou investigar as causas da baixa viabilidade polínica e verificar se há produção de pólen viável em seis espécies apomíticas de Miconieae, por meio de estudos de desenvolvimento e viabilidade dos grãos de pólen.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Espécies investigadas e locais de coleta**

Foram utilizadas seis espécies da tribo Miconieae, previamente definidas como apomíticas a partir de estudos de biologia reprodutiva (Melo *et al.* 1999, Goldenberg &

Shepherd 1998, Goldenberg & Varassin 2001). As espécies analisadas pertencem a três grupos diferentes de Miconieae (Goldenberg *et al.* 2008): grado *Clidemia*: *Clidemia hirta* D.Don; clado *Leandra* s.s.: *Leandra aurea* Cogn., *L. melastomoides* Radd, *Ossaea amygdaloides* (DC.) Triana e *O. confertiflora* (DC.) Triana; e clado *Miconia* IV + *Ossaea*: *Miconia leuocarpa* DC.

As coletas foram realizadas entre 2010 e 2014 em diferentes localidades no Estado de São Paulo, Brasil. *C. hirta* foi coletada em uma região de mata de encosta no município de Ubatuba; *L. melastomoides*, *O. amygdaloides* e *O. confertiflora* foram coletadas em floresta mesófila semidecidual na serra do Japi, município de Jundiaí; e *L. aurea* e *M. leuocarpa* foram coletadas respectivamente em áreas de cerrado campo sujo e cerrado *sensu stricto* no município de Itirapina.

O material testemunho foi depositado no Herbário UEC da Universidade Estadual de Campinas, sob os números: 178719, 178722 e 178723 (*C. hirta*), 178709 (*L. aurea*), A.P.S. Caetano *et al.* 3 (*L. melastomoides*), 178732 (*M. leuocarpa*), 178736 (*O. amygdaloides*) e 178730 (*O. confertiflora*).

### **Desenvolvimento do grão de pólen**

Botões florais em diversos estádios de desenvolvimento e flores foram coletados de pelo menos três indivíduos de cada espécie. A fixação foi realizada em solução de glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8 (modificado de McDowell & Trump 1976) por 24h. Fissuras com lâmina de barbear foram feitas nos botões florais e flores antes da fixação, para melhor penetração da solução fixadora. Durante a fixação, o material foi mantido sob vácuo por aproximadamente 1h. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8, desidratadas em série etanólica e estocadas em etanol a 70% (v/v).

O material foi incluído em resina Leica. Cortes transversais e longitudinais entre 1,0 e 3,0 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Leica com navalha descartável de tungstênio, aderidos a lâminas de vidro e, posteriormente, corados com azul de toluidina (C.I. 52040) a 0,05% em tampão fosfato, pH 6,8. As lâminas foram montadas no momento da observação com água destilada ou óleo de imersão e lamínula de vidro. As observações e fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica DM 4500 com câmera digital acoplada Leica DFC 295.

Algumas lâminas foram tratadas com azul de anilina (C.I. 42755) a 0,05% em tampão fosfato de potássio a 0,06M e pH 8,0. Esse material foi observado e fotografado em microscópio de luz Leica DM 4500 com câmera digital acoplada Leica DFC 295, utilizando-se filtro de luz ultravioleta para verificar a deposição de calose durante o desenvolvimento dos micrósoros (Eschrich & Currier 1964).

### **Viabilidade e germinação polínica**

Flores no início da antese, provenientes de diferentes ramos de cada indivíduo analisado, foram empregadas nos testes de viabilidade polínica com DAB e germinação *in vitro*. Metade das anteras de cada flor foi utilizada em cada um dos dois testes empregados. O número de indivíduos e de flores avaliados em cada espécie consta na tabela 1.

O teste para viabilidade polínica foi realizado com pastilhas de DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma Fast™), que detecta a presença de peroxidases no citoplasma da célula (Dafni *et al.* 2005). Para isso, as anteras provenientes de cada flor foram utilizadas na confecção de uma lâmina. Os 100 primeiros grãos de pólen de cada lâmina foram contabilizados e classificados como viáveis, quando apresentaram coloração marrom, ou inviáveis, quando não apresentaram esta coloração (Dafni *et al.* 2005).

A viabilidade polínica (VP) foi apresentada em porcentagem, segundo a seguinte fórmula:

$$VP = \frac{\text{número de grãos de pólen corados} \cdot 100}{\text{número de grãos de pólen analisados}}$$

No teste de germinação *in vitro*, *Leandra regnellii* (Triana) Cogn., uma espécie com sistema reprodutivo sexuado e alta proporção de grãos de pólen viáveis (Goldenberg & Varassin 2001), foi utilizada como controle para testar o sucesso do protocolo empregado (Santos & Mariath 1997). O meio de germinação utilizado foi composto por 20% de sacarose, 2% de gelatina incolor, 0,01% de ácido bórico e 0,05% de nitrato de cálcio. Os grãos de pólen foram retirados das anteras com auxílio de estilete, colocados no meio de germinação e incubados no escuro em lâminas escavadas em temperatura ambiente por até quatro horas. Posteriormente, os grãos de pólen foram examinados em microscópio de luz para verificar a emissão de tubo polínico.

**Tabela 1.** Número de indivíduos amostrados, número de flores utilizadas por indivíduo e número total de flores utilizadas nas análises de viabilidade polínica com DAB e germinação de grãos de pólen nas espécies estudadas de Miconieae.

<b>Espécies investigadas</b>	<b>Nº de indivíduos</b>	<b>Nº de flores por indivíduo</b>	<b>Nº total de flores utilizadas</b>
<i>Clidemia hirta</i>	7	5	35
<i>Leandra aurea</i>	3	10	30
<i>Leandra melastomoides</i>	5	5	25
<i>Miconia leucocarpa</i>	5	5	25
<i>Ossaea amygdaloides</i>	5	5	25
<i>Ossaea confertiflora</i>	5	5	25

Para averiguar a germinação de grãos de pólen no estigma e o crescimento dos tubos polínicos ao longo do estilete, pistilos provenientes de flores senescentes do

material já fixado foram clarificados em solução de NaOH 9N e corados em azul de anilina (Martin 1959). O material foi observado e fotografado em microscópio Leica DM 4500 com câmera digital acoplada Leica DFC 295 e filtro de luz ultravioleta.

## **RESULTADOS**

Todas as espécies apresentaram resultados semelhantes quanto à anatomia da antera, microsporogênese e microgametogênese. Desta forma, os resultados são apresentados em conjunto para estas espécies e as diferenças foram ressaltadas ao longo do texto.

As espécies apresentam anteras bitecas e tetrasporangiadas (Figs. 1A-B e 2A-B). Os dois microsporângios de cada teca são separados por algumas camadas de células parenquimáticas, que formam o septo interesporangial (Figs. 2A-B). Este septo se rompe na antera madura, formando um único saco polínico em cada teca (Fig. 2B). Idioblastos com drusas foram observados ao longo do conectivo (Fig. 2C) e na parede da antera (Fig. 2D).

Em estames de botões jovens, a parede da antera é formada por epiderme, endotécio, camada média e tapete, todos uniestratificados (Figs. 3A-F). As paredes das células do endotécio não desenvolvem qualquer tipo de espessamento. O tapete é do tipo secretor, com células uninucleadas (Figs. 3C-F). A camada média e o tapete se degeneram após a meiose das células-mãe de micrósporos, restando apenas epiderme e endotécio na antera madura (Fig. 2D).

No interior da antera jovem, células esporogênicas (Figs. 4A-B) dividem-se e diferenciam-se em células-mãe de micrósporos (Figs. 4C-F), que apresentam citoplasma denso, núcleo proeminente e são maiores quando comparadas às células dos estratos

parietais (Figs. 3C-F). No início da meiose ocorre deposição de calose entre a membrana celular e a parede original das células-mãe de micrósporos (Figs. 4E-G).

Nas células-mãe de micrósporos em meiose foram identificadas as seguintes figuras meióticas: 1) prófase I, com espiralamento dos cromossomos (Figs. 4D e F); 2) metáfase I, com cromossomos alinhados no equador das células e presença das fibras do fuso (Fig. 5A); 3) anáfase I, com presença de cromossomos nos dois polos da célula (Fig. 5B); 4) metáfase II, com dois conjuntos de cromossomos alinhados no equador da célula e presença de fibras do fuso (Fig. 5C); 5) anáfase II, com migração dos quatro conjuntos de cromossomos para os polos das células (Fig. 5D); 7); telófase II, com os quatro núcleos reestruturados, indicando também o final da cariocinese (Fig. 5E). A citocinese é simultânea (Figs. 5A-G), formando tétrades tetraédricas de micrósporos (Figs. 5F-G).

Todas as espécies apresentaram anormalidades durante a meiose, que incluem: migração precoce dos cromossomos na metáfase I e II (Figs. 5H-J), cromossomos retardatários na anáfase I (Figs. 5K-L), presença de micronúcleo durante a metáfase II (Fig. 5M). Além disto, ao final da meiose, pode ocorrer a formação de mais de quatro micrósporos, geralmente de tamanhos diferentes (Figs. 5N-P). Observou-se também a presença de micronúcleos em micrósporos (Fig. 5Q).

Após a degradação da calose os micrósporos são liberados (Figs. 6A-D), sendo caracterizados pela presença de citoplasma denso e núcleo central proeminente (Figs. 6B-C). Micrósporos de diferentes tamanhos foram frequentemente observados (Fig. 6D).

Das espécies investigadas, a microgametogênese se completa apenas em *Clidemia hirta*, *Leandra aurea* e *Ossaea confertiflora* (Figs. 6E-P), entretanto, são produzidos poucos grãos de pólen ao final deste processo, quando comparados à grande quantidade de micrósporos sem conteúdo citoplasmático que são formados. O processo

inicia-se com a vacuolização dos micrósporos livres e deslocamento de seu núcleo para a periferia da célula (Figs. 6E, I, M), acarretando uma mitose assimétrica. O produto desta mitose é o grão de pólen bicelular, formado pelas células vegetativa e generativa (Figs. 6F, J, N). No início da gametogênese, a célula generativa ocupa posição periférica no grão (Figs. 6F, J, N). Posteriormente, a célula generativa projeta-se para dentro do citoplasma da célula vegetativa (Figs. 6G, K, O). Nos estádios finais, a célula generativa, anteriormente esférica, adquire formato fusiforme (Figs. 6H, L, P). Estes grãos são dispersos em mônades, no estágio bicelular (Figs. 6H, L, P).

Em todas as espécies, a maioria dos micrósporos passa pelo processo de vacuolização e migração do núcleo para a periferia da célula (Figs. 6E, I, M e 7A- B). Entretanto, a partir deste estágio ocorre degeneração do citoplasma em grande parte dos micrósporos (Figs. 7C-D), levando à formação de micrósporos com deposição de exina e intina, mas sem nenhum ou com pouco conteúdo citoplasmático, os quais são observados em anteras maduras (Figs. 7E-J). Em anteras provenientes de flores ou botões em pré-antese, foram observados micrósporos e grãos de pólen imaturos (Figs. 7J-N).

A viabilidade polínica de *Leandra melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea confertiflora* e *O. amygdaloides* foi nula. A média de grãos de pólen viáveis foi de 13,62% ( $\pm 8,7$ ) em *L. aurea* e 5,69% ( $\pm 7,1$ ) em *Clidemia hirta*.

Nos experimentos de germinação polínica *in vitro* não foram observados tubos polínicos em *C. hirta*, *Leandra melastomoides*, *M. leucocarpa*, *O. amygdaloides* e *O. confertiflora*; em *L. aurea* foi observada a emissão de tubos (Fig. 8A) em 1,5% de um total de 5349 grãos analisados. Na espécie sexuada *Leandra regnellii*, utilizada como controle, houve germinação de grande parte dos grãos (Fig. 8B), demonstrando que a técnica utilizada era apropriada para o material em questão.

Em *Clidemia hirta* e *Ossaea confertiflora* observou-se a germinação de grãos de pólen no estigma e crescimento de tubo polínico no estilete em uma pequena parte das amostras de flores senescentes (Fig. 9; Tabela 2). Em nenhum dos pistilos analisados os tubos polínicos alcançaram o ovário.

**Tabela 2.** Porcentagem de tubos polínicos observados em estiletos das espécies estudadas de Miconieae.

<b>Espécies</b>	<b>Nºde indivíduos</b>	<b>Total de estiletos</b>	<b>Estiletos com tubos polínicos (%)</b>
<i>Clidemia hirta</i>	8	37	16,22%
<i>Leandra aurea</i>	3	37	0
<i>Leandra melastomoides</i>	6	26	0
<i>Miconia leucocarpa</i>	6	90	0
<i>Ossaea amygdaloides</i>	6	50	0
<i>Ossaea confertiflora</i>	6	39	2,56%

## DISCUSSÃO

As anormalidades meióticas são as principais responsáveis pela alta ou completa inviabilidade polínica em *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* e *O. confertiflora*. Embora *C. hirta*, *L. aurea* e *O. confertiflora* produzam uma pequena quantidade de grãos de pólen morfológicamente normais, a viabilidade polínica foi nula ou muito baixa e a germinação dos grãos foi um evento relativamente raro (*in situ* ou *in vitro*), demonstrando que a formação de gametófitos viáveis é severamente comprometida e ocorre apenas eventualmente nestas populações. *L. melastomoides*, *M. leucocarpa* e *O. amygdaloides* são completamente estéreis.

A inviabilidade polínica causada por anormalidades meióticas é um evento recorrente em representantes da tribo Miconieae. Em *Clidemia bullosa*, *C. capitellata* (Melo *et al.* 1999), *Miconia stenostachya* (Goldenberg & Shepherd 1998, Cortez *et al.* 2012) e *M. fallax* (Caetano *et al.* 2013b) são reportadas irregularidades durante a segregação cromossômica - cromossomos retardatários e migração precoce de cromossomos, além de tétrades com micronúcleos, que também indicam problemas durante a meiose. A relação entre irregularidades meióticas e inviabilidade polínica já foi também observada em diversos outros grupos de plantas, como em linhagens de milho, espécies de *Paspalum* e *Brachiaria* (Poaceae), *Brassica napus* (Brassicaceae), *Crotalaria* (Euphorbiaceae), *Eupatorium* e *Taraxacum* (Asteraceae), entre muitos outros (Nijs & Menken 1996, Pagliarini 2000, Bertasso-Borges & Coleman 2005, Ferreira *et al.* 2009, Risso-Pascoto *et al.* 2006).

A divisão meiótica é caracterizada pela ocorrência de vários eventos mecânicos e químicos de alta complexidade, que culminam na redução do número cromossômico (Pagliarini 2000). Cada etapa desta divisão é controlada geneticamente (Baker *et al.* 1976) e a interrupção na sequência normal dos eventos meióticos resulta em produtos anormais, impedindo a formação de gametas e prejudicando a fertilidade da planta (Baker *et al.* 1976, Pagliarini 2000).

Irregularidades meióticas são muito comuns em poliplóides (Stebbins 1950, Soltis & Soltis 2000, Soltis *et al.* 2009, Pagliarini 2000) e a apomixia está quase sempre associada à poliploidia, particularmente à alopoliplóides, originados após eventos de hibridação (Carmam 1997, 2007, Savidam 2007). Embora não haja registros do número cromossômico para nenhuma das espécies analisadas neste estudo, a relação entre anormalidades meióticas, baixa viabilidade polínica, poliploidia e apomixia é apontada em Miconieae (Goldenberg & Shepherd 1998, Goldenberg & Varassin 2001, Caetano *et*

*al.* 2013b). Na tribo, o número cromossômico básico é  $x=17$  (Solt & Wurdack 1980, Almeda & Chuang 1992, Almeda 1997, 2003), mas eventos de poliploidização já foram reportados (Solt & Wurdack 1980, Almeda 1997, Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano *et al.* 2013). Ainda assim reforçamos a necessidade de estudos citogenéticos para detectar eventos de hibridação e poliploidia e esclarecer sua associação com apomixia em Miconieae.

As espécies apomíticas da tribo produzem quase sempre muito menos grãos de pólen viáveis que seus parentes sexuados (Goldenberg & Shepherd 1998, Caetano *et al.* 2013a,b). De fato, os apomíticos autônomos, como os estudados em Melastomataceae, tendem a produzir uma menor quantidade de pólen viável, ocorrendo em muitos casos, esterilidade masculina (Asker & Jerling 1992, Meirmans *et al.* 2006, Thompson *et al.* 2008). A diminuição da qualidade do pólen pode ser uma consequência da evolução da assexualidade nestes grupos. Considerando que a polinização não é necessária para o desenvolvimento da semente nos apomíticos autônomos, a produção de grãos de pólen viáveis não é imprescindível para assegurar o sucesso reprodutivo destas espécies, existindo assim, uma menor pressão seletiva para manutenção desta função (Mogie 2011).

A esterilidade masculina completa observada em *Leandra melastomoides*, *Miconia leucocarpa* e *Ossaea amygdaloides* permite caracterizá-las como apomíticas obrigatórias. Como nas populações estudadas destas espécies não há produção de grãos de pólen viáveis e foi detectada apomixia do tipo gametofítica diplospórica (ver Cap. 2), é praticamente descartada a possibilidade de desenvolvimento de embriões sexuados nestas espécies, caso o padrão observado se mantenha em diferentes populações. Em *Clidemia hirta*, *L. aurea* e *O. confertiflora*, embora ocorra a formação de uma pequena quantidade de grãos de pólen, também verificou-se a ocorrência de apomixia do tipo

gametofítica diplospórica (ver Cap. 2), sendo, portanto, pouco possível a ocorrência de fecundação e formação de um zigoto. Assim, a probabilidade da reprodução sexuada ocorrer nas espécies apomíticas de *Miconieae* analisadas é muito baixa. Este resultado mostra-se de grande relevância, já que a literatura é incerta quanto à existência de apomíticos obrigatórios na natureza (Mogie 1992, Savidam 2007), que parecem ser frequentes no grupo aqui estudado.

Espécies de *Miconieae* são comuns em áreas perturbadas e, geralmente, desenvolvem densas populações nestes locais (Ellison *et al.* 1993, Baider *et al.* 1999). A apomixia acarreta benefícios para estas plantas, já que elas independem de ambientes estáveis e polinizadores para assegurar seu sucesso reprodutivo (Richards 1997). Adicionalmente, a inviabilidade polínica, que neste grupo está frequentemente associada à apomixia, também poderia trazer benefícios. Em apomíticas autônomas, a produção de grãos de pólen pode ser reduzida ou eliminada, evitando os custos associados à função masculina (Smith 1978, Charlesworth 1980, Mogie 2011). Um estudo recente com *Taraxacum officinale* (Asteraceae) indica que linhagens que não produzem grãos de pólen viáveis são capazes de realocar recursos para a produção de sementes (Meirmans *et al.* 2006), mas ainda é incerto se este processo pode ocorrer em outras espécies.

Outro aspecto que deve ser evidenciado é a presença de micrósporos e grãos de pólen imaturos em anteras maduras. Estas estruturas não são funcionais e, portanto, colaboram para a alta ou completa inviabilidade polínica observada nas espécies. Sabe-se que a apomixia é causada por uma desregulação, em tempo e espaço, nos processos de reprodução sexual (Koltunow & Grossniklaus 2003), causando padrões de expressão heterocrônica durante o desenvolvimento dos óvulos (Grimanelli *et al.* 2003, Bradley *et al.* 2007, Sharbel *et al.* 2010) e, eventualmente, durante a microsporogênese (Grimanelli *et al.* 2003). Neste caso, alterações de tempo durante o desenvolvimento dos grãos de

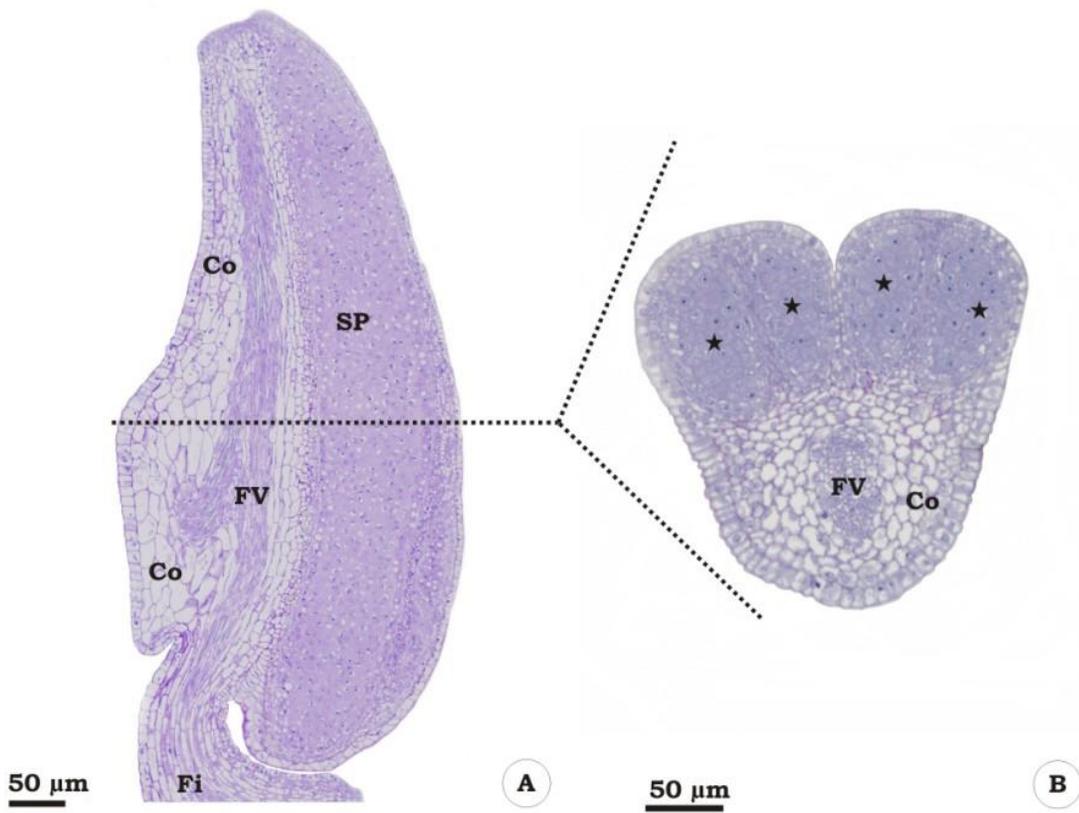
pólen, relacionadas à apomixia, poderiam explicar a presença destas estruturas polínicas juvenis em anteras maduras. Essa pode ser uma informação útil sobre os processos celulares de expressão heterocrônica durante o desenvolvimento de grãos de pólen em apomíticos, já que existem poucos dados neste sentido.

O presente estudo aponta para a presença de apomixia obrigatória em representantes da tribo Miconieae em Melastomataceae. Anormalidades meióticas associadas a problemas temporais durante a formação dos gametófitos são responsáveis pela completa ou alta inviabilidade polínica verificada nas espécies estudadas. Populações naturais de apomíticos obrigatórios são raramente relatadas na literatura e, neste contexto, o trabalho se mostra interessante ao apontar um grupo de espécies tropicais, pertencente a uma família representativa, e que se reproduz majoritariamente via apomixia.

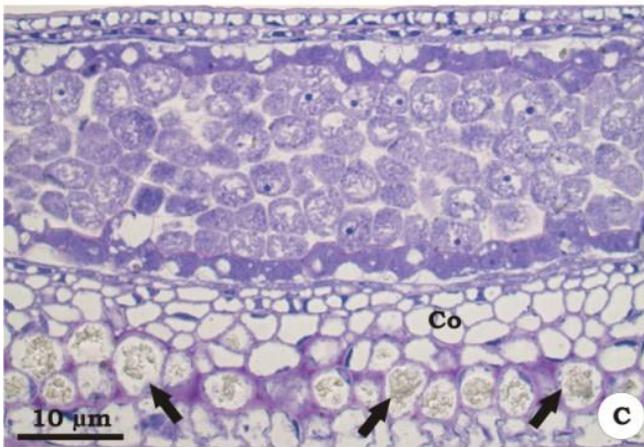
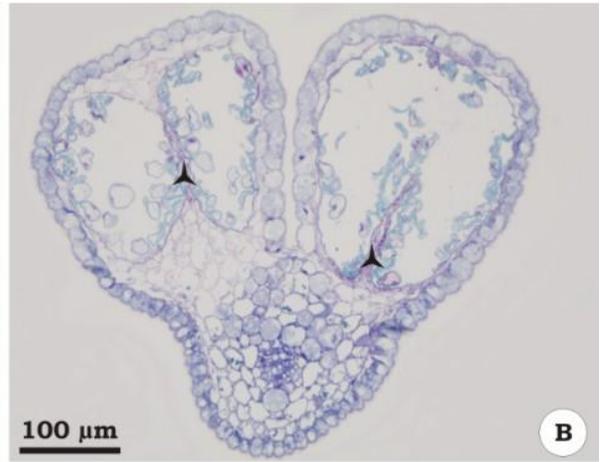


# **ILUSTRAÇÕES**

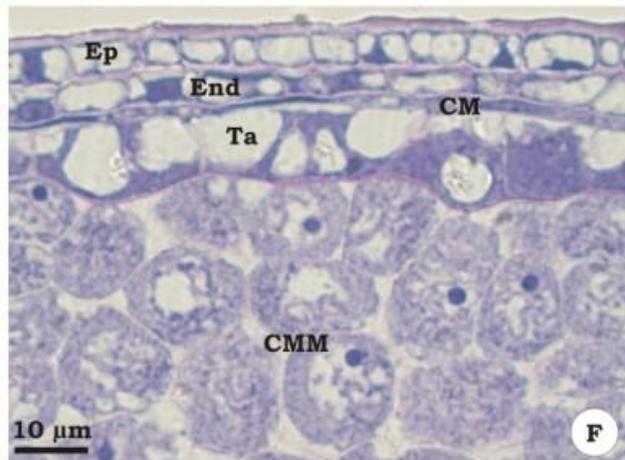
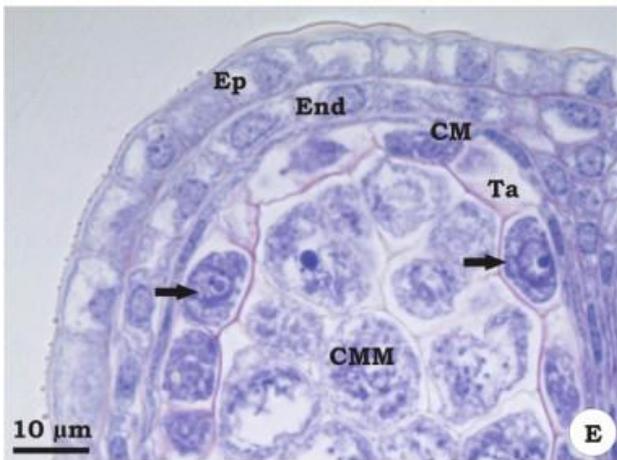
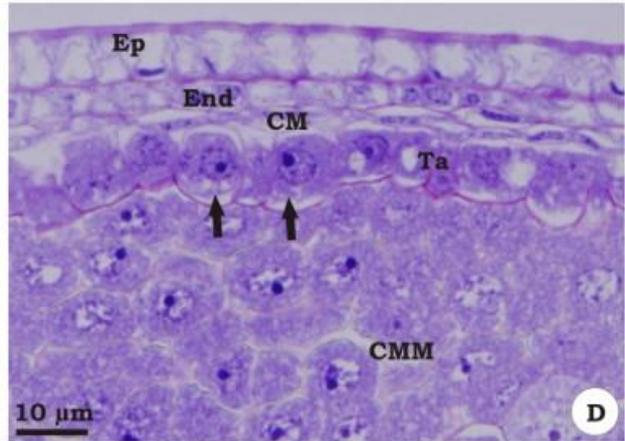
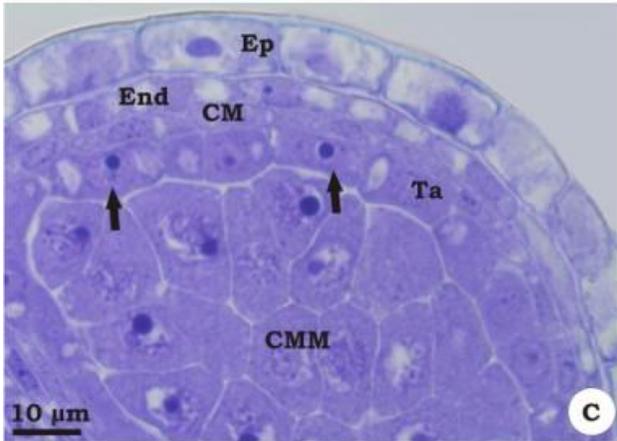
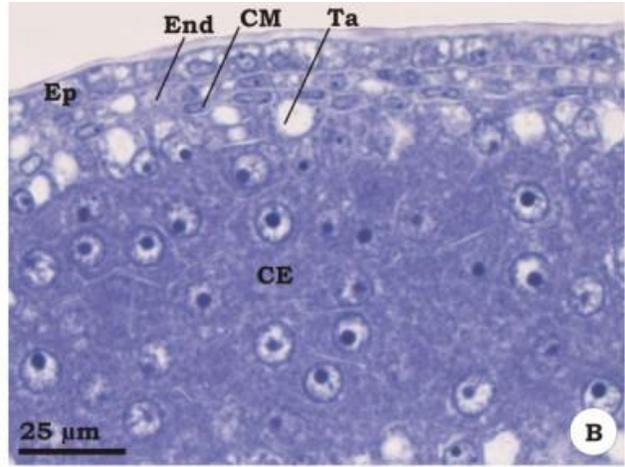
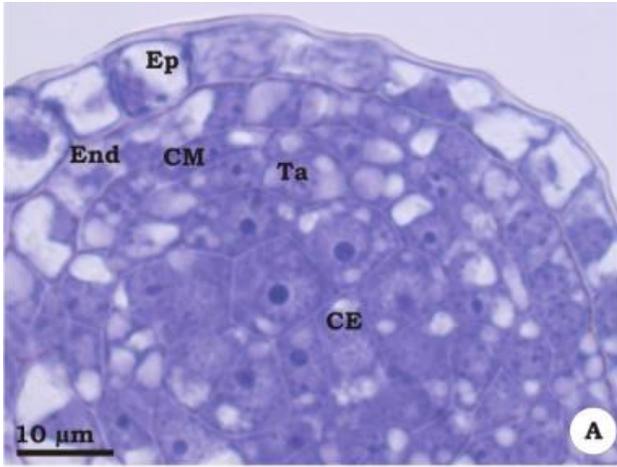
**Figura 1.** Anatomia da antera de *Ossaea confertiflora* **(A)** e *Leandra melastomoides* **(B)**. Cortes longitudinal **(A)** e transversal **(B)** da antera jovem evidenciam a estrutura geral da antera. Co: conectivo; Fi: filete; FV: feixe vascular; SP: saco polínico (representado em B. por estrelas)



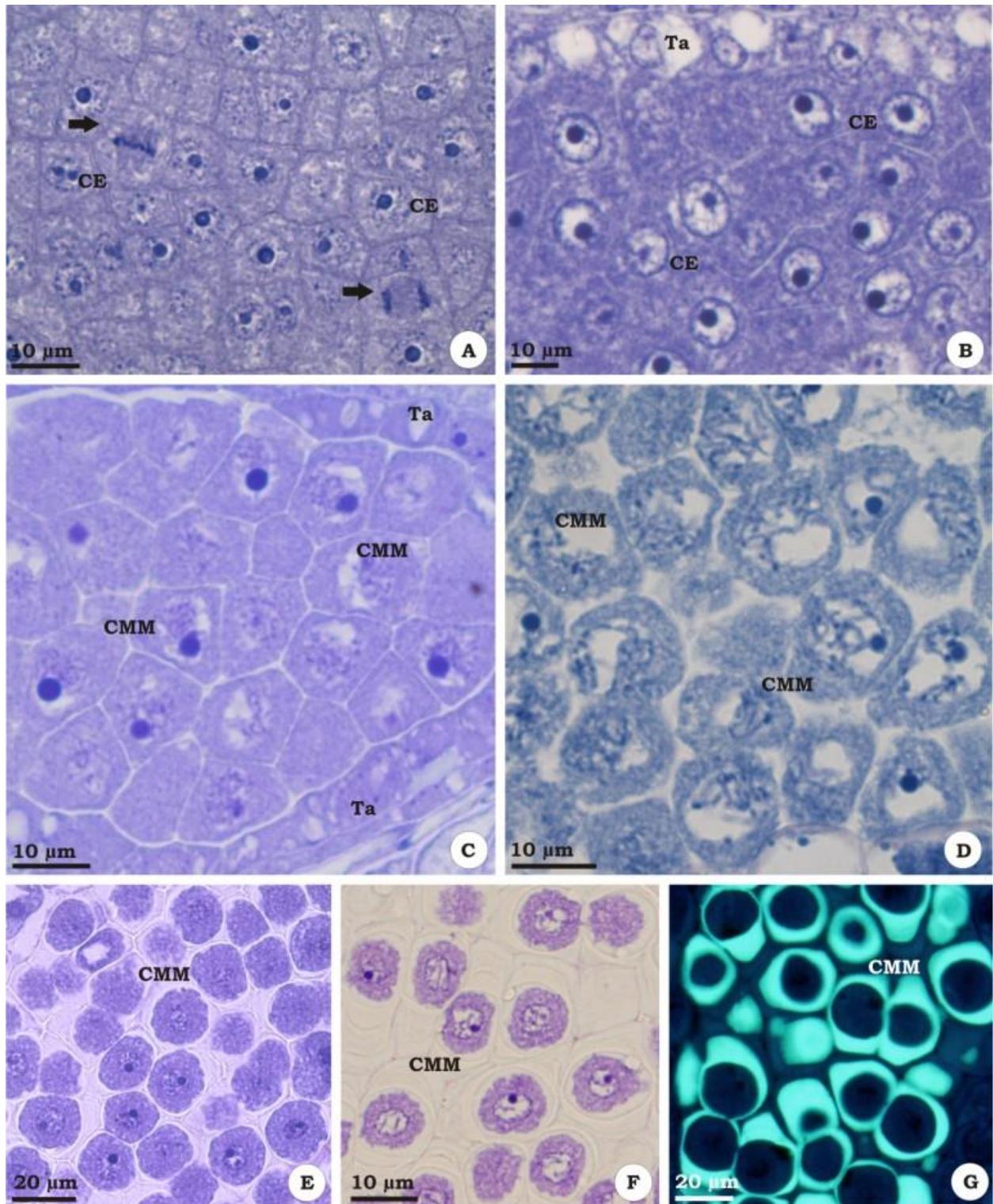
**Figura 2.** Anatomia da antera de espécies de Miconieae. **A.** *Clidemia hirta*. Corte transversal da antera jovem com septos interesporangiais (estrela de três pontas); **B.** *Miconia leucocarpa*. Corte transversal da antera madura, com septos interesporangiais em degeneração (estrela de três pontas); **C.** *Ossaea amygdaloides*. Corte longitudinal da antera jovem com cristais de oxalato de cálcio nas células do conectivo (setas); **D.** *Leandra melastomoides*. Corte transversal de uma das tecas da antera madura; presença de cristais de oxalato de cálcio em células do endotécio (setas). Co: conectivo; End: endotécio; Ep: epiderme.



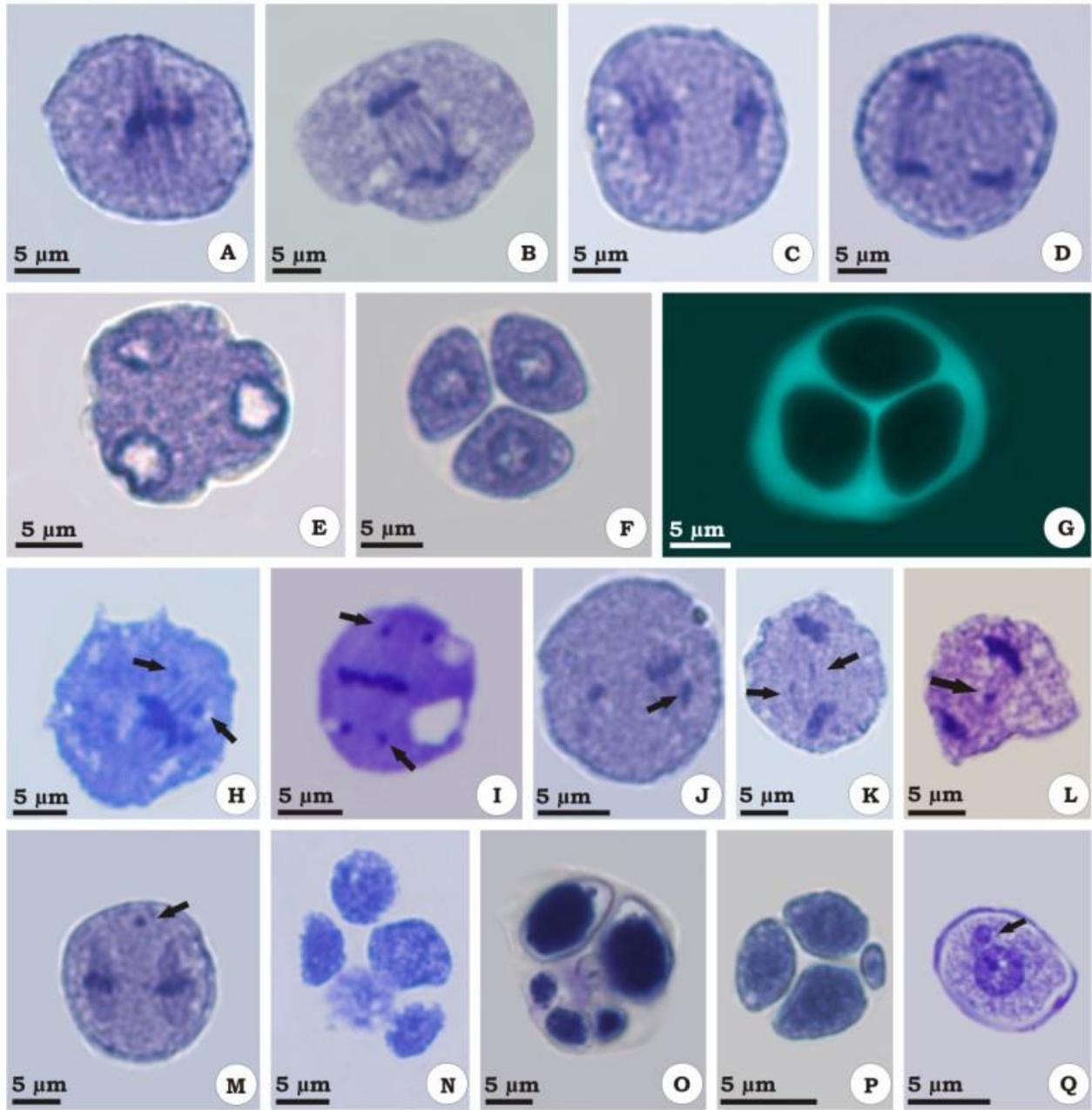
**Figura 3.** Anatomia da antera jovem em espécies de Miconieae. **A e B.** Cortes transversal e longitudinal da antera jovem, evidenciando os estratos parietais e células esporogênicas em *Leandra aurea* e *Miconia leucocarpa*, respectivamente; **C-F.** Cortes transversais (**C e E**) e longitudinais (**D e F**) da antera jovem, evidenciando os estratos parietais e células-mãe de micrósporos em *Clidemia hirta* (**C**) *Ossaea confertiflora* (**D**), *L. melastomoides* (**E**) e *O. amygdaloides* (**F**); observar células tapetais uninucleadas (setas). CE: células esporogênicas; CM: camada média; CMM: célula-mãe de micrósporos; End: endotécio; Ep: epiderme; Ta: tapete.



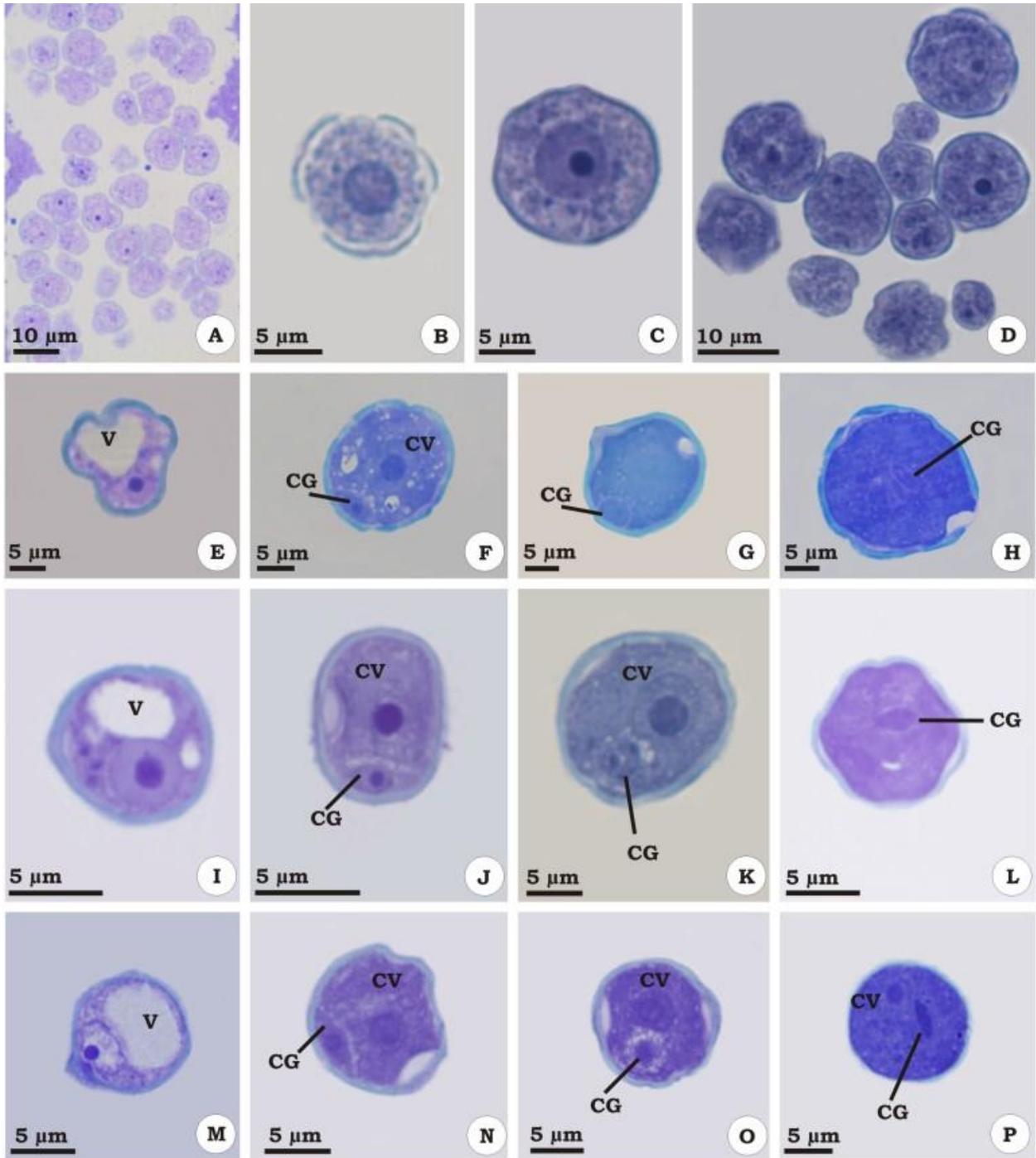
**Figura 4.** Microsporogênese em espécies de Miconieae. **A.** e **B.** Anteras jovens com células esporogênicas, algumas com figuras mitóticas (setas) em *Leandra aurea* e *L. melastomoides*, respectivamente. **C.** e **D.** Anteras jovens com células-mãe de micrósporos em *Clidemia hirta* e *Ossaea amygdaloides*, respectivamente. **E-G.** Células-mãe de micrósporos envoltas por calose, evidenciada pela coloração esverdeada quando corada em azul de anilina e observada sob microscópio de fluorescência (**G**). CE: células esporogênicas; CMM: célula-mãe de micrósporos; Ta: tapete.



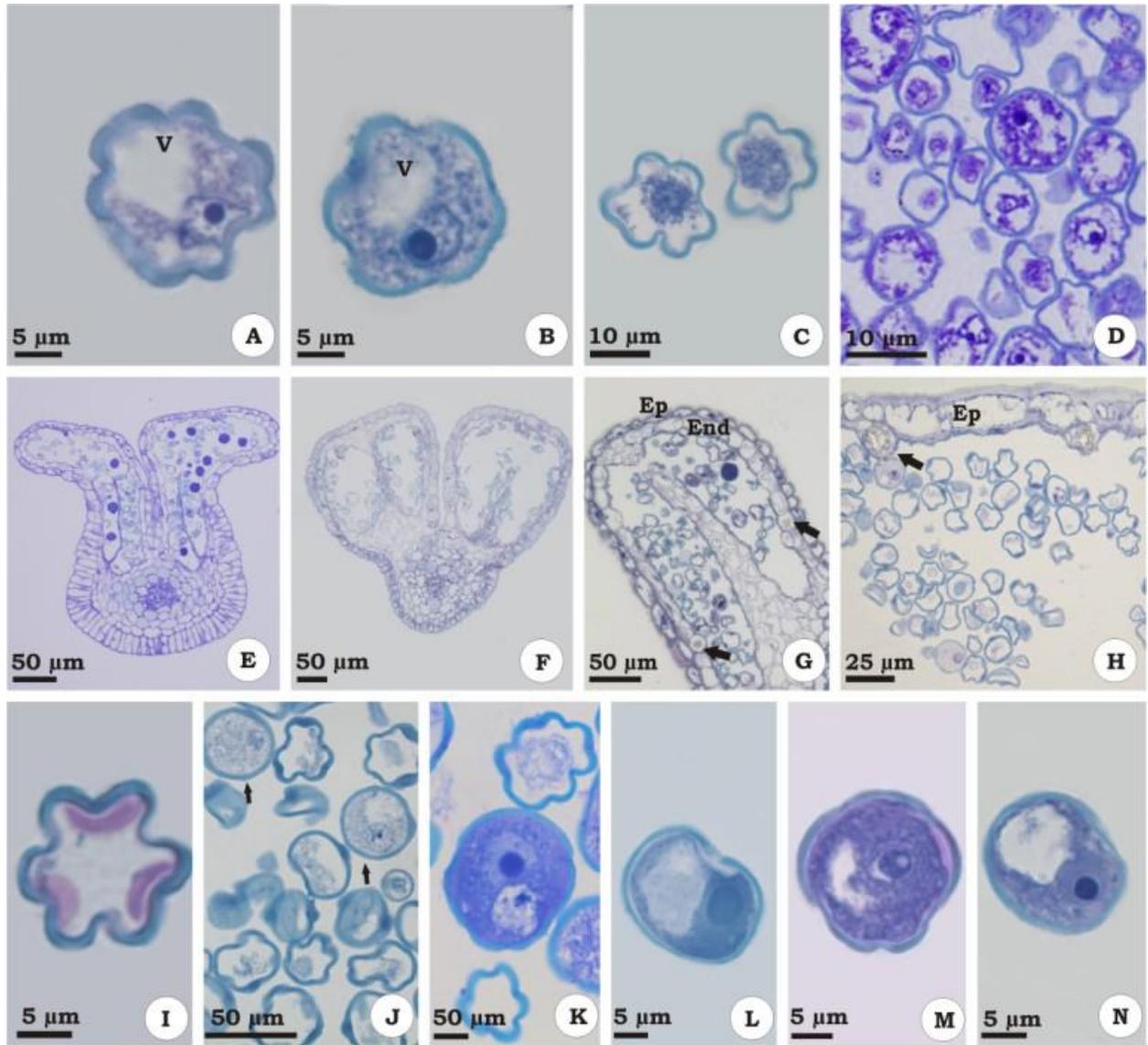
**Figura 5.** Microsporogênese em espécies de Miconieae. **A.** *Leandra aurea*. Célula-mãe de micrósporos em metáfase I; **B.** *L. melastomoides*. Célula-mãe de micrósporos em anáfase I; **C e D.** *L. aurea*. Células-mãe de micrósporos em metáfase II e anáfase II, respectivamente; **E.** *L. melastomoides*. Final da telófase II da célula-mãe de micrósporos; **F.** *Ossaea amygdaloides*. Tétrade tetraédrica de micrósporos; **G.** *L. melastomoides*. Tétrade tetraédrica de micrósporos com calose evidenciada pela coloração esverdeada quando corada em azul de anilina e observada sob microscópio de fluorescência; **H-J.** Migração precoce dos cromossomos (setas) na metáfase I em *Clidemia hirta* e *O. confertiflora* e na metáfase II em *L. aurea*, respectivamente; **K e L.** Cromossomos retardatários (setas) na anáfase I em *L. aurea* e *L. melastomoides*, respectivamente; **M.** *L. melastomoides*. Presença de micronúcleo (seta) ao final da metáfase II; **N-O.** Poliades formadas ao final da meiose, com mais de quatro micrósporos de diferentes tamanhos em *C. hirta* (**N**), *Miconia leucocarpa* (**O**) e *O. amygdaloides* (quatro micrósporos visíveis no plano de corte) (**P**). **Q.** *O. confertiflora*. Micrósporo com micronúcleo.



**Figura 6.** Microgametogênese em espécies de Miconieae. Micrósporos livres em *Clidemia hirta* **(A)**, *Ossaea amygdaloides* **(B)** e *Miconia leucocarpa* **(C)**; **D**. Observar a diferença de tamanho entre os micrósporos em *M. leucocarpa*; **E - K**. Microgametogênese em *Clidemia hirta* **(E-H)**, *Leandra aurea* **(I-L)** e *O. confertiflora* **(M-P)**: micrósporo vacuolado **(E, I e M)**; grão de pólen imaturo formado pelas células vegetativa e generativa **(F, J e N)**; célula generativa projetando-se para dentro do citoplasma da célula vegetativa **(G, K e O)**; grão de pólen maduro, bicelular, com célula generativa de formato fusiforme visível **(H, L e P)**. CG: célula generativa; CV: célula vegetativa; V: vacúolo.



**Figura 7.** Alterações na microgametogênese em espécies de Miconieae. Micrósporos vacuolados em *Leandra melastomoides* **(A)** e *Miconia leucocarpa* **(B)**; Micrósporos em degeneração em *M. leucocarpa* **(C)** e *Ossaea confertiflora* **(D)**; **E** e **F**. Corte transversal da antera madura, evidenciando a presença de poucos grãos de pólen com conteúdo em *O. confertiflora* e ausência de grãos normais em *M. leucocarpa*, respectivamente; **G** e **H**. Cortes transversal e longitudinal da antera madura em *L. melastomoides* e *O. amygdaloides*, respectivamente, evidenciando a presença de grãos pólen sem conteúdo e presença de cristais de oxalato de cálcio em células do endotécio (setas); **I**. Detalhe de micrósporo com deposição de exina e intina, mas sem conteúdo citoplasmático em *M. leucocarpa*; **J**. Micrósporos sem conteúdo citoplasmático e micrósporos que não se desenvolveram (setas), presentes em anteras maduras de *O. amygdaloides*; **K-N**. Micrósporos que não se desenvolveram, em anteras maduras de *Clidemia hirta*, *M. leucocarpa*, *L. melastomoides* e *L. aurea*, respectivamente. End: endotécio; Ep: epiderme; V: vacúolo.

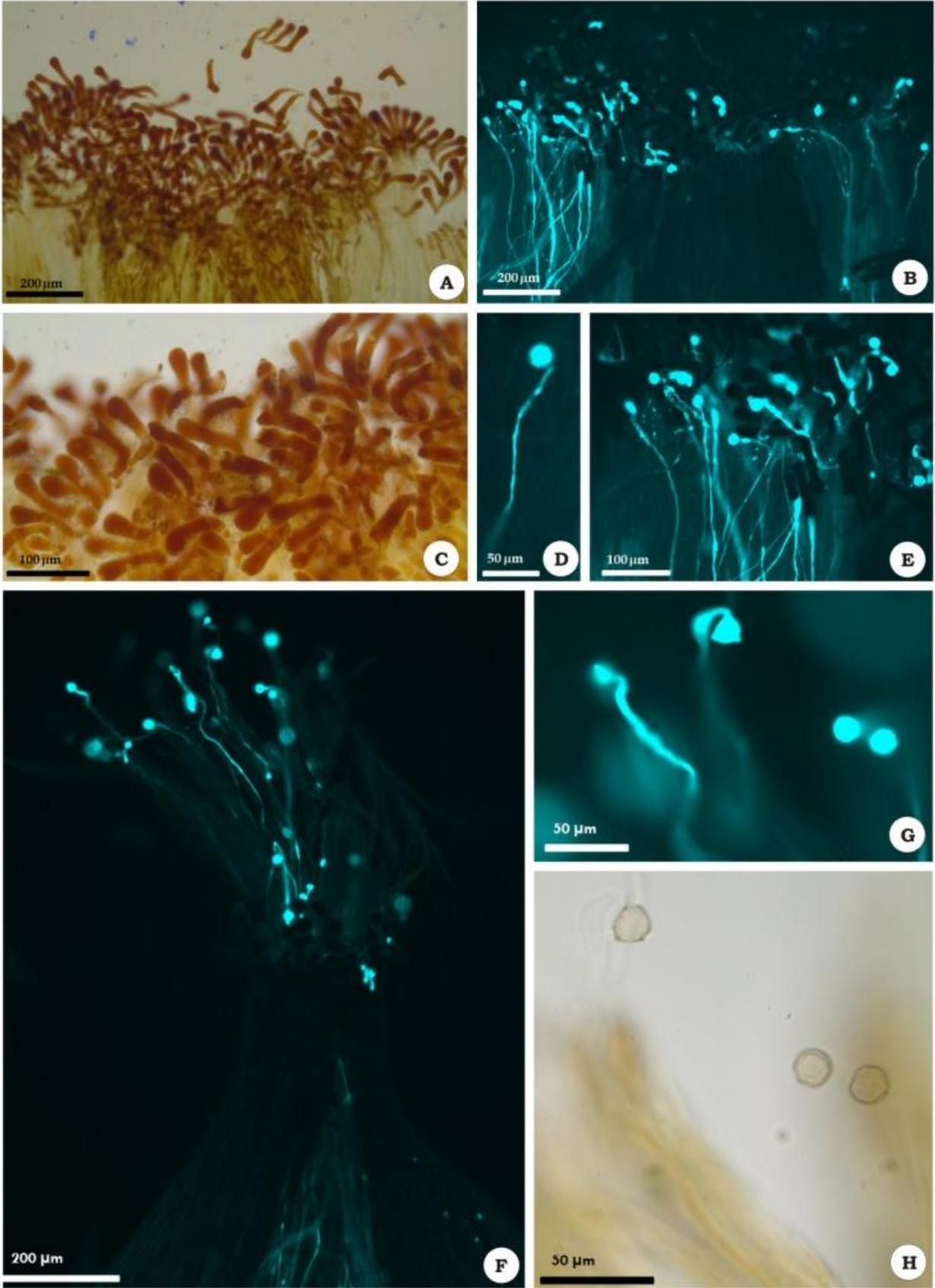






**Figura 8.** Grãos de pólen com tubo polínico observados em experimento *in vitro*, em *Leandra aurea* (A) e *L. regnellii* (B).

**Figura 9.** Grãos de pólen com tubos polínicos germinando no estigma e no estilete em *Clidemia hirta* **(A-E)** e *Ossaea confertiflora* **(F-H)**. **A, C** e **H**: Pistilos não corados, observados sob microscópio de luz. **B, D, E, F** e **G**: Pistilos corados com azul de anilina e observados sob microscópio de fluorescência.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeda, F. 1997. Chromosome numbers and their evolutionary significance in some neotropical and paleotropical Melastomataceae. *BioLlania Edición Esp.* 6: 167-190.
- Almeda, F. 2003. Cytology and taxonomy of the red goblet-flowered species of *Clidemia* (Melastomataceae: Miconieae) in central and south America. *Novon* 13(2): 161-169.
- Almeda, F. & Chuang, T.I. 1992. Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. *Systematic Botany* 17(4): 583-593.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Baider, C., Tabarelli, M. & Mantovani, W. 1999 O banco de sementes de um trecho de Floresta Atlântica Montana (São Paulo, Brasil). *Revista Brasileira de Biologia* 59(2): 319-328.
- Baker, B.S.; Carpenter, A.T.C.; Esposito, M.S.; Esposito, R.E. & Sandler, L. 1976. The genetic control of meiosis. *Annual Review of Genetics* 10: 53-134.
- Bradley, J., Carman, J., Jamison, M. & Naumova, T. 2007. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (Andropogoneae, Poaceae). *Sexual Plant and Reproduction* 20(1): 9-17.
- Bertasso-Borges, M.S. & Coleman, J.R. 2005. Cytogenetics and embryology of *Eupatorium laevigatum* (Compositae). *Genetics and Molecular Biology* 28(1): 123-128.
- Borges, H.B.N. 1991. Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Caetano A.P.S., Simão, D.G., Carmo-Oliveira, R. & Oliveira, P.E. 2013a. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. *Plant Systematics and Evolution* 299(7):1253-1262.

- Caetano, A.P.S., Teixeira, S.P., Forni-Martins, E.R. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2013b. Pollen insights into apomictic and sexual *Miconia* (Miconieae, Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences* 174(5):760–768.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperm may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61(1): 51-94.
- Carman, J.G. 2007. Do duplicate genes cause apomixis? *In* Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives (Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J., Sharbel, T., eds). ARG-Gantner, Ruggell. Pp. 169–194.
- Charlesworth, B. 1980. The cost of sex in relation to mating systems. *Journal of Theoretical Biology* 84(4): 655–671.
- Cortez, P.A., Carmello-Guerreiro, S.M. & Teixeira, S.P. 2012. Understanding male sterility in *Miconia* species (Melastomataceae) – a morphological approach. *Australian Journal of Botany* 60(6): 506-516.
- Dafni A., Pacini E. & Nepi M. 2005. Pollen and stigma biology. *In* Practical Pollination Biology (Dafni, A., Kevan, P.G. & Husband, B.C., eds.). Enviroquest, Ltd., Cambridge and Ontario. Pp. 83-146.
- Dent-Acosta, S.R. & Breckon, G.J. 1991. Reproductive biology of six species of Melastomataceae in western Puerto Rico. First International Melastomataceae Symposium, Smithsonian Institution, Washington D.C.
- Ellison, A.M., Denslow, J.S., Loiselle, B.A. & Brenes, M.D. 1993 Seed and seedling ecology of neotropical Melastomataceae. *Ecology* 74(6): 1733–1749.
- Eschrich, W. & Currier H.B. 1964. Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain technology* 39: 303-307.
- Ferreira, K., Torres, G.A., Carvalho, I.V.de. & Davide, L.C. 2009. Abnormal meiotic behavior in three species of *Crotalaria*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 44(12): 1641-1646.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211(1): 13-29.

- Goldenberg, R. & Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24(3): 283-288.
- Goldenberg, R., Penneys, D.S., Almeda, F., Judd, W.S. & Michelangeli, F.A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. *International Journal of Plant Sciences* 169(7): 963-979.
- Grimanelli, D., Garcia, M., Kaszas, E., Perotti, E. & Leblanc, O. 2003. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165(3): 1521-1531.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5(10): 1425-1437.
- Koltunow, A.M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34(3):125-128.
- Mcdowell, E.M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100(8): 405-414.
- Meirmans, P.G., Den Nijs, H.J.C.M. & Van Tienderen, P.H. 2006. Male sterility in triploid dandelions: asexual females vs. asexual hermaphrodites. *Heredity* 96(1): 45-52.
- Melo, G.F., Machado, I.C. & Luceño, M. 1999. Reproducción de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. *Revista de Biología Tropical* 47(3): 359-363.
- Mogie, M. 1992. The evolution of asexual reproduction in plants. Chapman and Hall, London.
- Mogie, M. 2011. Pollen profile, spatial structure, and access to sex in asexual hermaphrodites. *Biological Journal of the Linnean Society* 103(4): 954-966.
- Nijs, H.C.M. den & Menken, S.B.J. 1996. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. In *Advances in Compositae systematics* (Hind, H.D.N., Beentje, H.J. eds.). Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 665-677.

- Pagliarini, S.P. 2000. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 997-1002.
- Ramirez, N. & Brito, Y. 1990. Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *American Journal of Botany* 77: 1260-1271.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 496-518.
- Richards, A.J. 1997. *Plant breeding systems*. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M.S. & Valle, C.B. 2006. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* Stapf (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research* 5(4): 837-845.
- Santos, A.P.M.S., Fracasso, C.M., Santos, M.L., Romero, R., Sazima, M. & Oliveira, P.E. 2012. Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. *Annals of Botany* 110(3): 667-679.
- Santos, R.P. & Mariath, J.E.A. 1997. A single method for fixing, dehydrating and embedding pollen tubes cultivated in vitro for optical and transmission electron microscopy. *Biotechnic and Histochemistry* 72(6): 315-319.
- Saraiva, L.C., Cesar, O. & Monteiro, R. 1996. Breeding systems of shrubs and trees of a Brazilian Savanna. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 39: 751-763.
- Savidan, Y. 2007. Apomixis in higher plants. *In Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives* (Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J. & Sharbel, T., eds). ARG-Gantner, Ruggell. Pp. 15-22.
- Sharbel, T.F., Voigt, M.L., Corral, J.M., Galla, G., Kumlehn, J., Klukas, C., Schreiber, F., Vogel, H. & Rotter, B. 2010. Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *Plant Cell* 22(3): 655-671.
- Smith, J.M. 1978. *The evolution of sex*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sobrevila, C. & Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution* 140(1): 19-37.

- Solt, M.L. & Wurdack, J.J. 1980. Chromosome numbers in the Melastomataceae. *Phytologia* 47(3):199-220.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(13): 7051-7057.
- Soltis, D.E., Albert, V.A., Leebens-Mack, J., Bell, C.D., Paterson, A.H., Zheng, C., Sankoff, D., Pamphilis, C.W., Kerr Wall, P. & Soltis, P. S. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96: 336-348.
- Stebbins, G.L. 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia Univ. Press, New York.
- Thompson, S.L. & Whitton, J. 2006. Patterns of recurrent evolution and geographic parthenogenesis within apomictic polyploid Easter daisies (*Townsendia hookeri*). *Molecular Ecology* 15(11): 3389-3400.
- Thompson, S.L., Choe, G., Ritland, K. & Whitton, J. 2008. Cryptic sex within male-sterile polyploidy populations of the Easter daisy, *Townsendia hookeri*. *International Journal of Plant Sciences* 169(1): 183-193.
- Vinkenoog, R., Bushell, C., Spielman, M., Adams, S., Dickinson, H.G. & Scott, R.J. 2003. Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Molecular Biotechnology* 25:149-184.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J. & Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169(1): 169-182.



## **CAPÍTULO 2. APOMIXIA GAMETOFÍTICA COMO PRINCIPAL MODO DE REPRODUÇÃO EM ESPÉCIES DE MICONIEAE, MELASTOMATACEAE**

### **RESUMO**

Em Miconieae, Melastomataceae, a apomixia vem sendo descrita como um evento frequente, mas os processos relacionados à formação e ao desenvolvimento dos embriões apomíticos e a possibilidade de coocorrência de reprodução sexuada neste grupo são praticamente desconhecidos. Neste contexto, o presente trabalho objetiva verificar o tipo de apomixia e a ocorrência de embriões sexuados em seis representantes apomíticos de Miconieae: *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* e *O. confertiflora*. Para tal, análises de megasporogênese, megagametogênese e embriogênese foram realizadas por meio de técnicas usuais de anatomia. Em todas as espécies ocorre diplosporia, sendo o embrião formado a partir de um saco embrionário não reduzido que é originado diretamente da célula-mãe de megásporos. Adicionalmente, aposporia foi verificada em *C. hirta*, na qual o embrião é formado a partir de um saco embrionário não reduzido, que é originado de células nucleares. Em *L. melastomoides* ainda se desenvolvem embriões adventícios a partir de células nucleares. Em *C. hirta* e *L. melastomoides* observou-se poliembrionia. O desenvolvimento de sacos embrionários reduzidos e indícios de fecundação e formação de zigoto não foram observados, indicando que a formação de embriões sexuados deve ser um evento raro nas espécies analisadas. Estes dados, adicionados à informação de que a formação de grãos de pólen viáveis é severamente comprometida, reforçam a ideia de que este grupo forma um complexo apomítico obrigatório.



## **ABSTRACT**

Apomixis has been described as a frequent event in Miconieae, Melastomataceae, but the processes related to the formation and development of apomictic embryos and the possibility of co-occurrence of sexual reproduction are practically unknown. This work aims to verify the origin of apomictic embryos and the occurrence of sexual embryos in six Miconieae apomictic species: *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *Leandra melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* and *Ossaea confertiflora*. Analyses of megasporogenesis, megagametogenesis and embryogenesis were made using usual methods in anatomy studies. Diplospory was observed in all studied species, with the embryo formed from an unreduced embryo sac, which develops directly from a megaspores mother-cell. Additionally, apospory was detected in *C. hirta*, with the embryo being formed from an unreduced embryo sac originated from nucellar cells. In *L. melastomoides*, adventitious embryos are produced from nucellar cells. Polyembryony occurs in *C. hirta* and *L. melastomoides*. Reduced embryo sacs and evidences of fertilization and zygote formation were not observed, indicating the sexual reproduction as a rare event. These results, joint to the severely compromised production of viable pollen grains observed in the species, reinforces the hypothesis that this group forms a complex of obligate apomictics.



## INTRODUÇÃO

A apomixia pode ser brevemente descrita como reprodução assexuada por meio de sementes (Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003, Savidan 2007). De acordo com a origem do embrião apomítico este processo é classificado em: 1) embrionia adventícia ou apomixia esporofítica – o embrião origina-se por divisões de células nucleares ou tegumentares; e 2) apomixia gametofítica – o embrião origina-se por partenogênese da oosfera de um saco embrionário não reduzido. A apomixia gametofítica pode ainda ser subdividida em diplosporia e aposporia. Na diplosporia o saco embrionário não reduzido é formado a partir da célula-mãe de megásporos, por supressão ou alteração na meiose; já na aposporia o saco embrionário não reduzido desenvolve-se a partir de mitoses de células nucleares (Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003). Em espécies de plantas tropicais ou subtropicais a embrionia adventícia é o principal tipo de apomixia descrito, enquanto a apomixia gametofítica parece ocorrer principalmente em plantas de regiões temperadas (Asker & Jerling 1992, Richards 1997).

A apomixia e a reprodução sexuada não são eventos excludentes e ocorrem em paralelo nos ditos apomíticos facultativos, que representam a maioria das espécies apomíticas (Savidan 2007, Whitton *et al.* 2008). Neste sentido, a ocorrência de reprodução sexuada pode garantir a manutenção e aumento da variabilidade genética em populações apomíticas (Whitton *et al.* 2008). Por outro lado, nos apomíticos obrigatórios a reprodução sexuada não ocorre, mas a apomixia como único modo de reprodução parece ser uma exceção na natureza (Nogler 1984, Savidan 2007).

A tribo neotropical Miconieae, Melastomataceae, com cerca de 2200 espécies (Michelangeli *et al.* 2004, Goldenberg *et al.* 2008, Martin *et al.* 2008), vem se destacando

pela elevada proporção de espécies apomíticas, incluindo quase 70% das espécies analisadas (Sobrevila & Arroyo 1982, Renner 1989, Ramirez & Brito 1990, Borges 1991, Dent-Acosta & Breckon 1991, Almeda & Chuang 1992, Melo & Machado 1996, Saraiva *et al.* 1996, Goldenberg & Shepherd 1998, Melo *et al.* 1999, Goldenberg & Varassin 2001, Santos *et al.* 2012). Poucos estudos já abordaram a origem do embrião apomítico na tribo, e os dados disponíveis indicam que apomixia gametofítica (Cortez 2007, Caetano 2010, Caetano *et al.* 2013) e embrionia adventícia (Subramanyam 1942, 1944, 1948, Borges 1991) podem ocorrer. Entretanto estes dados ainda são escassos e pouco esclarecem a respeito deste processo tão frequente no grupo.

Em Miconieae, apesar de a viabilidade polínica ser frequentemente baixa nos apomíticos, determinadas espécies produzem alguma porcentagem de grãos de pólen viáveis (Borges 1991, Goldenberg & Shepherd 1998, Goldenberg & Varassin 2001), o que poderia indicar eventos de reprodução sexuada nestas espécies. Aparentemente, apomixia facultativa e obrigatória podem ocorrer na tribo, mas os dados disponíveis são insuficientes e pouco permitem discutir acerca destes processos em Miconieae (Borges 1991, Caetano 2010, Caetano *et al.* 2013).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é verificar o tipo de apomixia e a ocorrência de embriões sexuados, por meio de análise da megasporogênese, megagametogênese e embriogênese em seis espécies reconhecidamente apomíticas de diferentes linhagens de Miconieae, Melastomataceae.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Seis espécies pertencentes a quatro gêneros de Miconieae, e definidas como apomíticas em trabalhos prévios de biologia reprodutiva (Melo *et al.* 1999, Goldenberg &

Shepherd 2008, Goldenberg & Varassin 2001), foram investigadas. Estas espécies pertencem a três grupos diferentes dentro da tribo Miconieae, de acordo com a filogenia proposta por Goldenberg *et al.* 2008: grado *Clidemia*: *Clidemia hirta* D.Don; clado *Leandra* s.s.: *Leandra aurea* Cogn., *L. melastomoides* Radd, *Ossaea amygdaloides* (DC.) Triana e *O. confertiflora* (DC.) Triana; e clado *Miconia* IV + *Ossaea*: *Miconia leucocarpa* DC.

As coletas foram realizadas entre 2010 e 2014 em diferentes localidades no Estado de São Paulo, Brasil. *Clidemia hirta* foi coletada em uma região de mata de encosta no município de Ubatuba; *Leandra melastomoides*, *Ossaea amygdaloides* e *O. confertiflora* em floresta mesófila semidecidual na serra do Japi, município de Jundiá; *L. aurea* e *Miconia leucocarpa* em áreas de cerrado campo sujo e cerrado *sensu stricto* no município de Itirapina.

O material testemunho foi depositado no Herbário UEC da Universidade Estadual de Campinas, sob os números: 178719, 178722 e 178723 (*C. hirta*), 178709 (*L. aurea*), A.P.S. Caetano *et al.* 3 (*L. melastomoides*), 178732 (*M. leucocarpa*), 178736 (*O. amygdaloides*) e 178730 (*O. confertiflora*).

Botões florais, flores e frutos foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8 (modificado de McDowell & Trump 1976) por 24h. Fissuras com lâmina de barbear foram realizadas no material coletado antes da fixação, para melhor penetração da solução fixadora. Durante a fixação, o material foi mantido a vácuo por aproximadamente 1h. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8, desidratadas em série etanólica e estocadas em etanol 70% (v/v).

O material foi dissecado e incluído em resina Leica. Os cortes de 3,0 a 5,0 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Leica com navalha

descartável de tungstênio. As seções foram aderidas a lâminas de vidro e, posteriormente, coradas em azul de toluidina (C.I. 52040) a 0,05% em tampão fosfato, pH 6,8. As lâminas foram montadas no momento da observação, com água destilada ou óleo de imersão e lamínula de vidro. As observações e fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica DM 4500 com câmera digital acoplada Leica DFC 295.

## **RESULTADOS**

Todas as espécies analisadas apresentam padrões similares quanto à morfologia e ao desenvolvimento do óvulo.

Os óvulos iniciam seu desenvolvimento como protuberâncias da placenta, consistindo em um grupo de células meristemáticas recobertas pela protoderme (Fig. 1A). Os tegumentos desenvolvem-se a partir de divisões de células protodérmicas localizadas na base do primórdio do óvulo (Figs. 1B-C). Há também participação de células subepidérmicas na formação do tegumento externo do óvulo (Figs. 1B-C).

Os tegumentos aumentam em número de células em cada camada até cobrirem completamente o nucelo (Figs. 1B-H). Concomitantemente, as divisões e o crescimento de células na região do funículo promovem a curvatura do óvulo até um ângulo de 180° (Figs. 1B-H).

Os óvulos são anátropos e bitegmentados (Figs. 1G-H). Os tegumentos externo e interno não são vascularizados e são formados por três e duas camadas, respectivamente (Figs. 1G-I). Ambos os tegumentos formam a micrópila em “zig-zag” (Figs. 1H-J).

Um único feixe vascular sai da placenta, percorre o funículo e a rafe e termina na hipóstase, localizada na região calazal do óvulo, onde se encontram células

compactas de citoplasma denso, núcleo proeminente e sem indícios de lignificação nas paredes (Figs. 1G-H).

Nos primórdios de óvulos ocorre a diferenciação de uma célula subepidérmica, denominada célula arquesporrial (Fig. 2A). Esta célula divide-se formando a célula parietal primária e uma célula esporogênica (Figs. 2B-C). A célula esporogênica diferencia-se em uma célula-mãe de megásporos, caracterizada por um citoplasma denso, núcleo evidente e maior volume celular quando comparada às demais células do nucelo (Figs. 2D-F). A célula parietal primária e as outras células subepidérmicas dividem-se e formam as diversas camadas que separam a epiderme nucelar da célula-mãe de megásporos, caracterizando o óvulo como crassinucelado (Fig. 2D-F).

Padrões de desenvolvimento semelhantes durante a formação do saco embrionário foram observados nas espécies *Clidemia hirta*, *Leandra aurea* (Figs. 3A-J), *L. melastomoides* (Figs. 4A-J), *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* (Figs. 5A-G) e *O. confertiflora* (Figs. 6A-I). Nestas espécies, a meiose é suprimida e a célula-mãe de megásporos passa por um aumento em volume celular e se torna polarizada pela presença de um vacúolo calazal e outro micropilar (Figs. 3B, 4B, 5C, 6C). Esta célula polarizada passa diretamente por uma mitose acitocinética, dando origem a um saco embrionário formado dois núcleos, que se afastam em direção aos polos à medida que um vacúolo se forma entre eles (Figs. 3C, 4C-D, 5D-E, 6D). A segunda mitose acitocinética ocorre formando um saco embrionário tetranucleado (Figs. 3D, 4E-F, 5F-G, 6E-F). Por último, a terceira mitose seguida por citocinese resulta em um saco embrionário com sete células e oito núcleos, com desenvolvimento do tipo *Antennaria* (Figs. 3F-J, 4G-J, 6G-I).

Em *Clidemia hirta* e *Miconia leucocarpa*, além do desenvolvimento do saco embrionário do tipo *Antennaria*, com supressão da meiose, outro tipo de evento pode

ocorrer. Eventualmente, a célula-mãe de megásporos inicia a meiose (Figs. 7A-B) e dá origem a uma díade (Fig. 7C). A célula calazal da díade se diferencia, tornando-se polarizada devido à presença de dois vacúolos (Fig. 7C). Enquanto a célula micropilar da díade se degenera, a célula calazal passa pela primeira mitose acitocinética, formando um saco embrionário binucleado (Fig. 7D). Cada um dos núcleos move-se para um dos polos do saco embrionário, à medida que um vacúolo central é formado (Figs. 7E-F). Em seguida, a segunda mitose acitocinética dá origem a um saco embrionário tetranucleado (Figs. 7F-G). Finalmente, com a terceira mitose, seguida por citocinese, é formado um saco embrionário com sete células e oito núcleos, com desenvolvimento do tipo *Taraxacum* (Figs. 7H-K).

Em todas as espécies o saco embrionário maduro contém três antípodas no polo calazal (Figs. 3F-G, 4H, 7H), uma célula média com dois núcleos polares (Figs. 3F e H, 4H e I, 6I, 7I), e o aparato oosférico, localizado no polo micropilar e formado por duas sinérgides e a oosfera (Figs 3I-J, 4G e J, 5H, 6G-H, 7J-K). A oosfera é evidenciada pela presença do núcleo e grande parte do citoplasma localizados no polo calazal da célula e um vacúolo no polo micropilar da célula (Figs. 3I-J, 4G e J, 6G, 7J-K). Grande parte dos óvulos de flores em antese apresentou sacos embrionários imaturos. Existe uma assincronia entre os óvulos de uma mesma flor que, frequentemente, estão em diferentes estádios de desenvolvimento.

Adicionalmente, em alguns óvulos de *Clidemia hirta*, células nucleares denominadas iniciais apospóricas, adjacentes à célula-mãe de megásporos, à díade, ou ao saco embrionário em desenvolvimento, diferenciam-se, passando por um aumento no volume celular e apresentando citoplasma denso e núcleo conspícuo (Figs. 7L-N). Após três mitoses consecutivas as iniciais apospóricas dão origem a sacos embrionários adicionais (Fig. 7O), do tipo *Hieracium*. De um total de 49 óvulos observados

provenientes de flores em antese, 61,23% apresentaram dois ou três sacos embrionários em desenvolvimento, enquanto 38,77% apresentaram apenas um.

A oosfera do saco embrionário diplospórico e/ou apospórico divide-se e dá origem ao embrião apomítico em *Clidemia hirta* (Figs. 8A-J e 9A-F), *Leandra aurea* (Figs. 10A-G), *L. melastomoides*, *Miconia leuocarpa* (Figs. 11A-F), *Ossaea amygdaloides* (Figs. 12A-G) e *O. confertiflora* (Figs. 13A-J).

Uma divisão transversal assimétrica da oosfera resulta em um proembrião com duas células sobrepostas: uma pequena célula apical e uma célula maior, a célula basal (Figs. 8A-D, 9A-C, 10A-C, 11A, 12A- B e 13A-C). A célula basal passa por uma divisão transversal (Figs. 8E, 9C-D, 12C e 13D), enquanto a célula apical passa por uma divisão longitudinal (Figs. 8F-G, 9D, 10D, 11C, 12D, 13E), originando um proembrião com quatro células em formato de “T” (Figs. 8F-G, 9D, 10D, 12D). Posteriormente, foram observados embriões nos estádios globular (Figs. 11D-E e 12F), cordiforme (Fig. 12G), torpedo inicial (Figs. 8H, 9E e 10E) e torpedo tardio (Figs. 8I-J, 9F, 10F-G, 12G e 13I-J).

Em *Clidemia hirta* verificou-se o desenvolvimento de sementes poliembriônicas a partir da partenogênese da oosfera em óvulos com mais de um saco embrionário (Figs. 9A-F). Nestas sementes, o padrão de desenvolvimento dos embriões é idêntico ao observado em sementes monoembriônicas.

Em *Leandra melastomoides*, embriões também podem ser formados a partir de células nucelares (Figs. 14A-J). Nas sementes em início de desenvolvimento células nucelares adjacentes ao saco embrionário se diferenciam, sendo caracterizadas pela presença de vacúolos nos polos da célula, citoplasma denso e núcleo conspicuo (Figs. 14A-B). Estas células denominadas precursoras do embrião adventício passam por divisões e originam embriões adventícios, observados no estágio globular (Figs. 14 C-I).

Sementes poliembrionicas, com mais de um embrião adventício, podem ser formadas nesta espécie (Fig. 14D).

Em todas as espécies foram observados núcleos do endosperma em proliferação durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário (Figs. 8G, 10B-C e E, 11A, C e D, 12B, D e F, 13B, C, F e G e 14J). O endosperma é do tipo nuclear e a celularização dos núcleos parece não ocorrer, já que estes permanecem livres até serem totalmente consumidos pelo embrião em desenvolvimento (Figs. 8G, 10B, C e E, 11A e C-D, 12B e D-F, 13B-C e F-G). Células do nucelo acumulam algum tipo de conteúdo citoplasmático de reserva (Figs. 8H, 11E e 13I), provavelmente carboidratos, que são consumidos pelo embrião em desenvolvimento.

Os resultados relacionados à formação do saco embrionário e do embrião apomítico obtidos para as seis espécies de *Miconieae* analisadas estão compilados na tabela 1.

**Tabela 1.** Dados sobre a origem do saco embrionário e do embrião apomítico e o tipo de apomixia nas espécies de Miconieae estudadas.

	<b>Origem do saco embrionário</b>	<b>Origem do embrião</b>	<b>Tipo de apomixia</b>
<b><i>Clidemia hirta</i></b>	1. Célula-mãe de megásporos: supressão ou alteração na meiose; 2. Células nucelares;	Partenogênese da oosfera	Apomixia gametofítica: diplosporia e aposporia
<b><i>Leandra aurea</i></b>	Célula-mãe de megásporos: supressão da meiose;	Partenogênese da oosfera	Apomixia gametofítica: diplosporia
<b><i>Leandra melastomoides</i></b>	Célula-mãe de megásporos: supressão da meiose;	1. Partenogênese da oosfera; 2. Células nucelares	1. Apomixia gametofítica: diplosporia 2. Embrionia adventícia
<b><i>Miconia leucocarpa</i></b>	Célula-mãe de megásporos: supressão ou alteração na meiose;	Partenogênese da oosfera	Apomixia gametofítica: diplosporia
<b><i>Ossaea amygdaloides</i></b>	Célula-mãe de megásporos: supressão da meiose;	Partenogênese da oosfera	Apomixia gametofítica: diplosporia
<b><i>Ossaea confertiflora</i></b>	Célula-mãe de megásporos: supressão da meiose;	Partenogênese da oosfera	Apomixia gametofítica: diplosporia

## DISCUSSÃO

Nossos dados revelam uma diversidade de mecanismos apomíticos atuando em Miconieae, uma vez que diplosporia, aposporia e embrionia adventícia foram relatados.

Estes são os três tipos de apomixia descritos na literatura (Nogler 1984, Asker e Jerling 1992) e todos já haviam sido observados em espécies de Melastomataceae (Tabela 2) (Subramanyam 1942, 1944, 1948, Borges 1991, Caetano 2010, Caetano *et al.* 2013), indicando que diferentes processos podem levar a formação de embriões apomíticos na família. Contudo, algumas tendências parecem existir: apomixia gametofítica é o

processo predominante em Miconieae, enquanto fora da tribo, somente embrionia adventícia é relatada (Tabela 2). Apomixia gametofítica (diplosporia e/ou aposporia) e embrionia adventícia também podem ocorrer em diversas outras espécies, como em *Allium* (Amaryllidaceae), *Hieracium* (Asteraceae), *Malus* e *Pyrus* (Rosaceae), *Ochna* (Ochnaceae), alguns gêneros de Poaceae (Naumova 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003, Naumova 2008), entre outros (consultar “Apomixis Database”: <http://www.uni-goettingen.de/en/433689.html>).

**Tabela 2.** Tipos de apomixia descritos em espécies de Melastomataceae.

<b>Tribos</b>	<b>Clados/Grados</b>	<b>Espécies</b>	<b>Tipo de apomixia</b>	<b>Fonte</b>
<b>Miconieae</b>	<b>Clidemia</b>	<i>Clidemia hirta</i>	Diplosporia e aposporia	1
		<i>Leandra aurea</i>	Diplosporia	1
	<b>Leandra s.s. +</b>	<i>Leandra australis</i>	Diplosporia e embrionia adventícia	2
	<b>Pleiochiton</b>	<i>Leandra melastomoides</i>	Diplosporia e embrionia adventícia	1
		<i>Ossaea amygdaloides</i>	Diplosporia	1
		<i>Ossaea confertiflora</i>	Diplosporia	1
		<i>Miconia albicans</i>	Diplosporia	3
	<b>Miconia IV +</b>	<i>Miconia discolor</i>	Aposporia e embrionia adventícia	2
	<b>Ossaea</b>	<i>Miconia fallax</i>	Aposporia e embrionia adventícia	4
		<i>Miconia leucocarpa</i>	Diplosporia	1
<b>Dissochateae + Sonerileae</b>		<i>Sonerila wallichii</i>	Embrionia adventícia	5
<b>Melastomeae</b>		<i>Melastoma malabathricum</i>	Embrionia adventícia	6
		<i>Osbeckia hispidissima</i>	Embrionia adventícia	7

1. Neste estudo; 2. Borges 1991; 3. Caetano *et al.* 2013; 4. Caetano 2010; 5. Subramanyam 1944; 6. Subramanyam 1948; 7. Subramanyam 1942.

Assim como em *Clidemia hirta* e *Leandra melastomoides*, outras espécies de Miconieae apresentam mais de um tipo de apomixia (Borges 1991, Caetano 2010), e aparentemente este não é um evento incomum. Aposporia, diplosporia e embrionia adventícia coexistem em espécies de *Beta* (Amaranthaceae) (Jassem 1990), *Sorbus* e *Potentilla* (Rosaceae) (Nybom 1988); aposporia e embrionia adventícia ocorrem em

algumas espécies de gramíneas, *Citrus* e *Hieracium* (Naumova 1992, Koltunow 2000, Koltunow & Grossniklaus 2003).

Nas espécies analisadas o saco embrionário origina-se diretamente da célula-mãe de megásporos. Esse tipo de desenvolvimento é denominado *Antennaria* e é caracterizado pela completa omissão da meiose (Nogler 1984, Asker & Jerling 1992, Koltunow 1993), sendo o tipo mais comumente relatado entre as espécies diplospóricas (Nogler 1984, Koltunow 1993). Neste caso, por haver supressão da meiose, os núcleos das células do saco embrionário maduro são diploides. Exemplos ocorrem em *Antennaria*, *Erigeron*, *Eupatorium*, *Hieracium* e *Parthenium* (Asteraceae), *Burmannia* (Burmanniaceae), *Calamagrostis*, *Nardus* e *Poa* (Poaceae), *Cooperia* (Liliaceae) e *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) (Nogler 1984).

Ainda, eventualmente em *Clidemia hirta* e *Miconia leucocarpa*, há formação de um saco embrionário do tipo *Taraxacum*. Neste tipo de desenvolvimento, há uma alteração durante a meiose: a célula-mãe de megásporos entra em prófase meiótica, mas a primeira “divisão” resulta em restituição nuclear, e a segunda continua com um número cromossômico não reduzido, resultando em uma díade de células somáticas após a citocinese (Nogler 1984). Geralmente, é a célula calazal que passa por três mitoses, dando origem a um saco embrionário formado por células com núcleos diploides (Nogler 1984). É interessante ressaltar a possibilidade de ocorrer recombinação cromossômica durante a meiose I, gerando alguma variabilidade genética na progênie (Van Baarlen *et al.* 2000), o que pode ser interessante para *C. hirta* e *M. leucocarpa*, já que a reprodução sexuada parece não ocorrer nas populações estudadas. Entre os gêneros com esse tipo de desenvolvimento destacam-se *Chondrilla*, *Erigeron* e *Taraxacum* (Asteraceae), *Arabis* (Brassicaceae), *Agropyron* e *Paspalum* (Poaceae) (Nogler 1984).

Semelhantemente ao que ocorre em *Clidemia hirta* e *M. leucocarpa*, o desenvolvimento do saco embrionário do tipo *Antennaria* e *Taraxacum* pode coocorrer em espécies de *Tripsacum* (Poaceae) (LeBlanc et al. 1995). Acredita-se que estes dois tipos de desenvolvimento são muito similares e a mudança de uma forma para outra pode até mesmo ser influenciada pelo ambiente (Nogler 1984, LeBlanc et al. 1995).

O desenvolvimento do saco embrionário do tipo *Antennaria*, observado nas espécies estudadas, é morfológicamente muito semelhante ao do tipo *Adoxa* (Fig. 15 A). Entretanto, neste último ocorre meiose e os quatro núcleos formados participam da formação do saco embrionário, que exibe portanto, núcleos haploides (Rutishauser 1982) (Fig. 15A). Ainda, o desenvolvimento do saco embrionário do tipo *Taraxacum*, observado eventualmente em *Clidemia hirta* e *Miconia leucocarpa*, assemelha-se ao tipo *Allium* (Rutishauser 1982) (Fig. 15B). Contudo, no tipo *Allium* a meiose I é reducional, formando uma díade de megásporos haploides e conseqüentemente, um saco embrionário de células com número cromossômico reduzido à metade (Fig. 15B).

Apesar de não mensurarmos a ploidia das células do saco embrionário maduro, acreditamos que as etapas observadas nas espécies analisadas de fato se referem à formação de um saco embrionário apomítico (tipo *Antennaria* e *Taraxacum*), formado por células com núcleo diploide, já que verificamos a origem partenogenética do embrião a partir da oosfera e os experimentos de biologia reprodutiva asseguram que estas espécies formam sementes viáveis na ausência de polinização (Melo et al. 1999, Goldenberg & Shepherd 2008, Goldenberg & Varassin 2001). Além disso, não há na literatura informações sobre a formação de saco embrionário do tipo *Adoxa* ou *Allium* em Melastomataceae ou Myrtales (Tobe & Raven 1983).

Em *Clidemia hirta*, sacos embrionários apospóricos do tipo *Hieracium* foram identificados por sua origem a partir de células somáticas do nucelo. Este é o tipo mais

comum de saco embrionário apospórico, descrito em espécies dos gêneros *Crepis* e *Hieracium* (Asteraceae), *Beta* (Amaranthaceae), *Elatostema* (Urticaceae), *Hypericum* (Hypericaceae), *Hierochloë* e *Poa* (Poaceae), *Ranunculus* (Ranunculaceae) e, muito frequentemente em espécies da subfamília Panicoideae (Poaceae) (Nogler 1984).

A assincronia observada durante o desenvolvimento de sacos embrionários não reduzidos provenientes de óvulos de um mesmo ovário parece ser um evento comum em outras espécies apomíticas, como representantes de *Hieracium* e *Panicum*, mas uma condição incomum em espécies sexuais (Nogler 1984). A apomixia é reconhecidamente causada por uma desregulação, em tempo e espaço, nos processos de reprodução sexual (Koltunow & Grossniklaus 2003), e é marcada por padrões de expressão heterocrônica durante o desenvolvimento em óvulos (Grimanelli *et al.* 2003, Bradley *et al.* 2007, Sharbel *et al.* 2010). Aparentemente, em espécies apomíticas de Miconieae, essa alteração no tempo afeta a sincronia na formação dos sacos embrionários apospóricos e diplospóricos, explicando o evento observado.

A embrionia adventícia, aqui registrada em *Leandra melastomoides*, é o tipo mais comum de apomixia na natureza, e ocorre em aproximadamente 57 famílias de angiospermas, incluindo gêneros de importância taxonômica, como *Citrus*, *Mangifera*, *Ribes*, *Beta* e *Alnus* (Naumova 2008). Cabe ressaltar, entretanto, que diferente do observado em *L. melastomoides*, a embrionia adventícia é frequentemente associada à reprodução sexuada (Asker & Jerling 1992, Richards 1997, Koltunow & Grossniklaus 2003, Mendes-Rodrigues *et al.* 2005, Bittencourt & Moraes 2010, Sampaio *et al.* 2013). É muito comum que nestas espécies a polinização seguida pela dupla fecundação dê origem ao embrião e ao endosperma, que podem servir como estímulo ao desenvolvimento de embriões nucelares (Asker & Jerling 1992, Koltunow 1993, Richards 1997), como descrito em *Handroanthus* (Costa *et al.* 2004; Bittencourt Júnior & Moraes

2010), *Anemopaegma acutifolium* (Sampaio *et al.* 2013) e *Eriotheca pubescens* (Oliveira *et al.* 1992; Mendes-Rodrigues *et al.* 2005). Em *L. melastomoides* não há formação de grãos de pólen (Cap. 1) nem de sacos embrionários reduzidos, o que torna muito pouco provável a ocorrência de reprodução sexuada na espécie. Na literatura, de todas as espécies que exibem embrionia adventícia, o desenvolvimento embrionário e a formação de sementes poliembriônicas viáveis na ausência de grãos de pólen férteis são reconhecidos apenas em *Sarcococca humilis* (Buxaceae) (Naumova 2008), podendo *L. melastomoides* representar outra exceção na natureza.

O desenvolvimento de embriões a partir de sacos embrionários diplospóricos e apospóricos em um mesmo óvulo leva à formação de sementes poliembriônicas em *Clidemia hirta*. Em *Leandra melastomoides*, a ocorrência de diplosporia e embrionia adventícia também leva à poliembrionia, definida pela ocorrência de dois ou mais embriões em uma única semente (Batygina & Vinogradova 2007). Este fenômeno pode ser explicado por diferentes processos, como: 1. fusão de dois ou mais óvulos; 2. presença de mais de um saco embrionário em um mesmo óvulo; 3. mais de uma célula do saco embrionário desenvolvendo-se em embriões; ou 4. divisões do proembrião (Lakshmanan & Ambegaokar 1984). Em espécies apomíticas com embrionia adventícia é comum a ocorrência de poliembrionia, devido ao desenvolvimento de múltiplos embriões adventícios em uma única semente, ou ainda, a partir do desenvolvimento paralelo de embriões adventícios e zigótico (Lakshmanan & Ambegaokar 1984, Asker & Jerling 1992). Entretanto, apesar de menos comum, a poliembrionia também pode estar relacionada à aposporia (Asker & Jerling 1992, Koltunow & Grossniklaus 2003), como descrito em *C. hirta* e relatado em espécies de *Pennisetum* (Wen *et al.* 1998) *Hieracium* (Tucker *et al.* 2001) e *Brachiaria* (Araujo *et al.* 2000).

*Clidemia hirta* e *Leandra aurea*, espécies utilizadas neste estudo, foram anteriormente apontadas como poliembrionicas (Mendes-Rodrigues & Oliveira 2012). Em *C. hirta* a porcentagem de sementes poliembrionicas variou entre 3,93% e 24,08% (Mendes-Rodrigues & Oliveira 2012). Em duas populações investigadas de *L. aurea*, uma apresentou apenas sementes monoembrionicas e a outra exibiu uma proporção baixa de sementes poliembrionicas (1,29%). Estes dados demonstram que em *L. aurea* diferentes populações podem diferir quanto à ocorrência de sementes poliembrionicas e que a poliembrionia deve ser um fenômeno incomum na espécie. Em Melastomataceae, parece existir uma estreita relação entre apomixia e poliembrionia (Mendes-Rodrigues & Oliveira 2012). Este evento poderia representar uma vantagem evolutiva em espécies apomíticas da família, já que pode aumentar as chances de sobrevivência de pelo menos uma das plântulas em sementes poliembrionicas (Mendes-Rodrigues *et al.* 2012).

A formação autônoma do endosperma, como tem sido observado em Miconieae (neste estudo, Caetano *et al.* 2013), é um evento quase que exclusivamente relatado em Asteraceae (Nogler 1984, Hörandl *et al.* 2008). O endosperma autônomo é derivado dos núcleos polares não reduzidos da célula média e os apomíticos autônomos independem de polinização para se reproduzirem via semente (Nogler 1984). A garantia do sucesso reprodutivo independente da polinização confere vantagens a estas plantas, principalmente em ambientes de condições extremas, onde a oferta de polinizadores pode ser pequena (Richards 1997). Essa vantagem ecológica contribui, entre outros fatores, para o fenômeno de partenogênese geográfica, em que espécies apomíticas apresentam distribuição geográfica mais ampla que seus parentes sexuais (Hörandl 2006, Hörandl *et al.* 2008), e que de forma similar parece ocorrer em Melastomataceae (Santos *et al.* 2012).

A infrequência no desenvolvimento autônomo do endosperma em apomíticos pode ser explicada por limitações funcionais (Hörandl *et al.* 2008). Em geral, a razão entre o genoma materno e paterno (m:p) no endosperma tem que permanecer na proporção 2:1, mas em espécies apomíticas esse balanço é alterado (Koltunow & Grossniklaus 2003). Em geral, mudanças na razão 2m:1p levam ao aborto da semente (Haig & Westoby 1991, Koltunow & Grossniklaus 2003). Aparentemente, as espécies apomíticas pseudogâmicas desenvolveram mecanismos para manter essa proporção, enquanto as autônomas parecem ser insensíveis a alterações nessa razão (Koltunow & Grossniklaus 2003, Hörandl *et al.* 2008). A importância da razão 2m:1p pode variar em algumas espécies, dependendo também do papel do endosperma no desenvolvimento da semente (Messing & Grossniklaus 1999, Koltunow & Grossniklaus 2003).

Em Melastomataceae células do nucelo com conteúdo podem contribuir com a nutrição do embrião e o endosperma nuclear e pouco difuso é totalmente consumido durante o desenvolvimento da semente (neste estudo, Johri *et al.* 1992, Caetano *et al.* 2013). De forma semelhante, em Asteraceae, o endosperma em geral é pouco desenvolvido (Noyes 2007, Hörandl *et al.* 2008). É notória a predisposição destas duas famílias à ocorrência de apomixia autônoma, uma vez que fora destes grupos este fenômeno é reportado apenas esporadicamente em representantes de *Alchemilla* (Rosaceae), *Burmannia* (Burmanniaceae), *Calamagrostis* e *Cortaderia* (Poaceae) (Nogler 1984). As características do endosperma em Melastomataceae e Asteraceae devem contribuir para uma menor sensibilidade a alterações na razão 2m:1p e pode ter sido importante à manutenção da apomixia autônoma nestes grupos (neste estudo, Hörandl *et al.* 2008).

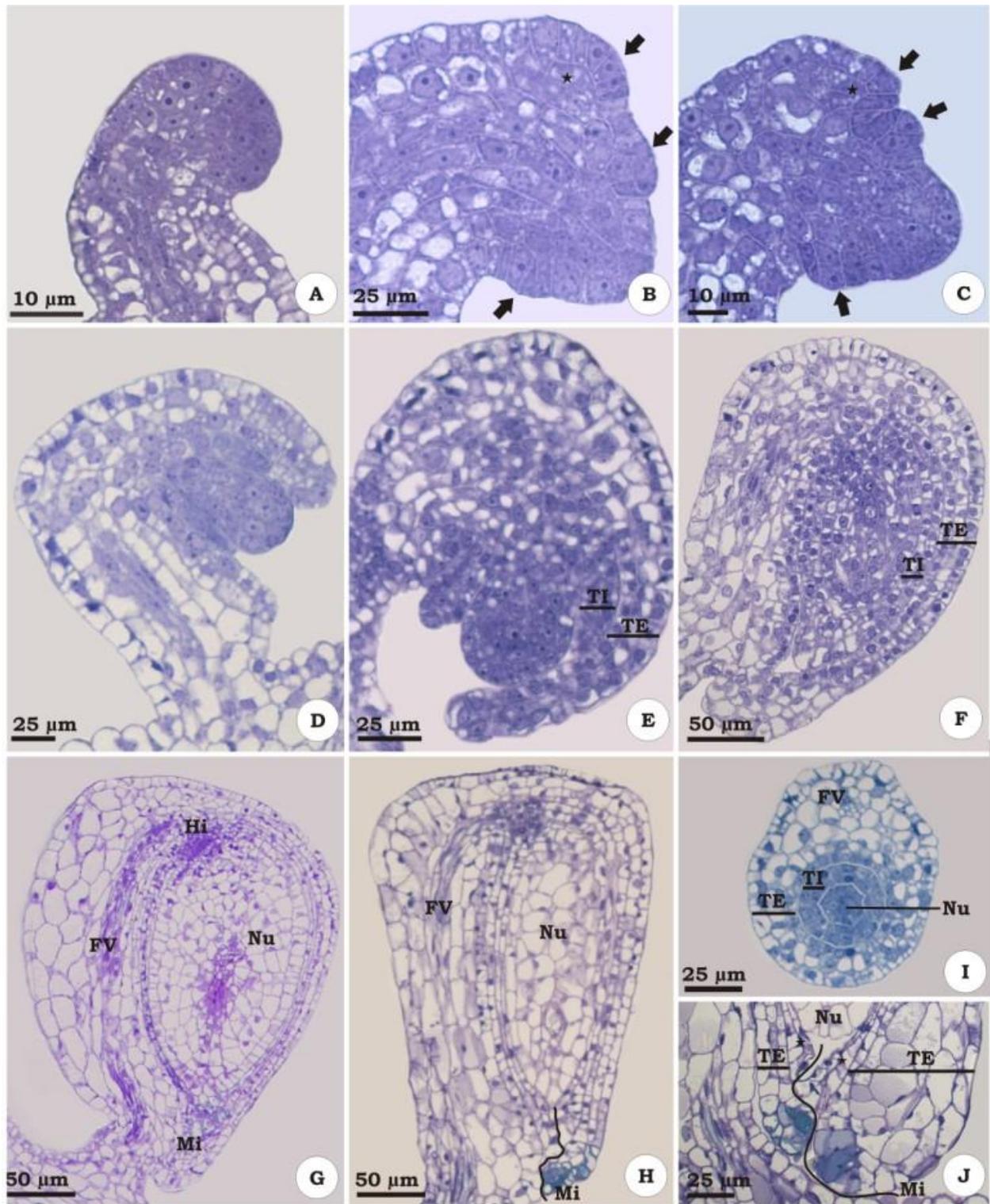
Nossos dados indicam que a formação de sacos embrionários reduzidos é improvável nas espécies analisadas. Este fato adicionado ao severo comprometimento

na formação de grãos de pólen viáveis (ver Cap. 1) revelam que o processo sexual deve ser um evento pouco provável no grupo em questão, cuja reprodução por sementes deve ser garantida predominantemente por meio de apomixia. Na natureza, apomíticos obrigatórios parecem ser pouco comuns, tornando estas espécies de Miconieae um modelo bastante interessante. Além disso, a apomixia, que tem se mostrado frequente em membros desta tribo, não pode ter sua importância negligenciada frente ao enorme sucesso reprodutivo do grupo, que apresenta cerca de 2200 espécies, muitas de ampla distribuição e reconhecidamente comuns em ambientes perturbados.

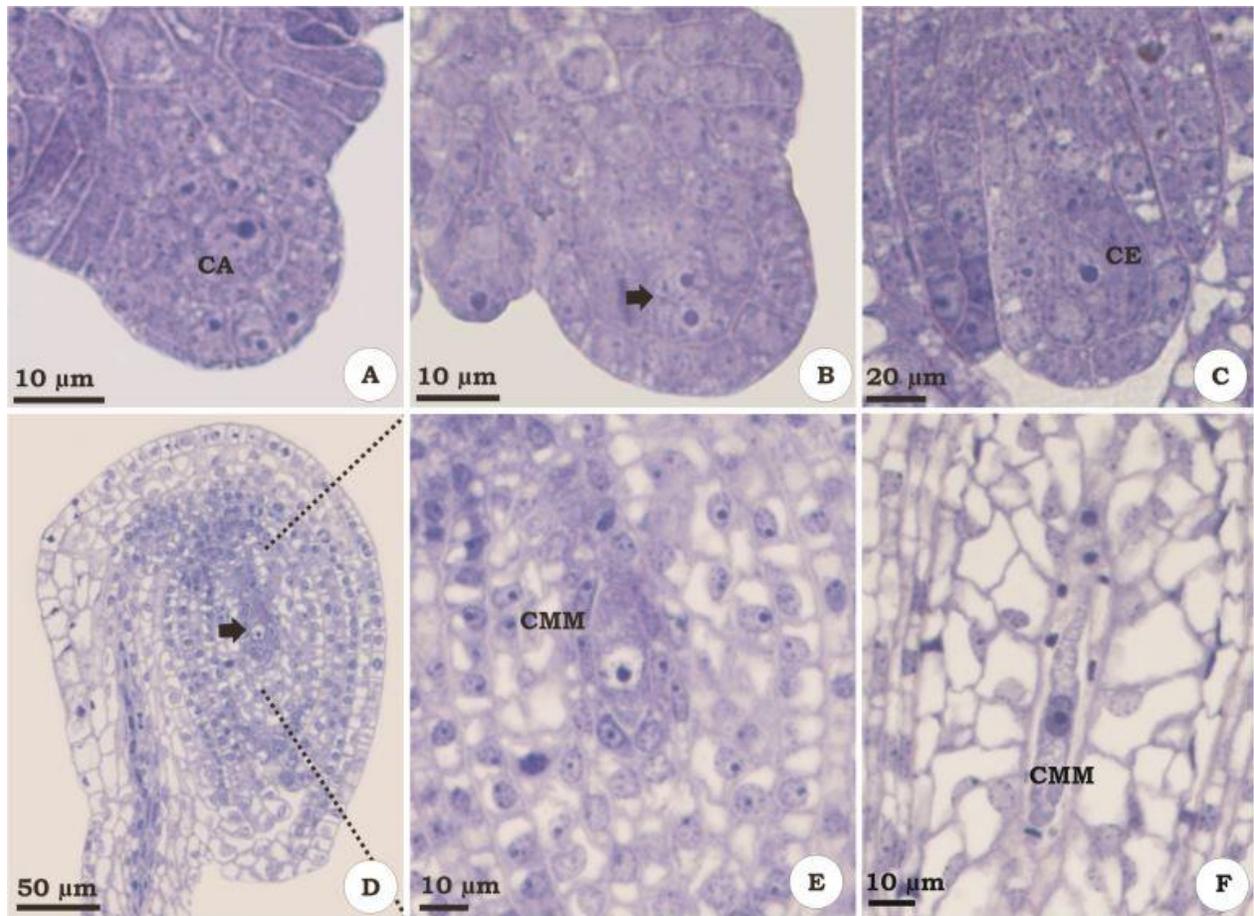


# **ILUSTRAÇÕES**

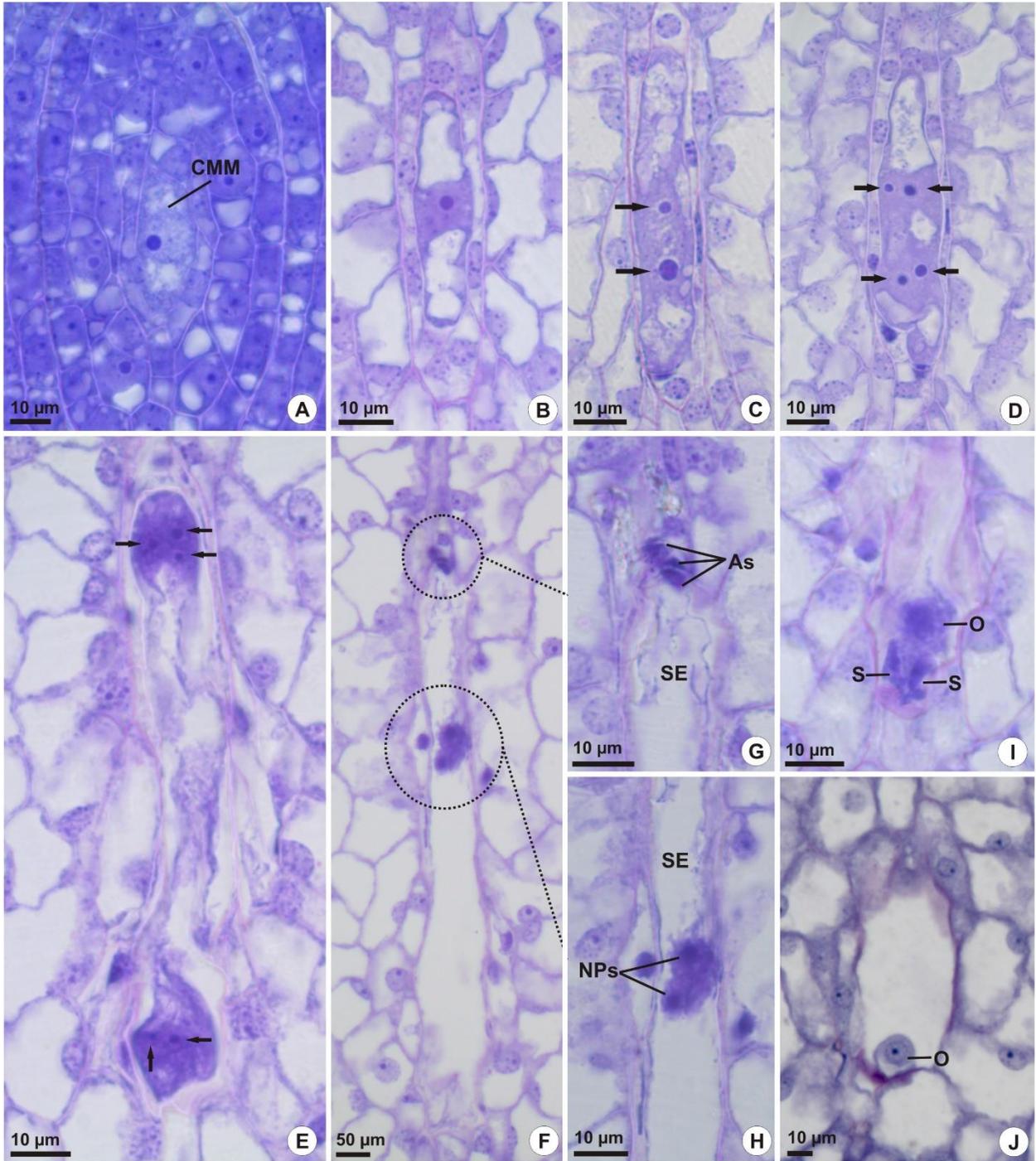
**Figura 1.** Desenvolvimento e morfologia do óvulo em espécies de Miconieae. **A-C.** *Leandra aurea*. **A.** Primórdio de óvulo com células meristemáticas recobertas pela protoderme; **B e C.** Primórdio de óvulo com tegumentos em início de desenvolvimento (setas). Observar a participação de células subepidérmicas na formação do tegumento externo (**C**) (estrela); **D-F.** *Miconia leucocarpa*. Óvulos em diferentes estádios de desenvolvimento. Observar o crescimento dos tegumentos e curvatura do óvulo; **G.** Óvulo maduro em *M. leucocarpa*; **H-J.** *Ossaea amygdaloides* **H.** Óvulo maduro em corte longitudinal; **I.** Óvulo maduro em corte transversal; **J.** Detalhe da micrópila delineada. FV: feixe vascular; Hi: hipóstase; Mi: micrópila; Nu: nucelo; TE: tegumento externo; TI: tegumento interno.



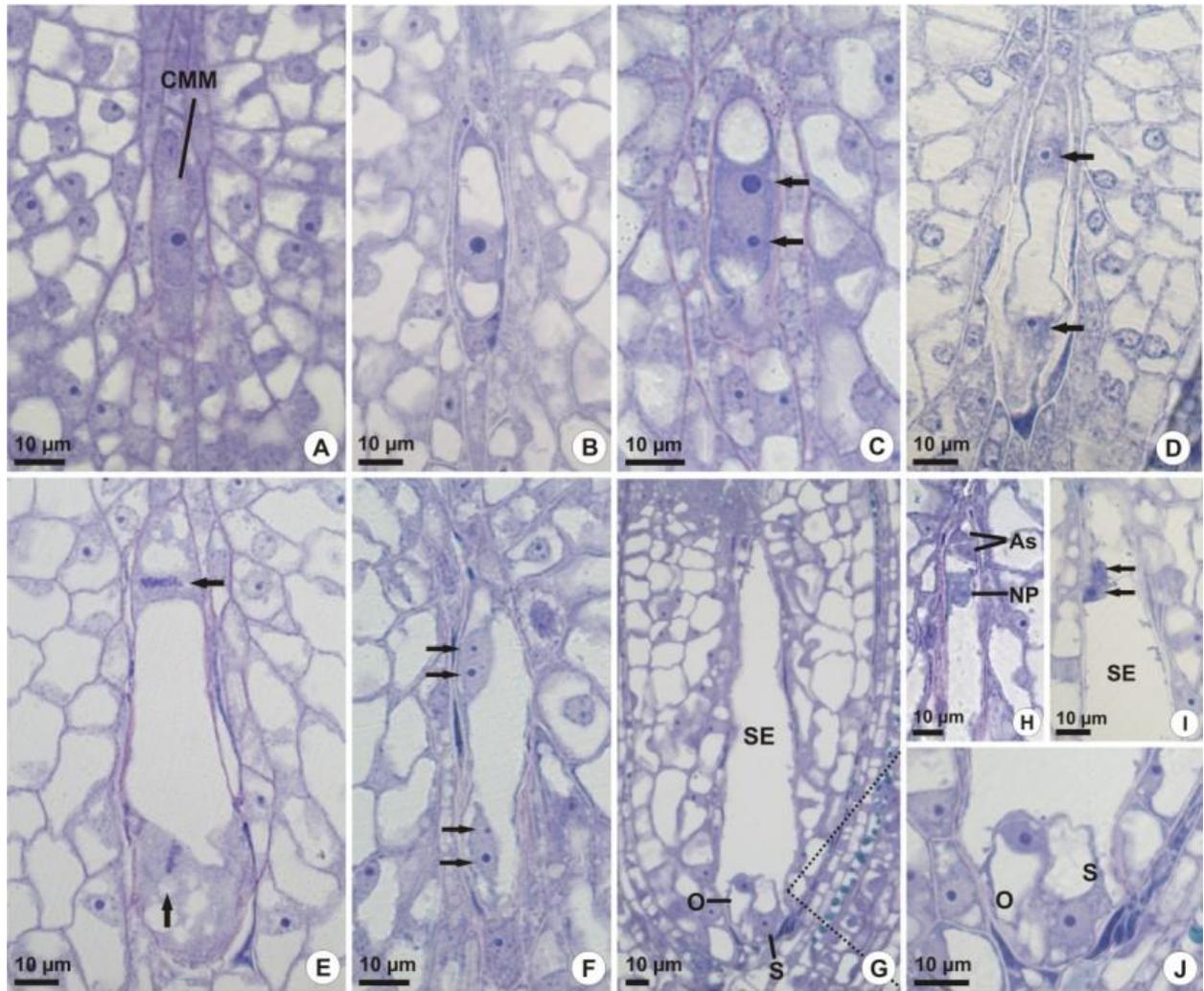
**Figura 2.** Megasporogênese em espécies de Miconieae. **A.** *Leandra aurea*. Célula arquesporial; **B.** *L. aurea*. Divisão da célula arquesporial para formação da célula esporogênica e célula parietal (seta); **C.** *Ossaea amygdaloides*. Célula esporogênica; **D.** e **E.** *Miconia leuocarpa*. Célula mãe de megásporos (seta na figura D); **F.** *O. confertiflora*.



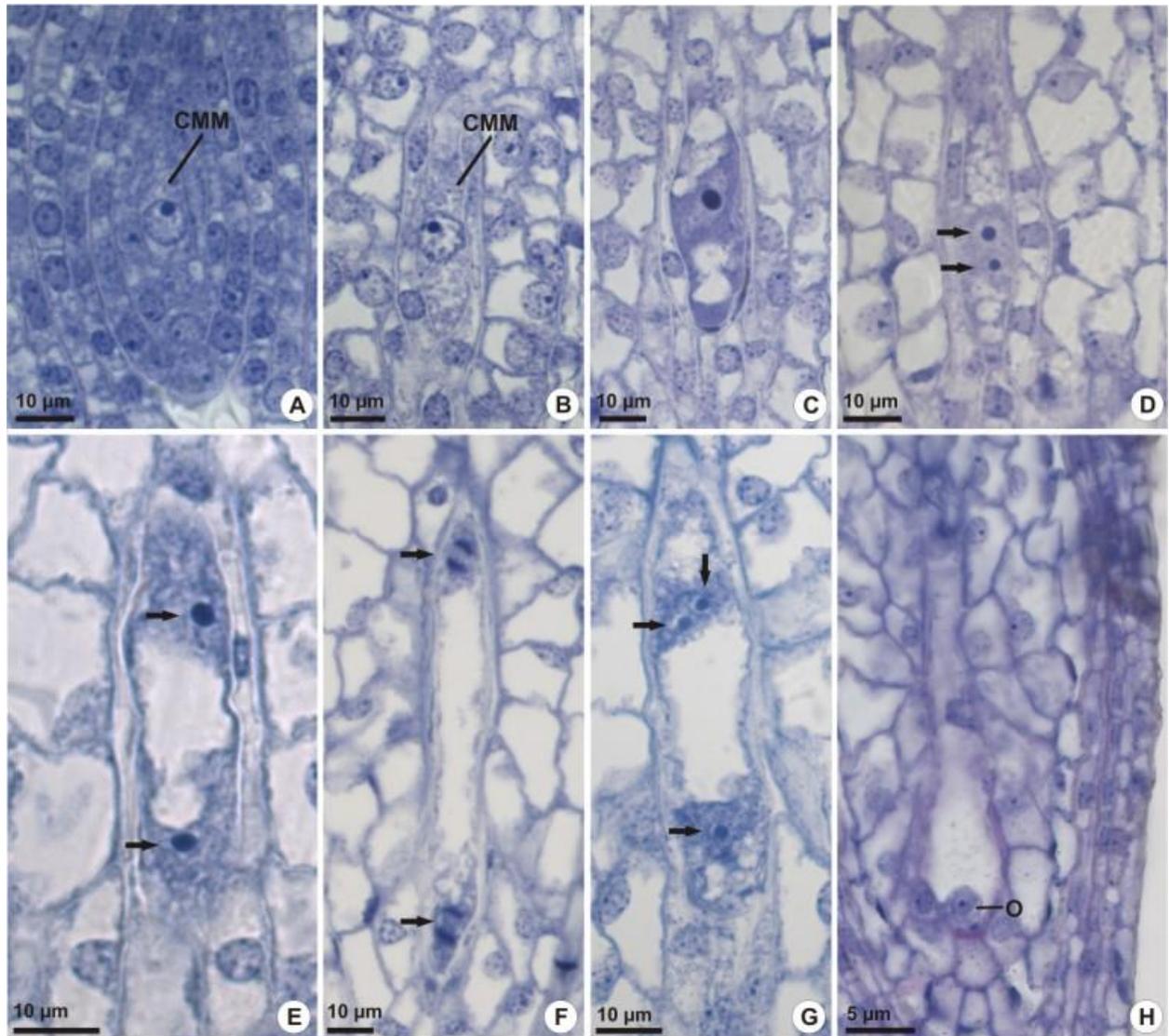
**Figura 3.** Desenvolvimento do saco embrionário diplospórico em *Leandra aurea*. **A.** Célula-mãe de megásporos; **B.** Saco embrionário diplospórico mononucleado; **C.** Saco embrionário diplospórico binucleado (setas); **D.** Saco embrionário diplospórico tetranucleado (setas); **E.** Saco embrionário diplospórico com quatro núcleos no polo calazal (três em evidência - setas) e mais dois núcleos no polo micropilar (setas); **F-H.** Saco embrionário diplospórico maduro: visão geral (**F**), detalhe das antípodas (**G**) e dos núcleos polares da célula média (**H**); **I.** Detalhe do aparato oosférico de um saco embrionário diplospórico maduro; **J.** Detalhe de uma oosfera de um saco embrionário diplospórico maduro. As: Antípodas; CMM: célula-mãe de megásporos; NPs: núcleos polares; O: oosfera; S: sinérgide; SE: saco embrionário.



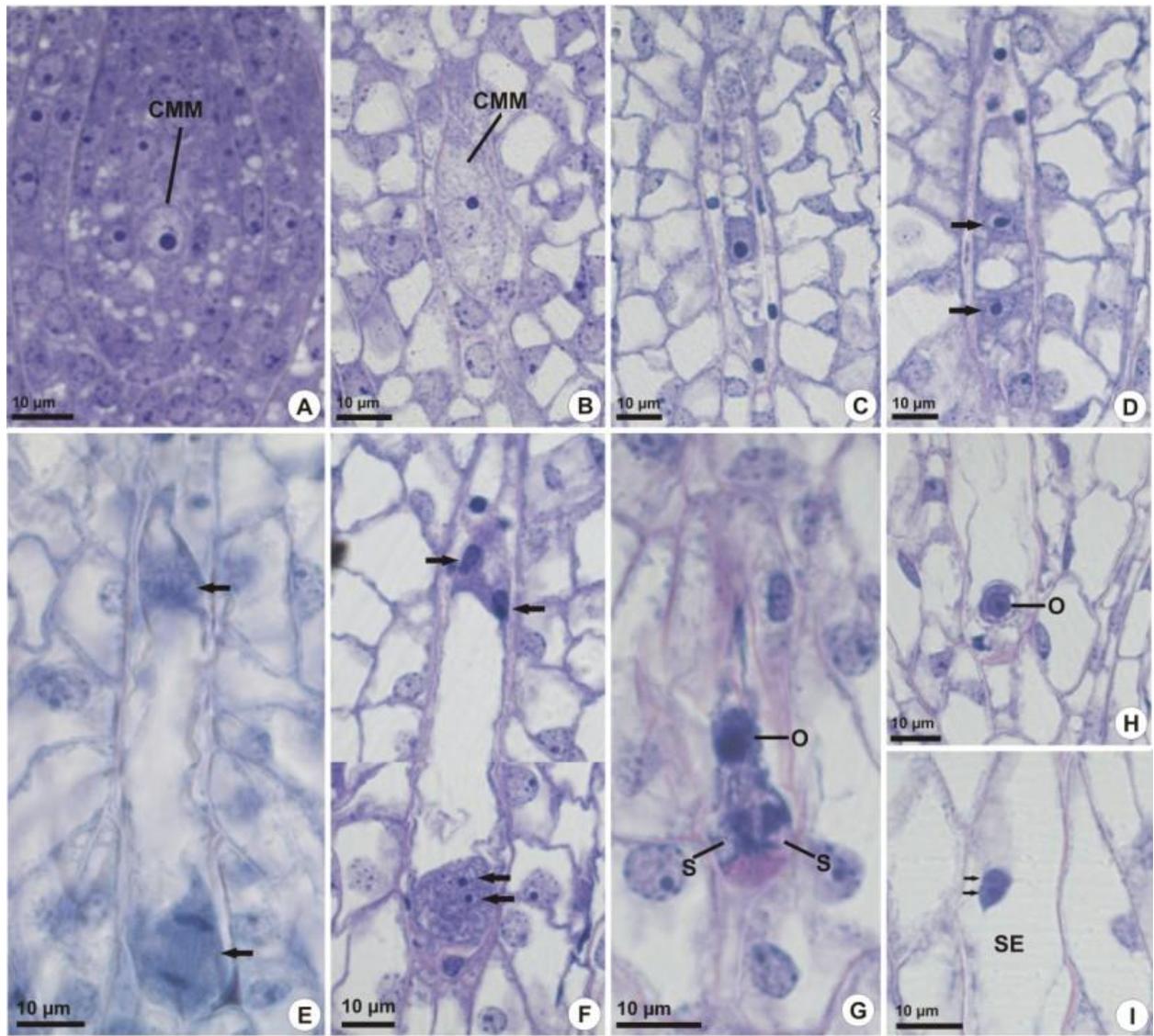
**Figura 4.** Desenvolvimento do saco embrionário diplospórico em *Leandra melastomoides*. **A.** Célula-mãe de megásporo; **B.** Saco embrionário diplospórico mononucleado; **C.** e **D.** Saco embrionário diplospórico binucleado (setas) logo após a primeira mitose (**C**) e com os dois núcleos bem separados por um grande vacúolo (**D**); **E.** Núcleos calazal e micropilar de um saco embrionário diplospórico binucleado em metáfase (setas); **F.** Saco embrionário diplospórico tetranucleado (setas); **G-J.** Saco embrionário diplospórico maduro: visão geral (**G**), detalhe de duas das antípodas e de um núcleo polar (**H**), detalhe dos núcleos polares da célula média (**I**) e detalhe da oosfera e de uma sinérgide (**J**). As: antípodas; CMM: célula-mãe de megásporos; NP: núcleo polar; O: oosfera; S: sinérgide; SE: saco embrionário.



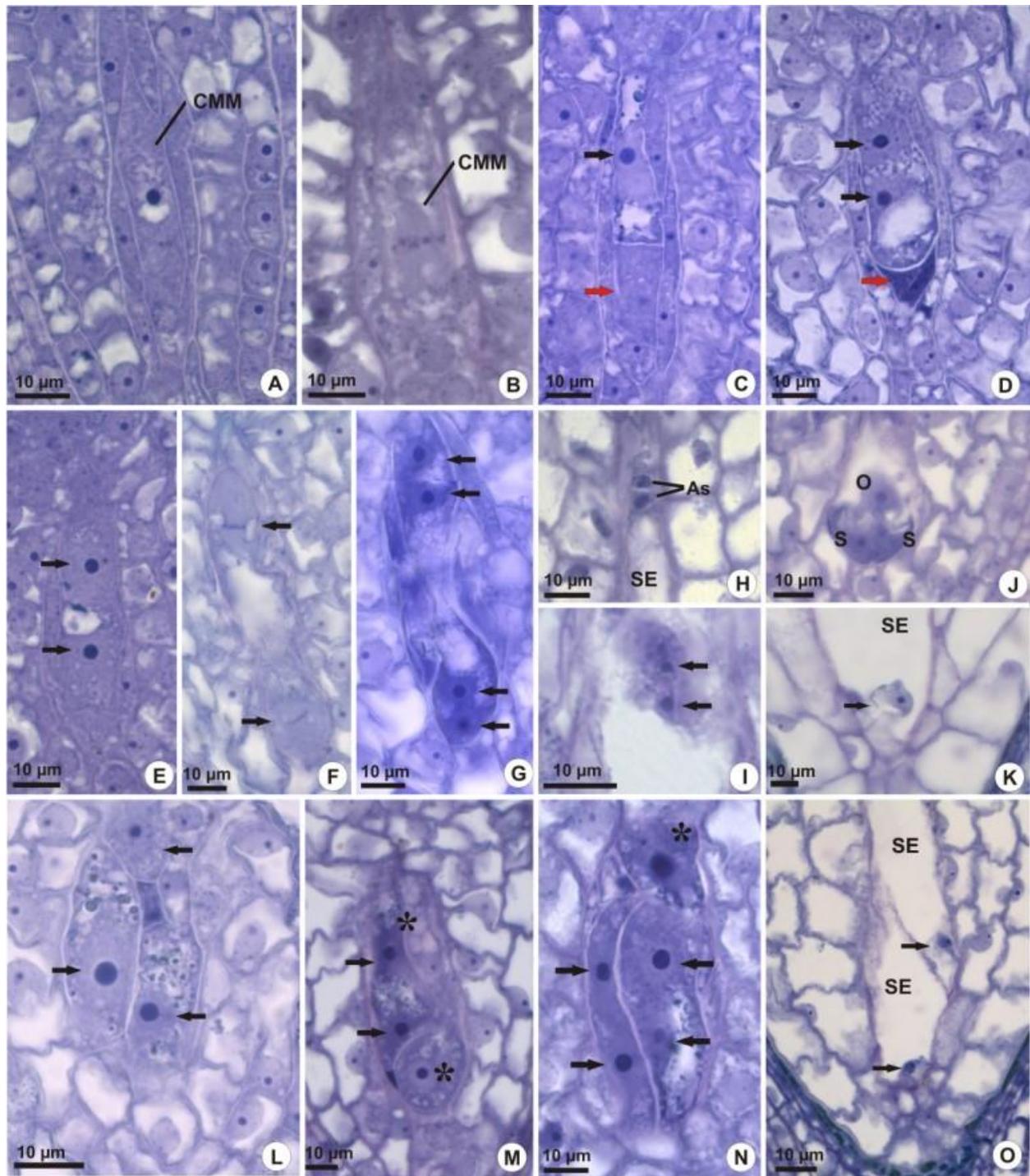
**Figura 5.** Desenvolvimento do saco embrionário diplospórico em *Ossaea amygdaloides*. **A.** e **B.** Célula-mãe de megásporo em início de desenvolvimento (**A**) e já bem diferenciada (**B**); **C.** Saco embrionário diplospórico mononucleado; **D.** e **E.** Saco embrionário diplospórico binucleado (setas) logo após a primeira mitose (**D**) e com os dois núcleos bem separados por um grande vacúolo (**E**); **F.** Núcleos calazal e micropilar de um saco embrionário diplospórico binucleado em anáfase (setas); **G.** Saco embrionário diplospórico tetranucleado (setas). **H.** Saco embrionário diplospórico com oosfera evidenciada CMM: célula-mãe de megásporos; O: oosfera.



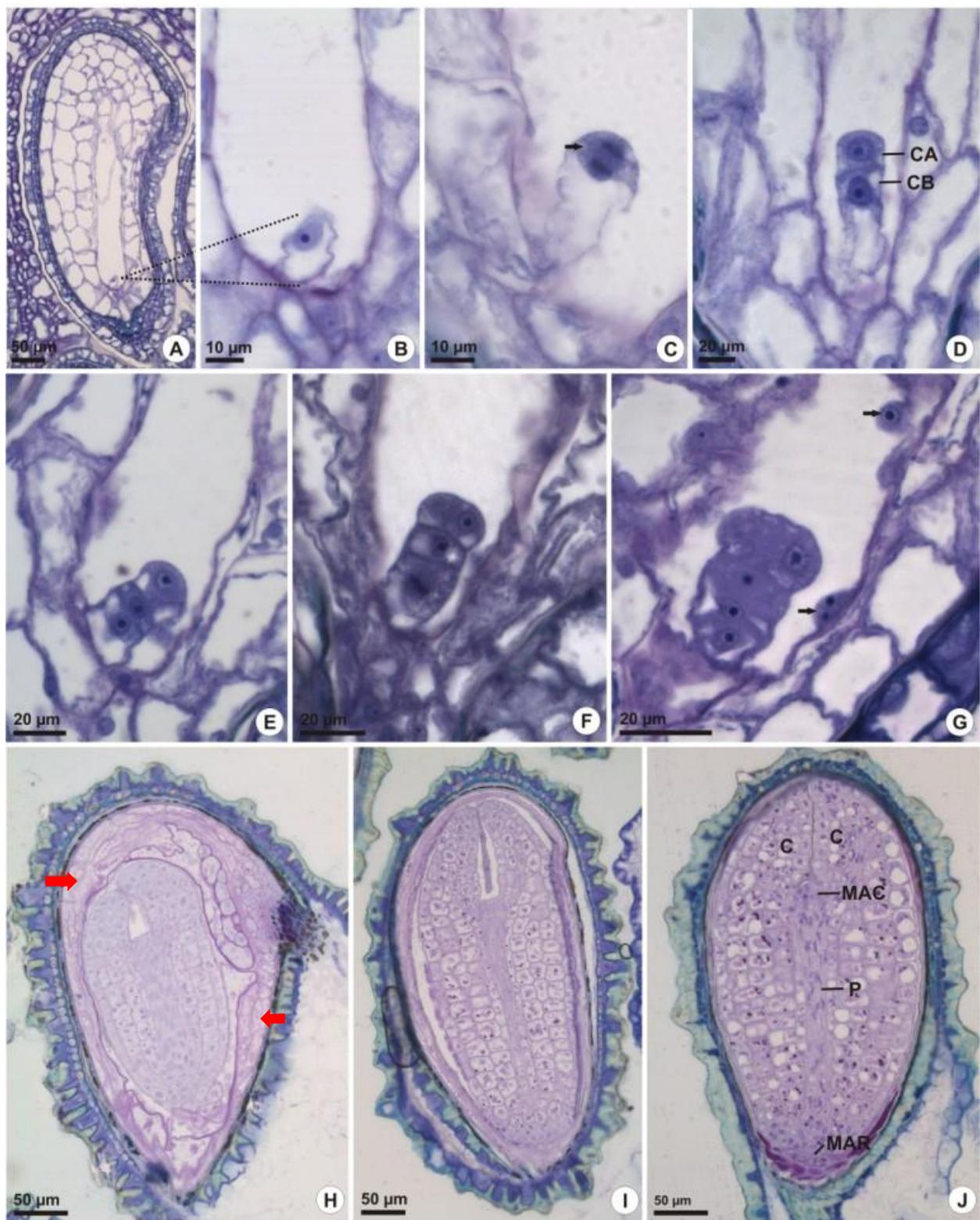
**Figura 6.** Desenvolvimento do saco embrionário diplospórico em *Ossaea confertiflora*. **A.** e **B.** Célula-mãe de megásporo em início de desenvolvimento (**A**) e já bem diferenciada (**B**); **C.** Saco embrionário diplospórico mononucleado; **D.** Saco embrionário diplospórico binucleado (setas). **E.** Núcleos calazal e micropilar de um saco embrionário diplospórico binucleado em metáfase e anáfase, respectivamente (setas); **F.** Saco embrionário diplospórico tetranucleado (setas) – imagem montada a partir de duas fotos de um mesmo saco embrionário, porém em planos diferentes; **G-I.** Detalhe do aparato oosférico (**G**), oosfera (**H**) e núcleos polares da célula média (**I**) (setas) de um saco embrionário diplospórico maduro. CMM: célula-mãe de megásporos; O: oosfera; S: sinérgide; SE: saco embrionário.



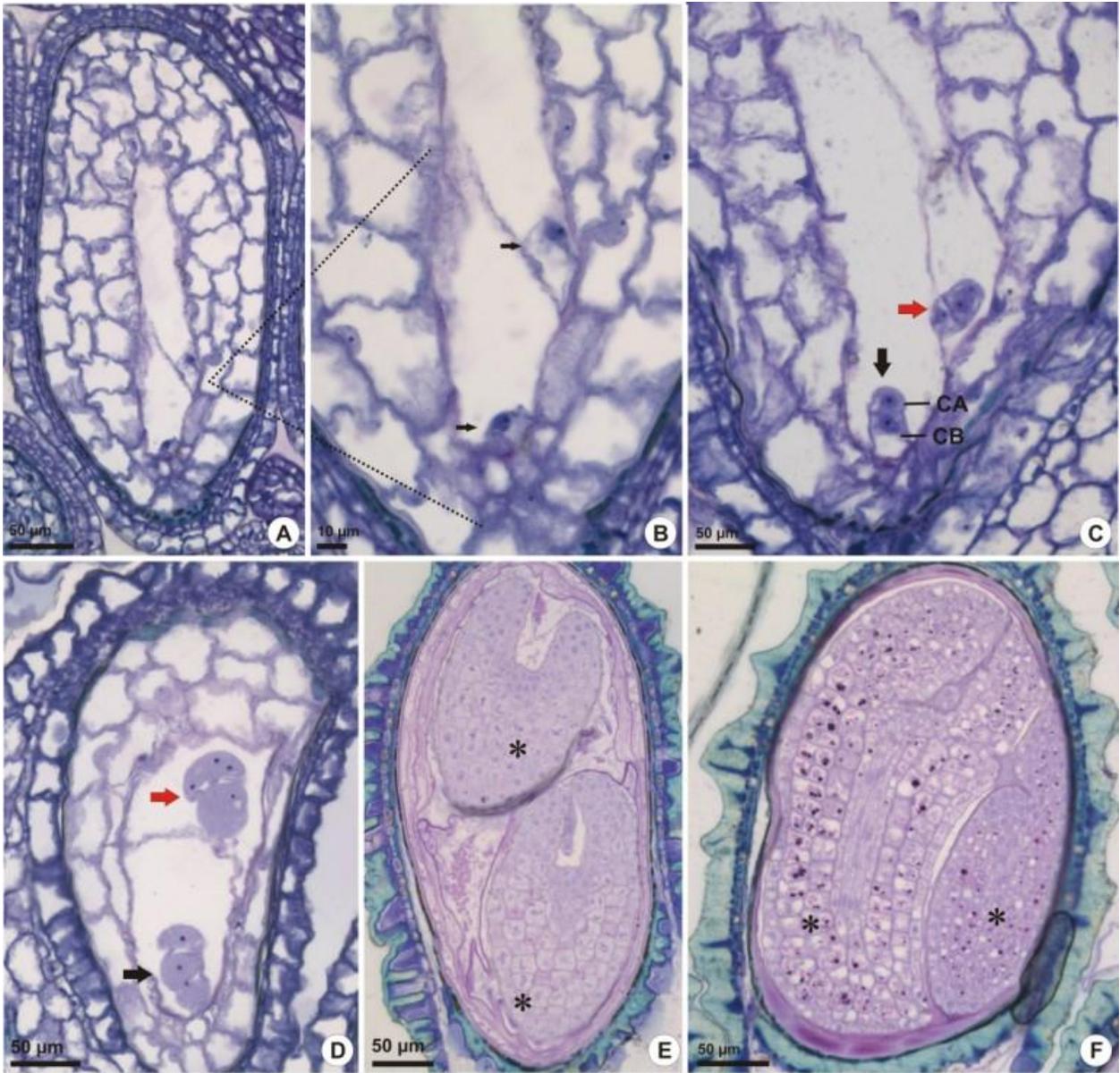
**Figura 7.** Desenvolvimento do saco embrionário diplospórico (**A-O**) e apospórico (**L-O**) em *Clidemia hirta*. **A.** e **B.** Célula-mãe de megásporo diferenciada (**A**) e em metáfase (**B**); **C.** Células calazal (seta preta) e micropilar (seta vermelha) de uma díade; **D.** Saco embrionário diplospórico binucleado (setas pretas) e célula micropilar da díade em degeneração (seta vermelha); **E.** Saco embrionário diplospórico binucleado (setas); **F.** Saco embrionário diplospórico binucleado com núcleos em metáfase (setas); **G.** Saco embrionário diplospórico tetranucleado (setas); **H-K.** Saco embrionário diplospórico maduro: detalhe das antípodas (**H**), núcleos polares (setas) da célula média (**I**), aparato oosférico (**J**) e oosfera (**K**); **L.** Célula-mãe megásporos e células nucleares adjacentes bem diferenciadas (setas); **M.** Saco embrionário binucleado (setas) e células nucleares adjacentes diferenciadas (estrelas); **N.** Dois sacos embrionários binucleados (setas) e célula adjacente diferenciada (estrela); **O.** Dois sacos embrionários com oosferas em evidência (setas). CMM: célula-mãe de megásporos; O: oosfera; S: sinérgide; SE: saco embrionário.



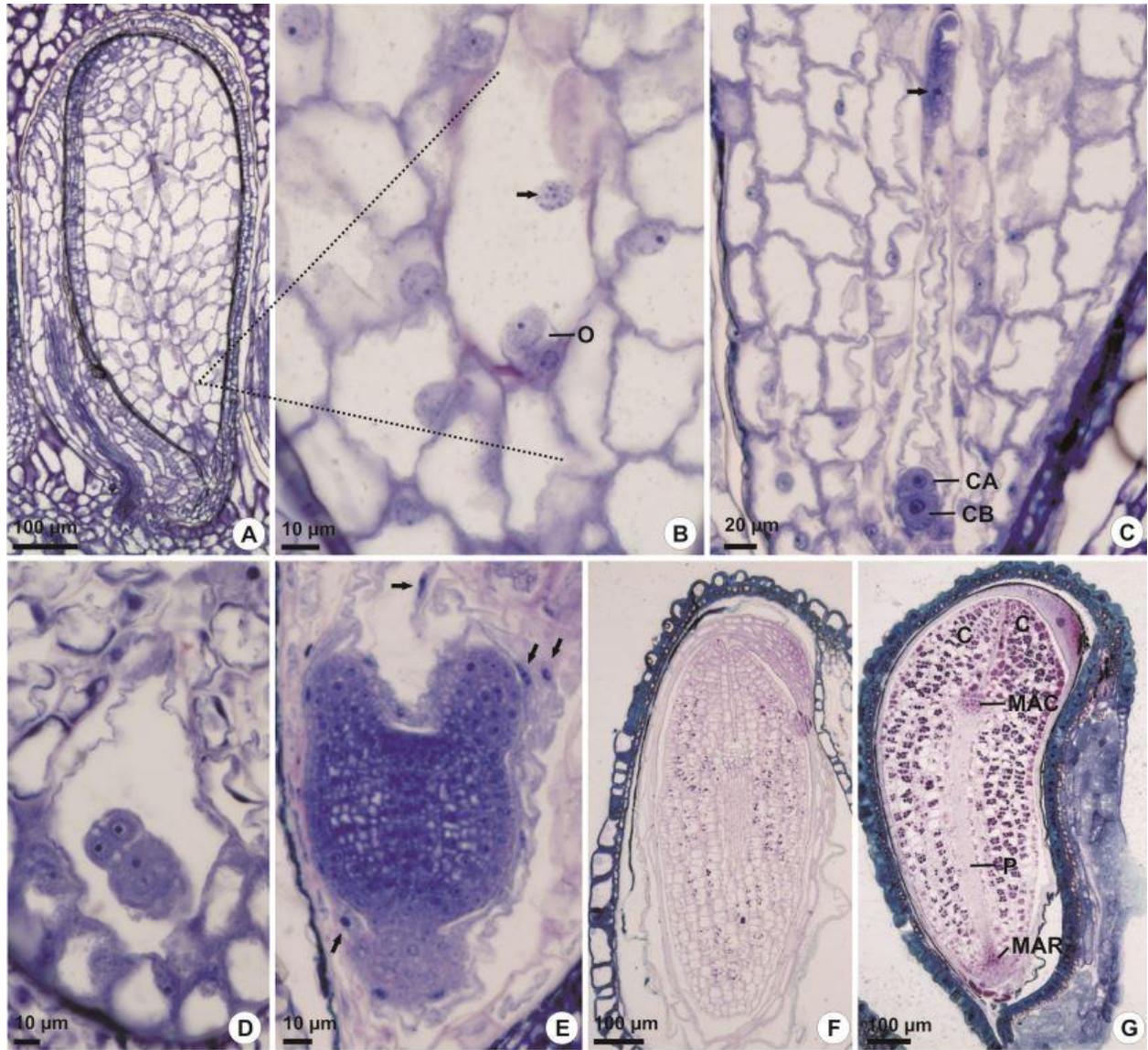
**Figura 8.** Desenvolvimento do embrião apomítico em sementes monoembriônicas de *Clidemia hirta*. **A.** Corte longitudinal de uma semente em início de desenvolvimento; **B.** Detalhe da figura anterior, oosfera em evidência; **C.** Divisão transversal da oosfera: metáfase; **D.** Proembrião bicelular; **E.** Proembrião após divisão transversal da célula basal; **F.** e **G.** Proembrião após divisão transversal da célula basal e longitudinal da célula apical, núcleos do endosperma evidentes (setas); **H-J.** Corte longitudinal de sementes em sucessivos estádios de desenvolvimento: embrião em estágio de torpedo inicial (**H**) e torpedo tardio com eixo hipocótilo-radicular e cotilédones visíveis (**I-J**); células nucelares acumulam conteúdo citoplasmático de reserva (**H**) (setas vermelhas). C: cotilédone; CA: célula apical; CB: célula basal; MAC: meristema apical caulinar; MAR: meristema apical radicular; P: procâmbio.



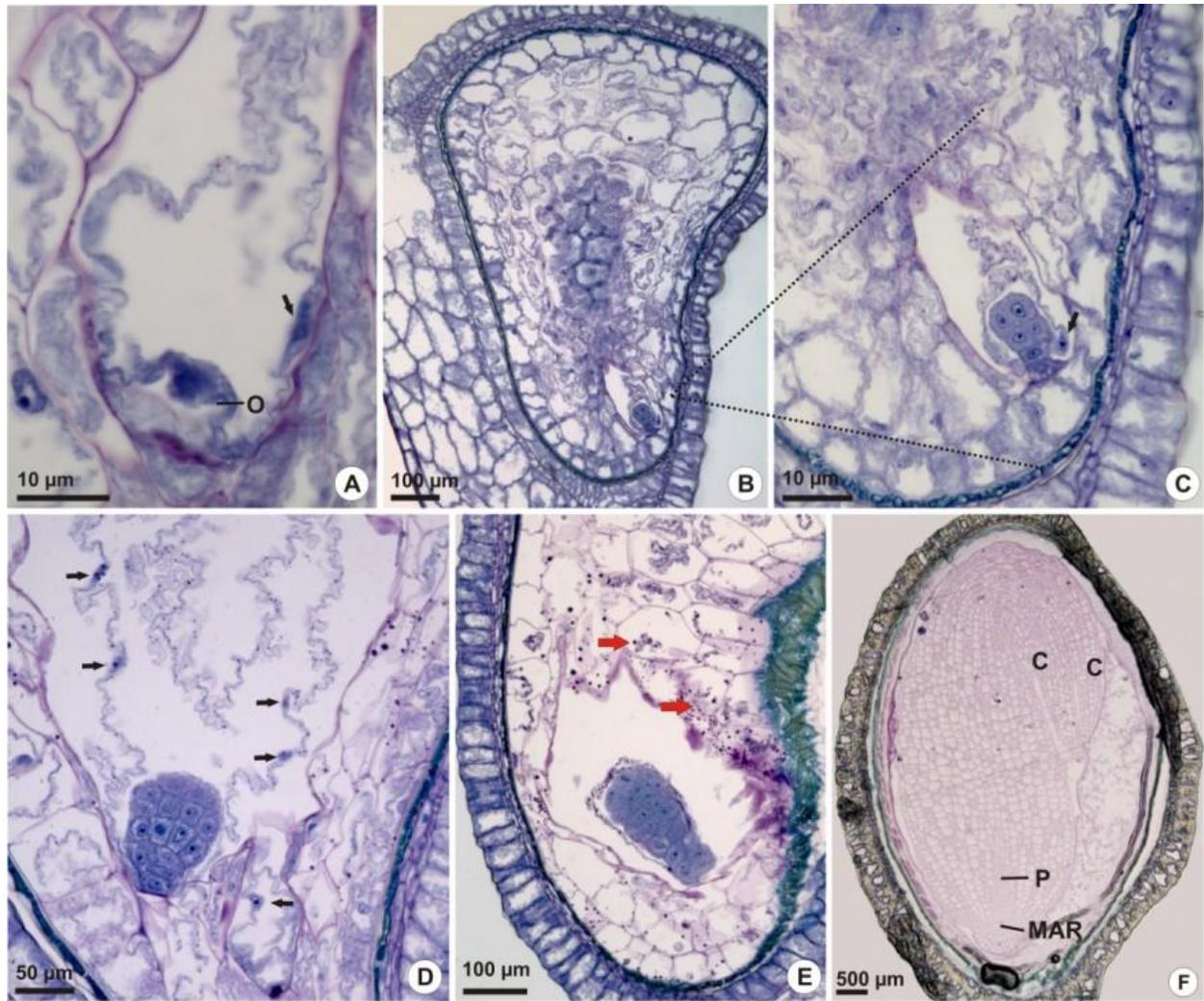
**Figura 9.** Desenvolvimento do embrião apomítico em sementes poliembriônicas em *Clidemia hirta*. **A.** Corte longitudinal de uma semente em início de desenvolvimento com dois sacos embrionários evidentes; **B.** Detalhe da figura anterior, com oosfera em evidência; **C.** Dois sacos embrionários com proembriões em estágio bicelular (seta preta) e proembrião após divisão transversal da célula basal (seta vermelha); **D.** Dois sacos embrionários com proembriões após primeira divisão da célula basal (seta preta) e após divisões longitudinais da célula apical (seta vermelha). **E** e **F.** Corte longitudinal de sementes poliembriônicas em sucessivos estádios de desenvolvimento: embrião em estágio de torpedo inicial (**E**) e torpedo tardio (**F**). CA: célula apical; CB: célula basal.



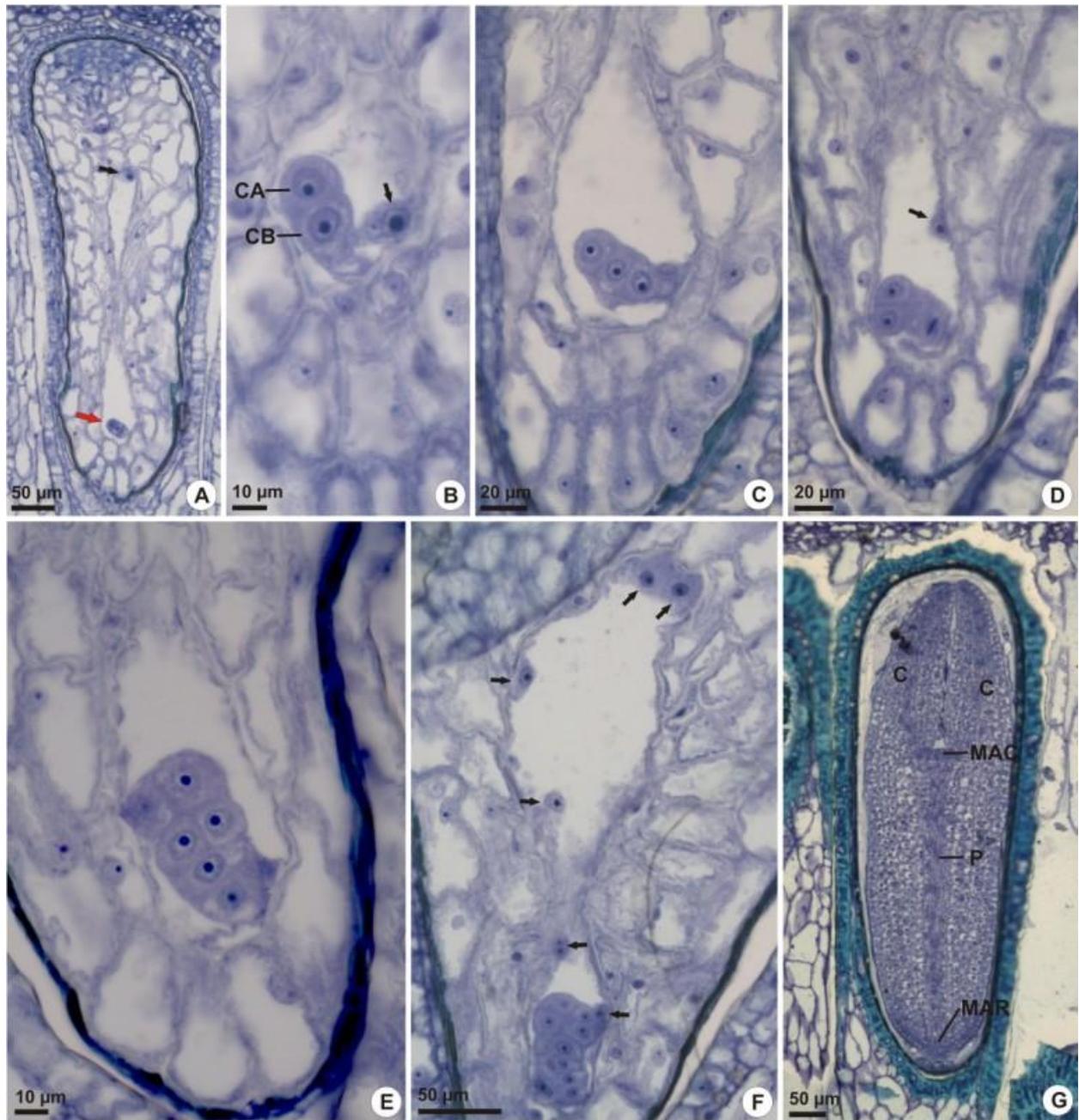
**Figura 10.** Desenvolvimento do embrião apomítico em *Leandra aurea*. **A.** Corte longitudinal de uma semente em início de desenvolvimento; **B.** Detalhe de **A**, evidenciando a oosfera quiescente e núcleo do endosperma (seta); **C.** Proembrião após divisão transversal da oosfera e núcleo do endosperma (seta); **D.** Detalhe de um proembrião logo após divisão longitudinal da célula apical; **E.** Embrião em estágio torpedo inicial e núcleos do endosperma em evidência (setas); **F.** e **G.** Sementes em sucessivos estádios de desenvolvimento: embrião com eixo hipocótilo-radicular e cotilédones visíveis. C: cotilédone; CA: célula apical; CB: célula basal; MAC: meristema apical caulinar; MAR: meristema apical radicular; O: oosfera; P: procâmbio.



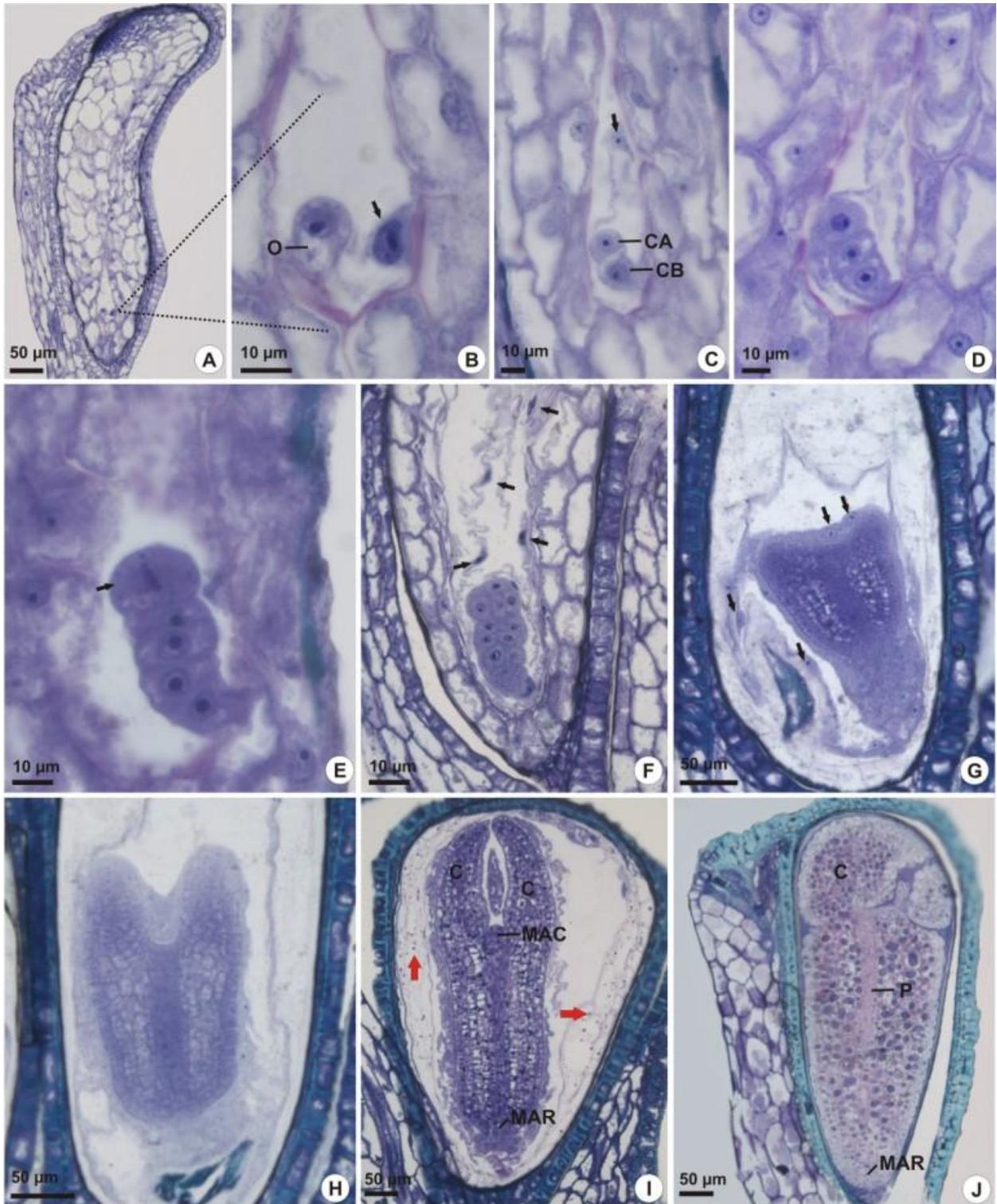
**Figura 11.** Desenvolvimento do embrião apomítico em *Miconia leucocarpa*. **A.** Oosfera e núcleo do endosperma (seta); **B.** Corte longitudinal da semente com proembrião; **C.** Detalhe da figura anterior, com proembrião e núcleo do endosperma (seta) evidenciados; **D.** e **E.** Embrião em estágio globular e núcleos do endosperma (setas); células nucelares acumulam conteúdo citoplasmático de reserva (setas vermelhas); **F.** Semente madura com eixo hipocótilo-radicular e cotilédones visíveis. C: cotilédone; MAR: meristema apical radicular; O: oosfera; P: procâmbio.



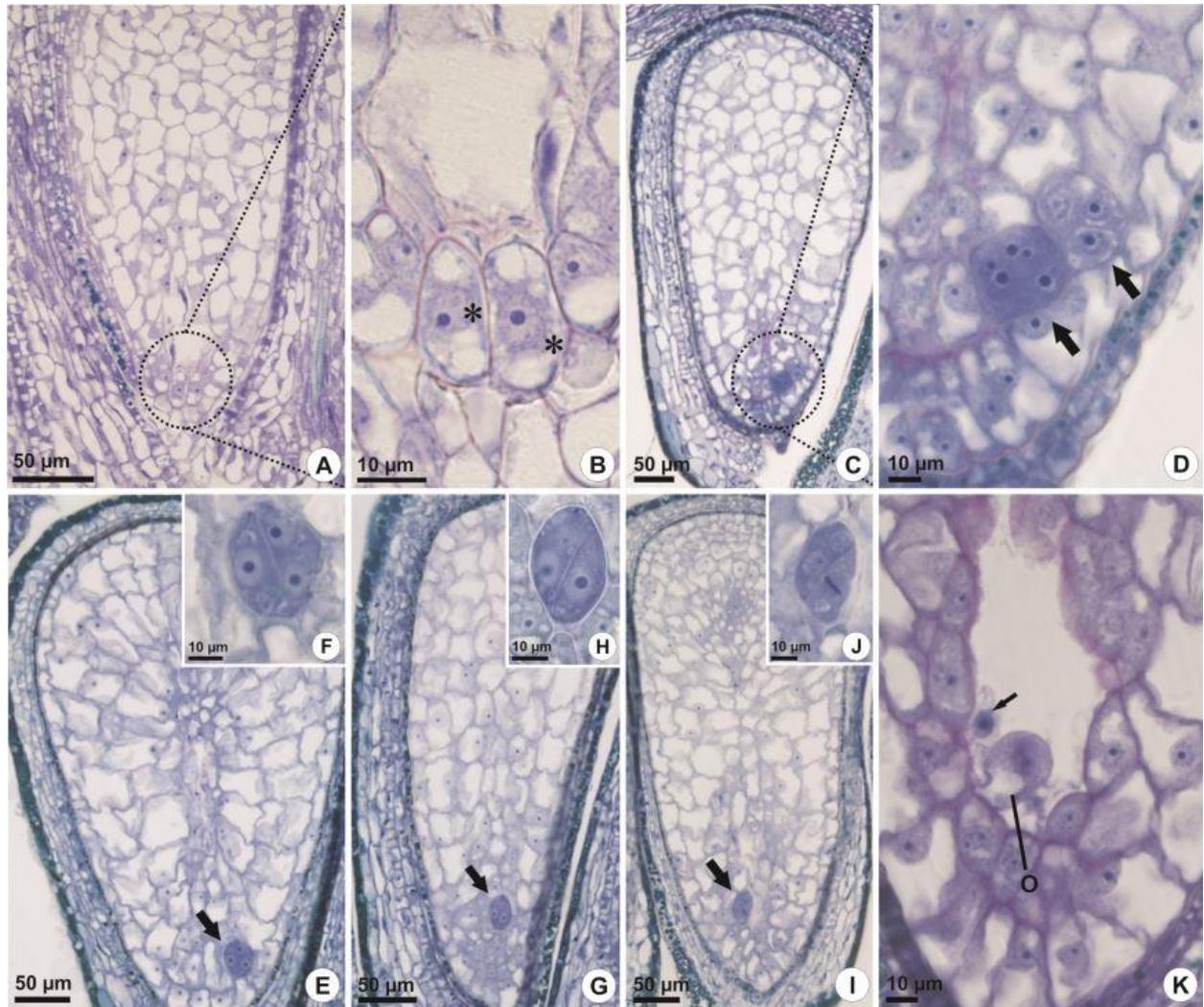
**Figura 12.** Desenvolvimento do embrião apomítico em *Ossaea amygdaloides*. **A.** Corte longitudinal da semente com proembrião (seta vermelha) e núcleo do endosperma (seta preta); **B.** Proembrião após divisão transversal da oosfera e núcleo do endosperma evidente (seta); **C.** Proembrião após divisão transversal da célula basal; **D.** Proembrião após divisão longitudinal da célula apical e núcleo do endosperma (seta); **E.** Proembrião: detalhe; **F.** Proembrião e núcleos do endosperma em proliferação (setas); **G.** Semente madura com eixo hipocótilo-radicular e cotilédones visíveis. C: cotilédone; CA: célula apical; CB: célula basal; MAC: meristema apical caulinar; MAR: meristema apical radicular; P: procâmbio.



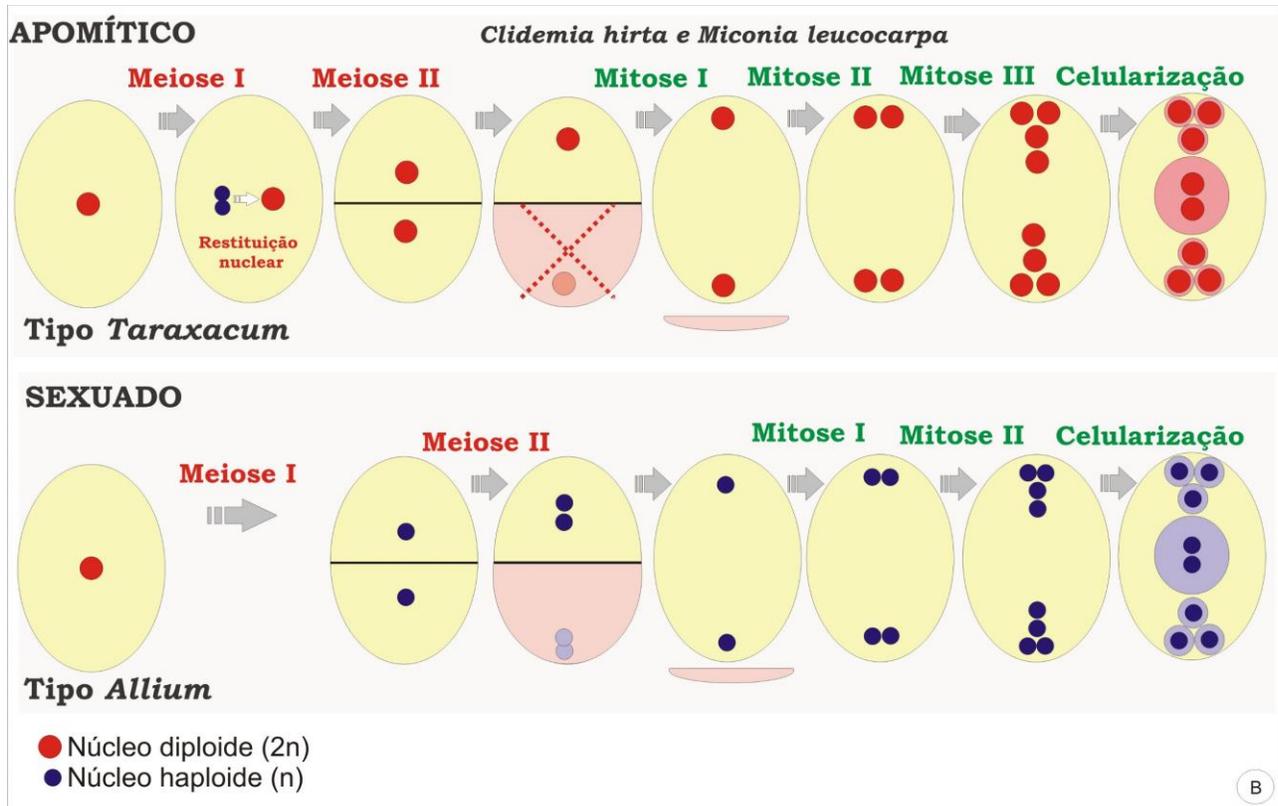
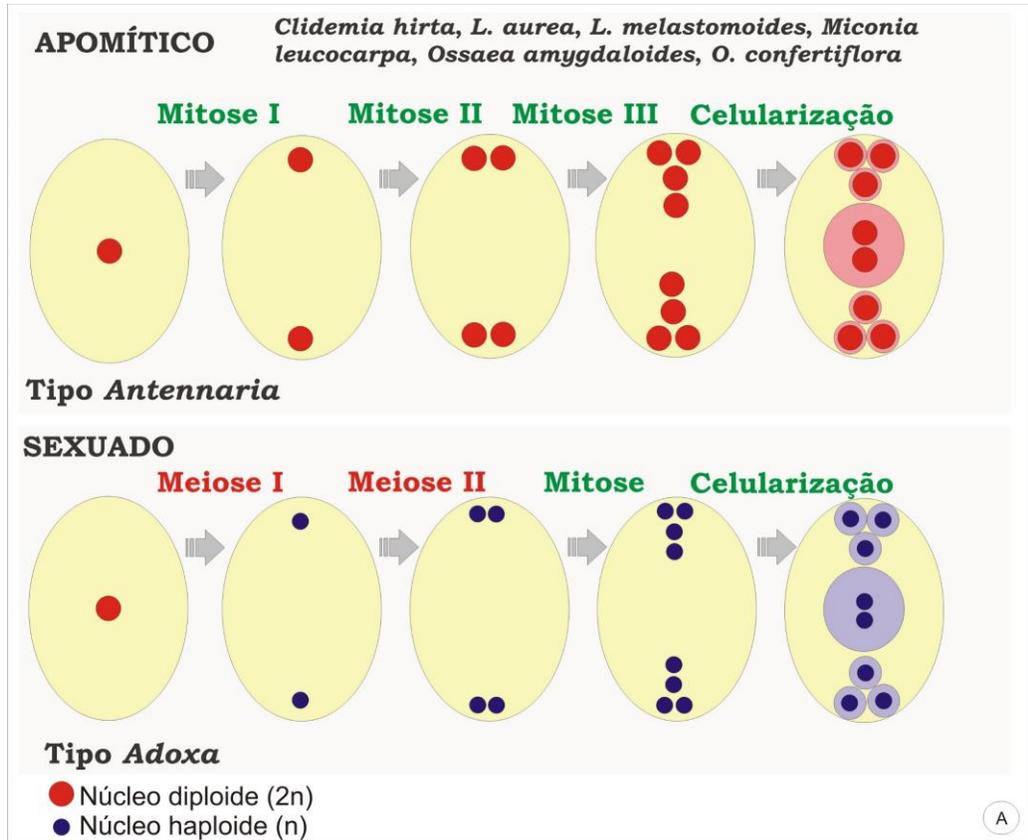
**Figura 13.** Desenvolvimento do embrião apomítico em *Ossaea confertiflora*. **A.** Corte longitudinal da semente em início de desenvolvimento; **B.** Oosfera e núcleo do endosperma (seta); **C.** Proembrião após divisão transversal da oosfera e núcleo do endosperma evidente (seta); **D.** Detalhe do proembrião após divisão transversal da célula basal; **E.** Proembrião após divisão longitudinal da célula apical; **F.** Embrião em estágio globular e núcleos do endosperma em proliferação (setas); **G.** Embrião em estágio cordiforme e núcleos do endosperma (setas); **H.** Embrião em estágio torpedo inicial; **I** e **J.** Sementes em estádios sucessivos de desenvolvimento: embrião em estágio torpedo tardio com eixo hipocótilo-radicular e cotilédones visíveis; células nucelares acumulam conteúdo citoplasmático de reserva (setas vermelhas). C: cotilédone; CA: célula apical; CB: célula basal; MAC: meristema apical caulinar; MAR: meristema apical radicular; O: oosfera; P: procâmbio.



**Figura 14.** Desenvolvimento do embrião adventício em *Leandra melastomoides*. **A.** Corte longitudinal da semente em início de desenvolvimento; **B.** Detalhe da figura anterior com células precursoras do embrião adventício em diferenciação (\*); **C.** Corte longitudinal da semente com embrião adventício; **D.** Detalhe da figura anterior evidenciando embriões adventícios em início de desenvolvimento (setas); **E-I:** Sementes com embriões adventícios em início de desenvolvimento: visão geral da semente com embriões sinalizados (setas) (**E**, **G**, e **I**); detalhes dos embriões adventícios (**F**, **H** e **J**); **K.** Oosfera e núcleo do endosperma (seta) em uma semente jovem. O: oosfera.



**Figura 15.** Representação esquemática para evidenciar as diferenças na formação de sacos embrionários apomíticos diplospóricos e sexuais com etapas de desenvolvimento semelhantes. **A.** Etapas do desenvolvimento de um saco embrionário do tipo *Antennaria* (apomítico) e *Adoxa* (sexuado). **B.** Etapas do desenvolvimento de um saco embrionário do tipo *Taraxacum* (apomítico) e *Allium* (sexuado).





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeda, F. & Chuang, T.I. 1992. Chromosome numbers and their systematic significance in some Mexican Melastomataceae. *Systematic Botany* 17(4): 583-593.
- Araújo, A.C.G., Mukhambetzhanov, S., Pozzobon, M.T., Santana, E.F. & Carneiro, V.T.C. 2000. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Revue Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste* 23:13-28.
- Asker, S.E. & Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Batygina, T.B. & Vinogradova, G.Y. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology* 38(3): 126-151.
- Bittencourt Jr., N.S. & Moraes, C.I.G. 2010. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae): a histological study of postpollination events. *Plant Systematics and Evolution* 288(1-2): 59-76.
- Borges, H.B.N. 1991. Biologia reprodutiva de quatro espécies de Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Bradley, J.E., Carman, J.G., Jamison, M.S. & Naumova, T.N. 2007. Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum* L. (Andropogoneae, Poaceae). *Sexual Plant Reproduction* 20(1): 9-17.
- Caetano, A.P.S. 2010. Apomixia e reprodução sexuada em espécies de *Miconia* Ruiz & Pavón, Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Caetano A.P.S., Simão, D.G., Carmo-Oliveira, R. & Oliveira, P.E. 2013. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. *Plant Systematics and Evolution* 299(7):1253-1262.

- Cortez, P.A. 2007. Embriologia de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), espécie agamospérmica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Costa, M.E., Sampaio, D.S., Paoli, A.A.S. & Leite, S.C.A.L. 2004. Poliembrião e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 27(2): 395-406.
- Dent-Acosta, S.R. & Breckon, G.J. 1991. Reproductive biology of six species of Melastomataceae in western Puerto Rico. First International Melastomataceae Symposium, Smithsonian Institution, Washington D.C.
- Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. *Plant Systematics and Evolution* 211(1): 13-29.
- Goldenberg, R. & Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24(3): 283-288.
- Goldenberg, R., Penneys, D.S., Almeda, F., Judd, W.S. & Michelangeli, F.A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. *International Journal of Plant Sciences* 169(7): 963-979.
- Grimanelli, D., García, M., Kaszas, E., Perotti, E. & Leblanc, Olivier. 2003. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165(3): 1521-1531.
- Haig, D. & Westoby, M. 1991. Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 33(1266): 1-13.
- Hörandl, E. 2006. The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist* 171: 525-538.
- Hörandl, E., Cosendai, A.C. & Temsch, E.V. 2008. Understanding the geographic distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach. *Plant Ecology & Diversity* 1(2): 309-320.

- Jassem, B. 1990. Apomixis in the genus *Beta*. *Apomixis Newsletter* 2: 7-23.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. Comparative embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5(10): 1425-1437.
- Koltunow, A.M. 2000. The genetic and molecular analysis of apomixis in the model plant *Hieracium*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 42(2): 61-72.
- Koltunow, A.M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574.
- Lakshmanan, K.K. & Ambegaokar, K.B. 1984. Polyembryony. *In Embryology of Angiosperms* (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 448-475.
- LeBlanc, O., Peel, M.D., Carman, J.G. & Savidan, Y. 1995. Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany* 82(1): 57-63.
- Martin, C.V., Little, D.P., Goldenberg, R. & Michelangeli, F.A. 2008. A phylogenetic evaluation of *Leandra* (Miconieae, Melastomataceae): a polyphyletic genus where the seeds tell the story, not the petals. *Cladistics* 24(3): 315-327.
- Mcdowell, E.M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100(8): 405-414.
- Melo, G.F.A. & Machado, I.C.S. 1996. Biologia da reprodução de *Henriettea succosa* DC. (Melastomataceae). *Revista Brasileira de Biologia* 56(2): 383-389.
- Melo, G.F.A., Machado, I.C. & Luceño, M. 1999. Reproducción de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. *Revista de Biología Tropical* 47(3): 359-363.
- Mendes-Rodrigues, C., Carmo-Oliveira, R., Talavera, S., Arista, M., Ortiz, P.L. & Oliveira, P.E. 2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae – Bombacoideae). *Plant Biology* 7(5): 533-540.
- Mendes-Rodrigues, C. & Oliveira, P.E. 2012. Polyembryony in Melastomataceae from Brazilian Cerrado: multiple embryos in a small world. *Plant Biology* 14(5): 845-853.

- Mendes-Rodrigues, C., Sampaio, D.S., Costa, M.E., Caetano, A.P.S., Ranal, M.A., Bittencourt Júnior, N.S. & Oliveira, P.E. 2012. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). *Flora* 207(4): 264-274.
- Meric, C. 2009a. Calcium oxalate crystals in *Aster squamatus* and *Bellis perennis* (Asteraceae: Astereae). *Phytologia balcanica* 15(2): 255-259.
- Meric, C. 2009b. Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Acta biologica cracoviensia Series Botanica* 51(1): 105-110.
- Messing, J. & Grossniklaus, U. 1999. Genomic imprinting in plants. *Results and Problems in Cell Differentiation* 25: 23-40.
- Michelangeli, F.A., Penneys, D.S., Giza, J., Soltis, D., Hils, M.H. & Skean, D.J.D. 2004. A preliminary phylogeny of the tribe Miconieae (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position. *Taxon* 53(2): 279-290.
- Naumova, T.N. 1992. *Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony*. CRC Press, Boca Raton.
- Naumova, T.N. 2008. Apomixis and amphimixis in flowering plants. *Cytology and Genetics* 42(3):179-188.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. *In Embryology of Angiosperms*, (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 475–518.
- Noyes, R.D. 2007. The evolutionary genetics of apomixis in *Erigeron* sect. *Phalacrocoma* (Asteraceae). *In Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives* (Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J., Sharbel, T., eds). ARG-Gantner, Ruggell. Pp. 337-358.
- Nybom, H. 1988. Apomixis versus sexuality in Blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* 160: 207–218.
- Oliveira, P.E., Gibbs, P.E., Barbosa, A.A. & Talavera, S. 1992. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian Cerrados. *Plant Systematics and Evolution* 160(3-4): 207-219.

- Ramirez, N. & Brito, Y. 1990. Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *American Journal of Botany* 77: 1260-1271.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76(2): 497-518.
- Richards, A.J. 1997. *Plant breeding systems*. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Rutishauser, A. 1982. *Introducción a la embriología y biología de la reproducción de las Angiospermas*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Sampaio, D.S., Bittencourt Júnior, N.S. & Oliveira, P.E. 2013. Sporophytic apomixis in polyploid *Anemopaegma* species (Bignoniaceae) from central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173(1): 77-91.
- Santos, A.P.M.S., Fracasso, C.M., Santos, M.L., Romero, R., Sazima, M. & Oliveira, P.E. 2012. Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. *Annals of Botany* 110(3): 667-679.
- Saraiva, L.C., Cesar, O. & Monteiro, R. 1996. Breeding systems of shrubs and trees of a Brazilian Savanna. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 39: 751-763.
- Savidan, Y. 2007. Apomixis in higher plants. *In Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives* (Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J., Sharbel, T., eds). ARG-Gantner, Ruggell. Pp 15–22.
- Sharbel, T.F., Voigt, M.L., Corral, J.M., Galla, G., Kumlehn, J., Klukas, C., Schreiber, F., Vogel, H. & Rotter, B. 2010. Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *The Plant Cell* 22(3): 655-671.
- Sobrevila, C. & Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution* 140(1): 19-37.
- Subramanyam, K. 1942. Gametogenesis and embryogeny in a few members of Melastomataceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 21: 69–85.
- Subramanyam, K. 1944. A contribution to the life-history of *Sonerila wallachii* Benn. *Proceedings of the Indian Academy Of Sciences* 19: 115-120.
- Subramanyam, K. 1948. An embryological study of *Melastoma malabathricum* L. *Journal of the Indian Botanical Society* 27: 11-19.

- Tobe, H. & Raven, P.H. 1983. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70(1):71–94.
- Tucker, M.R., Paech, N.A., Willemse, M.T.M. & Koltunow, A.M.G. 2001. Dynamics of callose deposition and  $\beta$ -1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic *Hieracium*. *Planta* 212(4): 487–98.
- Van Baarlen, P., van Dijk P.J., Hoekstra, R.F. & De Jong, J.H. 2000. Meiotic recombination in sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum officinale* L.). *Genome* 43(5): 827–835.
- Wen, X.S., Ye, X.L., Li, Y.Q., Chen, Z.L. & Xu, S.X. 1998. Embryological studies on apomixis in *Pennisetum squamulatum*. *Acta Botanica Sinica* 40(7): 598–604.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J. & Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169(1): 169-182.

**CAPÍTULO 3. CRYSTALS IN THE ANTHER WALL PROVIDES MORPHOLOGICAL MARKERS  
WITH POTENTIAL USE FOR MELASTOMATACEAE SYSTEMATICS**

**ABSTRACT**

Calcium oxalate crystals are highly insoluble salts widespread among plant tissues. The morphology and distribution of the crystals provide conservative characters with taxonomic value for some taxa, as observed in Melastomataceae. In this family, the crystals, usually of the druse-type, are reported for leaves and floral organs, including the anther wall, connective and intersporangial septum. The main goal of this study was to verify the crystal occurrence in the anther wall from 180 species and 64 genera of Melastomataceae and to test the taxonomic value for this character. All tribes of the family were sampled. Mature anthers were processed using anatomical routine techniques. Druses on the anther wall layers were observed in 89 species from seven of the 15 tribes analyzed, as a condition that has probably evolved multiple times inside the family. Apparently, this character-state could be used to distinguish Henrietteae from Astronieae, its sister group. In Blakeae, the character seems to separate *Blakea* and *Topobea* from its sister group, *Huilaea*. In Miconieae, specifically in the “Caribbean + *Conostegia*” clade, the druses in the anther wall can be considered a synapomorphy for the clade formed by *Conostegia* and *Miconia* species, separating this group from its sister group and from the related Caribbean species.

**Keywords:** calcium oxalate crystals; druses; anther wall; endothecium; middle layer.



## INTRODUCTION

Calcium oxalates are salts highly insoluble formed from oxalic acid and calcium (Franceschi & Nakata 2005). This kind of crystals is present in all photosynthetic organisms, with special abundance in gymnosperms and angiosperms (Franceschi & Horner 1980, Franceschi & Nakata 2005). The diversity of both shape and size, and the pattern of topological distribution of the crystals among plant tissues lead to several hypotheses about their role in plants, either regulating the calcium level or ionic balance, or acting as protection against herbivory, as detoxification or tissue support (Franceschi & Horner 1980, Finley 1999, Nakata 2003, Franceschi & Nakata 2005), among others functions.

Virtually all plant tissues can contain calcium oxalate crystals (Franceschi & Horner 1980, Nakata 2003, Coté 2009), and their distribution among species is highly variable (Franceschi & Nakata 2005). Based on the shape and grouping, they are classified as sand, raphide, druse, styloid and prismatic (Nakata 2003, Franceschi & Nakata 2005). Crystal occurrence and type along with its distribution are characters considered as conservative in plants (Nakata 2003), and of taxonomic value (Prychid & Rudall 1999, Lersten & Horner 2000, Molano-Flores 2001, Franceschi & Nakata 2005).

The occurrence of calcium oxalate crystals in the anther wall layers was already reported for the tapetum and the endothecium in species of Asteraceae (Horner 1977, Méric & Dane 2004, Méric 2009a, b), for the tapetum in species of Fabaceae and Commelinales (Buss & Lersten 1972, Prychid *et al.* 2003) and for the hypodermal stomium in species of Solanaceae and Ericaceae (Horner Jr & Wagner 1980, 1992, Lersten 2004, D'arcy *et al.* 1996).

Melastomataceae Juss. is an angiosperm group in which the occurrence and type of calcium oxalate crystals seem to be of taxonomic value (Ter Welle & Mennega 1977, Baas 1981, Judd 1989, Penneys *et al.* 2010). The most common reports for this family are druses in leaves (Metcalfé & Chalk 1950, Costa 1977, Baumgratz & Ferreira 1980, Baas 1981, Baumgratz & Ferreira 1984, Mentink & Baas 1992, Souza & Marquete 2000, Reis *et al.* 2005, Gardoni *et al.* 2007), and in floral organs (Eyde & Teeri 1967, Clausning *et al.* 2000, Goldenberg *et al.* 2003, Puglissi 2007, Garcia 2009, Fernandes 2011), including the anther connective, the intersporangial septum and the anther wall layers (Goldenberg *et al.* 2003, Caetano 2010, Fernandes 2011, Cortez *et al.* 2014).

This family is monophyletic, but intrafamilial relationships are still under debate (Clausning & Renner 2001, Fritsch *et al.* 2004, Penneys *et al.* 2010, Michelangeli *et al.* 2011, Goldenberg *et al.* 2012, Michelangeli *et al.* 2013). One of the problems assessing systematic approaches in the family is the lack of synapomorphies for clades in all levels. The crystal occurrence, type and distribution in the anther wall from a large number of species systematically chosen and the available phylogenies can be used as a tool to elucidate some unresolved questions on the systematics of this tropical diverse group. Thus, the main goal of this study is to verify the occurrence of crystals in the anther wall of several lineages of Melastomataceae in a phylogenetic context in order to test the value of this character for systematics studies in the family.

## **MATERIAL AND METHODS**

A total of 180 species, belonging to 64 genera distributed in 15 groups currently recognized in Melastomataceae (Clausning & Renner 2001, Stone 2006, Goldenberg *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009, Penneys *et al.* 2010, Reginato *et al.* 2010, Mendoza-Cifuentes

& Fernández-Alonso 2011, Penneys & Judd 2013, Goldenberg *et al.* 2012, Kriebel 2014, Michelangeli *et al.* 2013) were sampled. The mature anthers used in this study came from both materials preserved in alcohol and from herbarium specimens (see appendix for details); anthers from herbarium specimens were rehydrated prior to the embedding process (Smith & Smith 1942).

All samples were embedded in historesin (Leica and Heraeus Kulzer GmbH, Germany) and mainly longitudinally sectioned using a rotary microtome with blade steel. The 5.0  $\mu\text{m}$  thick sections were adhered to glass slides and stained with Toluidine Blue (C.I. 52040) solution (0.05% in phosphate buffer 0.01 M and pH 6.8). The anther sections were observed using a light microscope equipped with light polarization system (DM 5000 and DM 4500, Leica, Germany). Digital images were taken using a digital camera (DFC 295 and DFC 490, Leica, Germany) coupled to the light microscope.

## RESULTS

Most species showed epidermis and endothecium in the mature anther wall (Fig. 1A), but anthers from open flowers can exhibit only the epidermis (Fig. 1B). In addition, approximately 30 species from all tribes except Astronieae, Dissochateae + Sonerileae, Bertolonieae 2 and Rhexieae, presented one or more layers below the endothecium, probably corresponding to the middle layer. This multilayered anther wall was observed, for example, in *Mouriri acutiflora* (Olisbeoideae), *Pterandra echineta* (Kibessieae), *Bellucia aequiloba* and *Loreya mespiloides* (Henrietteae), *Blakea gracilis* (Blakeeae), *Microlicia fasciculata* and *Rhynchanthera grandiflora* (Microlicieae) (Figs. 1C-E), among others.

Secondary wall thickenings in the endothecium were observed only in *Memecylon*, *Mouriri* and *Votomita* species (Olisbeoideae) (Figs. 1E-F). All other groups lack members with a lignified endothelial cells.

Druses were observed in the anther wall in 89 species from seven of the 15 groups studied: Henrietteae, Blakeae, Microlicieae, Melastomeae, Cyphostyleae, Merianieae and Miconieae (Fig. 2). Druses were almost always found in the endothecium cell layer (Fig. 1A), but 11 species showed druses in the layers below the endothecium: *Bellucia aequiloba* (Fig. 1D), *Henriettea ramiflora*, *Loreya mespiloides*, *Blakea gracilis*, *B. schlimii*, *Wurdastom ecuadorensis*, *Rhynchanthera grandiflora*, *Microlicia euphorbioides*, *M. fasciculata*, *Melastoma denticulatum* and *Tococa capitata*. The data for druses occurrence in the anther wall layers were synthesized in the table 1.

In Henrietteae, species of *Bellucia*, *Henriettea* and *Loreya* exhibited druses in the anther wall (Figs. 3 A-C) (table 1). Megastyloids were found only in the connective in Henrietteae members (Fig. 3D) and in *Astronia candolleana* (Astronieae) (Fig. 3E).

In Blakeae druses in the anther wall were observed in species of *Blakea* and *Topobea* (Figs. 3F-G), but they were not present in species from *Huilaea* (Fig. 3H) (table 1).

In Microlicieae druses in the anther wall occurred in species of *Microlicia* and *Rhynchanthera* (Figs. 3 I-J) but not in species of *Lavoisiera* (Fig. 3K) (table 1).

*Melastoma denticulatum* (Melastomeae) (Fig. 3L), *Wurdastom ecuadorensis* (Cyphostyleae) (Fig. 3M) and *Centronia laurifolia* (Merianieae) (Fig. 3N) (table 1) were the only species in each of these tribes to present druses in the anther wall layers.

In Miconieae, druses in the anther wall were found in all the analyzed species of the “*Miconia* I” (Figs. 4A-C), “*Miconia* II” (Fig. 4D), “*Leandra* + *Ossaea*” (Figs. 4E-F), “*Tococa*” (Fig. 4G), “*Mecranium* + *Anaectocalyx*” (Figs. 4H-I), “*Leandra* s.s. + *Pleiochiton*”

clades (Figs. 4J-O) and of the “*Clidemia*” grade (Figs. 4P-R). No druses were found in *Eriocnema*. The occurrence of druses is variable in the “Caribbean + *Conostegia*” (Figs. 5A-C), “*Miconia* III” (Figs. 5D-F), “*Miconia* IV + *Ossaea*” clades (Figs. 5G-I) and in the “*Miconia* V” grade (Figs. 5J-L).

**Table 1. continued**

**Table 1.** Occurrence (+ = present; - = absent) of druses in the mature anther wall layers in Melastomataceae species.

	<b>Tribes/species</b>	<b>Druses Occurrence</b>
<b>External groups: Myrtales</b>	<i>Ludwigia</i> sp	-
	<i>Syzygium jambos</i>	-
<b>Olisbeoideae</b>	<i>Memecylon lateriflorum</i> (G. Don) Bremek.	-
	<i>Mouriri acutiflora</i> Naudin	-
	<i>Mouriri guianensis</i> Aubl.	-
	<i>Mouriri</i> sp.	-
	<i>Votomita guianensis</i> Aubl.	-
<b>Kibessieae</b>	<i>Pternandra echinata</i> Jack	-
	<i>Pternandra coerulescens</i> Jack	-
<b>Astronieae</b>	<i>Astronia candolleana</i> Cogn.	-
<b>Henrietteae</b>	<i>Bellucia aequiloba</i> Pilg.	+
	<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana	+
	<i>Henriettea ramiflora</i> (Sw.) DC.	+
	<i>Henriettea saldanhaei</i> Cogn.	+
	<i>Henriettea succosa</i> (Aubl.) DC.	+
	<i>Loreya mespiloides</i> Miq.	+
<b>Bertolonieae (1)</b>	<i>Bertolonia mosenii</i> Cogn.	-
	<i>Phainantha laxiflora</i> (Triana) Gleason	-
<b>Dissochateae + Sonerileae</b>	<i>Amphiblemma mildbraedii</i> Gilg ex Engl.	-
	<i>Boyania ayangannae</i> Wurdack	-
	<i>Diplectria divaricata</i> (Willd.) Kuntze	-
<b>Blakeeae</b>	<i>Blakea gracilis</i> Hemsl.	+
	<i>Blakea schlimii</i> (Naudin) Triana	+
	<i>Blakea portentosa</i> Wurdack	+
	<i>Huilaea ecuadorensis</i> Wurdack	-
	<i>Topobea multiflora</i> (D. Don) Triana	+
<b>Cyphostyleae</b>	<i>Allomaieta grandiflora</i> Gleason	-
	<i>Wurdastom ecuadorensis</i> (Wurdack) B. Walln.	+
<b>Bertolonieae (2)</b>	<i>Diplarpea paleacea</i> Triana	-
	<i>Monolena primuliflora</i> Hook. f.	-
	<i>Triolena amazonica</i> (Pilg.) Wurdack	-
	<i>Triolena obliqua</i> (Triana) Wurdack	-

**Table 1. continued**

	<b>Tribes/species</b>	<b>Druses Occurrence</b>
<b>Merianthera &amp; allies</b>	<i>Behuria glutinosa</i> Cogn.	-
	<i>Cambessedesia espora</i> (A. St.-Hil. ex Bonpl.) DC.	-
	<i>Dolichoura spiritusanctensis</i> Brade	-
	<i>Huberia consimilis</i> Baumgratz	-
	<i>Huberia ovalifolia</i> DC.	-
	<i>Merianthera bullata</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	-
	<i>Merianthera parvifolia</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	-
<b>Rhexieae</b>	<i>Arthrostemma ciliatum</i> Pav. ex D. Don	-
	<i>Rhexia virginica</i> L.	-
<b>Microlicieae</b>	<i>Rhynchanthera grandiflora</i> (Aubl.) DC.	+
	<i>Lavoisiera cordata</i> Cogn.	-
	<i>Microlicia euphorbioides</i> Mart.	+
	<i>Microlicia fasciculata</i> Mart. ex Naudin	+
<b>Marcetia alliance</b>	<i>Comolia microphylla</i> Benth.	-
	<i>Ernestia glandulosa</i> Gleason	-
	<i>Macairea radula</i> (Bonpl.) DC.	-
	<i>Marcetia taxifolia</i> (A. St.-Hil.) DC.	-
	<i>Nepsera aquatica</i> (Aubl.) Naudin	-
<b>Melastomeae</b>	<i>Brachyotum ledifolium</i> (Desr.) Triana	-
	<i>Castratella piloselloides</i> (Bonpl.) Naudin	-
	<i>Desmocelis villosa</i> Naudin	-
	<i>Dissotis rotundifolia</i> (Sm.) Triana	-
	<i>Heterocentron elegans</i> (Schltdl.) Kuntze	-
	<i>Melastoma denticulatum</i> Labill.	+
	<b>Core Melastomeae</b>	
	<i>Monochaetum calcaratum</i> (DC.) Triana	-
	<i>Monochaetum meridense</i> (Klotzsch ex H.Karst.) Naudin	-
	<i>Osbeckia chinensis</i> L.	-
	<i>Pterolepis glomerata</i> (Rottb.) Miq.	-
	<i>Tibouchina clavata</i> (Pers.) Wurdack	-
	<i>Tibouchina clinopodifolia</i> (DC.) Cogn.	-
<i>Tibouchina urvilleana</i> (DC.) Cogn.	-	

**Table 1. continued**

	<b>Tribes/species</b>	<b>Druses Occurrence</b>
<b>Merianieae</b>	<i>Axinaea grandifolia</i> (Naudin) Triana	-
	<i>Centronia laurifolia</i> D. Don	+
	<i>Graffenrieda gracilis</i> (Triana) L.O. Williams	-
	<i>Graffenrieda harlingii</i> Wurdack	-
	<i>Graffenrieda latifolia</i> (Naudin) Triana	-
	<i>Macrocentrum cristatum</i> (DC.) Triana	-
	<i>Meriania macrophylla</i> (Benth.) Triana	-
	<i>Meriania subumbellata</i> Cogn.	-
	<i>Meriania tomentosa</i> (Cogn.) Wurdack	-
	<i>Meriania urceolata</i> Triana	-
<b>Miconieae</b>	<i>Eriocnema acaulis</i> Triana	-
	<i>Eriocnema fulva</i> Naudin	-
	<b>Miconia I</b> <i>Miconia dodecandra</i> Cogn.	+
	<i>Miconia mirabilis</i> (Aubl.) L.O. Williams	+
	<i>Miconia superba</i> Ule	+
	<b>Miconia II</b> <i>Miconia centrodesma</i> Naudin	+
	<i>Miconia duckei</i> Cogn.	+
	<b>Leandra + Ossaea</b> <i>Leandra reversa</i> (DC.) Cong.	+
	<i>Ossaea capillaris</i> (D. Don) Cogn.	+
	<b>Tococa</b> <i>Tococa capitata</i> Traill ex Cogn.	+
	<i>Tococa guianensis</i> Aubl.	+
	<b>Caribbean</b> <i>Charianthus alpinus</i> (Sw.) R.A. Howard	-
	<i>Charianthus nodosus</i> (Desr.) Triana	-
<i>Tetrazygia crotonifolia</i> (Desr.) DC.	-	
<i>Tetrazygia elaeagnoides</i> (Sw.) DC.	-	
<b>Conostegia</b>	<i>Clidemia mortoniana</i> Standl.	-
	<i>Clidemia spectabilis</i> Gleason	-
	<i>Conostegia icosandra</i> (Sw. ex Wikstr.) Urb.	+
	<i>Conostegia bigibbosa</i> Cogn.	+
	<i>Conostegia montealegreana</i> Cogn.	+
	<i>Conostegia speciosa</i> Naudin	+
	<i>Conostegia subcrustulata</i> (Beurl.) Triana	+
	<i>Conostegia tenuifolia</i> Donn. Sm.	+
<i>Conostegia xalapensis</i> (Bonpl.) D. Don ex DC.	+	

**Table 1. continued**

	<b>Tribes/species</b>	<b>Druses Occurrence</b>
	<i>Miconia friedmaniorum</i> Almeda & Umaña	+
<b>Conostegia</b>	<i>Miconia ligulata</i> Almeda	+
	<i>Miconia schlimii</i> Triana	+
<b>Mecranium, Anaectocalyx</b>	<i>Mecranium acuminatum</i> (DC.) Skean	+
	<i>Mecranium latifolium</i> (Cogn.) Skean	+
	<i>Miconia ciliata</i> (Rich.) DC.	+
<b>Miconia III</b>	<i>Leandra subseriata</i> (Naudin) Cogn.	+
	<i>Miconia corymbiformis</i> Cogn.	+
	<i>Miconia crocea</i> (Desr.) Naudin	+
	<i>Miconia denticulata</i> Naudin	+
	<i>Miconia goniostigma</i> Triana	+
	<i>Miconia papillosa</i> (Desr.) Naudin	-
	<i>Miconia stenobotrys</i> (Rich.) Naudin	+
	<i>Miconia theaezans</i> Cogn.	+
<b>Miconieae</b>	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	-
	<i>Miconia cabucu</i> Hoehne	-
	<i>Miconia capixaba</i> R. Goldenb.	-
	<i>Miconia cercophora</i> Wurdack	+
	<i>Miconia chartacea</i> Triana	-
	<i>Miconia cinerascens</i> Miq.	-
	<i>Miconia collatata</i> Wurdack	-
	<i>Miconia cubatanensis</i> Hoehne	-
	<i>Miconia donaeana</i> Naudin	+
	<i>Miconia fallax</i> DC.	-
<b>Miconia IV + Ossaea</b>	<i>Miconia fasciculata</i> Gardner	+
	<i>Miconia hyemalis</i> A. St.-Hil. & Naudin	-
	<i>Miconia laevigata</i> (L.) DC.	-
	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	-
	<i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl.) DC.	-
	<i>Miconia octopetala</i> Cogn.	-
	<i>Miconia pepericarpa</i> DC.	-
	<i>Miconia rufescens</i> (Aubl.) DC.	-
	<i>Miconia serrulata</i> (DC.) Naudin	+

**Table 1. continued**

	<b>Tribes/species</b>	<b>Druses Occurrence</b>	
	<i>Miconia stenostachya</i> DC.	-	
<b>Miconia IV + Ossaea</b>	<i>Ossaea macrophylla</i> (Benth.) Cogn.	+	
	<i>Ossaea micrantha</i> (Sw.) Macfad. ex Cogn.	+	
	<i>Ossaea robusta</i> (Triana) Cogn.	+	
	<i>Leandra rufescens</i> (DC.) Cogn.	+	
	<i>Miconia calvescens</i> DC.	-	
	<i>Miconia ceramicarpa</i> (DC.) Cogn.	+	
	<i>Miconia chamissois</i> Naudin	-	
	<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Triana	-	
	<i>Miconia jucunda</i> (DC.) Triana	-	
<b>Miconia V</b>	<i>Miconia paniculata</i> (DC.) Naudin	-	
	<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.	-	
	<i>Miconia pusilliflora</i> (DC.) Naudin	-	
	<i>Miconia rugosa</i> Triana	-	
	<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	-	
	<i>Miconia tomentosa</i> (Rich.) D. Don ex DC.	+	
	<i>Miconia tristis</i> Spring	-	
		<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	+
		<i>Clidemia octona</i> (Bonpl.) L.O. Williams	+
		<i>Clidemia rubra</i> (Aubl.) Mart.	+
	<i>Clidemia sericea</i> D. Don	+	
<b>Clidemia</b>	<i>Clidemia strigillosa</i> (Sw.) DC.	+	
	<i>Clidemia urceolata</i> DC.	+	
	<i>Leandra clidemioides</i> (Naudin) Wurdack	+	
	<i>Maieta guianensis</i> Aubl.	+	
	<i>Maieta poeppigii</i> Mart. ex Cogn.	+	
		<i>Clidemia blepharodes</i> DC.	+
		<i>Leandra amplexicaulis</i> DC.	+
	<b>Leandra s.s. + Pleiochiton</b>	<i>Leandra aurea</i> (Cham.) Cogn.	+
<i>Leandra australis</i> (Cham.) Cogn.		+	
<i>Leandra carassana</i> (DC.) Cogn.		+	

**Table 1. continued**

		<b>Tribes/species</b>	<b>Druses Occurrence</b>
		<i>Leandra dasytricha</i> (A. Gray) Cogn.	+
		<i>Leandra echinata</i> Cogn.	+
		<i>Leandra fragilis</i> Cogn.	+
		<i>Leandra humilis</i> (Cogn.) Wurdack	+
		<i>Leandra ionopogon</i> (Mart.) Cogn.	+
		<i>Leandra itatiaiae</i> (Wawra) Cogn.	+
		<i>Leandra melastomoides</i> Raddi	+
		<i>Leandra purpurascens</i> (DC.) Cogn.	+
		<i>Leandra quinquentata</i> (DC.) Cogn.	+
		<i>Leandra refracta</i> Cogn.	+
<b>Miconieae</b>	<b><i>Leandra s.s.</i> + <i>Pleiochiton</i></b>	<i>Leandra regnellii</i> (Triana) Cogn.	+
		<i>Leandra salicina</i> (Ser. ex DC.) Cogn.	+
		<i>Leandra sulfurea</i> (Naudin) Cogn.	+
		<i>Leandra xanthocoma</i> (Naudin) Cogn.	+
		<i>Leandra xanthostachya</i> Cogn.	+
		<i>Ossaea congestiflora</i> Cogn.	+
		<i>Ossaea sanguine</i> Cogn.	+
		<i>Pleiochiton blepharodes</i> (DC.) Reginato, R. Goldenb. & Baumgratz	+
		<i>Pleiochiton ebracteatum</i> Triana	+
		<i>Pleiochiton micranthum</i> Cogn.	+

## DISCUSSION

This is the first record for druses in the anther wall layers in a great number of species of Melastomataceae. The presence of crystals in the anther wall seems to be an apomorphic character-state in this family, which seems to have arisen independently in Henrietteae, Blakeae, Microlicieae, Melastomeae, Cyphostyleae, Merianieae and Miconieae. Crystals have never been observed in species of Myrtales, including two species observed in this study, *Ludwigia* sp. (Onagraceae) and *Syzygium jambos* (Myrtaceae).

The tribe Henrietteae, whose members have druses and megastyloids in the anther, is monophyletic and seems to represent an early-divergent lineage within Melastomataceae (Penneys *et al.* 2010). Tribe Astronieae, which includes *Astronia candolleana*, a species with only megastyloid crystals in the connective, has already been considered as the sister group of Henrietteae (Goldenberg *et al.* 2012). The megastyloids reported in vegetative organs (Baas 1981, Judd *et al.* 2008) and here, in reproductive ones, along with the anomocytic type of stomata (Baas 1981) observed in species of Henrietteae and Astronieae, reinforce their close relationship and suggest these two character states as a synapomorphy for these groups. The druses present only in the Henrietteae anther wall layers may be used as a distinctive character between Henrietteae and Astronieae.

The occurrence of druses in the anther wall layers was a variable character in Blakeae, since it is present only in species of *Blakea* and *Topobea*. The presence of druses in the anther wall may be used to distinguish the clade *Blakea* + *Topobea* from its sister group *Huilaea*.

In Microlicieae, Melastomeae, Cyphostyleae and Merianieae we were not able to make taxonomic inferences. In Microlicieae and Cyphostyleae the relative low number of samples did not indicate the taxonomic use for druses. In Melastomeae, the variation was detected only in *Melastoma denticulatum*, a species from the Old World group, which, in turn, was also poorly sampled. In Merianieae, the confused relationship within the group, complicate the taxonomic analysis of tribe.

In Miconieae druses seem to have arisen in the first ramification of the tribe, after the divergence of its sister group, *Eriocnema*. Some reversions, from presence to absence may have occurred in the “Caribbean + *Conostegia*”, “*Miconia* III”, “*Miconia* IV + *Ossaea*” clades, and in the “*Miconia* V” grade. Within these groups, except for “*Miconia* III” clade, new reversions from absence to presence had occurred.

In the “Caribbean + *Conostegia*” clade, the Caribbean group shares the absence of anther druses with a basal group inside the “*Conostegia* s.l.” group, here represented by *Clidemia*. Druses are already present in the first ramification of “*Conostegia* s.l.” and, in this case, the occurrence of druses in the anther may be useful to delimit this subclade formed by species in *Conostegia* and *Miconia*, and separating it from its sister group and from the related Caribbean species.

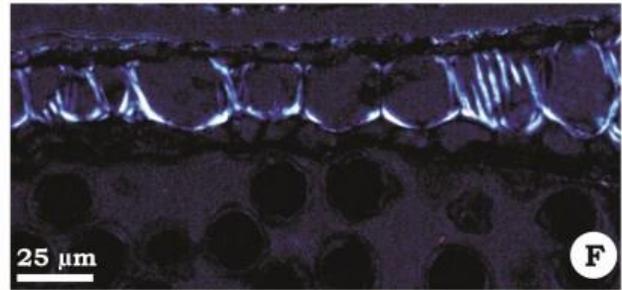
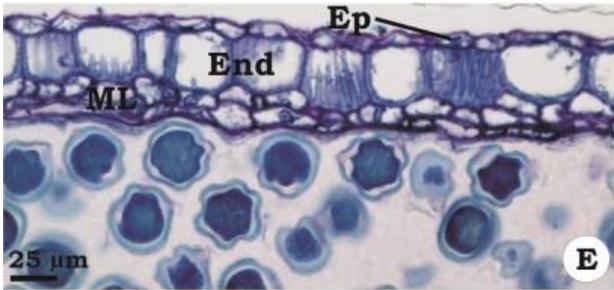
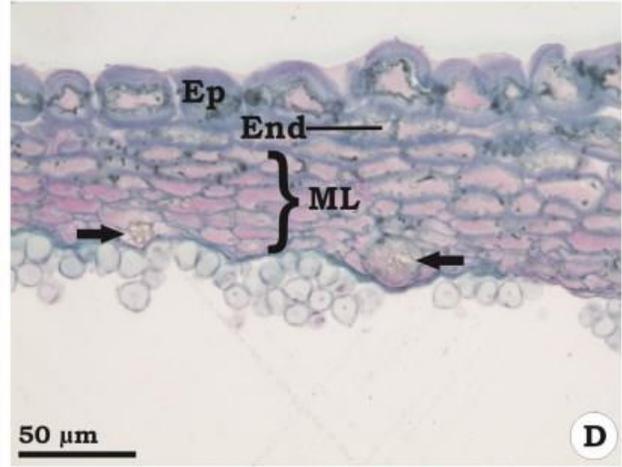
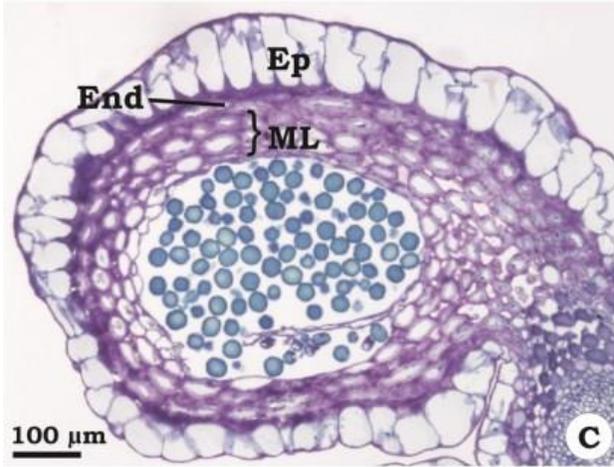
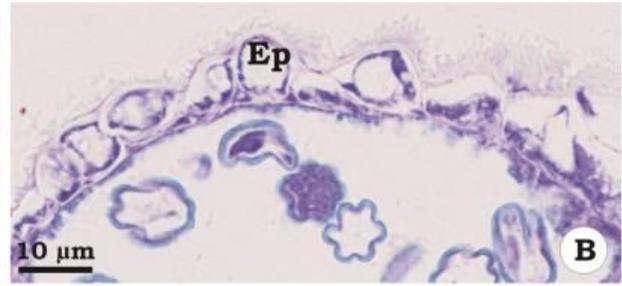
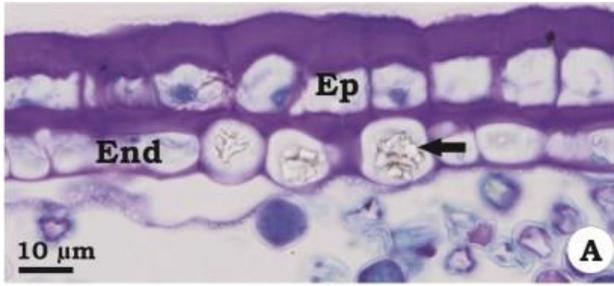
No systematics considerations were made regarding the use of druse occurrence in the anther in the “*Miconia* III” clade given that *Miconia papillosa*, the only species studied here showed only one reversion, from presence to absence. In the “*Miconia* IV + *Ossaea*” clade and in the “*Miconia* V” grade, the analyzed character-state seems not to have systematic value, despite the reversions from presence to absence of druse crystals had occurred in a big species block.

Crystals in the anthers are commonly associated to the pollen release mechanisms (Horner Jr & Wagner 1980, 1992, Lersten 2004), and to enhance pollinator

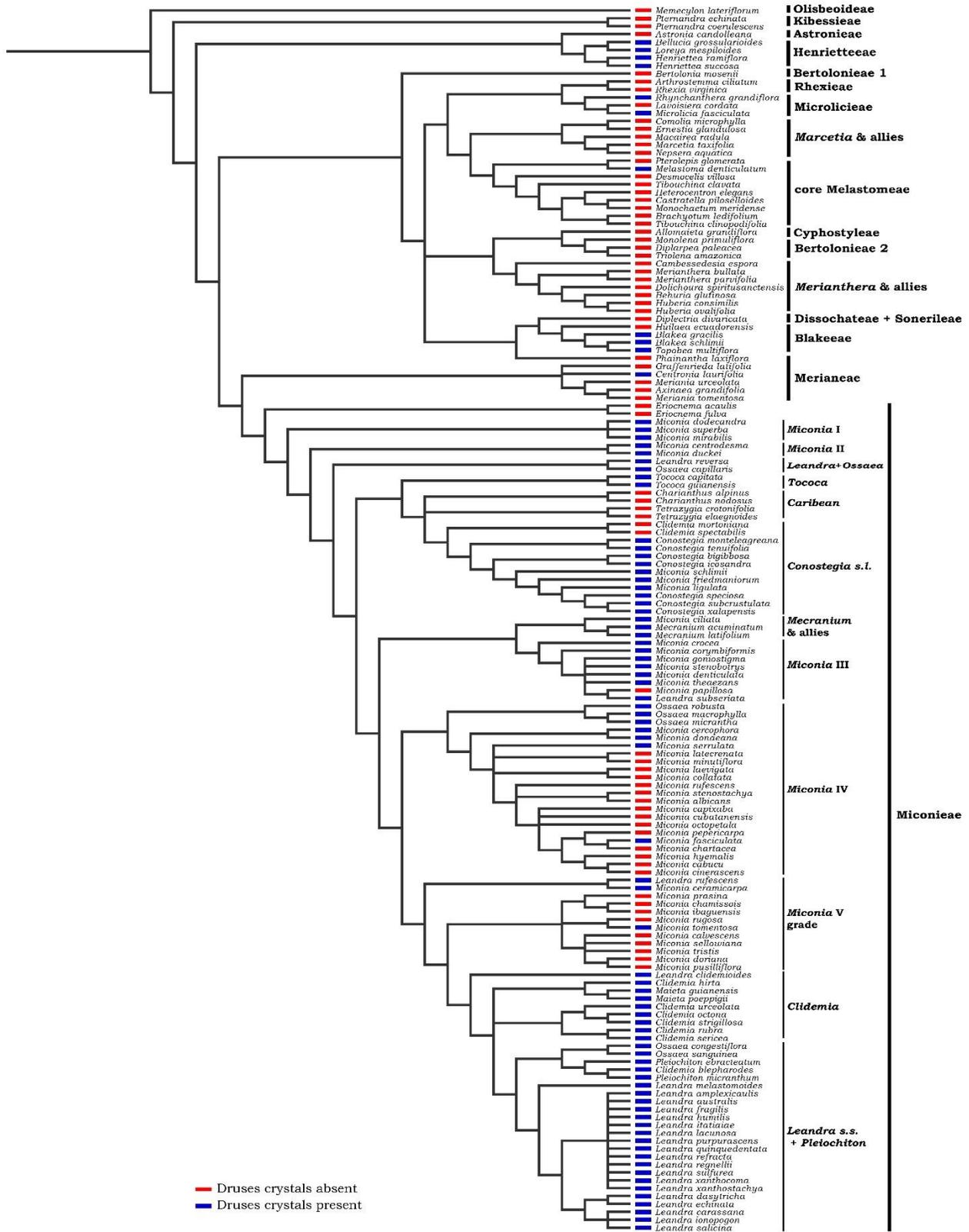
attraction through visual stimuli (D'arcy et al. 1996), both particularly studied in species of Solanaceae and Ericaceae. Melastomataceae species usually have poricidal anther dehiscence (Renner 1993), that seems to be related to the absence of cuticle in the pore region but not with druses in the anther (Cortez et al. 2014). Apparently, druses crystalline material is visible in ultraviolet light and it may be detected by some groups of insects (Chase & Peacor 1987, D'arcy et al. 1996). Since the pollen grains are the almost only resource to the bees and the buzz-pollination is widespread in Melastomataceae (Renner 1989), the function and influence of druses in anther in pollinator attraction should be investigated in this group. Furthermore, the presence of crystals in endothecium, middle layer and/or tapetum cells in species of Melastomataceae (this study, Cortez *et al.* 2014) indicates that the relationship between crystals and pollen development deserves more attention, since they may be associated to the microsporogenesis and the microgametogenesis control (Meric & Dane 2004).

# FIGURES

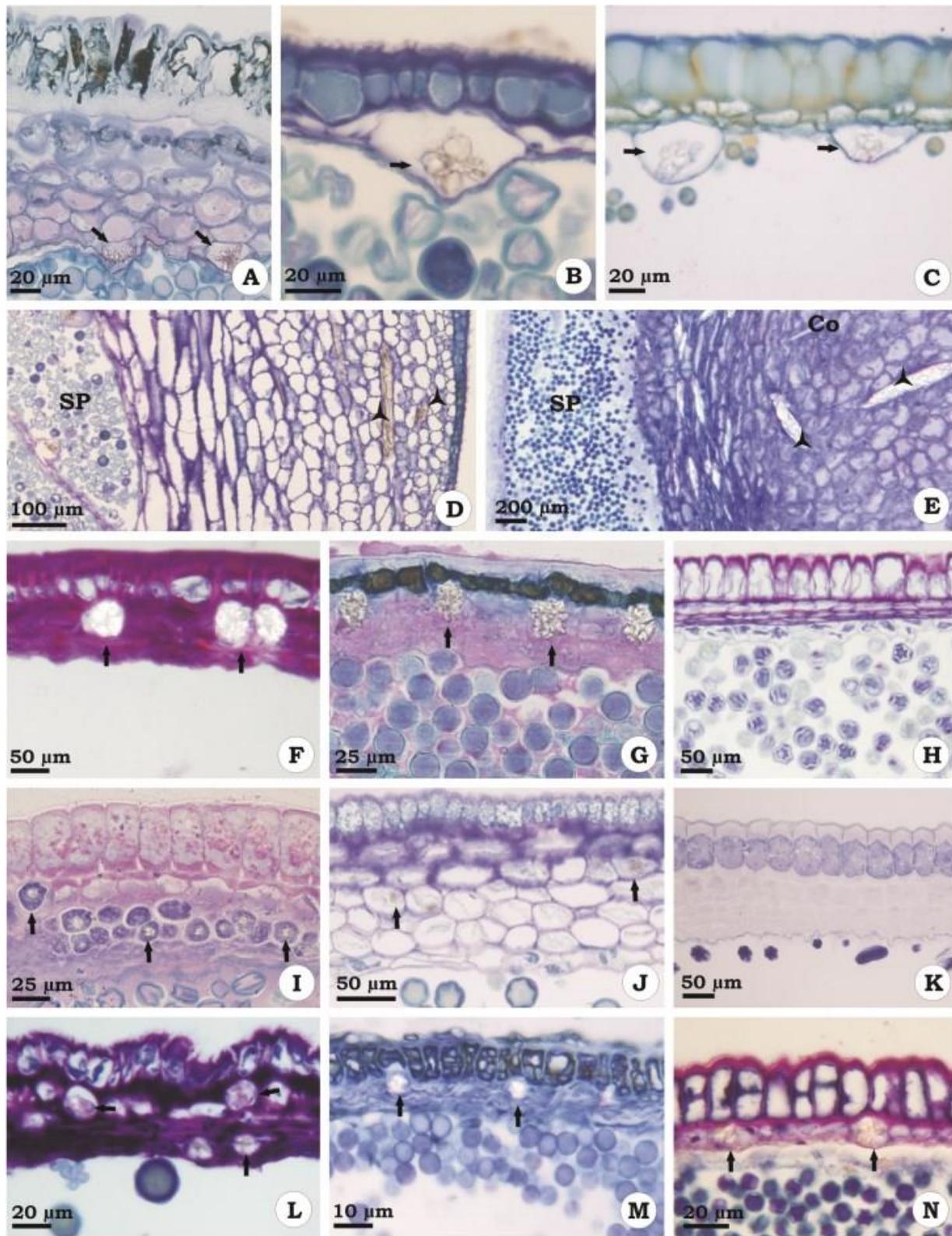
**Figure 1.** Longitudinal (**A, D, E e F**) and transversal (**B e C**) sections of the mature anther wall in Melastomataceae species. **A.** The anther wall formed by epidermis and endothecium in *Leandra xanthocoma* (arrows indicate druses); **B.** The anther wall consists only of epidermis in *Miconia minutiflora*; **C-D.** Multilayered anther wall in *Rhynchanthera grandiflora* (**C**) and *Bellucia aequiloba* (**D**) (arrows indicate druses); **E-F.** The anther wall in *Mouriri acutifolia* (**E**), with secondary wall thickenings in the endothecium, evidenced in polarized light (**F**). End: endothecium; Ep: epidermis; ML: middle layer.



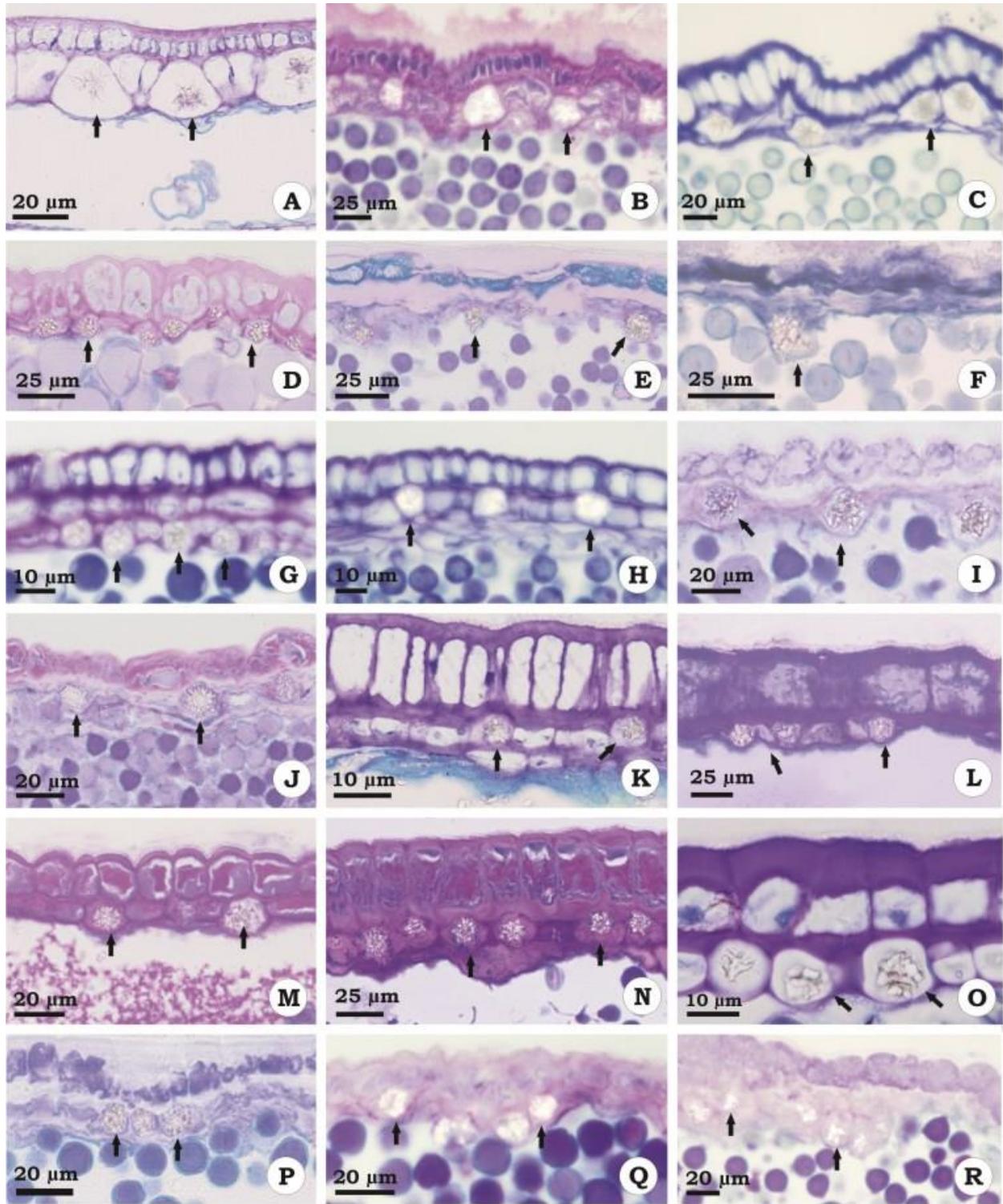
**Figure 2.** Diagram of phylogenetic relationships of Melastomataceae based on available molecular analyses (Clausing & Renner 2001, Stone 2006, Goldenberg *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009, Penneys *et al.* 2010, Reginato *et al.* 2010, Mendoza-Cifuentes & Fernández-Alonso 2011, Penneys & Judd 2013, Goldenberg *et al.* 2012, Kriebel 2014, Michelangeli *et al.* 2013). The diagram shows the taxonomic position of the tribes, clades and species analyzed and the presence/absence of druses in the anther wall layers in these taxa.



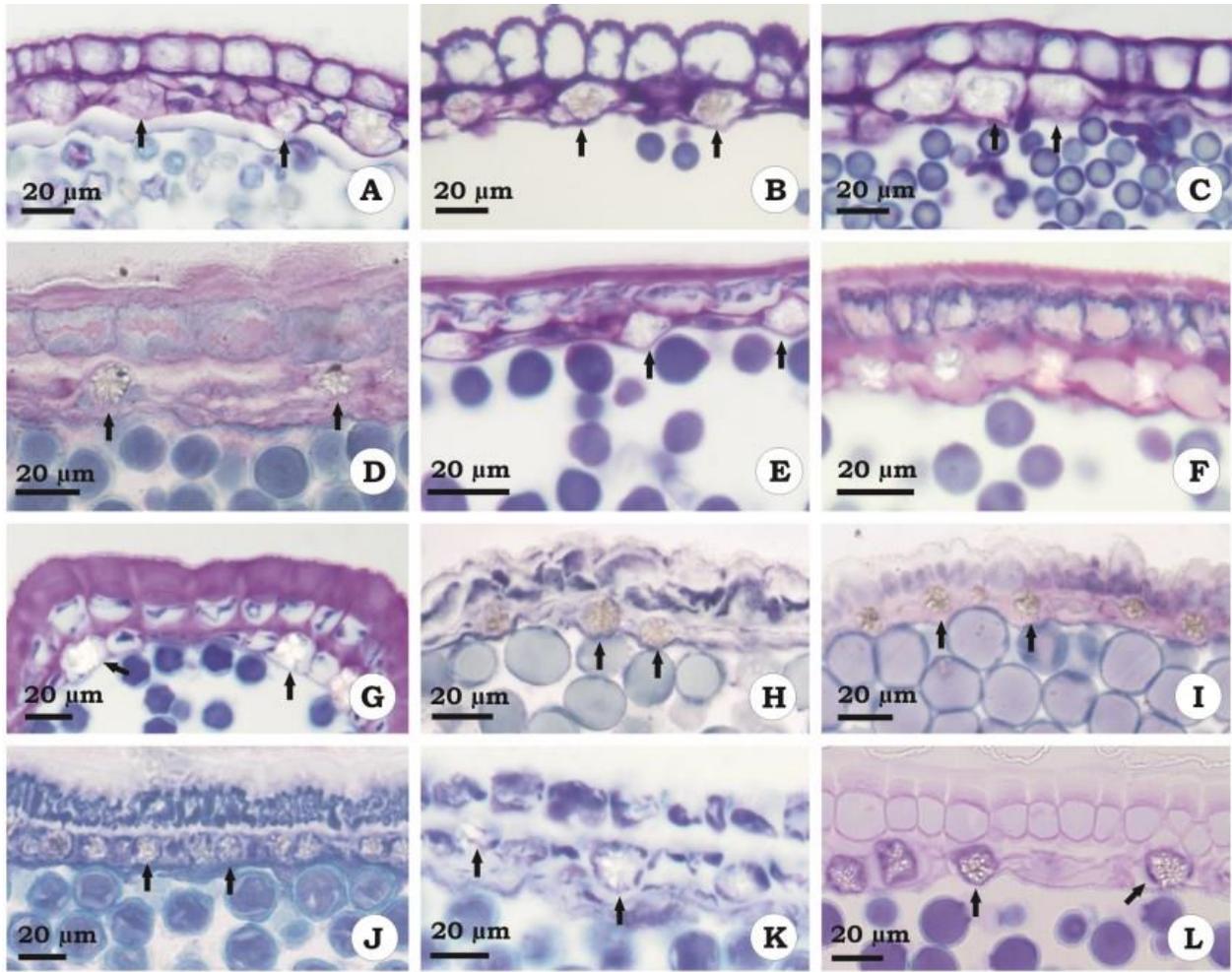
**Figure 3.** Longitudinal sections of the mature anther wall in Melastomataceae species. **A-D.** Henrietteae: *Bellucia arquiloba* (**A**), *Henriettea saldanhaei* (**B**) and *Loreya mespiloides* (**C**); Megastyloid crystals in the anther connective cells in *Henriettea saldanhaei* (**D**) and *Astronia candolleana* (**E**), indicated by stars; **F-H.** Blakeae: The anther wall layer in: *Blakea schlimii* (**F**), *Topobea multiflora* (**G**) and *Huilaea ecuadorensis* (**H**); **I-K.** Microlicieae: *Microlicia fasciculata* (**I**), *Rhynchanthera grandiflora* (**J**) and *Lavoisiera cordata* (**K**); **L.** Melastomeae: *Melastoma denticulatum*; **M.** Cyphostyleae: *Wurdastom ecuadorensis*. **N.** Merianieae: *Centronia laurifolia*. Arrows indicate druse crystals. SP: saco polínico; Co: conectivo.



**Figure 4.** Longitudinal sections of the mature anther wall with druse crystals in Miconieae species: *Miconia dodecandra* **(A)**, *M. mirabilis* **(B)** and *M. superba* **(C)** (“*Miconia* I”); *M. centrodesma* **(D)** (“*Miconia* II); *Leandra reversa* **(E)** and *Ossaea capillaris* **(F)** (“*Leandra* + *Ossaea*”); *Tococa capitata* **(G)** (“*Tococa*”); *Mecranium latifolium* **(H)** and *Miconia ciliata* **(I)** (“*Mecranium* + *Anaectocalyx*”); *Clidemia blepharodes* **(J)**, *L. australis* **(K)**, *L. equinata* **(L)**, *L. itatiaiae* **(M)**, *L. quinquedentata* **(N)** and *L. xanthocoma* **(O)** (“*Leandra* s.s. + *Pleichiton*”); *Clidemia strigillosa* **(P)**, *Leandra clidemioides* **(Q)** and *Maieta guianensis* **(R)** (“*Clidemia*”). Arrows indicate druse crystals.



**Figure 5.** Longitudinal sections of the mature anther wall with druse crystals in Miconieae species: *Conostegia tenuifolia* **(A)**, *Conostegia xalapensis* **(B)** and *Miconia friedmaniorum* **(C)** (“*Conostegia*”); *Leandra subseriata* **(D)**, *M. crocea* **(E)** and *M. denticulata* **(F)** (“*Miconia* III”); *M. cercophora* **(G)**, *Ossaea macrophylla* **(H)** and *O. robusta* **(I)** (“*Miconia* IV + *Ossaea*”); *L. rufescens* **(J)**, *M. ceramicarpa* **(K)** and *M. tomentosa* **(L)**. Arrows indicate druse crystals.





## REFERENCES

- Amorim, A.M., Goldenberg, R. & Michelangeli, F.A. 2009. A new species of *Physeterostemon* (Melastomataceae) from Bahia, Brazil, with notes on the phylogeny of the genus. *Systematic Botany* 34(2): 324-329.
- Baas, P. 1981. A note on stomatal types and crystals in the leaves of Melastomataceae. *Blumea* 27: 475-479.
- Baumgratz, J.F.A. & Ferreira, G.L. 1980. Estudo da nervação e epiderme foliar das Melastomataceae do Município do Rio de Janeiro. Gênero *Miconia*. Seção *Miconia*. *Rodriguésia* 32(55): 161-169.
- Baumgratz, J.F.A. & Ferreira, G.L. 1984. Nervação e epiderme foliar das Melastomataceae do estado do Rio de Janeiro. Gênero *Miconia* Ruiz et Pavon. Seção *Tamonea* (Aubl.) Cogniaux. *Rodriguésia* 36(58): 89-94.
- Buss, P.A. Jr. & Lersten, N.R. 1972. Crystals in tapetal cells of the Leguminosae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 65(1):81-85.
- Caetano, A.P.S. 2010. Apomixia e reprodução sexuada em espécies de *Miconia* Ruiz & Pavón, Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Chase, M.W. & Peacor, C.R. 1987. Crystals of calcium oxalate hydrate on the perianth of *Stelis* Sw. *Lindleyana* 2(2):91-94.
- Clausing, G., Meyer, K. & Renner, S.S. 2000. Correlations among fruit traits and evolution of different fruits within Melastomataceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133(3): 303-326.
- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany* 88(3): 486-498.
- Cortez, P.A., Caetano, A.P.S., Carmello-Guerreiro, S.M. & Teixeira, S.P. 2014. Anther wall and pollen Development in neotropical species-rich *Miconia* (Melastomataceae). *Plant Systematics and Evolution*, *online*.

- Costa, C.G. 1977. *Miconia theaezans* (Bonpl.) Cogn. (Melastomataceae) – considerações anatômicas. *Rodriguésia* 29(43): 7-91.
- Coté, G.G. 2009. Diversity and distribution of idioblasts producing calcium oxalate crystals in *Dieffenbachia seguine* (Araceae). *American Journal of Botany* 96(7): 1245-1254.
- D'arcy, W.G., Keating, R.C. & Buchmann, S.L. 1996. The calcium oxalate package or so-called resorption tissue in some angiosperms anthers. *In* The anther: form function and phylogeny. Edited by W.G. D'Arcy and R.C. Keating. Cambridge University Press. pp 159–191.
- Eyde, R.H. & Teeri, J.A. 1967. Floral anatomy of *Rhexia virginica* (Melastomataceae). *Rhodora* 69: 163-178.
- Fernandes, W.P. 2011. Desenvolvimento da parede da antera e do grão de pólen em três espécies de Melastomataceae. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Uberlândia.
- Finley, D.S. 1999. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Revista de Biología Tropical* 47(1-2):27–31
- Franceschi, V.R. & Horner, H.T.Jr. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Review* 46(4): 361–427.
- Franceschi, V.R. & Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.
- Fritsch, P.W., Almeda, F., Renner, S.S., Martins, A.B., Cruz, B.C. 2004. Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). *American Journal of Botany* 91(7): 1105-1114.
- Garcia, S.R. 2009. Estrutura e ontogênese do fruto de *Macairea radula* DC. (Melastomataceae). Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Coxim.
- Gardoni, L.C.P., Isaias, R.M.S. & Vale, F.H.A. 2007. Morfologia e anatomia foliar de três morfotipos de *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae) na Serra do Cipó, MG. *Revista Brasileira de Botânica* 30(3): 487-500.

- Goldenberg, R., Teixeira, S.P., Martins, A.B. 2003. Anther dehiscence and circumscription of *Miconia* sect. *Hypoxanthus* (Melastomataceae). *Kew Bulletin* 58(1):195-203.
- Goldenberg, R., Penneys, D.S., Almeda, F., Judd, W.S. & Michelangeli, F.A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. *International Journal of Plant Sciences* 169(7): 963-979.
- Goldenberg, R., Fraga, C.N. De, Fontana, A.P. & Nicolas, A.N. 2012. Taxonomy and phylogeny of *Merianthera* (Melastomataceae). *Taxon* 61(5):1040-1056.
- Horner, H.T., Jr. 1977. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *American Journal of Botany* 64(6): 745-759.
- Horner, H.T., Jr. & Wagner, B.L. 1980. The association of druse crystals with the developing stomium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) anthers. *American Journal of Botany* 67(2):1347-1360.
- Horner, H.T., Jr. & Wagner, B.L. 1992. Association of four different calcium crystals in the anther connective tissue and hypodermal stomium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) during microsporogenesis. *American Journal of Botany* 79(5): 531-541.
- Judd, W.S. 1989. Taxonomic studies in the Miconieae (Melastomataceae). III. Cladistic analysis of axillary-flowered taxa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 476-495.
- Judd, W.S., Skee, J.D. Jr., Penneys, D.S. & Michelangeli, F.A. 2008. A new species of *Henriettea* (Melastomataceae) from the Sierra de Baoruco, the Dominican Republic. *Brittonia* 60(3): 217 – 227.
- Kriebel, R. 2014. Phylogeny, taxonomy and morphological evolution in *Conostegia* (Melastomataceae: Miconieae). Ph.D. thesis.
- Lersten, N.R. 2004. Flowering plant embryology, with emphasis on economic species. Blackwell Publishing, Oxford.

- Lersten, N.R. & Horner, H.T. 2000. Calcium oxalate crystal types and trends in their distribution patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae: Prunoideae). *Plant Systematics and Evolution* 224(1-2): 83–96.
- Mendoza-Cifuentes, H. & Fernández-Alonso, J.L.. 2011. Análisis cladístico de *Centronia* (Merianieae, Melastomataceae) con base en caracteres morfológicos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 35 (137): 431-450.
- Mentink, H. & Baas, P. 1992. Leaf anatomy of the Melastomataceae, Memecylaceae and Crypteroniaceae. *Blumea* 37(1): 189-225.
- Meric, C. 2009a. Calcium oxalate crystals in *Aster squamatus* and *Bellis perennis* (Asteraceae: Astereae). *Phytologia Balcanica* 15(2): 255-259.
- Meric, C. 2009b. Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Acta Biologica Cracoviensia* 51(1): 105-110.
- Meric, C. & Dane, F. 2004. Calcium oxalate crystals in floral organs of *Helianthus annuus* L. and *H. tuberosus* L. (Asteraceae). *Acta Biologica Szegediensis* 48(1-4): 19-23.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon.
- Michelangeli, F.A., Nicolas, A.N., Morales-Puentes, M.E. & David, H. 2011. Phylogenetic relationships of *Allomaieta*, *Alloneuron*, *Cyphostyla* and *Wurdastom* (Melastomataceae) and the resurrection of the tribe Cyphostyleae. *International Journal of Plant Sciences* 172(9): 1165-1178.
- Michelangeli, F.A., Guimarães, P.J.F., Penneys, D.S., Almeda, F. & Kriebel, R. 2013. Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171(1):38-60.
- Molano-Flores, B. 2001. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany* 88(3): 387–391.
- Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sciences* 164(6): 901–909.
- Penneys, D.S., Michelangeli, F.A., Judd, W.S. & Almeda, F. 2010. Henrietteae (Melastomataceae): A new neotropical berry-fruited tribe. *Systematic Botany* 35(4): 783-800.

- Penneys, D.S. & Judd, W.S. 2013. Combined molecular and morphological phylogenetic analyses of the Blakeeae (Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences* 174(5): 802-817.
- Prychid, C.J. & Rudall, P.J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany* 84(6):725-739.
- Prychid, C.J., Furness, C.A. & Rudall, P.J. 2003. Systematic significance of cell inclusions in Haemodoraceae and allied families: silica bodies and tapetal raphides. *Annals of Botany* 92(4): 571-580.
- Puglisi, C. 2007. Multiplications of floral parts in the genus *Conostegia* (Melastomataceae). Royal Botanic Garden Edinburgh. MSc thesis.
- Reginato, M., Michelangeli, F.A. & Goldenberg, R. 2010. Phylogeny of *Pleiochiton* (Melastomataceae, Miconieae): total evidence. *Botanical Journal of the Linnean Society* 162(3): 423-434.
- Reis, C., Bieras, A.C. & Sajo, M.G. 2005. Anatomia foliar de Melastomataceae do cerrado do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 28(3): 451-466.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76(2): 496-518.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* 29: 464-471.
- Souza, R.C.O.S. & Marquete, O. 2000. *Miconia tristis* Spring e *Miconia doriana* Cogn. (Melastomataceae): anatomia do eixo vegetativo e folhas. *Rodriguésia* 51(78-79): 133-142.
- Stone, R.D. 2006. Phylogeny of major lineages in Melastomataceae, subfamily Olindebeoideae: utility of nuclear glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GapC) gene sequences. *Systematic Botany* 31(1): 107-121.
- Ter Welle, B.J.H. & Mennega, A.M.W. 1977. On the presence of large styloids in the secondary xylem of the genus *Henriettea* (Melastomataceae). *IAWA Bulletin* 2: 31-35.



## APPENDIX

List of Melastomataceae species with information about collector, voucher and sample origin (alcohol samples: AS; herbarium specimens: HS; FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; NYBG: New York Botanical Garden).

Species	Collector number or voucher	Sample provenance
<b>Olisbeoideae</b>		
<i>Memecylon lateriflorum</i> (G. Don) Bremek.	A.A.Enti 639	HS
<i>Mouriri acutiflora</i> Naudin		AS
<i>Mouriri guianensis</i> Aubl.	UPCB 34109	HS
<i>Mouriri</i> sp.		AS (FCFRP)
<i>Votomita guianensis</i> Aubl.	NYBG 1654101	HS
<b>Kibessieae</b>		
<i>Pternandra echinata</i> Jack	Chih-Hua Tsou 1987	HS
<i>Pternandra coerulescens</i> Jack	NYBG	HS
<b>Astronieae</b>		
<i>Astronia candolleana</i> Cogn.	NYBG 45549	HS
<b>Henrietteae</b>		
<i>Bellucia aequiloba</i> Pilg.	UPCB 66633	HS
<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana	UPCB 68280	HS
<i>Henriettea ramiflora</i> (Sw.) DC.	S.A. Mori 19212	AS (NYBG)
<i>Henriettea saldanhaei</i> Cogn.	J.P.Basso-Alves	AS (FCFRP)
<i>Henriettea succosa</i> (Aubl.) DC.	F.A.Michelangeli 685	AS (NYBG)
<i>Loreya mespiloides</i> Miq.	S.A.Mori 18327	AS (NYBG)
<b>Bertolonieae (1)</b>		
<i>Bertonia mosenii</i> Cogn.	UPCB 67838	HS
<i>Phainantha laxiflora</i> (Triana) Gleason	NYBG 43994	HS
<b>Dissochateae + Sonerileae</b>		
<i>Amphiblemma mildbraedii</i> Gilg ex Engl.	NYBG Carvalho 2617	HS
<i>Boyania ayangannae</i> Wurdack	NYBG 45000	HS
<i>Diplectria divaricata</i> (Willd.) Kuntze	T.N.Roque (1926)	AS (NYBG)
<b>Blakeeae</b>		
<i>Blakea gracilis</i> Hemsl.	NYBG A.Molina (1951)	HS
<i>Blakea schlimii</i> (Naudin) Triana	F.A.Michelangeli 726	AS (NYBG)
<i>Blakea portentosa</i> Wurdack	J.Homeier 3593	AS (NYBG)

APPENDIX Continued

	Species	Collector number or voucher	Sample provenance	
<b>Blakeeae</b>	<i>Huilaea ecuadorensis</i> Wurdack	D.S.Penneys 1589	AS (NYBG)	
	<i>Topobea multiflora</i> (D. Don) Triana	UPCB 18658	HS	
<b>Cyphostyleae</b>	<i>Allomaieta grandiflora</i> Gleason	NYBG 1127326	HS	
	<i>Wurdastom ecuadorensis</i> (Wurdack) B. Walln.	NYBG 1855864	HS	
<b>Bertolonieae (2)</b>	<i>Diplarpea paleacea</i> Triana	NYBG 88740	HS	
	<i>Monolena primuliflora</i> Hook. f.	NYBG 84556	HS	
	<i>Triolena amazonica</i> (Pilg.) Wurdack	NYBG 710043	HS	
	<i>Triolena obliqua</i> (Triana) Wurdack	J.Homeier 2112	AS (NYBG)	
<b>Merianthera &amp; allies</b>	<i>Behuria glutinosa</i> Cogn.	UPCB 71781	HS	
	<i>Cambessedesia espora</i> (A. St.-Hil. ex Bonpl.) DC.	UPCB 55194	HS	
	<i>Dolichoura spiritusanctensis</i> Brade	UPCB 71760	HS	
	<i>Huberia consimilis</i> Baumgratz	F.A.Michelangeli 1618	AS (NYBG)	
	<i>Huberia ovalifolia</i> DC.	UPCB 70972	HS	
	<i>Merianthera bullata</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	A.P. Fontana <i>et al.</i> 3331	AS (FCFRP)	
<i>Merianthera parvifolia</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	A.P. Fontana <i>et al.</i> 1548	AS (FCFRP)		
<b>Rhexieae</b>	<i>Arthrostemma ciliatum</i> Pav. ex D. Don	F.A.Michelangeli 740	AS (NYBG)	
	<i>Rhexia virginica</i> L.	NYBG H.E.Ahles 84421	HS	
<b>Microlicieae</b>	<i>Rhynchanthera grandiflora</i> (Aubl.) DC.	J.P.Basso-Alves	AS (FCFRP)	
	<i>Lavoisiera cordata</i> Cogn.	UPCB 45773	HS	
	<i>Microlicia euphorbioides</i> Mart.	J.P.Basso-Alves	AS (FCFRP)	
	<i>Microlicia fasciculata</i> Mart. ex Naudin	UPCB 70953	HS	
<b>Melastomeae</b>	<b><i>Marcetia</i> alliance</b>	<i>Comolia microphylla</i> Benth.	NYBG 1289618	HS
		<i>Ernestia glandulosa</i> Gleason	C.V.Martin 435	AS (NYBG)
		<i>Macairea radula</i> (Bonpl.) DC.	UPCB 63856	HS
		<i>Marcetia taxifolia</i> (A. St.-Hil.) DC.	F.A.Michelangeli 680	AS (NYBG)
		<i>Nepsera aquatica</i> (Aubl.) Naudin	C.V.Martin 420	AS (NYBG)

APPENDIX *Continued*

		Species	Collector number or voucher	Sample provenance
<b>Melastomeae</b>	<b>Core Melastomeae</b>	<i>Brachyotum ledifolium</i> (Desr.) Triana	F.A.Michelangeli 1886	AS (NYBG)
		<i>Castratella piloselloides</i> (Bonpl.)Naudin	NYBG F.R.Fosberg 20849	HS
		<i>Desmocelis villosa</i> Naudin	UPCB 47372	HS
		<i>Dissotis rotundifolia</i> (Sm.) Triana	NYBG 190426	HS
		<i>Heterocentron elegans</i> (Schltdl.) Kuntze	NYBG E.K.Balls 84736	HS
		<i>Melastoma denticulatum</i> Labill.	M.P.Simmons 1832	AS (NYBG)
		<i>Monochaetum calcaratum</i> (DC.) Triana	NYBG V.W.Steinmanny & J.M.Porter 4108	HS
		<i>Monochaetum meridense</i> (Klotzsch ex H.Karst.) Naudin	F.A.Michelangeli 1241	AS (NYBG)
		<i>Osbeckia chinensis</i> L.	NYBG	HS
		<i>Pterolepis glomerata</i> (Rottb.) Miq.	UPCB 37973	HS
		<i>Tibouchina clavata</i> (Pers.) Wurdack	UEC 178712	AS (FCFRP)
		<i>Tibouchina clinopodifolia</i> (DC.) Cogn.	UEC 178713	AS (FCFRP)
<i>Tibouchina urvilleana</i> (DC.) Cogn.	UPCB 68214	HS		
<b>Merianieae</b>		<i>Axinaea grandifolia</i> (Naudin) Triana	F.A.Michelangeli 650	AS (NYBG)
		<i>Centronia laurifolia</i> D. Don	C.Ulloa Ulloa 1780	AS (NYBG)
		<i>Graffenrieda gracilis</i> (Triana) L.O. Williams	UPCB 60222	HS
		<i>Graffenrieda harlingii</i> Wurdack	C.Ulloa Ulloa 1843	AS (NYBG)
		<i>Graffenrieda latifolia</i> (Naudin) Triana	NYBG 1264275	HS
		<i>Macrocentrum cristatum</i> (DC.) Triana	S.A. Mori 24554	HS
		<i>Meriania macrophylla</i> (Benth.) Triana	NYBG 61415	HS
		<i>Meriania subumbellata</i> Cogn.	F.A.Michelangeli 819	AS (NYBG)
		<i>Meriania tomentosa</i> (Cogn.) Wurdack	D.S.Penneys 1621	AS (NYBG)
	<i>Meriania urceolata</i> Triana	F.A.Michelangeli 462	AS (NYBG)	
<b>Miconieae</b>		<i>Eriocnema acaulis</i> Triana	UEC 104906	HS
		<i>Eriocnema fulva</i> Naudin	UPCB 64095	HS
		<i>Physeterostemon thomasi</i> Amorim, F.A. Michelangeli & R. Goldenb.		AS (FCFRP)
		<i>Miconia dodecandra</i> Cogn.	UEC 178711	AS (FCFRP)
		<i>Miconia mirabilis</i> (Aubl.) L.O.Williams	NYBG 559373	HS
	<i>Miconia superba</i> Ule	F.A.Michelangeli 452	AS (NYBG)	

APPENDIX *Continued*

	Species	Collector number or voucher	Sample provenance	
<b>Miconia II</b>	<i>Miconia centrodesma</i> Naudin	UEC 106832	HS	
	<i>Miconia duckei</i> Cogn.	NYBG 1722237	HS	
<b>Leandra + Ossaea</b>	<i>Leandra reversa</i> (DC.) Cong.	UEC 106822	HS	
	<i>Ossaea capillaris</i> (D. Don) Cogn.	UPCB 66632	HS	
<b>Tococa</b>	<i>Tococa capitata</i> Traill ex Cogn.	F.A.Michelangeli 506	AS (NYBG)	
	<i>Tococa guianensis</i> Aubl.	UEC 143688	HS	
<b>Caribbean</b>	<i>Charianthus alpinus</i> (Sw.) R.A. Howard	D.S.Penneys 1314	AS (NYBG)	
	<i>Charianthus nodosus</i> (Desr.) Triana	D.S.Penneys 1275	AS (NYBG)	
	<i>Tetrazygia crotonifolia</i> (Desr.) DC.	F.A.Michelangeli 2012	AS (NYBG)	
	<i>Tetrazygia elaeagnoides</i> (Sw.) DC.	F.A.Michelangeli 1997	AS (NYBG)	
<b>Miconieae</b>	<i>Clidemia mortoniana</i> Standl.	R.Kriebel 5341	AS (NYBG)	
	<i>Clidemia spectabilis</i> Gleason	R.Kriebel 5646	AS (NYBG)	
	<i>Conostegia icosandra</i> (Sw. ex Wikstr.) Urb.	UPCB 63927	HS	
	<i>Conostegia bigibbosa</i> Cogn.	R.Kriebel 5522	AS (NYBG)	
	<i>Conostegia brenesii</i> Standl.	R.Kriebel 5631	AS (NYBG)	
	<i>Conostegia lasiopoda</i> Benth.	R.Kriebel 5651	AS (NYBG)	
	<b>Conostegia</b>	<i>Conostegia montealegreana</i> Cogn.	R.Kriebel 5354	AS (NYBG)
		<i>Conostegia speciosa</i> Naudin	R.Kriebel 5489	AS (NYBG)
		<i>Conostegia subcrustulata</i> (Beurl.) Triana	R.Kriebel 5653	AS (NYBG)
		<i>Conostegia tenuifolia</i> Donn. Sm.	R.Kriebel 5773	AS (NYBG)
		<i>Conostegia xalapensis</i> (Bonpl.) D. Don ex DC.	R.Kriebel 5619	AS (NYBG)
		<i>Miconia friedmaniorum</i> Almeda & Umaña	R.Kriebel 5641	AS (NYBG)
		<i>Miconia ligulata</i> Almeda	R.Kriebel 5726	AS (NYBG)
	<i>Miconia schlimii</i> Triana	R.Kriebel 5604	AS (NYBG)	
<b>Mecranium, Anaectocalyx</b>	<i>Mecranium acuminatum</i> (DC.) Skean	NYBG 854620	HS	
	<i>Mecranium latifolium</i> (Cogn.) Skean	F.A.Michelangeli 2001	AS (NYBG)	
	<i>Miconia ciliata</i> (Rich.) DC.	UEC 155696	HS	

APPENDIX *Continued*

	Species	Collector number or voucher	Sample provenance
	<i>Leandra subseriata</i> (Naudin) Cogn.	UPCB 18652	HS
	<i>Miconia corymbiformis</i> Cogn.	NYBG 1722207	HS
	<i>Miconia crocea</i> (Desr.) Naudin	C.Ulloa Ulloa 1870	AS (NYBG)
<b>Miconia III</b>	<i>Miconia denticulata</i> Naudin	NYBG 1596619	HS
	<i>Miconia goniostigma</i> Triana	R.Kriebel 5695	AS (NYBG)
	<i>Miconia papillosa</i> (Desr.) Naudin	NYBG 44239	HS
	<i>Miconia stenobotrys</i> (Rich.) Naudin	UEC 676935	HS
	<i>Miconia theaezans</i> Cogn.	UEC122369-UPCB 56156	HS
	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	UEC 162376	HS
	<i>Miconia cabucu</i> Hoehne	UEC 149910	HS
	<i>Miconia capixaba</i> R.Goldenb.	NYBG 1015412	HS
	<i>Miconia cercophora</i> Wurdack	NYBG 1599170	HS
	<i>Miconia chartacea</i> Triana	UEC 135846	HS
<b>Miconieae</b>	<i>Miconia cinerascens</i> Miq.	UEC 30608	HS
	<i>Miconia collatata</i> Wurdack	UEC 155696	HS
	<i>Miconia cubatanensis</i> Hoehne	UEC 38558UPCB 54513	HS
	<i>Miconia donaeana</i> Naudin	F.A.Michelangeli 727	AS (NYBG)
<b>Miconia IV</b>	<i>Miconia fallax</i> DC.	UEC 150450	AS (FCFRP)
	<i>Miconia fasciculata</i> Gardner	UEC 58209	HS
	<i>Miconia hyemalis</i> A.St.-Hil. & Naudin	UEC 157487	HS
	<i>Miconia laevigata</i> (L.) DC.	UEC 94916	HS
	<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	UEC 071717	HS
	<i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl.) DC.	UEC 10788	HS
	<i>Miconia octopetala</i> Cogn.	UEC 83025	HS
	<i>Miconia pepericarpa</i> DC.	UEC 150451	AS (FCFRP)
	<i>Miconia rufescens</i> (Aubl.) DC.	UPCB 37834	HS
	<i>Miconia serrulata</i> (DC.) Naudin	UEC 95013	HS

APPENDIX *Continued*

	Species	Collector number or voucher	Sample provenance
<b>Miconieae</b>	<b>Miconia IV</b>	<i>Miconia stenostachya</i> DC.	UEC 162382 AS (FCFRP)
		<i>Ossaea macrophylla</i> (Benth.) Cogn.	UEC 064256 HS
		<i>Ossaea micrantha</i> (Sw.) Macfad. ex Cogn.	UEC 81399 HS
		<i>Ossaea robusta</i> (Triana) Cogn.	R.Kriebel 5703 AS (NYBG)
	<b>Miconia V</b>	<i>Leandra rufescens</i> (DC.) Cogn.	UPCB 63762 HS
		<i>Miconia calvescens</i> DC.	UEC 94504 HS
		<i>Miconia ceramicarpa</i> (DC.) Cogn.	NYBG 987221 HS
		<i>Miconia chamissois</i> Naudin	UEC 178717 AS (FCFRP)
		<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Triana	UEC 85820/ UPCB 46762 HS
		<i>Miconia jucunda</i> (DC.) Triana	UEC 81350 HS
		<i>Miconia paniculata</i> (DC.) Naudin	UEC 162490 HS
		<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.	IPCB 46237 HS
		<i>Miconia pusilliflora</i> (DC.) Naudin	UEC 178734 AS (FCFRP)
		<i>Miconia rugosa</i> Triana	UPCB 70855 HS
		<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	UEC 79582 HS
		<i>Miconia tomentosa</i> (Rich.) D.Don ex DC.	UEC 50602 HS
		<i>Miconia tristis</i> Spring	NYBG 522168 HS
	<b>Clidemia</b>	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	UEC 178722 AS (FCFRP)
		<i>Clidemia octona</i> (Bonpl.) L.O. Williams	UEC 92217 HS
		<i>Clidemia rubra</i> (Aubl.) Mart.	UEC 100190 HS
		<i>Clidemia sericea</i> D. Don	UEC 81400 HS
		<i>Clidemia strigillosa</i> (Sw.) DC.	UEC 42699 HS
		<i>Clidemia urceolata</i> DC.	UEC 117202 HS
		<i>Leandra clidemioides</i> (Naudin) Wurdack	NYBG 522818 HS
		<i>Maieta guianensis</i> Aubl.	NYBG J.M.Cruxent 1951 HS
	<i>Maieta poeppigii</i> Mart. ex Cogn.	NYBG 5637 HS	
	<b>Leandra s.s. + Pleiochiton</b>	<i>Clidemia blepharodes</i> DC.	UEC 067925 HS
<i>Leandra amplexicaulis</i> DC.		UEC 96394 HS	

APPENDIX *Continued*

	<b>Species</b>	<b>Collector number or voucher</b>	<b>Sample provenance</b>	
	<i>Leandra aurea</i> (Cham.) Cogn.	UEC 178709	AS (FCFRP)	
	<i>Leandra australis</i> (Cham.) Cogn.	UEC 178710	AS (FCFRP)	
	<i>Leandra carassana</i> (DC.) Cogn.	UEC 158613	HS	
	<i>Leandra dasytricha</i> (A. Gray) Cogn.	UEC 057419	HS	
	<i>Leandra echinata</i> Cogn.	UEC 070117	HS	
	<i>Leandra fragilis</i> Cogn.	UEC 162493	HS	
	<i>Leandra humilis</i> (Cogn.) Wurdack	UEC 111948	HS	
	<i>Leandra ionopogon</i> (Mart.) Cogn.	UEC 107495	HS	
	<i>Leandra itatiaiae</i> (Wawra) Cogn.	UEC 144468	HS	
	<i>Leandra melastomoides</i> Raddi	A.P.S. Caetano 03	AS (FCFRP)	
	<i>Leandra purpurascens</i> (DC.) Cogn.	UEC 178729	AS (FCFRP)	
<b>Miconieae</b>	<b><i>Leandra s.s.</i> + <i>Pleiochiton</i></b>	<i>Leandra quinquedentata</i> (DC.) Cogn.	UEC 157463	HS
		<i>Leandra refracta</i> Cogn.	UEC 146737	HS
		<i>Leandra regnellii</i> (Triana) Cogn.	UEC 178726	AS (FCFRP)
		<i>Leandra salicina</i> (Ser. ex DC.) Cogn.	UEC 135845	HS
		<i>Leandra sulfurea</i> (Naudin) Cogn.	UEC 120270	HS
		<i>Leandra xanthocoma</i> (Naudin) Cogn.	A.P.S. Caetano 26	AS (FCFRP)
		<i>Leandra xanthostachya</i> Cogn.	UEC 26147	HS
		<i>Ossaea congestiflora</i> Cogn.	UEC 136830	HS
		<i>Ossaea sanguine</i> Cogn.	UEC 067843	HS
		<i>Pleiochiton blepharodes</i> (DC.) Reginato, R. Goldenb. & Baumg.	UPCB 72934	HS
		<i>Pleiochiton ebracteatum</i> Triana	UEC 178718	AS (FCFRP)
		<i>Pleiochiton micranthum</i> Cogn.	UPCB 67721	HS



## **CAPÍTULO 4: O TEGUMENTO EXTERNO DO ÓVULO E SEU VALOR NA SISTEMÁTICA DE MELASTOMATACEAE**

### **RESUMO**

Apesar do monofiletismo evidente de Melastomataceae, a circunscrição e as relações das tribos e de muitos grupos dentro da família ainda não foram totalmente esclarecidas e estão em debate. Por serem relativamente constantes nos táxons, os caracteres do óvulo são de grande interesse na sistemática em angiospermas. A espessura do tegumento externo do óvulo varia em Melastomataceae, mas o pequeno volume de dados disponíveis não permite a utilização destes caracteres na delimitação ou compreensão das relações entre os grupos da família. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar o número de camadas no tegumento externo do óvulo em espécies de diferentes linhagens de Melastomataceae, a fim de se avaliar seu valor sistemático para a família. Amostras de espécimes herborizadas ou preservadas em álcool foram incluídas em historresina, seccionadas transversal e longitudinalmente e posteriormente observadas e fotografadas. Os dados obtidos de 144 espécies apontam que o caráter analisado é relativamente estável e a maioria das tribos e grupos amostrados apresenta tegumento externo formado por duas camadas. Variações são observadas em Melastomeae, Merianieae e Miconieae, e parecem possuir valores sistemático e adaptativo para estes grupos. Em Melastomeae, o clado "*Marcetia* & allies" pode ser caracterizado por apresentar óvulos com tegumento externo formado por três camadas. Em Merianieae, devido a variação na espessura do tegumento externo e a ausência de estudos filogenéticos com boa representatividade, nenhuma consideração taxonômica pode ser feita. Em Miconieae, a ocorrência de três ou mais camadas no tegumento externo pode estar relacionada a presença de frutos endozoocórios. O gênero

*Physeterostemon* e um subclado dentro de “*Conostegia* s.l.” são delimitados pela ocorrência de duas camadas no tegumento externo. No clado “Miconia IV” o surgimento de mais de três camadas de células no tegumento externo parece ter sido um evento selecionado em linhagens com sementes grandes. Os dados obtidos evidenciam a importância sistemática deste caráter embriológico para a família.

## ABSTRACT

Melastomataceae is resolved as a monophyletic group but internal relationships within the family are not yet fully resolved. Ovule characters are relatively constant in the angiosperms and for this, of a great interest to systematic analyses. The outer integument thickness and the curvature of the ovule are not constant in Melastomataceae but the limited available data do not assist in elucidating the relationships among groups within this family. Thus, this study aims to analyze the number of ovule outer integument layers in species from different lineages of Melastomataceae in order to evaluate the systematic value of this character for the family. Herborized or alcohol-preserved samples from 144 species belonging to 14 tribes were embedded in historesin and transversally and longitudinally sectioned. Samples from herbarium specimens were rehydrated prior to embedding. Data obtained show that the character is relatively stable, with most of the tribes and sampled groups presenting a bi-layered outer integument. Variations are observed in Melastomeae, Merianieae and Miconieae, possibly with systematic and adaptive. In Melastomeae, the clade "*Marcetia* & allies" can be characterized by a tri-layered outer integument. Considering the thickness outer integument variation in Merianieae and the absence of phylogenetic studies with a good sampling, no systematics considerations can be made regarding the use of analyzed character in this group. Most species in Miconieae exhibit three or more layers in the outer integument and it seems to be related to endozoochoric fruits. The genus *Physeterostemon* and a subclade in "*Conostegia* s.l." are delimited by the occurrence of two layers in the outer integument. More than three layers in the outer integument of "*Miconia* IV" occurs strictly in the "*Miconia discolor* subclade" members and it appears to be an event that was selected in the lineages with large seeds. Our

data highlight the systematic value of the outer integument thickness and hypothesize some functional significance for this embryologic character in Melastomataceae.

## INTRODUÇÃO

Melastomataceae Juss., com cerca de 4500 espécies e 170 gêneros, é a maior família da ordem Myrtales e uma das maiores entre as angiospermas, com riqueza notável de espécies no Novo Mundo, com ca. 2950 (Renner 1993, Conti *et al.* 1996, APG III 2009).

Apesar do monofiletismo evidente (Clausing & Renner 2001), a circunscrição e as relações dentro de Melastomataceae não estão totalmente compreendidas e ainda passam por mudanças (Clausing & Renner 2001, Fritsch *et al.* 2004, Michelangeli *et al.* 2004, Penneys *et al.* 2010, Goldenberg *et al.* 2012, Michelangeli *et al.* 2013). Embora a última revisão reconheça 12 tribos para a família (Clausing & Renner 2001), trabalhos recentes propuseram a criação de duas novas tribos: Henrietteae (Penneys *et al.* 2010) e Cyphostyleae (Michelangeli *et al.* 2011), além de mudanças consideráveis na delimitação de outras (Fritsch *et al.* 2004, Michelangeli *et al.* 2004, Goldenberg *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009, Penneys & Judd 2011, Goldenberg *et al.* 2012, Michelangeli *et al.* 2013, Penneys & Judd 2013).

Caracteres embriológicos são tradicionalmente utilizados na sistemática como auxílio para a compreensão das posições e delimitação de grupos de angiospermas (Davis 1966, Tobe 1989). Entre estes caracteres, destacam-se os relacionados aos óvulos, que podem apresentar variações quanto a sua posição no ovário, à espessura do nucelo, ao número e à espessura dos tegumentos, ao grau e à direção da curvatura e às diferenciações histológicas (Endress 2011).

Por serem relativamente constantes nos táxons, os caracteres do óvulo são reconhecidamente de grande interesse na sistemática (Davis 1966; Endress 2011). Em angiospermas, muitos clados podem ser caracterizados pelas características de seus

óvulos (Endress 2011), como na ordem Myrtales, embriologicamente reconhecida por apresentar óvulos crassinucelados, tegumento interno formado por duas camadas de células e micrópila formada por ambos os tegumentos (Tobe & Raven 1983).

Particularmente em Melastomataceae, apesar dos estados de caráter conservados compartilhados pelos representantes de Myrtales, a espessura do tegumento externo é variável, podendo ser formada por duas ou mais camadas de células (Ziegler 1925, Subramanyam 1942, 1944, 1948, 1951, Etheridge & Herr 1968, Tobe & Raven 1983, Medeiros & Morretes 1996, Caetano *et al.* 2013).

Apesar da importância das características do óvulo na sistemática de angiospermas, em Melastomataceae os dados disponíveis são escassos, o que impede sua utilização na delimitação e/ou compreensão de relações entre os grupos da família. Assim, o objetivo deste trabalho é levantar informações referentes ao número de camadas no tegumento externo do óvulo em um grande número de espécies de diferentes linhagens em Melastomataceae, a fim de avaliar seu valor sistemático para a família.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas 144 espécies pertencentes a 14 das 15 tribos ou grupos atualmente reconhecidos em Melastomataceae (exceto Astronieae) (Clausing & Renner 2001, Stone 2006, Goldenberg *et al.* 2008, Amorim *et al.* 2009, Penneys *et al.* 2010, Reginato *et al.* 2010, Mendoza-Cifuentes & Fernández-Alonso 2011, Penneys & Judd 2013, Goldenberg *et al.* 2012, Kriebel 2014, Michelangeli *et al.* 2013). Dados de 21 espécies disponíveis na literatura também foram utilizados na comparação dos resultados. (Tabela 1).

Óvulos de flores ou de botões em pré-antese foram amostrados. Essas amostras foram obtidas de materiais fixados e, posteriormente, preservados em álcool, ou de espécimes herborizados (detalhes no apêndice), que foram reidratados segundo Smith & Smith (1942).

As amostras selecionadas foram embebidas em resina (Leica e Heraeus Kulzer GmbH, Germany) e seccionadas transversal e longitudinalmente usando um micrótomo rotativo com lâmina de aço. As secções obtidas com aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$  foram aderidas a lâminas de vidro e coradas em solução de azul de toluidina (C.I. 52040) 0,05% em tampão fosfato de sódio 0,01M e pH 6,8. As observações e fotomicrografias foram realizadas em microscópio de luz (DM 5000 e DM 4500, Leica, Germany) com câmera digital acoplada (DFC 295 e DFC 490, Leica, Germany).

Os resultados aqui obtidos e os dados disponíveis na literatura foram plotados em uma árvore filogenética com informações recentemente publicadas para a família, de forma a comparar os dados das tribos e grupos que atualmente são reconhecidos em Melastomataceae.

## **RESULTADOS**

Todos os representantes analisados de 11 dos 14 grupos amostrados apresentam óvulos com tegumento externo formado por duas camadas de células (Tabela 1, Fig. 1): *Olisbeoideae*, *Kibessieae* (Fig. 2A), *Henrietteae* (Figs. 2B-D), *Bertolonieae* 1 (Fig. 2E), *Dissochateae* + *Sonerileae*, *Blakeeae* (Fig. 2F), *Cyphostyleae*, *Bertolonieae* 2 (Fig. 2G), *Merianthera* & allies (Fig. 2H), *Rhexieae* (Figs. 3A-B) e *Microlicieae* (Fig. 3C).

A ocorrência de óvulos com tegumento externo formado por duas, três, ou eventualmente mais de três camadas de células foi observada em espécies de Melastomeae (Figs. 4 e 5), Merianieae (Fig. 6) e Miconieae (Figs. 7 e 8) (Tabela 1, Fig. 1).

Em Melastomeae, os representantes analisados de “*Marcetia* & allies” apresentam tegumento externo formado por três camadas de células (Figs. 4A-G), enquanto nos do “Core Melastomeae” são observadas duas camadas (Figs. 5A-E).

Em Merianieae a espessura do tegumento externo de um mesmo óvulo varia entre duas e três camadas de células em *Axinaea dentata* (Fig. 6A), *A. grandifolia*, *A. minutiflora* e *Meriania urceolata* (Fig. 6B). Em *Axinaea* sp. (Fig. 6C), *M. sclerophylla* (Fig. 6D) e *M. subumbellata* o tegumento externo é formado por três camadas, enquanto em *Graffenrieda gracilis*, *G. harlingii* (Fig. 6E), *G. latifolia* (Fig. 6F) e *Macrocentrum repens* (Fig. 6G) esta camada é biestratificada.

Em Miconieae, grande parte das espécies apresenta tegumento externo do óvulo formado por três camadas celulares (Figs. 7A-F). Entretanto, variações foram observadas em espécies dos clados “*Eriocnema* + *Physeterostemon*”, “Caribbean”, “*Conostegia* s.l.” e “*Miconia* IV” e no grado “*Miconia* V”.

No clado “*Eriocnema* + *Physeterostemon*”, enquanto *Physeterostemon thomasi* apresenta duas camadas de células formando o tegumento externo (Fig. 8A), *Eriocnema acaulis* (Fig. 8B) e *E. fulva* apresentam três.

No clado “Caribbean”, em *Charianthus alpinus* (Fig. 8C) e *C. nodosus* o tegumento externo é formado por duas camadas celulares. Três camadas foram observadas em *Tetrazygia crotonifolia* (Fig. 8D) e *T. elaeagnoides*.

No clado “*Conostegia* s.l.”, em representantes de *Conostegia* e *Miconia* foram observados óvulos com tegumento externo formado por duas camadas celulares (Figs. 8E-G), mas três camadas ocorrem em *Clidemia mortoniana* (Fig. 8H) e *C. spectabilis*.

Em “*Miconia IV*” há uma grande variação em relação ao caráter analisado. O tegumento externo do óvulo pode ser formado por três, quatro (Figs. 9A-D) ou mais camadas. Eventualmente, um mesmo óvulo pode apresentar variações: três a quatro ou seis a sete camadas celulares no tegumento externo.

Em “*Miconia V*” a maior parte das espécies exibe tegumento externo do óvulo formado por três camadas; no entanto, duas camadas foram observadas em *M. ceramicarpa* (Fig. 9E), e três a quatro em *M. sellowiana* (Fig. 9F).

O tegumento interno do óvulo é formado por duas camadas de células em todas as espécies analisadas (Figs. 2-9).

**Tabela 1.** Listagem das espécies de Melastomataceae estudadas com o número de camadas no tegumento externo do óvulo e a fonte dos dados apresentados.

	<b>Espécies</b>	<b>Nº de camadas do tegumento externo do óvulo</b>	<b>Fonte</b>	
<b>Tribo Olisbeoideae</b>	<i>Memecylon heyneanum</i> Benth. ex Wight & Arn.	2	Subramanyam 1942	
	<i>Memecylon umbellatum</i> Burm. f.	2	Corner 1976	
<b>Tribo Kibessieae</b>	<i>Pternandra coerulescens</i> Jack	2	Neste estudo	
	<i>Pternandra azurea</i> (Bl.) Burk	2	Corner 1976	
<b>Tribo Henrietteae</b>	<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana	2	Neste estudo	
	<i>Henriettea ramiflora</i> (Sw.) DC.	2	Neste estudo	
	<i>Henriettea saldanhaei</i> Cogn.	2	Neste estudo	
	<i>Henriettea succosa</i> (Aubl.) DC.	2	Neste estudo	
	<i>Loreya mespiloides</i> Miq.	2	Neste estudo	
<b>Tribo Bertolonieae (1)</b>	<i>Bertolonia mosenii</i> Cogn.	2	Neste estudo	
	<i>Phainantha laxiflora</i> (Triana) Gleason	2	Neste estudo	
<b>Tribo Rhexieae</b>	<i>Arthrostemma ciliatum</i> Pav. ex D. Don	2	Neste estudo	
	<i>Rhexia mariana</i> L.	2	Etheridge & Herr 1968	
<b>Tribo Microlicieae</b>	<i>Microlicia euphorbioides</i> Mart.	2	Neste estudo	
	<i>Rhynchanthera grandiflora</i> (Aubl.) DC.	2	Neste estudo	
<b>Tribo Melastomeae</b>	<b><i>Marcetia</i> &amp; allies</b>	<i>Acanthella sprucei</i> Hook.f.	3	Neste estudo
		<i>Aciotis purpurascens</i> (Aubl.) Triana	3	Neste estudo
		<i>Aciotis fragilis</i> (DC.) Cogn.	3	Neste estudo
		<i>Acisanthera hedyotoidea</i> (C.Presl) Triana	3	Neste estudo
		<i>Appendicularia</i> sp	3	Neste estudo
		<i>Comolia microphylla</i> Benth.	3	Neste estudo
		<i>Comolia</i> sp	3	Neste estudo
		<i>Ernestia glandulosa</i> Gleason	3	Neste estudo
		<i>Macairea radula</i> (Bonpl.) DC.	3	Neste estudo
		<i>Marcetia taxifolia</i> (A. St.-Hil.) DC.	3	Neste estudo
		<i>Nepsera aquatica</i> (Aubl.) Naudin	3	Neste estudo
		<i>Sandemania hoehnei</i> (Cogn.) Wurdack	3	Neste estudo
		<i>Siphanthera hostmannii</i> Cogn.	3	Neste estudo

		<b>Espécies</b>	<b>Nº de camadas do tegumento externo do óvulo</b>	<b>Fonte</b>
		<i>Brachyotum ledifolium</i> (Desr.) Triana	2	Neste estudo
		<i>Desmocelis villosa</i> (Aubl.) Naud.	2	Neste estudo
		<i>Heterocentron elegans</i> (Schltdl.) Kuntze	2	Neste estudo
		<i>Melastoma malabatricum</i> L.	2	Subramanyam 1948
		<i>Monochaetum calcaratum</i> (DC.) Triana	2	Neste estudo
		<i>Monochaetum ensiferum</i> Naudin	2	Ziegler 1925
<b>Tribo Melastomeae</b>	<b>Core Melastomeae</b>	<i>Monochaetum meridense</i> Naudin	2	Neste estudo
		<i>Osbeckia cupularis</i> D.Don ex Wight & Arn.	2	Subramanyam 1942
		<i>Osbeckia wightiana</i> Benth. ex Wall.	2	Subramanyam 1942
		<i>Osbeckia hispidissima</i> Wight	2	Subramanyam 1942
		<i>Pterolepis glomerata</i> (Rottb.) Miq.	2	Neste estudo
		<i>Tibouchina clavata</i> (Pers.) Wurdack	2	Neste estudo
		<i>Tibouchina clinopodifolia</i> (DC.) Cogn.	2	Neste estudo
		<i>Tibouchina semidecandra</i> (Schranck & Mart. ex DC.) Cogn.	2	Ziegler 1925
<b>Tribo Cyphostyleae</b>		<i>Allomaieta grandiflora</i> Gleason	2	Neste estudo
		<i>Diplarpea paleacea</i> Triana	2	Neste estudo
<b>Tribo Bertolonieae (2)</b>		<i>Triolena amazonica</i> (Pilg.) Wurdack	2	Neste estudo
		<i>Triolena obliqua</i> (Triana) Wurdack	2	Neste estudo
		<i>Behuria glutinosa</i> Cogn.	2	Neste estudo
		<i>Cambessedesia espora</i> (A.ST.Hil. ex Bonpl.) DC.	2	Neste estudo
<b>Tribo Merianthera &amp; allies</b>		<i>Dolichoura spiritusantensis</i> Brade	2	Neste estudo
		<i>Huberia consimilis</i> Baumgratz	2	Neste estudo
		<i>Merianthera bullata</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	2	Neste estudo
		<i>Merianthera parvifolia</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	2	Neste estudo

		<b>Espécies</b>	<b>Nº de camadas do tegumento externo do óvulo</b>	<b>Fonte</b>
<b>Tribo Blakeeae</b>		<i>Blakea trinervia</i> L.	2	Corner 1976
		<i>Huilaea calyptrata</i> Penneys & M. E. Morales	2	Neste estudo
		<i>Huilaea ecuadorensis</i> Wurdack	2	Neste estudo
		<i>Topobea multiflora</i> (D.Don) Triana	2	Neste estudo
<b>Tribo Dissochateae + Sonerileae</b>		<i>Diplectria divaricata</i> (Willd.) Kuntze	2	Neste estudo
		<i>Oxyspora paniculata</i> (D.Don) DC.	2	Subramanyan 1951
		<i>Sonerila wallichii</i> Benn.	2	Subramanyan 1944
<b>Tribo Merianieae</b>		<i>Axinaea dentata</i>	2-3	Neste estudo
		<i>Axinaea grandifolia</i> (Naudin) Triana	2-3	Neste estudo
		<i>Axinaea minutiflora</i>	2-3	Neste estudo
		<i>Axinaea</i> sp	3	Neste estudo
		<i>Graffenrieda gracilis</i> (Triana) L.O.Williams	2	Neste estudo
		<i>Graffenrieda harlingii</i> Wurdack	2	Neste estudo
		<i>Graffenrieda latifolia</i> (Naudin) Triana	2	Neste estudo
		<i>Macrocentrum repens</i> (Gleason) Wurdack	2	Neste estudo
		<i>Meriania sclerophylla</i> (Naudin) Triana	3	Neste estudo
		<i>Meriania subumbellata</i> Cogn.	3	Neste estudo
	<i>Meriania urceolata</i> Triana	2-3	Neste estudo	
<b>Tribo Miconieae</b>	<b>Eriocnema + Physeterostemon</b>	<i>Eriocnema acaulis</i> Triana	3	Neste estudo
		<i>Eriocnema fulva</i> Naudin	3	Neste estudo
		<i>Physeterostemon thomasi</i> Amorim, Michelangeli & Goldenb.	2	Neste estudo
	<b>Miconia I</b>	<i>Miconia dodecandra</i> Cogn.	3	Neste estudo
		<i>Miconia superba</i> Ule	3	Neste estudo
	<b>Miconia II</b>	<i>Miconia centrodesma</i> Naudin	3	Neste estudo
<b>Leandra + Ossaea</b>	<i>Leandra reversa</i> (DC.) Cogn.	3	Neste estudo	
	<i>Ossaea capillaris</i> (D.Don) Cogn.	3	Neste estudo	
<b>Tribo Miconieae</b>	<b>Tococa</b>	<i>Tococa formicaria</i> Mart.	3	Simão 2006
	<b>Caribbean</b>	<i>Charianthus alpinus</i> (Sw.) R.A.Howard	2	Neste estudo
		<i>Charianthus nodosus</i> (Desr.) Triana	2	Neste estudo
		<i>Tetrazygia crotonifolia</i> (Desr.) DC.	3	Neste estudo
		<i>Tetrazygia elaeagnoides</i> (Sw.) DC.	3	Neste estudo

	<b>Espécies</b>	<b>Nº de camadas do tegumento externo do óvulo</b>	<b>Fonte</b>
<b>Tribo Miconieae</b>	<i>Clidemia mortoniana</i> Standl.	3	Neste estudo
	<i>Clidemia spectabilis</i> Gleason	3	Neste estudo
	<i>Conostegia bigibbosa</i> Cogn.	2	Neste estudo
	<i>Conostegia brenesii</i> Standl.	2	Neste estudo
	<i>Conostegia icosandra</i> (Sw. ex Wikstr.) Urb.	2	Neste estudo
	<i>Conostegia lasiopoda</i> Benth.	2	Neste estudo
	<i>Conostegia montealegreana</i> Cogn.	2	Neste estudo
	<i>Conostegia speciosa</i> Naudin	2	Neste estudo
	<i>Conostegia subcrustulata</i> (Beurl.) Triana	2	Neste estudo
	<i>Conostegia xalapensis</i> (Bonpl.) D. Don ex DC.	2	Neste estudo
	<i>Miconia friedmaniorum</i> Almeda & Umaña	2	Neste estudo
	<i>Miconia ligulata</i> Almeda	2	Neste estudo
	<i>Miconia schlimii</i> Triana	2	Neste estudo
<b>Mecranium, Anaectocalyx</b>	<i>Mecranium acuminatum</i> (DC.) Skean	3	Neste estudo
	<i>Mecranium latifolium</i> (Cogn.) Skean	3	Neste estudo
	<i>Miconia ciliata</i> (Rich.) DC.	3	Neste estudo
	<i>Tococa platyphylla</i> Benth.	3	Neste estudo
<b>Miconia III</b>	<i>Leandra subseriata</i> (Naudin) Cogn.	3	Neste estudo
	<i>Miconia crocea</i> (Desr.) Naudin	3	Neste estudo
	<i>Miconia denticulata</i> Naudin	3	Neste estudo
	<i>Miconia goniostigma</i> Triana	3	Neste estudo
	<i>Miconia papillosa</i> (Desr.) Naudin	3	Neste estudo
	<i>Miconia stenobotrys</i> (Rich.) Naudin	3	Neste estudo
	<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn.	3	Neste estudo

	<b>Espécies</b>	<b>Nº de camadas do tegumento externo do óvulo</b>	<b>Fonte</b>
	<i>Miconia budlejoides</i> Triana	3	Neste estudo
	<i>Miconia cabucu</i> Hoehne	6 a 7	Medeiros & Morretes 1996
	<i>Miconia capixaba</i> R. Goldenb.	3-4	Neste estudo
	<i>Miconia castaneiflora</i> Naudin	4	Neste estudo
	<i>Miconia cercophora</i> Wurdack	3	Neste estudo
	<i>Miconia chartacea</i> Triana	3-4	Neste estudo
<b>Miconia IV</b>	<b>Subclado “Miconia discolor”</b> <i>Miconia cinerascens</i> Miq.	4	Neste estudo
	<i>Miconia cubatanensis</i> Hoehne	5	Neste estudo
	<i>Miconia discolor</i> DC.	3	Neste estudo
	<i>Miconia fasciculata</i> Gardner	3	Neste estudo
	<i>Miconia hyemalis</i> A.St.-Hil. & Naudin	3-4	Neste estudo
	<i>Miconia lymanii</i> Wurdack	4	Neste estudo
	<i>Miconia pepericarpa</i> Mart. ex DC.	3-4	Neste estudo
	<i>Miconia rufescens</i> (Aubl.) DC.	3	Neste estudo
	<i>Miconia sclerophylla</i> Triana	4	Neste estudo
	<b>outros</b>	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	3
<i>Miconia donaeana</i> Naudin		3	Neste estudo
<i>Miconia fallax</i> DC.		3	Neste estudo
<i>Miconia laevigata</i> (L.) DC.		3	Neste estudo
<i>Miconia latecrenata</i> DC. Naudin		3	Neste estudo
<i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl.) DC.		3	Neste estudo
<i>Miconia rubiginosa</i> (Bonpl.) DC.		3	Simão 2006
<i>Miconia serrulata</i> (DC.) Naudin		3	Neste estudo
<b>Miconia V</b>	<i>Leandra rufescens</i> (DC.) Cogn.	3	Neste estudo
	<i>Miconia ceramicarpa</i> (DC.) Cogn.	2	Neste estudo
	<i>Miconia chamissois</i> Naudin	3	Caetano <i>et al.</i> 2013
	<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Triana	3	Neste estudo
	<i>Miconia nervosa</i> (Sm.) Triana	3	Neste estudo
	<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.	3	Neste estudo
	<i>Miconia rugosa</i> Triana	3	Neste estudo
	<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	3-4	Neste estudo

		<b>Espécies</b>	<b>Nº de camadas do tegumento externo do óvulo</b>	<b>Fonte</b>
<b>Tribo Miconieae</b>	<b><i>Clidemia</i></b>	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	3	Neste estudo
	<b><i>Leandra s.s. + Pleiochiton</i></b>	<i>Leandra cordifolia</i> (Naud.) Cogn.	3	Subramanyam 1942
		<i>Leandra melastomoides</i> Raddi	3	Neste estudo
		<i>Ossaea amygdaloides</i> (DC.) Triana	3	Neste estudo
		<i>Ossaea confertiflora</i> (DC.) Triana	3	Neste estudo
		<i>Pleiochiton ebracteatum</i> Triana	3	Neste estudo

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo apresenta dados referentes a um caráter embriológico que se revelou importante na sistemática de Melastomataceae. A espessura do tegumento externo do óvulo foi verificada em um grande número de espécies de diferentes linhagens da família e sua importância sistemática é destacada.

Óvulos com tegumento externo formado por duas camadas celulares ocorrem nos grupos basais e em grande parte das tribos de Melastomataceae, sendo possivelmente o estado de caráter plesiomórfico no grupo. Em Myrtales, apesar de haver variações quanto ao número de camadas no tegumento externo do óvulo, a ocorrência de duas camadas é o estado de caráter mais frequente entre as espécies de praticamente todas as famílias já analisadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Compilação de dados referente ao número de camadas presente no tegumento externo do óvulo em espécies de famílias pertencentes à Myrtales.

Famílias	Número de camadas no tegumento externo do óvulo	Referências
<b>Combretaceae</b>	<b>2</b> na maioria das espécies; <b>3:</b> <i>Bucida</i> e <i>Terminalia</i> ;	1
<b>Onagraceae</b>	<b>2</b> na maioria das espécies; <b>2-3:</b> <i>Calylophus</i> , <i>Camissonia serrulatus</i> , <i>Gaura longiflora</i> ; <i>Ludwigia peploides</i> ; <b>2-4:</b> <i>Gaura coccinea</i> e <i>Stenosiphon linifolius</i> ; <b>2-5:</b> <i>Hauya</i> , <i>Oenothera</i> ; <b>3-4:</b> <i>Lopezia</i> ; <b>3-5:</b> <i>Circaea</i> , <b>3-6:</b> <i>Fuchsia</i> ;	1, 2, 3,
<b>Lytraceae</b>	<b>2</b> na maioria das espécies; <b>4:</b> <i>Punica</i> ; <b>4-8:</b> <i>Lagerstroemia</i> e <i>Punica</i> ; <b>5:</b> <i>Cuphea</i> ; massivo: <i>Trapa</i> ;	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9
<b>Myrtaceae</b>	<b>2</b> na maioria das espécies; <b>2-4</b> vários gêneros; <b>3:</b> <i>Eucalyptus stellulata</i> ; <b>3-4:</b> <i>Angophora</i> ;	1, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
<b>Melastomataceae</b>	<b>2</b> na maioria das espécies; <b>2-3:</b> <i>Axinaea</i> e <i>Meriania</i> ; <b>3:</b> <i>Marcetia</i> & allies, <i>Macrocentrum</i> , <i>Meriania</i> e <i>Miconieae</i> ; <b>3</b> ou mais: <i>Miconieae</i> ;	1, 19
<b>Crypteroniaceae</b>	<b>2</b> <i>Crypteronia paniculata</i> ; <i>Axinandra zeylanica</i> - <b>2:</b> início do desenvolvimento e <b>3:</b> final do desenvolvimento; <b>2-3:</b> <i>Dactylocladus stenostachys</i>	20, 21, 22
<b>Alzateaceae</b>	<i>Alzatea verticillata</i> : <b>2</b> - início do desenvolvimento e <b>2-4:</b> final do desenvolvimento;	23
<b>Penaeaceae</b>	<b>2</b> maioria das espécies; <b>3:</b> <i>Olinia</i> ;	24, 25, 26

MYRTALES

1. Tobe & Raven 1983a; 2. Tobe & Raven 1985; 3. Tobe & Raven 1986; 4. Joshi & Venkateswarlu 1935a; 5. Joshi & Venkateswarlu 1935b; 6. Joshi & Venkateswarlu 1936; 7. Venkateswarlu 1937; 8. King 1947; 9. Ghosh 1954; 10. Prakash 1969a; 11. Prakash 1969b; 12. Prakash 1969c 13. Davis 1968; 14. Davis 1969; 15. Roy 1955; 16. Roy 1960; 17. Tobe & Raven 1987a; 18. Tobe & Raven 1990; 19. Neste estudo; 20. Tobe & Raven 1983b; 21. Tobe & Raven 1987b; 22. Tobe & Raven 1987c; 23. Tobe & Raven 1984a; 24. Tobe & Raven 1984b; 25. Tobe & Raven 1984c; 26. Tobe & Raven 1984d.

O tegumento externo do óvulo formado por três ou mais camadas, surgiu em pelo menos três tribos de Melastomataceae: Melastomeae, Merianieae e Miconieae.

Em Melastomeae, a ocorrência de três camadas celulares no tegumento externo do óvulo deve ser uma sinapomorfia para o clado “*Marcetia* & allies”, uma vez que duas camadas foram observadas em espécies do clado “core Melastomeae” e das tribos proximamente relacionadas Rhexieae e Microlicieae.

Microlicieae, Rhexieae, “*Marcetia* & allies” e “core Melastomeae” formam um grande grupo monofilético em Melastomataceae e compartilham entre si a presença de anteras com pedoconectivos bem desenvolvidos e frutos do tipo cápsula, mas suas relações ainda estão sob discussão (Michelangeli *et al.* 2013). Particularmente, o clado “*Marcetia* & allies” é caracterizado pela presença de flores tetrâmeras (com algumas exceções), ausência de apêndices no ovário (Michelangeli *et al.* 2013) e ocorrência de três camadas de células no tegumento externo do óvulo (neste estudo). O grupo, tradicionalmente inserido em Melastomeae pode, futuramente, ser reconhecido como uma nova tribo em Melastomataceae (R. Goldenberg & F.A. Michelangeli, comunicação pessoal).

Considerando a variação ampla da espessura do tegumento externo em Merianieae, somada à ausência de uma filogenia com boa amostragem e suporte para a tribo, não foi possível inferir sobre a utilização deste caráter na sistemática do grupo. Entretanto, reforçamos a necessidade da ampliação dos estudos embriológicos, que podem fornecer dados importantes na delimitação de clados e na compreensão das relações infragenéricas em Merianieae.

Em Miconieae, grande parte das espécies analisadas apresenta três camadas celulares no tegumento externo do óvulo e a partir deste estado de caráter surgiu uma nova condição, com o tegumento externo formado por mais de três camadas de células.

Os membros de Miconieae são conhecidos por produzirem frutos carnosos (Clausing *et al.* 2000, Michelangeli *et al.* 2004) com dispersão endozoocórica realizada principalmente por pássaros (Renner 1989, Ellison *et al.* 1993, Stiles & Rosselli 1993, Maruyama *et al.* 2013). Uma vez que em Melastomataceae a testa da semente é a camada mecânica responsável pela proteção do embrião (Corner 1976, Cortez & Guerreiro 2008), a presença de uma ou mais camadas no tegumento externo do óvulo em Miconieae pode

corresponder a uma ou mais camadas esclerificadas na testa da semente, conferindo-lhe maior rigidez e espessura. Em *Miconia albicans*, por exemplo, as três camadas do tegumento externo do óvulo se diferenciam no envoltório da semente, composto por uma exotesta de células esclerificadas em paliçadas, seguida pela meso e endotesta, constituída por células esclerificadas cubóides (Cortez & Guerreiro 2008). Na literatura a endozoocoria é frequentemente relacionada com um envoltório resistente na semente (Baskin & Baskin 1998), responsável pela proteção do embrião e de outros componentes seminais (Boesewinkel & Bouman 1984, Mohamed-Yasseen *et al.* 1994). Assim, a presença de camadas adicionais no tegumento externo do óvulo pode ter sido um passo evolutivo importante em uma tribo como Miconieae, com frutos endozoóricos.

É válido ressaltar que frutos carnosos evoluíram independentemente também em Blakeeae, Dissochaeteae, Henrietteae e Olisbeoideae (Renner 1989, Clausen *et al.* 2000, Penneys *et al.* 2010). Em *Memecydom* e *Mouriri* (Olisbeoideae), a presença de uma testa multiplicativa confere as sementes um envoltório bastante espesso (Corner 1976). Por outro lado, em *Blakea*, a testa da semente não é multiplicativa, sendo composta por apenas duas camadas celulares (Corner 1976). Não há informações anatômicas da estrutura da semente para membros de Dissochaeteae e Henrietteae.

Ainda em Miconieae, no clado “*Eriocnema* + *Physeterostemon*”, os dois gêneros parecem ser delimitados pelo número de camadas no tegumento externo: duas em *Physeterostemon* e três em *Eriocnema*.

No clado “Caribbean”, embora *Charianthus* e *Tetrazygia* também apresentem diferenças quanto ao número de camadas no tegumento externo do óvulo, o polifiletismo de *Tetrazygia* (Goldenberg *et al.* 2008) impossibilita o uso do caráter analisado na delimitação dos gêneros analisados. Uma amostragem mais ampla deste clado deve ser realizada para avaliar a utilização sistemática deste caráter.

No clado “*Conostegia* s.l.” a ocorrência de duas camadas celulares no tegumento externo do óvulo delimita um subclado bem apoiado, formado por espécies de *Conostegia* e *Miconia*, embriologicamente distinto de seu grupo irmão, aqui amostrado por *Clidemia mortoniana* e *C. spectabilis*, que apresentam tegumento externo formado por três camadas de células.

Uma nova condição em Miconieae, representada pela ocorrência de mais de três camadas no tegumento externo do óvulo surge no clado “*Miconia* IV” e no grado “*Miconia* V”. Em “*Miconia* IV”, este estado de caráter é observado exclusivamente em espécies pertencentes ao subclado “*Miconia discolor*”, notável por apresentar frutos com poucas sementes grandes (Caddah 2013), que diferem dos frutos com muitas sementes diminutas comumente observadas em Melastomataceae (Corner 1976). Nas espécies analisadas, o surgimento de óvulos com mais de três camadas no tegumento externo parece estar relacionado com sementes grandes, que devem apresentar a testa mais espessa. A única espécie em “*Miconia* V” (*M. sellowiana*) com óvulos de tegumento externo formado por mais de três camadas também apresenta fruto com poucas sementes grandes, reforçando essa relação.

O tegumento interno biestratificado observado em todas as espécies analisadas é um resultado esperado, já que este estado de caráter vem sendo utilizado na delimitação embriológica de Myrtales (Tobe & Raven 1983a, Conti *et al.* 1997).

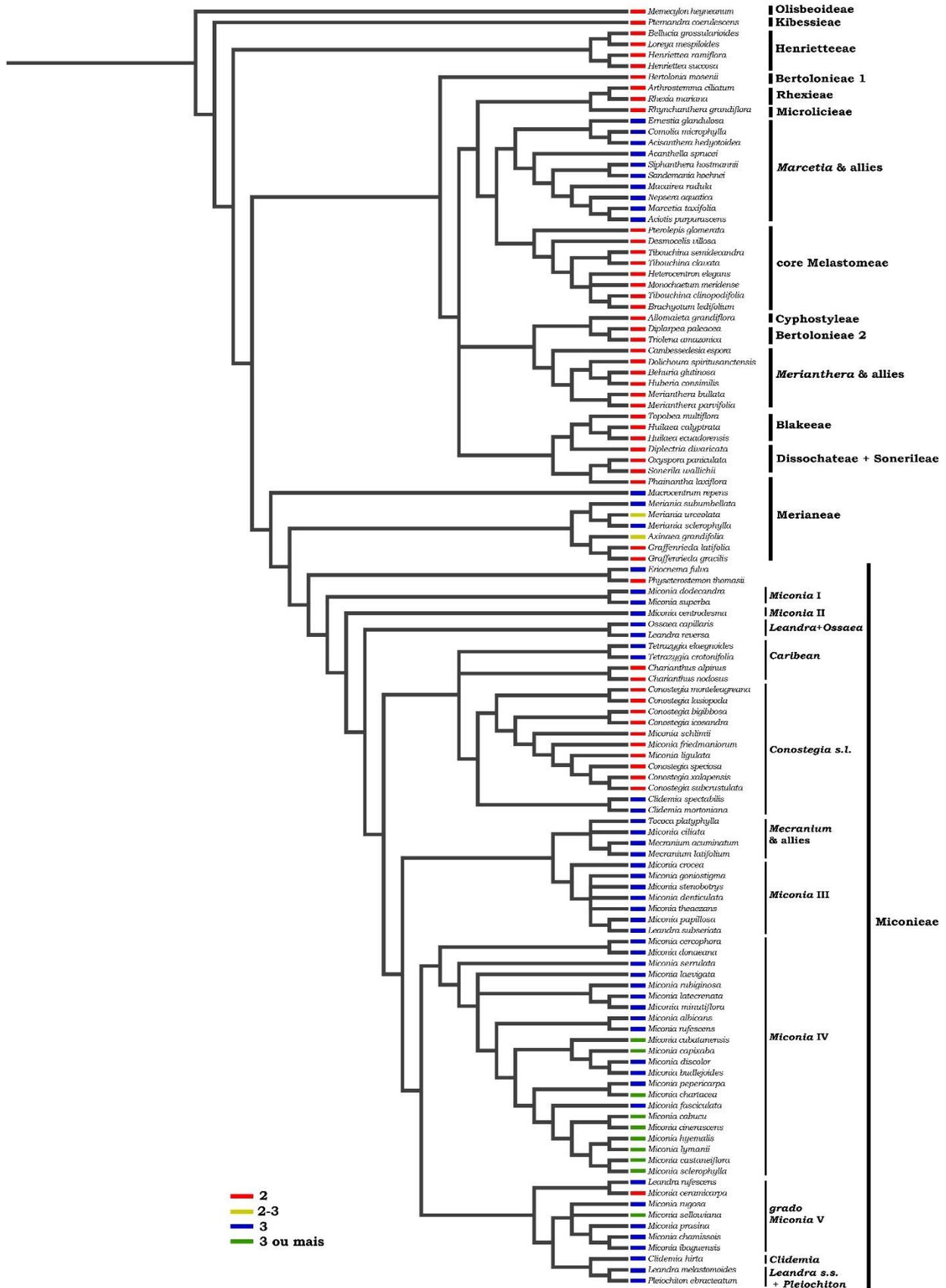
Concluindo, o presente trabalho é pioneiro por apresentar dados de número de camadas no tegumento externo do óvulo em um grande número de espécies de Melastomataceae. Embora a importância sistemática deste caráter seja reconhecida e destacada, seu uso na família foi até então ignorado devido à escassez de dados disponíveis na literatura. Nossos resultados apontam que o caráter é relativamente

estável na família, mas as variações observadas em Melastomeae, Merianieae e Miconieae, podem apresentar valores sistemático e adaptativo para estes grupos.

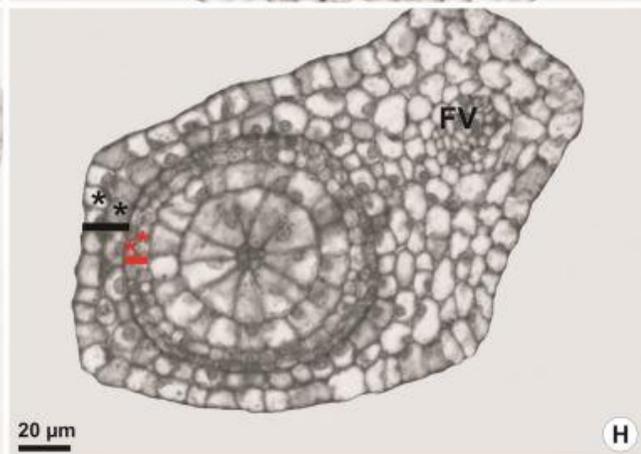
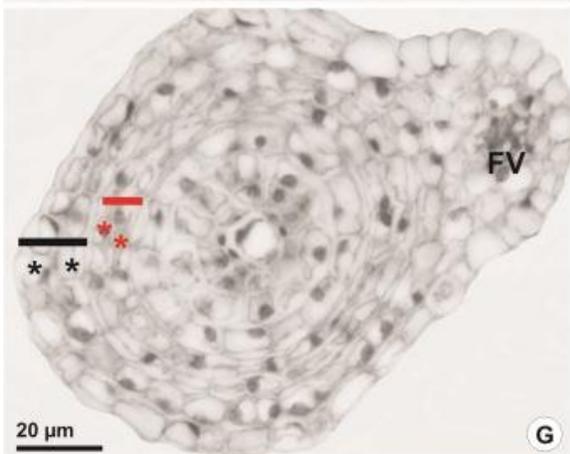
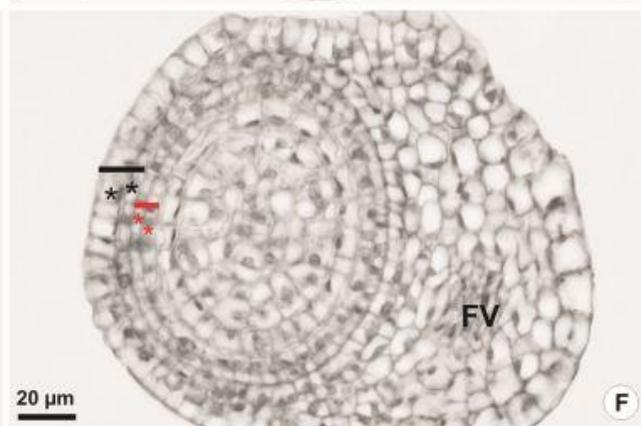
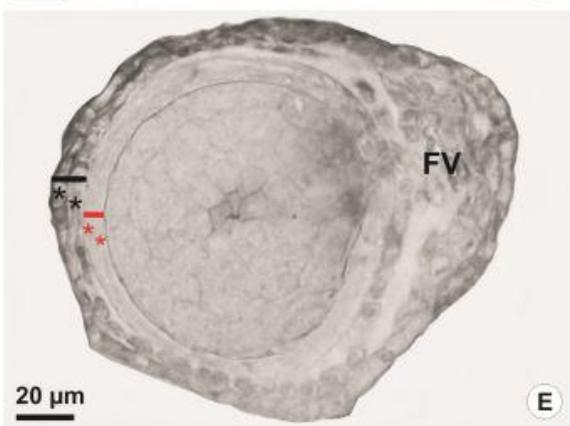
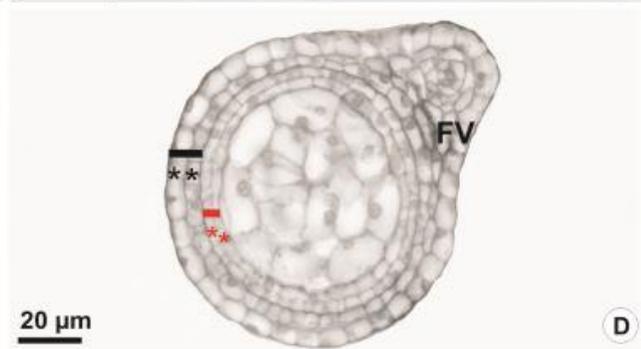
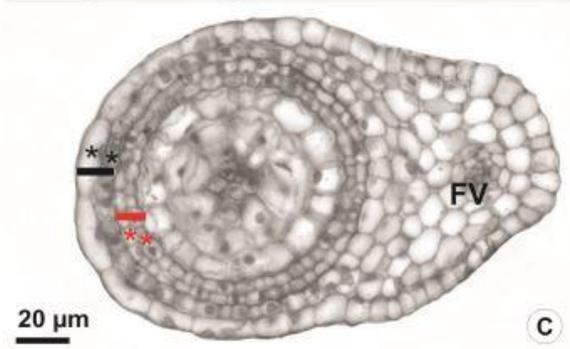
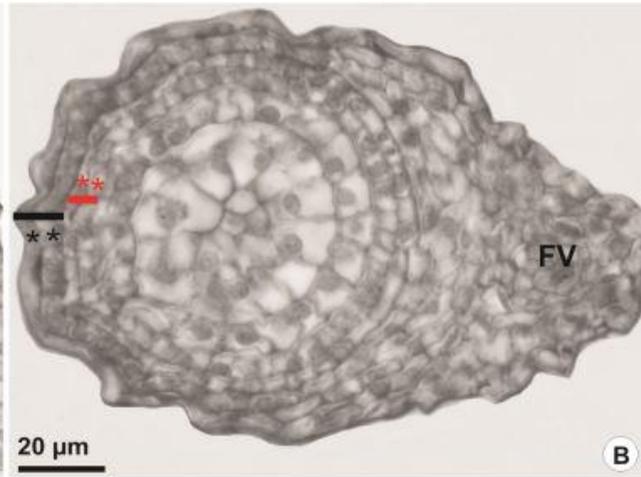
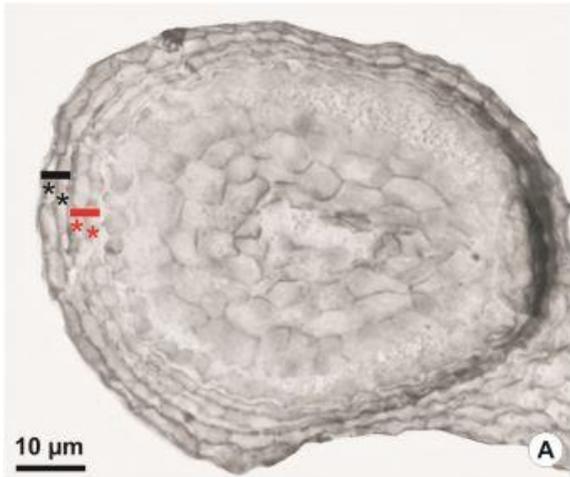


# FIGURAS

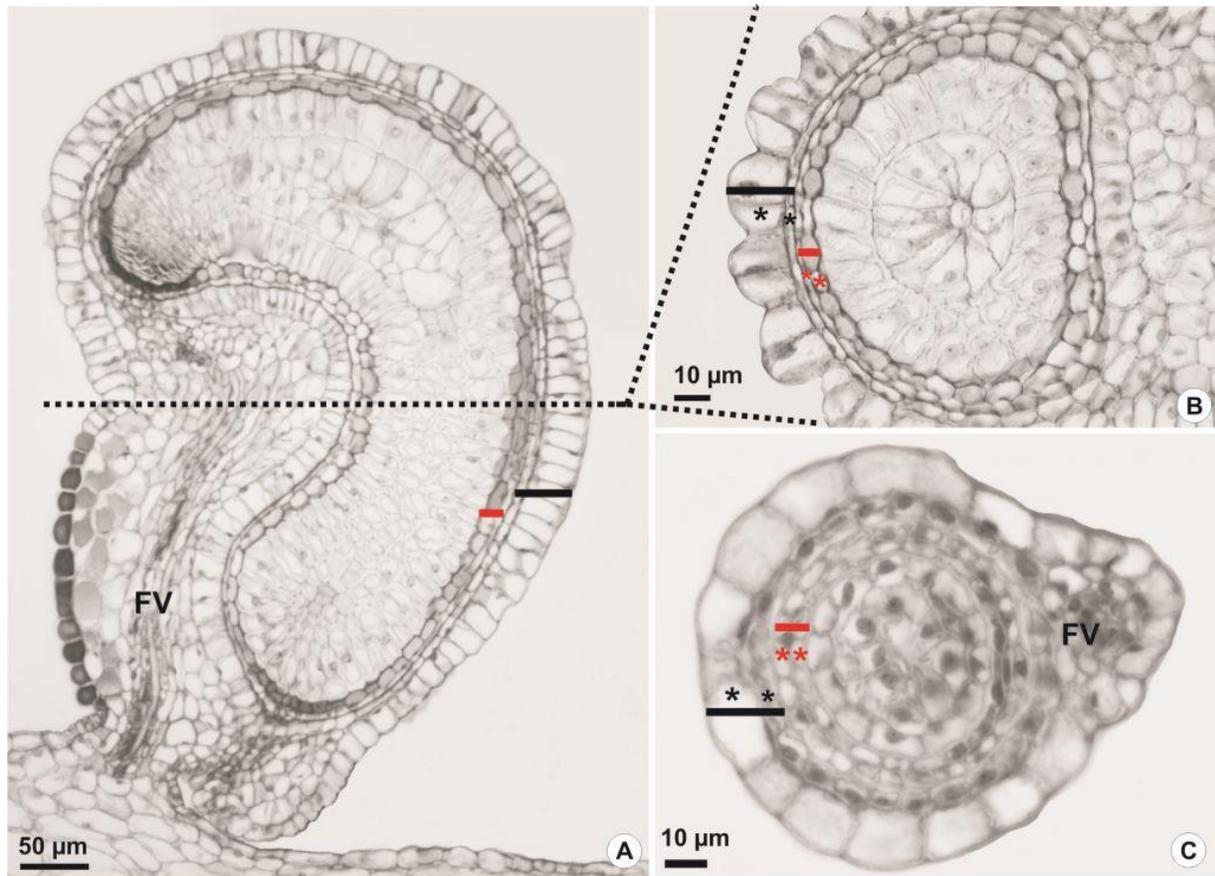
**Figura 1.** Diagrama das relações filogenéticas de Melastomataceae baseado em análises moleculares publicadas (Clausing & Renner 2001; Stone 2006; Goldenberg *et al.* 2008; Amorim *et al.* 2009; Penneys *et al.* 2010; Reginato *et al.* 2010; Mendoza-Cifuentes & Fernández-Alonso 2011; Penneys & Judd 2013; Goldenberg *et al.* 2012; Caddah 2013, Michelangeli *et al.* 2013; Kriebel 2014). O diagrama exhibe a distribuição do número de camadas no tegumento externo do óvulo em diferentes taxa da família.



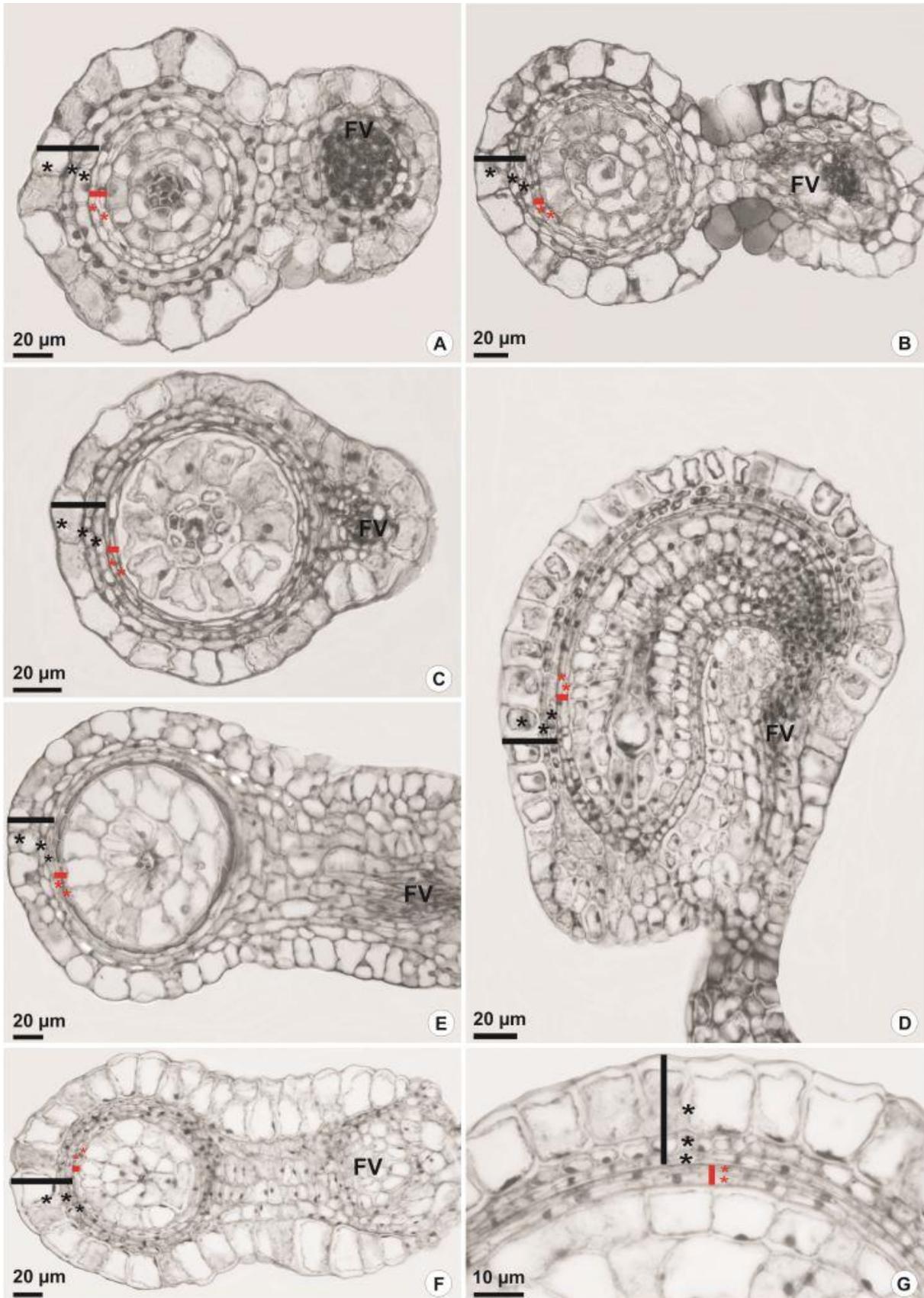
**Figura 2.** Cortes transversais de óvulos de espécies de Melastomataceae posicionadas em tribos que apresentam tegumento externo formado por duas camadas celulares. **A.** *Pternandra coerulescens* (Kibessieae); **B.** *Henriettea succosa* (Henrietteae); **C.** *Henriettea ramiflora* (Henrietteae); **D.** *Loreya mespiloides* (Henrietteae); **E.** *Bertolonia monsenii* (Bertoloniaeae 1); **F.** *Huilaea ecuadorensis* (Blakeeae); **G.** *Triolena obliqua* (Bertoloniaeae 2); **H.** *Merianthera bullata* (“Merianthera & allies”). Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



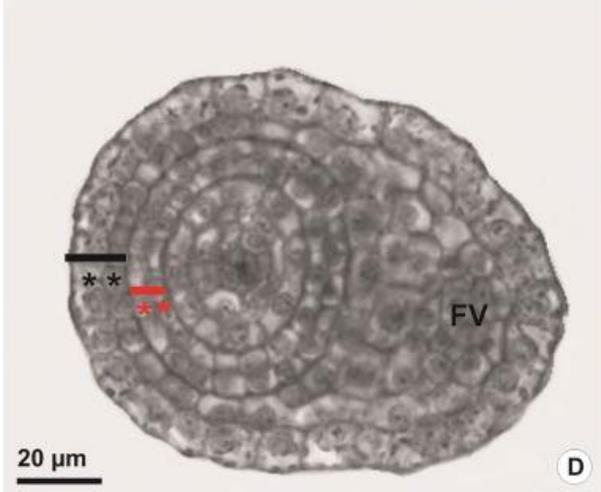
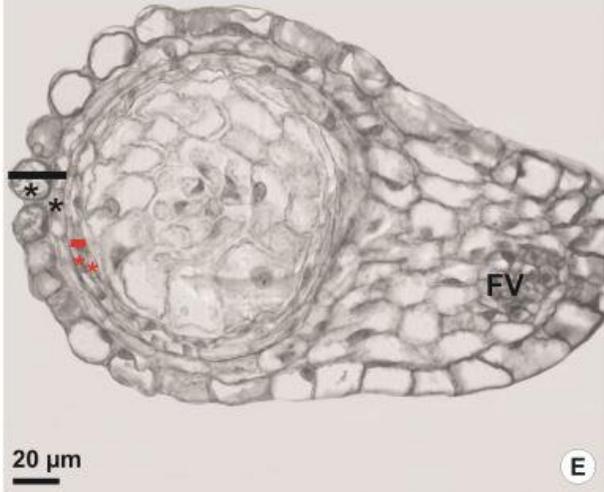
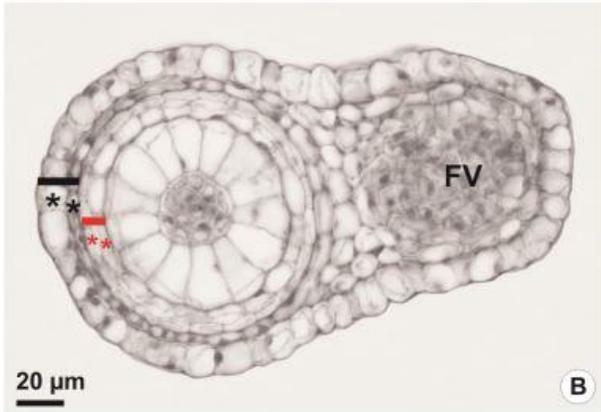
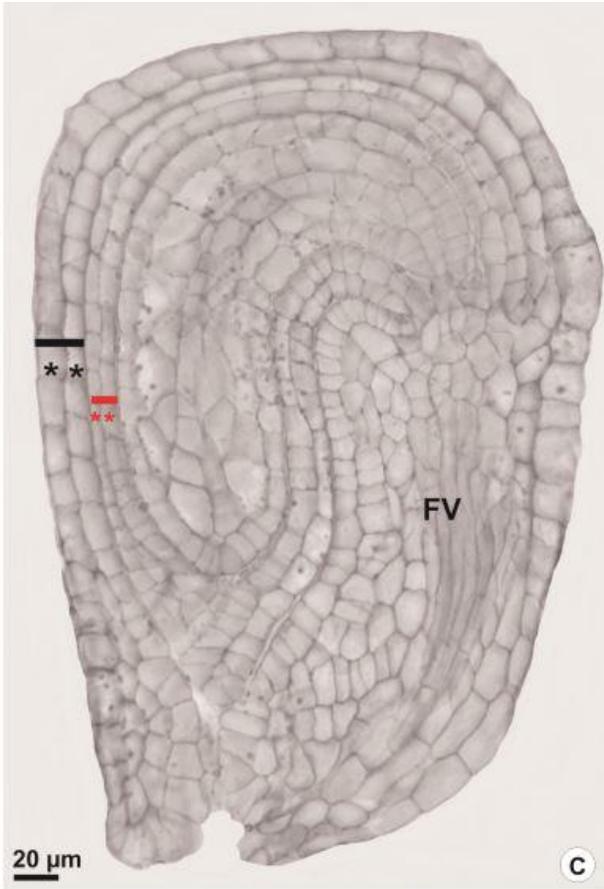
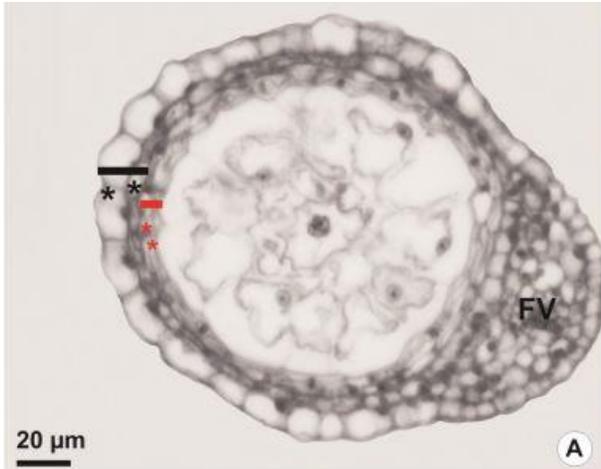
**Figura 3.** Cortes longitudinal **(A)** e transversais **(B e C)** de óvulos de espécies de Melastomataceae posicionadas em tribos que apresentam tegumento externo formado por duas camadas celulares. *Arthrostemma ciliatum* (Rhexieae): corte longitudinal **(A)** e transversal **(B); C.** *Microlicia* (Microlicieae). Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



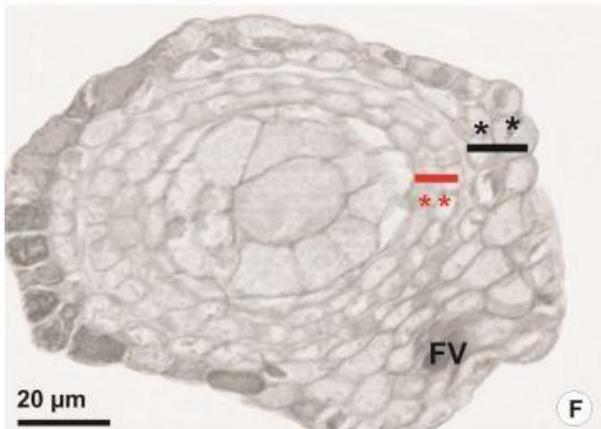
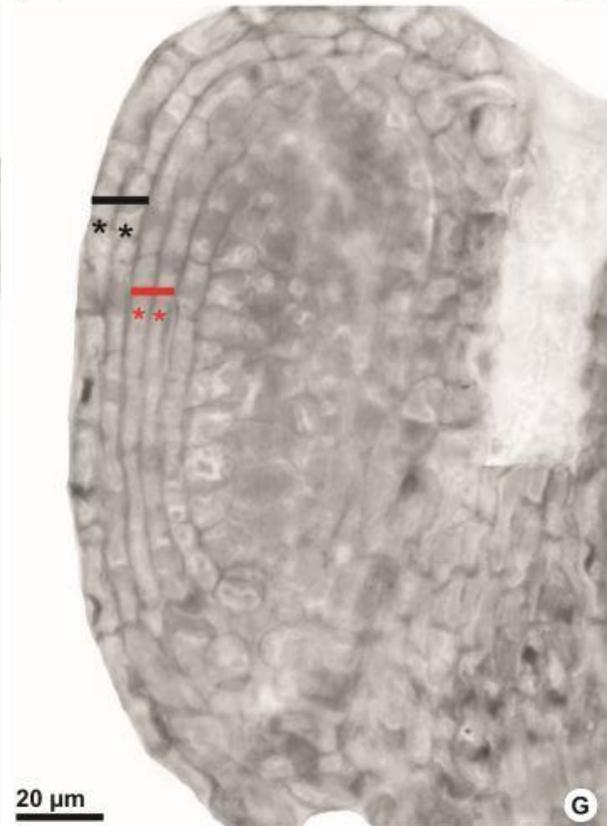
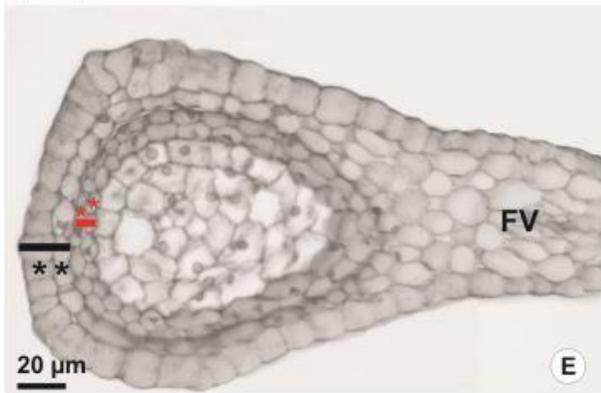
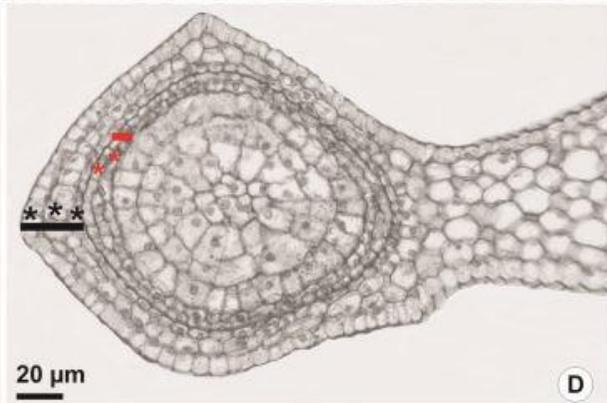
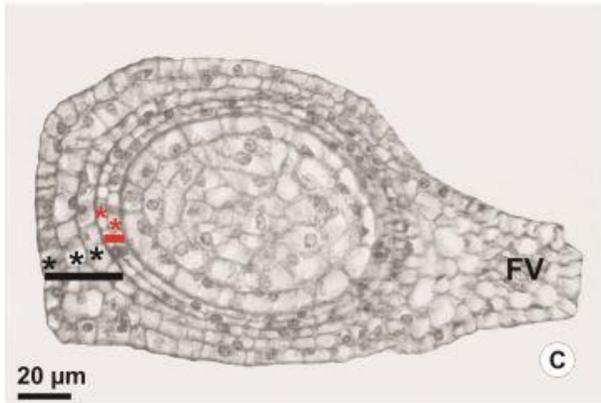
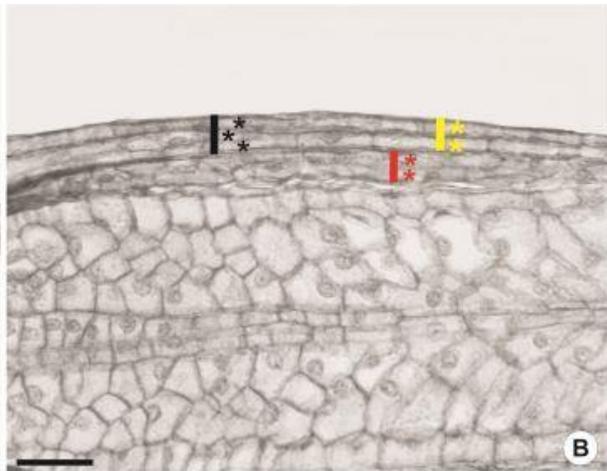
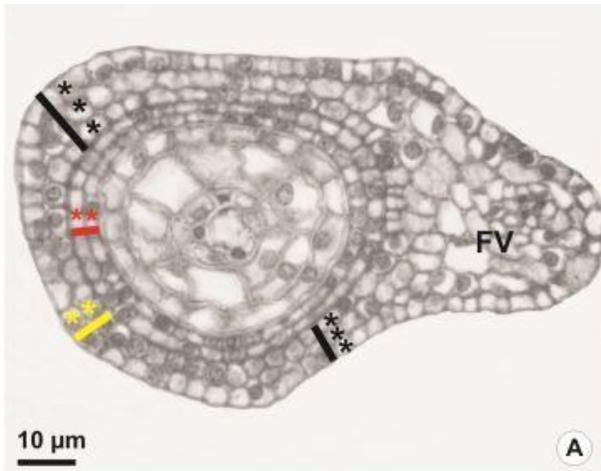
**Figura 4.** Óvulos em cortes transversais (**A**, **B**, **C**, **E** e **F**) e longitudinais (**D** e **G**) de espécies do clado “*Marcetia* & allies” (Melastomeae), caracterizado por apresentar tegumento externo formado por três camadas celulares. **A.** *Aciotis fragilis*; **B.** *Acisanthera hedyotoidea*; **C.** *Appendicularia* sp.; **D.** *Ernestia glandulosa*; **E.** *Marcetia taxifolia*; **F.** *Nepsera aquatica*; **G.** Detalhe da foto anterior. Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



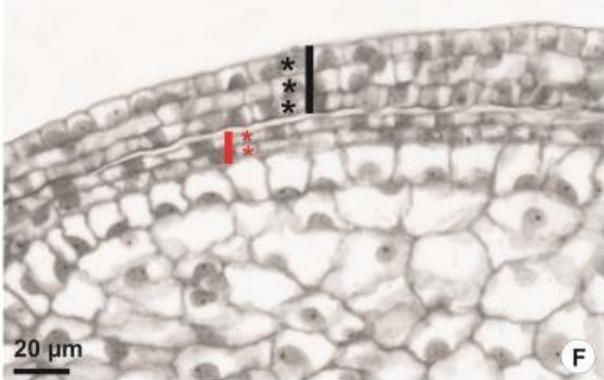
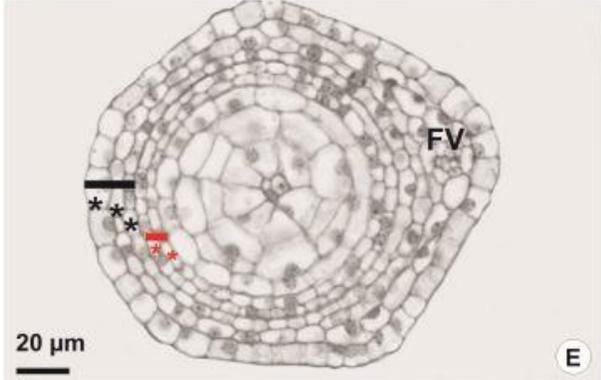
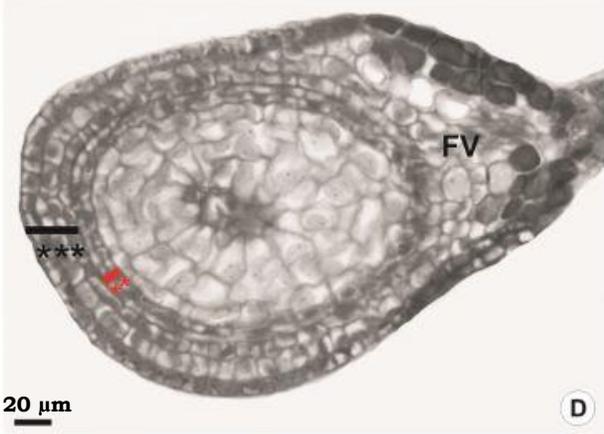
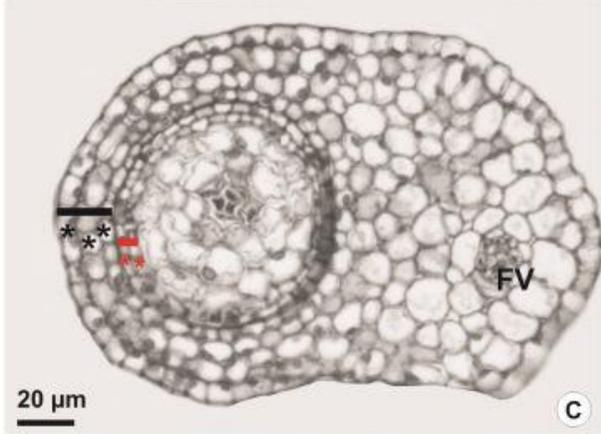
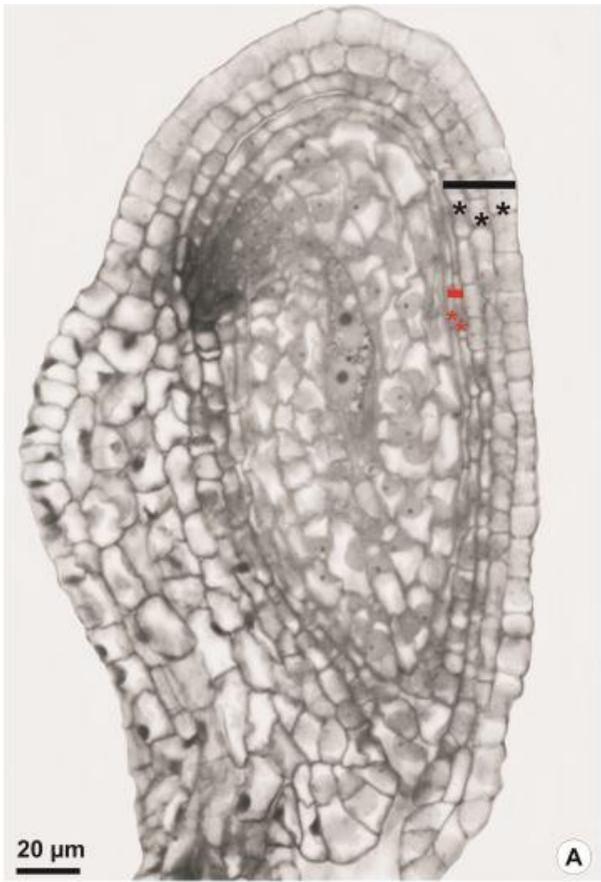
**Figura 5.** Óvulos em cortes transversais (**A**, **B**, **D** e **E**) e longitudinal (**C**) de espécies do clado “core Melastomeae” (Melastomeae), que apresentam tegumento externo sempre formado por duas camadas celulares. **A.** *Brachyotum ledifolium*; **B.** *Monochaetum meridense*; **C.** *Heterocentron elegans*; **D.** *Tibouchina clinopodifolia*; **E.** *Tibouchina clavata*. Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



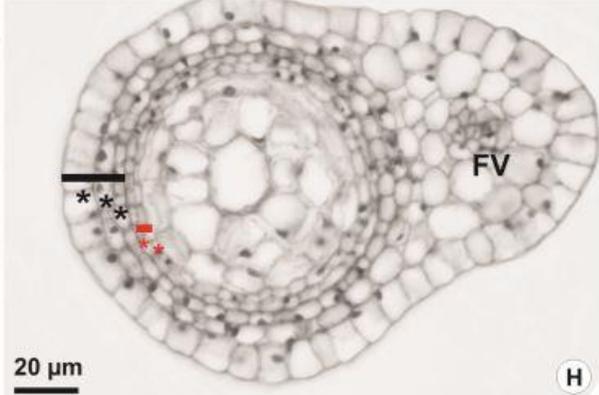
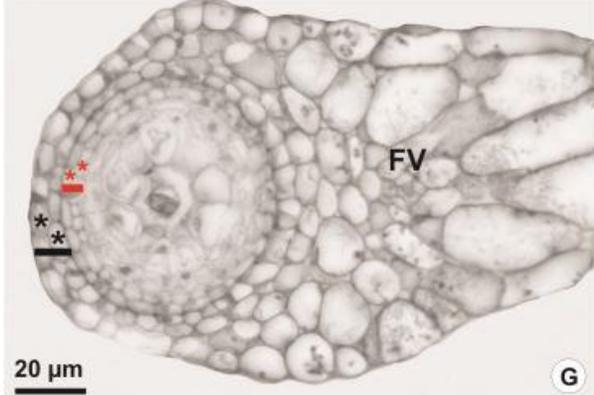
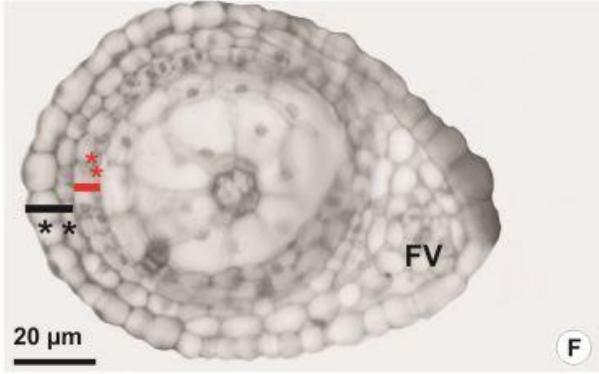
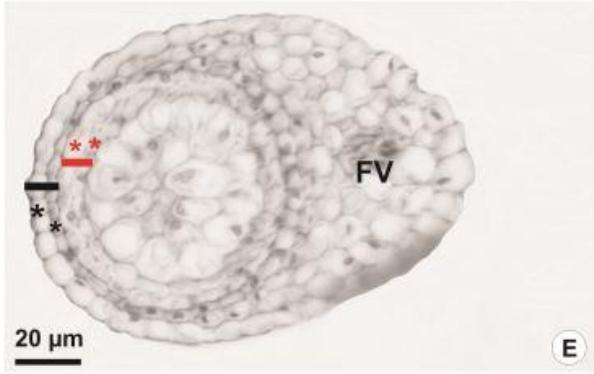
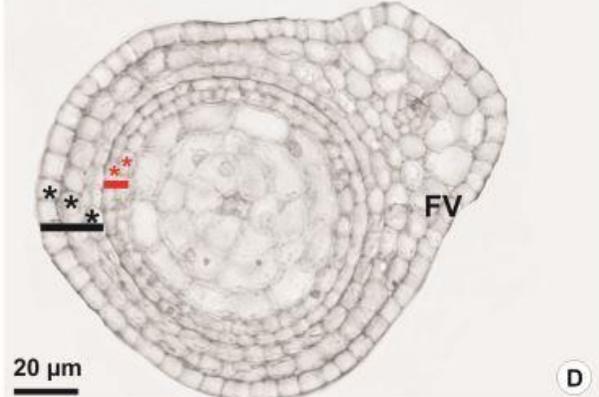
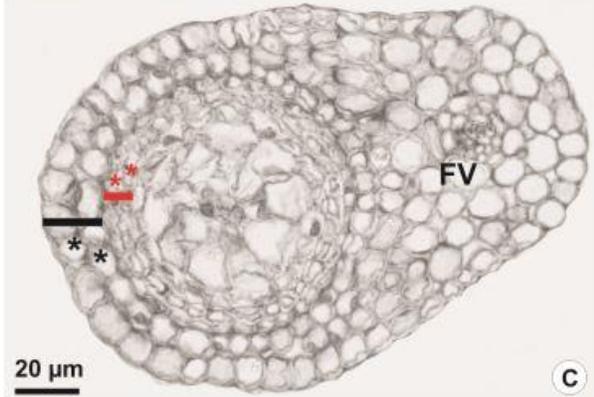
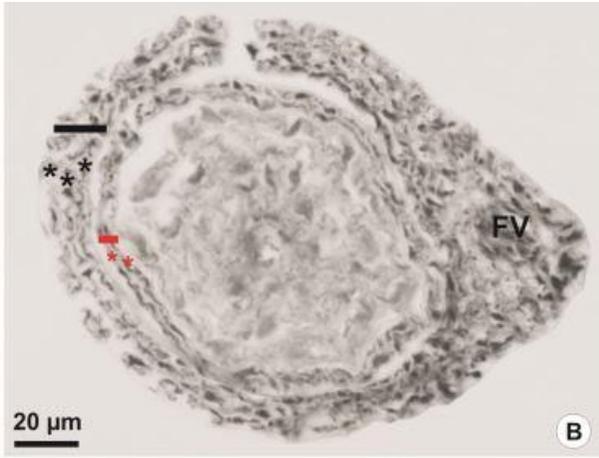
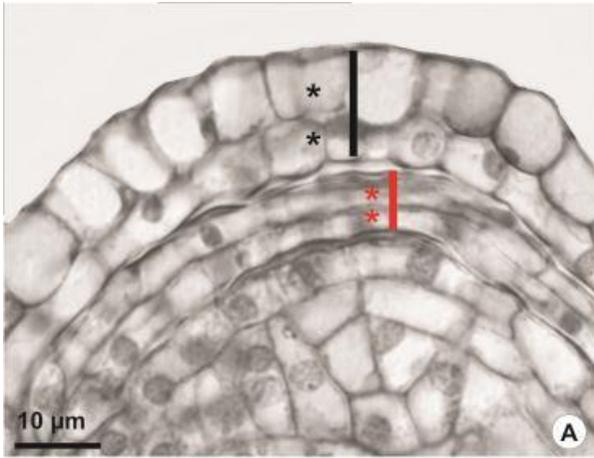
**Figura 6.** Óvulos em cortes transversais (**A**, **C**, **D**, **E** e **F**) e longitudinais (**B** e **G**) em espécies de Merianieae. **A.** *Axinaea dentata*; **B.** *Meriania urceolata*; **C.** *Axinaea* sp.; **D.** *M. sclerophylla*; **E.** *Graffenrieda harlingii*; **F.** *G. latifolia*; **G.** *Macrocentrum repens*. Regiões do tegumento externo onde ocorrem três camadas celulares são indicadas por estrelas e setas pretas; e onde ocorrem duas camadas por estrelas e setas amarelas. O tegumento interno é indicado por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



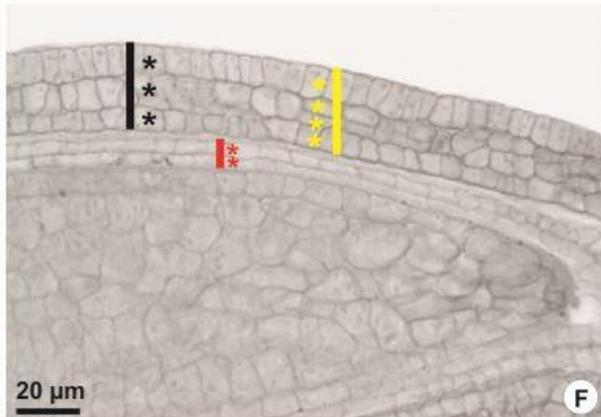
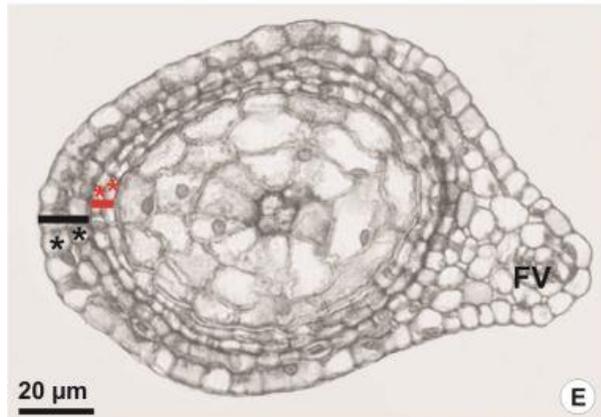
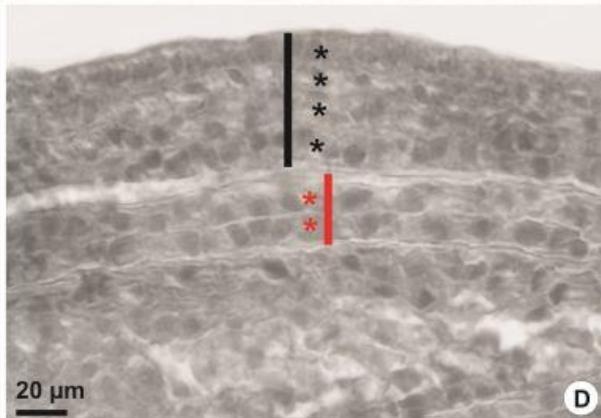
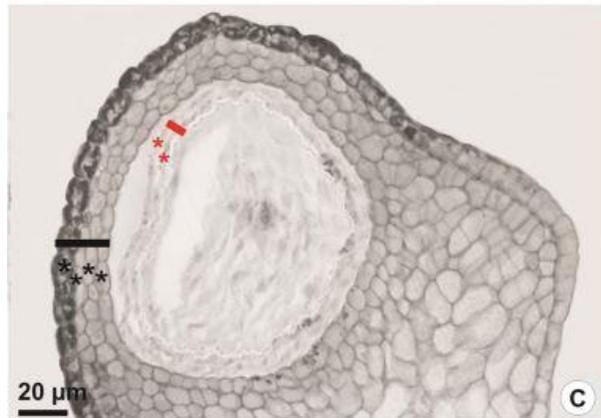
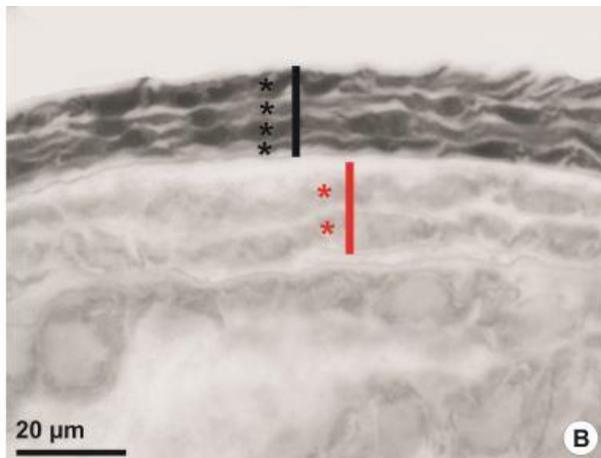
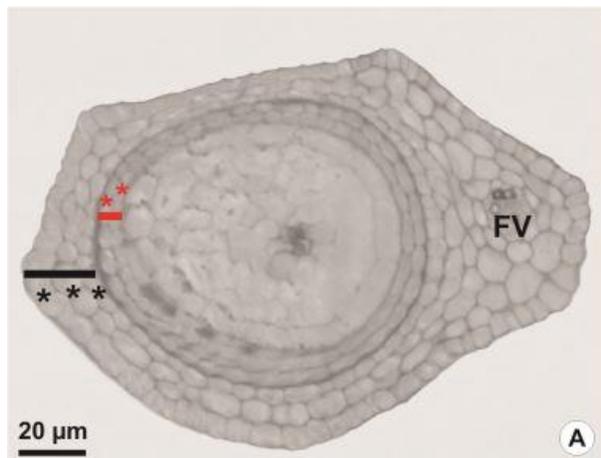
**Figura 7.** Óvulos em cortes longitudinais (**A**, **B** e **F**) e transversais (**C**, **D** e **E**) em espécies de Miconieae com tegumento externo formado por três camadas celulares. **A.** *Clidemia hirta*; **B.** *Leandra melastomoides*; **C.** *Miconia ciliata*; **D.** *M. dodecandra*; **E.** *Pleiochiton ebracteatum*; **F.** *M. leucocarpa*. Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



**Figura 8.** Óvulos em cortes longitudinal (**A**) e transversais (**B, C, D, E, F, G e H**) em espécies de Miconieae pertencentes a um clado de divergência mais antiga e clados nos quais ocorrem variações quanto ao número de camadas observadas no tegumento externo. **A.** *Physeterostemon thomasi* (basal); **B.** *Eriocnema acaulis* (basal); **C.** *Charianthus alpinus* (“Caribbean”); **D.** *Tetrazygia crotonifolia* (“Caribbean”); **E.** *Conostegia brenesii* (“*Conostegia* s.l.”); **F.** *C. lasiopoda* (“*Conostegia* s.l.”); **G.** *Miconia friedmaniorum* (“*Conostegia* s.l.”); **H.** *Clidemia mortoniana* (“*Conostegia* s.l.”). Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.



**Figura 9.** Cortes transversais (**A**, **C** e **E**) e longitudinais (**B**, **D** e **F**) de óvulos em espécies de Miconieae pertencentes à clado/grado em que ocorrem variações quanto ao número de camadas observadas no tegumento externo. Clado *Miconia* IV: *Miconia cercophora* (**A**); *M. sclerophylla* (**B**); *M. castaneiflora* (**C**) e *M. cubatanensis* (**D**). Grado *Miconia* V: *M. ceramicarpa* (**E**) e *M. sellowiana* (**F**); Camadas de células do tegumento externo são indicadas por estrelas pretas e amarelas; e camadas do tegumento interno por estrelas vermelhas. FV: feixe vascular.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, A.M., Goldenberg, R. & Michelangeli, F.A. 2009. A new species of *Physeterostemon* (Melastomataceae) from Bahia, Brazil, with notes on the phylogeny of the genus. *Systematic Botany* 34(2): 324-329.
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2): 105-121.
- Baskin, C.C. & J.M. Baskin. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.
- Boesewinkel, F.D. & Bouman, F. 1984. The seed: structure. *In* Embriology of angiosperms (Johri, B.M., ed). Springer-Verlag, Berlin. Pp: 567-610.
- Caddah, M.K. 2013. Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Miconia* sect. *Discolor* (Melastomataceae, Miconieae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Caetano, A.P.S. 2010. Apomixia e reprodução sexuada em espécies de *Miconia* Ruiz & Pavón, Melastomataceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Caetano A.P.S., Simão, D.G., Carmo-Oliveira, R. & Oliveira, P.E. 2013. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. *Plant Systematics and Evolution* 299(7):1253–1262.
- Cortez, P.A. & Carmelo-Guerreiro, S.M. 2008. Ontogeny and structure of the pericarp and the seed coat of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) from “cerrado”, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 31(1): 71-79.
- Clausing, G., Meyer, K. & Renner, S.S. 2000. Correlations among fruit traits and evolution of different fruits within Melastomataceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133(3): 303-326.

- Clausing, G. & Renner, S.S. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany* 88(3): 486-498.
- Conti, E., Litt, A. & Sytsma, K.J. 1996. Circumscription of Myrtales and their relationships to other rosids: evidence from rbcL sequence data. *American Journal of Botany*, 83(2):221-233.
- Conti, E., Litt, A., Wilson, P.G., Graham, S.A., Briggs, B.G. Johnson, L.A.S. & Sytsma, K.J. 1997. Interfamilial relationships in Myrtales: Molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany* 22(4): 629-647.
- Corner, E.J.H. 1976. *The seeds of dicotyledons*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Davis, G.L. 1966. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. John Wiley, New York.
- Davis, G.L. 1968. Floral morphology and the development of gametophytes in *Eucalyptus melliodora* A. Cunn. *Australian Journal of Botany* 16:19-35.
- Davis G.L. 1969. Floral morphology and the development of the gametophytes in *Eucalyptus stellulata* Sieb. *Australian Journal of Botany* 17:177-190.
- Ellison, A.M., Denslow, A.M., Loiselle, B.A. & Brenes, D.M. 1993. Seed and seedling ecology of neotropical Melastomataceae. *Ecology* 74:1737-1749.
- Endress, P.K. 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany* 107(9): 1465-1489.
- Etheridge, A.L. & Herr, Jr. J.M., 1968. The development of the ovule and megagametophyte in *Rhexia mariana*. *Canadian Journal of Botany* 46(2):133-139.
- Fritsch, P.W., Almeda, F., Renner, S.S., Martins, A.B., Cruz, B.C. 2004. Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). *American Journal of Botany* 91(7): 1105-1114.
- Goldenberg, R., Penneys, D.S., Almeda, F., Judd, W.S. & Michelangeli, F.A. 2008. Phylogeny of *Miconia* (Melastomataceae): Patterns of stamen diversification in a megadiverse neotropical genus. *International Journal of Plant Sciences* 169(7): 963-979.
- Goldenberg, R., Fraga, C.N. De, Fontana, A.P. & Nicolas, A.N. 2012. Taxonomy and phylogeny of *Merianthera* (Melastomataceae). *Taxon* 61(5):1040-1056.

- Ghosh, M. 1954. The embryology and systematic position of *Trapa bispinosa*. Current Science 23:24-26.
- Joshi, A. & Venkateswarlu, J. 1935a. Embryological studies in the Lythraceae I. *Lawsonia inermis*. Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B 2:481-493.
- Joshi, A. & Venkateswarlu, J. 1935a. Embryological studies in the Lythraceae II. *Lagerstroemia*. Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B 2:523-534.
- Joshi, A. & Venkateswarlu, J. 1936. Embryological studies in the Lythraceae III. Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B 3:377-400.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. Comparative embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- King, J. 1947. Development of ovule and megagametophyte in Pomegranate. Botanical Gazette 108:394-398.
- Kriebel, R. 2014. Phylogeny, taxonomy and morphological evolution in *Conostegia* (Melastomataceae: Miconieae). Ph.D. thesis.
- Maruyama, P.K., Borges, M.R., Silva, P.A., Burns, K.C. & Melo, C. 2013. Avian frugivory in *Miconia* (Melastomataceae): contrasting fruiting times promote habitat complementarity between savanna and palm swamp. Journal of Tropical Ecology 29:99-109.
- Medeiros, J.D. & Morretes, B.L. 1996. The embryology of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). Cytologia 61(1): 83-91.
- Mendoza-Cifuentes, H. & Fernández-Alonso, J.L. 2011. Análisis cladístico de *Centronia* (Merianieae, Melastomataceae) con base en caracteres morfológicos. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias 35 (137): 431-450.
- Michelangeli, F.A., Penneys, D.S., Giza, J., Soltis, D., Hils, M.H. & Skee, D.J.D. 2004. A preliminary phylogeny of the tribe Miconieae (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position. Taxon 53(2): 279-290.

- Michelangeli, F.A., Nicolas, A.N., Morales-Puentes, M.E. & David, H. 2011. Phylogenetic relationships of *Allomaieta*, *Alloneuron*, *Cyphostyla*, and *Wurdastom* (Melastomataceae) and the resurrection of the tribe Cyphostyleae. *International Journal of Plant Sciences* 172(9): 1165-1178.
- Michelangeli, F.A., Guimarães, P.J.F., Penneys, D.S., Almeda, F. & Kriebel, R. 2013. Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171(1):38-60.
- Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S.A., Splittstoesser, W.E. & Costanza, S. 1994. The role of seed coats in seed viability. *Botanical Review* 60(4): 426-439.
- Penneys, D.S. & Judd, W.S. 2011. Phylogenetics and morphology in the Blakeeae (Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences*, 172(1): 78-106.
- Penneys, D.S. & Judd, W.S. 2013. Combined molecular and morphological phylogenetic analyses of the Blakeeae (Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences* 174(5): 802-817.
- Penneys, D.S., Michelangeli, F.A., Judd, W.S. & Almeda, F. 2010. Henrietteae (Melastomataceae): A new neotropical berry-fruited Tribe. *Systematic Botany* 35(4): 783-800.
- Prakash, N. 1969a. A contribution to the life history of *Angophora floribunda* (Sm.) Sweet (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 17:457-469.
- Prakash, N. 1969b. Some aspects of the life history of *Callistemon citrinus* (Curt.) Skeels. *Australian Journal of Botany* 17:107-117.
- Prakash, N. 1969c. The embryology of *Kunzea capitata* Reichb. *Australian Journal of Botany* 17:97-106.
- Reginato, M., Michelangeli, F.A. & Goldenberg, R. 2010. Phylogeny of *Pleiochiton* (Melastomataceae, Miconieae): total evidence. *Botanical Journal of the Linnean Society* 162(3): 423-434.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76(2): 496-518.
- Renner, S.S. 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany* 13(5): 519-540.

- Roy, S. 1955. Embryology of *Eugenia bracteata*. Current Science 24:348-349.
- Roy, S. 1960. Embryology of *Eugenia malaccensis* Lam. Current Science 29:189-190.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. American Journal of Botany 29: 464-471.
- Stiles, F.G. & Rosselli, L. 1993. Consumption of fruits of the Melastomataceae by birds: How diffuse is coevolution? Vegetatio 108(1): 57-73.
- Stone, R.D. 2006. Phylogeny of major lineages in Melastomataceae, subfamily Oliboeidae: utility of nuclear glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GapC) gene sequences. Systematic Botany 31(1): 107-121.
- Subramanyam, K. 1942. Gametogenesis and embryogeny in a few members of Melastomataceae. Journal of the Indian Botanical Society 21: 69-85.
- Subramanyam, K. 1944. A contribution to the life-history of *Sonerila wallachii* Benn. Proceedings of the Indian Academy Of Sciences 19: 115-120.
- Subramanyam, K. 1948. An embryological study of *Melastoma malabathricum* L. Journal of the Indian Botanical Society 27: 11-19.
- Subramanyam, K. 1951. Embryology of *Oxyspora paniculata*. Phytomorphology 1: 205-212.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1983a. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. Annals of the Missouri Botanical Garden 70(1):71-94.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1983b. The embryology of *Axinandra zeylanica* (Crypteroniaceae) and the relationships of the genus. Botanical Gazette 144:426-432.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984a. The embryology and relationships of *Alzatea* Ruiz & Pav. (Alzateaceae, Myrtales). Annals of the Missouri Botanical Garden 71:844-852.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984b. The embryology and relationships of Penaeaceae (Myrtales). Plant Systematics and Evolution 146:181-195.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984c. The embryology and relationships of Oliniaceae. Plant Systematics and Evolution 146:105-116.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1984d. The embryology and relationships of *Rhynchocalyx* Oliv. (Rhynchocalycaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 71:836-843.

- Tobe, H. & Raven, P.H. 1985. The histogenesis and evolution of integuments in Onagraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 451-468.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1986. A comparative study of the embryology of *Ludwigia* (Onagraceae): characteristics, variation, and relationships. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 768-787.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987a. Embryology and systematic position of *Heteropyxis* (Myrtales). *American Journal of Botany* 74:197-208.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987b. The embryology and relationships of *Crypteronia* (Crypteroniaceae). *Botanical Gazette* 148:96-102.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1987c. The embryology and relationships of *Dactylocladus* (Crypteroniaceae) and a discussion of the family. *Botanical Gazette* 148:103-111.
- Tobe, H. 1989. The embryology of angiosperms: its broad application to the systematic and evolution study. *The Botanical Magazine* 102(2):351-367.
- Tobe, H. & Raven, P.H. 1990. Embryology and systematic position of *Psiloxylon* (Myrtales). *Botanical Bulletin - Academia Sinica*. 31:119-127.
- Venkateswarlu, J. 1937. A contribution to the embryology of Sonneratiaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 5:206-223.
- Ziegler, A. 1925. Beitrage zur Kenntnis des Androeceums und der Samenentwicklung einiger Melastomaceen. *Botanischer Archiv* 9: 398-467.

## APÊNDICE

Listagem das espécies de Melastomataceae utilizadas e informações sobre nº coletor/voucher e origem das amostras.

	Espécies	Nº coletor ou voucher	Origem da amostra
<b>Tribo Kibessieae</b>	<i>Pternandra coerulescens</i> Jack	NYBG	Herborizada
	<i>Bellucia grossularioides</i> (L.) Triana	UPCB 68280	Herborizada
	<i>Henriettea ramiflora</i> (Sw.) DC.	S.A. Mori 19212	Fixada (NYBG)
<b>Tribo Henrietteae</b>	<i>Henriettea saldanhaei</i> Cogn.	J.P. Basso-Alves	Fixada (FCFRP)
	<i>Henriettea succosa</i> (Aubl.) DC.	F.A. Michelangeli 685	Fixada (NYBG)
	<i>Loreya mespiloides</i> Miq.	S.A. Mori 18327	Fixada (NYBG)
<b>Tribo Bertolonieae (1)</b>	<i>Bertolonia mosenii</i> Cogn.	UPCB 67838	Herborizada
	<i>Phainantha laxiflora</i> (Triana) Gleason	NYBG 43994	Herborizada
<b>Tribo Rhexieae</b>	<i>Arthrostemma ciliatum</i> Pav. ex D. Don	F.A. Michelangeli 740	Fixada (NYBG)
<b>Tribo Microlicieae</b>	<i>Microlicia euphorbioides</i> Mart.	J.P. Basso-Alves	Fixada (FCFRP)
	<i>Rhynchanthera grandiflora</i> (Aubl.) DC.	J.P. Basso-Alves	Fixada (FCFRP)
	<i>Acanthella sprucei</i> Hook.f.	NYBG G.A. Romero 1967	Herborizada
	<i>Aciotis purpurascens</i> (Aubl.) Triana	C.V. Martin 422	Fixada (NYBG)
	<i>Aciotis fragilis</i> (DC.) Cogn.	C.V. Martin 445	Fixada (NYBG)
	<i>Acisanthera hedyotoidea</i> (C.Presl) Triana	F.A. Michelangeli 822	Fixada (NYBG)
	<i>Appendicularia</i> sp	F.A. Michelangeli	Fixada (NYBG)
<b>Tribo Melastomeae</b>	<i>Comolia microphylla</i> Benth.	F.A. Michelangeli	Fixada (NYBG)
<b>Marcetia &amp; allies</b>	<i>Comolia</i> sp	F.A. Michelangeli	Fixada (NYBG)
	<i>Ernestia glandulosa</i> Gleason	C.V. Martin 435	Fixada (NYBG)
	<i>Macairea radula</i> (Bonpl.) DC.	UPCB 63856	Herborizada
	<i>Marcetia taxifolia</i> (A. St.-Hil.) DC.	F.A. Michelangeli 680	Fixada (NYBG)
	<i>Nepsera aquatica</i> (Aubl.) Naudin	C.V. Martin 420	Fixada (NYBG)
	<i>Sandemania hoehnei</i> (Cogn.) Wurdack	NYBG 01290882	Herborizada
	<i>Siphanthera hostmannii</i> Cogn.	F.A. Michelangeli	Fixada (NYBG)

**APÊNDICE - continuação**

		<b>Espécies</b>	<b>Nº coletor ou voucher</b>	<b>Origem da amostra</b>
<b>Tribo Melastomeae</b>	<b>Core Melastomeae</b>	<i>Brachyotum ledifolium</i> (Desr.) Triana	F.A. Michelangeli 1886	Fixada (NYBG)
		<i>Desmocelis villosa</i> (Aubl.) Naud.	UPCB 47372	Herborizada
		<i>Heterocentron elegans</i> (Schltdl.) Kuntze	NYBG E.K. Balls 84736	Herborizada
		<i>Monochaetum calcaratum</i> (DC.) Triana	NYBG V.W. Steinmanny <i>et al.</i> 4108	Herborizada
		<i>Monochaetum meridense</i> Naudin	F.A. Michelangeli 1241	Fixada (NYBG)
		<i>Pterolepis glomerata</i> (Rottb.) Miq.	UPCB 37973	Herborizada
		<i>Tibouchina clavata</i> (Pers.) Wurdack	UEC 178712	Fixada (NYBG)
		<i>Tibouchina clinopodifolia</i> (DC.) Cogn.	UEC 178713	Fixada (FCFRP)
<b>Tribo Cyphostyleae</b>		<i>Allomaieta grandiflora</i> Gleason	NYBG 1127326	Herborizada
<b>Tribo Bertolonieae (2)</b>		<i>Diplarpea paleacea</i> Triana	NYBG 88740	Herborizada
		<i>Triolena amazonica</i> (Pilg.) Wurdack	NYBG 84556	Herborizada
		<i>Triolena obliqua</i> (Triana) Wurdack	J. Homeier 2112	Fixada (NYBG)
<b>Tribo Merianthera &amp; allies</b>		<i>Behuria glutinosa</i> Cogn.	UPCB 71781	Herborizada
		<i>Cambessedesia espora</i> (A.St.Hil. ex Bonpl.) DC.	UPCB 55194	Herborizada
		<i>Dolichoura spiritusantensis</i> Brade	UPCB 71760	Herborizada
		<i>Huberia consimilis</i> Baumgratz	F.A. Michelangeli 1618	Fixada (NYBG)
		<i>Merianthera bullata</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	A.P. Fontana <i>et al.</i> 3331	Fixada (FCFRP)
		<i>Merianthera parvifolia</i> R. Goldenb., Fraga & A.P. Fontana	A.P. Fontana <i>et al.</i> 1548	Fixada (FCFRP)
<b>Tribo Blakeeae</b>		<i>Diplectria divaricata</i> (Willd.) Kuntze	T.N. Roque 1926	Fixada (NYBG)
		<i>Huilaea calyptrata</i> Penneys & M. E. Morales	D.S. Penneys 1892	Fixada (NYBG)
		<i>Huilaea ecuadorensis</i> Wurdack	D.S. Penneys 1589	Fixada (NYBG)
		<i>Topobea multiflora</i> (D.Don) Triana	UPCB 18658	Herborizada
<b>Tribo Dissochateae + Sonerileae</b>		<i>Diplectria divaricata</i> (Willd.) Kuntze	T.N. Roque 1926	Fixada (NYBG)
<b>Tribo Merianieae</b>		<i>Axinaea dentata</i>	J. Homeier 1624	Fixada (NYBG)
		<i>Axinaea grandifolia</i> (Naudin) Triana	F.A. Michelangeli 650P.	Fixada (NYBG)
		<i>Axinaea minutiflora</i>	P. Pedraza-Penãlosa 2203	Fixada (NYBG)
		<i>Axinaea</i> sp	F.A. Michelangeli 1981	Fixada (NYBG)
		<i>Graffenrieda gracilis</i> (Triana) L.O. Williams	UPCB 60222	Herborizada
		<i>Graffenrieda harlingii</i> Wurdack	C. Ulloa Ulloa 1843	Fixada (NYBG)
		<i>Graffenrieda latifolia</i> (Naudin) Triana	NYBG 1264275	Herborizada
		<i>Macrocentrum repens</i> (Gleason) Wurdack	NYBG J.J. Pipoly 10777	Herborizada

**APÊNDICE - continuação**

	<b>Espécies</b>	<b>Nº coletor ou voucher</b>	<b>Origem da amostra</b>	
<b>Tribo Merianieae</b>	<i>Meriania sclerophylla</i> (Naudin) Triana	K.M. Redden 1229	Fixada (NYBG)	
	<i>Meriania subumbellata</i> Cogn.	F.A. Michelangeli 819	Fixada (NYBG)	
	<i>Meriania urceolata</i> Triana	F.A. Michelangeli 462	Fixada (NYBG)	
<b>Tribo Miconieae</b>	<b>Eriocnema + Physeterostemon</b>	<i>Eriocnema acaulis</i> Triana	NYBG 909906	Herborizada
		<i>Eriocnema fulva</i> Naudin	UPCB 64095	Herborizada
		<i>Physeterostemon thomasii</i> Amorim, Michelangeli & Goldenb. R. Goldenberg		Fixada (FCFRP)
	<b>Miconia I</b>	<i>Miconia dodecandra</i> Cogn.	UEC 178711	Fixada (FCFRP)
		<i>Miconia superba</i> Ule	F.A. Michelangeli 452	Fixada (NYBG)
	<b>Miconia II</b>	<i>Miconia centrodesma</i> Naudin	UEC 106832	Herborizada
	<b>Leandra + Ossaea</b>	<i>Leandra reversa</i> (DC.) Cogn.	UEC 106822	Herborizada
		<i>Ossaea capillaris</i> (D.Don) Cogn.	UPCB 66632	Herborizada
	<b>Caribbean</b>	<i>Charianthus alpinus</i> (Sw.) R.A.Howard	D.S. Penneys 1314	Fixada (NYBG)
		<i>Charianthus nodosus</i> (Desr.) Triana	D.S. Penneys 1275	Fixada (NYBG)
		<i>Tetrazygia crotonifolia</i> (Desr.) DC.	F.A. Michelangeli 2012	Fixada (NYBG)
		<i>Tetrazygia elaeagnoides</i> (Sw.) DC.	F.A. Michelangeli 1997	Fixada (NYBG)
<b>Conostegia s.l.</b>	<i>Clidemia mortoniana</i> Standl.	R. Kriebel 5341	Fixada (NYBG)	
	<i>Clidemia spectabilis</i> Gleason	R. Kriebel 5646	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia bigibbosa</i> Cogn.	R. Kriebel 5522	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia brenesii</i> Standl.	R.Kriebel 5631	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia icosandra</i> (Sw. ex Wikstr.) Urb.	UPCB 63927	Herborizada	
	<i>Conostegia lasiopoda</i> Benth.	R. Kriebel 5651	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia monteagleana</i> Cogn.	R. Kriebel 5354	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia speciosa</i> Naudin	R. Kriebel 5489	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia subcrustulata</i> (Beurl.) Triana	R. Kriebel 5653	Fixada (NYBG)	
	<i>Conostegia xalapensis</i> (Bonpl.) D. Don ex DC.	R. Kriebel 5619	Fixada (NYBG)	
	<i>Miconia friedmaniorum</i> Almeda & Umaña	R. Kriebel 5641	Fixada (NYBG)	
	<i>Miconia ligulata</i> Almeda	R. Kriebel 5726	Fixada (NYBG)	
	<i>Miconia schlimii</i> Triana	R. Kriebel 5604	Fixada (NYBG)	

**APÊNDICE - continuação**

	<b>Espécies</b>	<b>Nº coletor ou voucher</b>	<b>Origem da amostra</b>	
<b>Tribo Miconieae</b>	<i>Mecranium acuminatum</i> (DC.) Skean	NYBG 854620	Herborizada	
	<b><i>Mecranium,</i></b> <b><i>Anaectocalyx</i></b>	<i>Mecranium latifolium</i> (Cogn.) Skean	F.A. Michelangeli 2001	Fixada (NYBG)
		<i>Miconia ciliata</i> (Rich.) DC.	UEC 155696	Herborizada
		<i>Tococa platyphylla</i> Benth.	P. Pedraza-Peñalosa 2091	Fixada (NYBG)
		<i>Leandra subseriata</i> (Naudin) Cogn.	UPCB 18652	Herborizada
		<i>Miconia crocea</i> (Desr.) Naudin	C. Ulloa Ulloa 1870	Fixada (NYBG)
		<i>Miconia denticulata</i> Naudin	NYBG 1596619	Herborizada
	<b><i>Miconia III</i></b>	<i>Miconia goniostigma</i> Triana	F.A. Michelangeli 1848	Fixada (NYBG)
		<i>Miconia papillosa</i> (Desr.) Naudin	NYBG 44239	Herborizada
		<i>Miconia stenobotrys</i> (Rich.) Naudin	UEC 676935	Herborizada
		<i>Miconia theaezans</i> (Bonpl.) Cogn.	UPCB 56156	Herborizada
		<i>Miconia budlejoides</i> Triana	R. Goldenberg 722	Fixada (NYBG)
		<i>Miconia capixaba</i> R. Goldenb.	NYBG 1015412	Herborizada
		<i>Miconia castaneiflora</i> Naudin	NYBG 1081547	Herborizada
		<i>Miconia cercophora</i> Wurdack	NYBG 1599170	Herborizada
		<i>Miconia chartacea</i> Triana	NYBG 629574	Herborizada
		<i>Miconia cinerascens</i> Miq.	NYBG 071394	Herborizada
		<i>Miconia cubatanensis</i> Hoehne	NYBG 558045	Herborizada
		<i>Miconia discolor</i> DC.	NYBG 162480	Herborizada
	<b><i>Miconia IV</i></b>	<i>Miconia donaeana</i> Naudin	F.A. Michelangeli 727	Fixada (NYBG)
		<i>Miconia fallax</i> DC.	UEC 150450	Fixada (FCFRP)
		<i>Miconia fasciculata</i> Gardner	NYBG 058209	Herborizada
		<i>Miconia hyemalis</i> A.St.-Hil. & Naudin	NYBG 104274	Herborizada
		<i>Miconia laevigata</i> (L.) DC.	UEC 94916	Herborizada
		<i>Miconia latecrenata</i> DC. Naudin	UEC 071717	Fixada (FCFRP)
		<i>Miconia lymanii</i> Wurdack	NYBG 87843	Herborizada
	<i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl.) DC.	UEC 10788	Fixada (FCFRP)	
	<i>Miconia rufescens</i> (Aubl.) DC.	UPCB 37834	Herborizada	

**APÊNDICE - continuação**

	<b>Espécies</b>	<b>Nº coletor ou voucher</b>	<b>Origem da amostra</b>	
<b>Tribo Miconieae</b>	<b>Miconia IV</b>	<i>Miconia serrulata</i> (DC.) Naudin	UEC 95013	Herborizada
		<i>Miconia sclerophylla</i> Triana	NYBG 143406	Herborizada
		<i>Leandra rufescens</i> (DC.) Cogn.	UPCB 63762	Herborizada
		<i>Miconia ceramicarpa</i> (DC.) Cogn.	C.V. Martin 457	Fixada
		<i>Miconia ibaguensis</i> (Bonpl.) Triana	UPCB46762	Herborizada
	<b>Miconia V</b>	<i>Miconia nervosa</i> (Sm.) Triana	UEC 178716	Fixada (FCFRP)
		<i>Miconia prasina</i> (Sw.) DC.	IPCB 46237	Herborizada
		<i>Miconia rugosa</i> Triana	UPCB 70855	Herborizada
		<i>Miconia sellowiana</i> Naudin	UEC 79582	Herborizada
	<b>Clidemia</b>	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D.Don	UEC 178722	Fixada (FCFRP)
		<i>Leandra melastomoides</i> Raddi	A.P.S. Caetano 03	Fixada (FCFRP)
	<b>Leandra s.s. + Pleiochiton</b>	<i>Ossaea amygdaloides</i> (DC.) Triana	UEC 178736	Fixada (FCFRP)
		<i>Ossaea confertiflora</i> (DC.) Triana	UEC 178730	Fixada (FCFRP)
	<i>Pleiochiton ebracteatum</i> Triana	UEC 178718	Fixada (FCFRP)	



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta dados que contribuem efetivamente para elucidar o modo de reprodução em um grupo de espécies apomíticas de Miconieae, Melastomataceae. Ainda, o estudo comparativo de caracteres anatômicos da antera e do óvulo em diferentes tribos fornece informações importantes para a sistemática do grupo, subsidiando futuras discussões sobre a evolução de caracteres embriológicos na família.

O comprometimento no desenvolvimento de grãos de pólen viáveis e sacos embrionários reduzidos nas apomíticas *Clidemia hirta*, *Leandra aurea*, *L. melastomoides*, *Miconia leucocarpa*, *Ossaea amygdaloides* e *O. confertiflora* indica que a reprodução sexuada deve ser um evento incomum e que a apomixia deve garantir a reprodução via sementes nestas espécies, apomíticas obrigatórias. Este é um evento aparentemente infrequente em populações naturais e que deve ser cuidadosamente avaliado quanto a seu papel ecológico e evolutivo em uma tribo tão complexa e diversa quanto Miconieae. Estudos de genética de população seriam interessantes para avaliar a diversidade genética intra e inter-populacional em espécies apomíticas, ampliando o entendimento da estratégia reprodutiva no grupo amostrado.

Além disso, destacamos a ocorrência de diferentes mecanismos apomíticos atuando na tribo: apomixia gametofítica, com a formação de embriões a partir de sacos embrionários não reduzidos; e esporofítica (embrionia adventícia), onde embriões se desenvolvem a partir de células nucelares. É possível que a combinação de eventos de hibridação e poliploidia, aparentemente comuns em Miconieae, juntamente com a formação de sementes com endosperma pouco profuso, pode ter contribuído e gerado condições favoráveis à ocorrência e manutenção da apomixia na tribo.

Muitas espécies de Miconieae são conhecidas por sua ampla distribuição e presença em ambientes perturbados, como é o caso de *Miconia albicans* e *Clidemia hirta*, ambas apomíticas. A independência de polinizadores somada aos benefícios da reprodução por sementes devem determinar uma vantagem evolutiva destas espécies em cenários de degradação ambiental, cada vez mais frequentes em biomas brasileiros.

Além de colaborarem para o entendimento do processo apomítico, os dados embriológicos disponibilizados neste trabalho fornecem uma grande quantidade de informações comparativas de caracteres que se mostraram úteis para sistemática de Melastomataceae.

Cristais do tipo drusa na parede da antera madura foram observados em praticamente metade dos representantes analisados (89 de 180), e também apresentaram valor sistemático em Melastomataceae. A ocorrência destes cristais parece distinguir o clado *Blakea* + *Topobea* (Blakeeae), a tribo Henrietteae e um subclado dentro de “*Conostegia* s.l.” (Miconieae) de grupos proximalmente relacionados. O papel das drusas na parede da antera não foi testado, mas uma função hipotética, relacionada à atração de polinizadores é apresentada.

A importância sistemática e adaptativa da espessura do tegumento externo do óvulo foi verificada para as tribos Melastomeae e Miconieae. Em “*Marcetia* & allies” (Melastomeae) a ocorrência de óvulos com tegumento externo formado por três camadas de células é apontada como uma sinapomorfia para o grupo. Em Miconieae, a presença de três camadas no tegumento externo do óvulo é amplamente difundida, mas um evento derivado, com tegumento externo formado por mais de três camadas, foi descrito e parece ter sido selecionado em linhagens com sementes grandes. Na tribo, a espessura do tegumento externo parece estar relacionada a presença de frutos endozoóricos. Ainda

em Miconieae, o gênero *Physeterostemon* e um subclado dentro de “*Conostegia* s.l.” foram delimitados pela ocorrência de duas camadas no tegumento externo do óvulo.

Ressaltamos que frente à escassez de caracteres morfológicos que possam ser utilizados em conjunto com dados moleculares na delimitação de clados em Melastomataceae, as informações disponibilizadas devem de fato contribuir para estudos de classificação e compreensão das relações dentro de um grupo tão diverso nos neotrópicos.