



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



NATÁLIA ARIAS GALASTRI

**MORFOANATOMIA, HISTOQUÍMICA E
ULTRAESTRUTURA FLORAL DE ESPÉCIES DE
ANNONACEAE DO CERRADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



NATÁLIA ARIAS GALASTRI

**MORFOANATOMIA, HISTOQUÍMICA E
ULTRAESTRUTURA FLORAL DE ESPÉCIES DE
ANNONACEAE DO CERRADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Prof. Dr. Élder Antônio Sousa e Paiva
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG
2013

043

Galastri, Natália Arias.

Morfoanatomia, histoquímica e ultraestrutura floral de espécies de annonaceae do cerrado [manuscrito] /Natália Arias Galastri. – 2013.

151 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Denise Maria Trombert de Oliveira. Co-orientador: Élder Antônio Sousa e Paiva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

1. Annonaceae – Teses. 2. Nectário. 3. Microsporogênese. 4. Microgametogênese. 5. Megasporogênese. 6. Megagametogênese. 7. Fenograma. 8. Biologia vegetal. I. Oliveira, Denise Maria Trombert. II. Paiva, Élder Antônio Sousa e. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. IV. Título.

CDU: 581

Tese defendida e aprovada, em 30 de janeiro de 2013, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira - orientadora



Dr. Antonio Carlos Webber



Dra. Daniela Guimarães Simão



Dra. Alessandra Ike Coan



Dra. Leticia Silva Souto

*“Segue o teu destino, rega as tuas plantas, ama as tuas rosas.
O resto é a sombra de árvores alheias”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, que com sua graça e bondade permitiu que eu finalizasse mais este projeto.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado. Jamais teria conseguido sem o auxílio e o amor de vocês.

À Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira, minha orientadora, por toda compreensão, paciência, ajuda, amizade e por todo o conhecimento que me proporcionou. Você é um exemplo de pessoa e de profissional. Levarei você e seus ensinamentos para toda a minha vida. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Élder Antônio Sousa Paiva, meu coorientador, por todo ensinamento e compreensão. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto de Oliveira e Silveira, pelo auxílio e colaboração em parte deste projeto.

À Dra. Wilma de Grava Kempinas, pela acolhida e pela cessão de equipamentos do Laboratório de Embriologia do Departamento de Morfologia da UNESP de Botucatu.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, pela cessão de equipamentos. E aos seus funcionários Lúcia, Claudete, Tiago e Rodrigo, por toda compreensão, auxílio e paciência.

Ao Dr. Renato de Mello Silva, pela identificação das espécies estudadas.

Aos membros da banca por terem aceitado participar e, em especial, ao Dr. Antonio Carlos Webber pela cessão de material.

Aos funcionários José Eduardo Bozzano e Clemente José Campos, da UNESP de Botucatu, por toda ajuda e amizade.

Ao meu namorado Leandro, por todo apoio, paciência, disposição, ajuda nas coletas, compreensão, amor e carinho. Meu muito obrigada.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Sônia Mara de Oliveira Costa e Terezinha de Jesus Alves, por todo auxílio prestado durante o doutorado.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial à Ana Paula Martins de Oliveira, que atendeu com eficiência e agilidade a todos os artigos que necessitei pedir por COMUT e também pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia, pelas discussões proveitosas, pela ajuda e pelo agradável convívio durante este período.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) pelo apoio financeiro.

Ao PPGBV (Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal) por todo o auxílio prestado.

À Jenifer de Carvalho Lopes pela cessão de material.

À Inara, minha amiga de todas as horas, pela ajuda nas coletas, na herborização e na confecção do laminário, por toda paciência em me ouvir e por estar sempre do meu lado.

A todos os meus amigos, em especial Priscilla, Valéria e Tania, por todo carinho, conforto, confiança e amizade.

À coordenação e a todos os professores do Curso de Tecnologia em Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Faculdade de Tecnologia de Jahu, pela ajuda e compreensão nos períodos em que tive de me afastar para realizar atividades referentes ao doutorado.

A todos que, de alguma forma, estiveram presentes durante toda a minha formação, tornando-me melhor e colaborando, direta ou indiretamente, com mais este projeto.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Introdução Geral	3
1. Estrutura Floral de Annonaceae	5
2. Biologia Floral.....	8
3. Espécies estudadas.....	12
4. Objetivo Geral.....	19
5. Referências Bibliográficas	19
Capítulo 1: Tecido nutritivo em pétalas de <i>Annona</i> (Annonaceae): estrutura, ultraestrutura e papel no processo reprodutivo	25
Resumo	27
Introdução	27
Material e Métodos.....	29
Resultados.....	31
Discussão	35
Agradecimentos.....	41
Referências.....	41
Capítulo 2: Nectários florais em <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart. (Annonaceae): estrutura, secreção e aspectos funcionais	52
Resumo	54
Introdução	54
Material e Métodos.....	55
Resultados.....	57
Discussão	59
Agradecimentos.....	61
Referências.....	62
Capítulo 3: Estrutura da antera e ontogênese do pólen de Annonaceae e suas possíveis implicações taxonômicas	69
Resumo	71
Introdução	71
Material e Métodos.....	72

Resultados.....	73
Discussão	76
Agradecimentos.....	81
Referências.....	81
Capítulo 4: Megasporogênese e megagametogênese em espécies de Annonaceae	91
Resumo	93
Introdução	93
Material e Métodos.....	94
Resultados.....	95
Discussão	97
Agradecimentos.....	100
Referências Bibliográficas	100
Capítulo 5: Potencial filogenético de caracteres florais de Annonaceae do Cerrado	110
Resumo	112
Introdução	112
Material e Métodos.....	114
Resultados e discussão.....	116
Conclusões	119
Agradecimentos.....	120
Referências.....	120
Considerações Finais.....	150

GALASTRI, N.A. 2013. **Morfoanatomia, histoquímica e ultraestrutura floral de espécies de Annonaceae do Cerrado**. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 151 p.

RESUMO

Incluída em Magnoliales, Annonaceae é a maior família entre as Angiospermas basais, havendo carência de dados estruturais, histoquímicos e ultraestruturais das flores dessas plantas, especialmente do Cerrado. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo estrutural, histoquímico e ultraestrutural das flores de sete espécies de Annonaceae, típicas do bioma Cerrado (*Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *Duguetia furfuracea*, *Guatteria australis* e *Xylopia aromatica*). Para isto, foram utilizadas técnicas usuais de processamento para microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. Muitas Annonaceae apresentam tecidos nutritivos nas pétalas, que constituem adaptações à cantarofília. Nas espécies estudadas (Capítulo 1), verifica-se que a região nutritiva apresenta epiderme uniestratificada, com variados tipos de células e mesofilo parenquimático, com idioblastos fenólicos e cristalíferos, células com substâncias pécticas no espaço periplasmático e reserva de amido. Tais células apresentam matriz citoplasmática densa, rica em mitocôndrias, dictiosomos e plastídios em que se destacam grandes grãos de amido. Para *Xylopia*, este trabalho apresenta o registro inédito de nectário floral (Capítulo 2), descrevendo a anatomia e ultraestrutura destes nectários nas pétalas internas de *X. aromatica*. O nectário é formado por epiderme secretora e tecido subglandular parenquimático, com células vacuoladas e ricas em amido. No Capítulo 3, apresenta-se a ontogênese da antera e do pólen, estrutura relevante para o entendimento de relações filogenéticas em Annonaceae. Destaca-se que o tapete varia de ameboide a glandular, e há anteras septadas, com septos parenquimáticos ou tapetais, bem como anteras asseptadas. A meiose também é variável, sendo sucessiva ou simultânea e, após a microgametogênese, o pólen é liberado em tétrades ou mônades. O Capítulo 4 caracteriza os óvulos das sete espécies como bitegmentados, crassinucelados e pericalazais, variando de anátropos a anacampilótropos, unitários ou múltiplos por carpelo, respectivamente em placentação basal ou parietal. Tanto a megasporogênese quanto a megagametogênese caracterizam o desenvolvimento do tipo *Polygonum*. Finalmente, o Capítulo 5 apresenta uma avaliação de 218 caracteres estruturais de flores das Annonaceae estudadas, utilizando métodos filogenéticos comparativos, para inferir a respeito do potencial uso desses caracteres para compreender a evolução floral na família. Construiu-se um fenograma, a partir do qual se pode reconhecer, entre outros aspectos, que *A. emarginata* é a espécie mais distinta entre as *Annona*, mostrando que a inclusão de *Rollinia* em *Annona* deveria ser revista. Reconhece-se, ainda, que os caracteres florais mais informativos provêm da corola, em especial das pétalas internas, intimamente relacionadas ao elaborado processo de polinização da família.

Palavras-chave: Tecido nutritivo, nectário, microsporogênese, microgametogênese, megasporogênese, megagametogênese, fenograma.

GALASTRI, N.A. 2013. **Morphoanatomy, histochemistry and ultrastructure of flowers of Annonaceae from Cerrado.** Thesis (Doctorate) – Institute of Biological Sciences, UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 151 p.

ABSTRACT

Annonaceae, included in Magnoliales, is the largest family among basal Angiosperms and there is a lack of structural, histochemical and ultrastructural data regarding the flowers of these plants, especially for those from the Brazilian savanna. Thus, the general aim of this study was to carry out a structural, histochemical and ultrastructural investigation of the flowers of seven Annonaceae species, typical of the biome Cerrado (*Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *Duguetia furfuracea*, *Guatteria australis* and *Xylopia aromatica*). Usual processing techniques for light microscopy, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy were employed. A large number of Annonaceae have nutritive tissues in the petals, which constitute adaptation to cantharophily. For the studied species (Chapter 1), the nutritive region has uniseriate epidermis, with varied cell types, and parenchymatous mesophyll, with phenolic and crystal idioblasts, cells with pectic substances in the periplasmic space and starch reserve. Such cells show dense cytoplasmic matrix rich in mitochondria, dictyosomes and plastids in which large starch grains are highlighted. For *Xylopia*, this study presents an unprecedented record of flower nectary (Chapter 2), describing the anatomy and the ultrastructure of these nectaries in the inner petals of *X. aromatica*. The nectary is formed by secretory epidermis and parenchymatous subglandular tissue, with vacuolated cells rich in starch. In Chapter 3, ontogeny of the anther and the pollen, a relevant structure for understanding phylogenetic relationships in Annonaceae, is presented. It must be emphasized that the tapetum varies from amoeboid to glandular and that there are septate anthers, with parenchymatous or tapetal septa, as well as aseptate anthers. Meiosis is also variable and may be successive or simultaneous and, after microgametogenesis, the pollen is released in tetrads or monads. Chapter 4 characterizes the ovules of all seven species as bitegmic, crassinucellate and perichalazal, varying from anatropous to anacampylotropous, single or multiple per carpel, respectively, in basal or parietal placentation. Both megasporogenesis and megagametogenesis characterize the development of *Polygonum* type. Finally, Chapter 5 shows the evaluation of 218 structural traits of flowers of the studied Annonaceae, using comparative phylogenetic methods to infer about the potential use of these traits to understand the flower evolution in the family. A phenogram was constructed indicating that, among other aspects, *A. emarginata* is the most distinct species among *Annona*, which shows that the inclusion of *Rollinia* in *Annona* should be revised. In addition, the most informative flower traits come from the corolla, especially from the inner petals, closely related to the elaborated process of pollination of the family.

Keywords: Nutritive tissue, nectary, microsporogenesis, microgametogenesis, megasporogenesis, megagametogenesis, phenogram.



Introdução Geral

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira, superada apenas pela floresta amazônica (Machado *et al.* 2005), e tem se mostrado mais rico do que se imaginava com muitas de suas tipologias endêmicas da América do Sul e do Brasil. Assim, a importância intrínseca de seu patrimônio genético merece maior reconhecimento (Mendonça *et al.* 1998). O amplo conhecimento da flora do Cerrado é importante para embasar a elaboração de estratégias para a preservação de áreas representativas do bioma, além de salientar sua importância nacional e mundial, a fim de priorizar a conservação e o manejo racional.

Dentre as famílias mais representativas do Cerrado, está Annonaceae, que figura em nono lugar (Mendonça *et al.* 1998). Annonaceae é a maior família dentre as angiospermas basais, apresenta distribuição predominantemente tropical e inclui, aproximadamente, 135 gêneros e 2.500 espécies (Doyle *et al.* 2004). No Brasil, a família conta com 29 gêneros e 388 espécies (Maas *et al.* 2013).

Incluída em Magnoliales (APG III 2009), Annonaceae apresenta-se subdividida, de acordo com Richardson *et al.* (2004), em três grandes clados: um grupo basal que compreende os gêneros *Anaxagorea*, *Ambavia*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Cyathocalyx*, *Mezzettia* e *Tetrameranthus*; um grupo com aproximadamente 47 gêneros e 1.500 espécies caracterizadas pela condição de pólen inaperturado, contendo *Annona*, *Artabotrys*, *Duguetia*, *Goniothalamus*, *Guatteria*, *Uvaria* e *Xylopia*; e um grupo com 50 gêneros e apenas 700 espécies, predominantemente asiático, mas que inclui gêneros neotropicais com sépalas imbricadas, um óvulo basal e frutos apocárpicos, incluindo *Malmea*, *Oxandra*, *Ephedranthus*, *Crematospera* e *Mosannonia*.

Chatrou *et al.* (2012), por meio de árvores filogenéticas parcimoniosas construídas da análise de sequências gênicas, concluíram que Annonaceae apresenta quatro clados: o clado da subfamília Anaxagoreoideae, que apresenta um único gênero, *Anaxagorea*; o clado da subfamília Ambavioideae, com os gêneros *Ambavia*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Cyathocalyx*, *Mezzettia* e *Tetrameranthus*; o clado de braço longo (subfamília Annonoideae), que contém sete tribos (Bocageae, Xylopieae, Duguetieae, Guatterieae, Annoneae, Monodoreae e Uvarieae); e o clado de braço curto (subfamília Malmeoideae), também dividido em sete tribos (Piptostigmateae, Malmeeae, Maasieae, Monocarpieae, Miliuseae, Fenerivieae e Dendrokingstonieae).

A família é composta por árvores, arbustos, subarbustos e lianas. As folhas são simples, alternas, dísticas, sem estípulas e com pecíolo reduzido. A casca é fibrosa, os elementos de vaso apresentam perfurações simples e a madeira tem amplos raios. Podem

ser observados tricomas simples, algumas vezes estrelados, ou escamas peltadas em algumas espécies da família (Simpson 2006, Judd *et al.* 2008, Souza e Lorenzi 2012).

Considerando-se sua dimensão, os gêneros mais representativos de Annonaceae são: *Guatteria*, com 250 espécies; *Xylopia*, 150 espécies; *Annona* e *Uvaria*, 110 espécies cada; *Polyalthia* e *Artabotrys*, 100 espécies cada (Judd *et al.* 2008). Na região centro-leste do Brasil, que inclui o bioma Cerrado, de acordo com Maas *et al.* (2001), dentre os gêneros de Annonaceae mais comuns estão *Annona*, com cerca de 28 espécies, *Duguetia*, com 20 espécies, *Guatteria* com 41 espécies, *Rollinia* com 13 e *Xylopia* com 10 espécies.

1. Estrutura Floral de Annonaceae

A maioria das espécies de Annonaceae apresenta flores hermafroditas e protogínicas, com receptáculo plano ou hemisférico. As flores variam grandemente em tamanho e podem ser esbranquiçadas, creme-amareladas, esverdeadas, alaranjadas e até vináceas (Heusden 1992, Ribeiro *et al.* 1999).

São flores com perianto trímero, composto por três sépalas livres ou levemente concrecidas e por dois verticilos de três pétalas cada, o externo geralmente com pétalas mais espessas e carnosas que o interno, embora em alguns casos o verticilo interno possa estar suprimido (Heusden 1992, Ribeiro *et al.* 1999, Pontes *et al.* 2004, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006). Nectários e tecidos nutritivos, quando presentes, ocorrem normalmente na face adaxial das pétalas internas (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Judd *et al.* 2008). Na maioria dos gêneros, a prefloração das pétalas internas é a mesma das externas, porém, em *Annona*, *Rollinia* e *Guatteriopsis* pode-se observar o verticilo externo valvar e o interno imbricado (Heusden 1992).

Uma característica marcante das flores dessa família é o fechamento das pétalas internas sobre os órgãos reprodutivos durante a antese, formando uma câmara denominada câmara de polinização ou câmara floral, que apresenta importantes funções durante o processo de polinização (Gottsberger 1970, Heusden 1992, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006). Nesta câmara são produzidos odores específicos para atrair os insetos polinizadores que encontram um ambiente aquecido, disponibilidade de alimento (tecidos do perianto e pólen), parceiros para a cópula, abrigo e proteção contra a luz solar e predadores (Gottsberger 1990, 1994, Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006, Ratnayake *et al.* 2007).

De acordo com Judd *et al.* (2008), as flores de Annonaceae apresentam adaptações aos polinizadores, como as flores relativamente fechadas, tecidos comestíveis, odores, pétalas carnosas e espessas, além de estruturas protetoras dos órgãos reprodutivos.

Segundo Schatz (1987), muitas Annonaceae apresentam modificações específicas nas pétalas, como adaptações à cantarofilia, podendo a pétala inteira funcionar como recompensa floral, ou apenas uma porção da pétala ser modificada como área alimentícia especializada.

Flores polinizadas por besouros grandes apresentam estruturas especializadas na superfície adaxial ou nas margens das pétalas internas que são ingeridas por estes insetos. São tecidos nutritivos, ricos em amido, lipídios, taninos e mucilagem, os quais, aparentemente, constituem o único alimento disponível para os besouros durante a fase pistilada, pois a liberação do pólen só ocorre posteriormente, na fase estaminada (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Amido e lipídios nas pétalas, além de constituírem alimentos para os besouros, comumente apresentam importante papel na termogênese, em que a degradação de carboidratos e lipídios promove a liberação de calor (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Dentre as muitas espécies que apresentam termogênese, o aquecimento da flor pode atingir até 12°C acima da temperatura ambiente, o que aumenta a liberação de compostos odoríferos (Ribeiro *et al.* 1999, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Os odores liberados pelas flores variam muito entre as espécies e são, junto à termogênese, os principais atrativos aos polinizadores (Gottsberger 1994, Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006). Segundo Jürgens (2009), a diversidade de odores emitidos por espécies de Annonaceae parece ser relativamente maior que os de todas as angiospermas já listadas. As Annonaceae analisadas pelo autor representam 2,2% das angiospermas e compreendem 8,4% de toda a diversidade de odores encontrada nas Angiospermas.

Os odores florais podem ser responsáveis por atrair polinizadores específicos, no entanto, a situação mais comum na maioria das angiospermas é que vários compostos juntos atraiam uma ampla gama de visitantes. Nem todos esses visitantes são necessariamente polinizadores efetivos, então existem outros aspectos que frequentemente funcionam como filtros. Em Annonaceae, fatores como o tamanho da câmara de polinização, a coloração das flores e o sistema de recompensa também precisam ser considerados na evolução do grupo (Jürgens 2009).

Thien *et al.* (2000) já destacaram que as fragrâncias florais e o calor desempenham importantes papéis nos sistemas reprodutivos das angiospermas basais, em que os odores podem sinalizar, não apenas o alimento e local para reprodução, mas também a fonte de calor.

Nas Annonaceae, o androceu é formado por numerosos estames com filetes curtos ou ausentes, duas tecas lineares e um prolongamento apical do conectivo, similar a um escudo (Heusden 1992). As anteras são deiscentes longitudinalmente e produzem grãos de pólen que podem ser liberados em mônades, tétrades ou políades (Johri *et al.* 1992, Heusden 1992). Os estames, com frequência, estão fortemente unidos devido aos conectivos das anteras, que são duros e achatados e ajusta-se uns aos outros de modo a formar uma camada tida como intransponível. Podem ocorrer estaminódios internos, externos ou em ambas as posições em relação ao gineceu (Johri *et al.* 1992, Heusden 1992, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Segundo Tsou e Johnson (2003), as anteras de muitas espécies de Annonaceae apresentam septos que individualizam as células-mãe de microsporo. Esses septos podem ser formados apenas pelo tapete ou pelo tapete mais outras camadas parenquimáticas, originando, respectivamente, anteras com septos tapetais (tipo T) e anteras com septos parenquimáticos (tipo P).

O gineceu é, geralmente, dialicarpelar e composto por três a numerosos carpelos arranjados espiraladamente (Heusden 1992, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006, Simpson 2006, Judd *et al.* 2008). O estilete pode estar ou não presente, sendo, na maioria dos gêneros ausente ou muito curto (Heusden 1992). O estigma varia em formato, de elipsoide, esferoide, ovoide, cilíndrico, obcônico, discoide, bilobado a achatado, sendo difícil de ser delimitado em um grande número de gêneros (Heusden 1992). Segundo Briechle-Mäck (1993), para os gêneros *Annona* e *Rollinia*, existem três tipos de estigmas: no primeiro tipo, as papilas estigmáticas apenas se tocam e são completamente recobertas por secreções; no segundo, os estigmas são alongados e aproximadamente do mesmo diâmetro, com suas partes basais conatas pela epiderme; e, no terceiro tipo, as partes basais dos estigmas apresentam estruturas que se tocam, provocando a fusão epidérmica.

O ovário é súpero, podendo ocorrer de um a vários óvulos por carpelo (Heusden 1992, Judd *et al.* 2008). De acordo com Setten e Koek-Noorman (1992), a placentação é basal ou lateral, raramente apical ou laminar.

Os óvulos são anátropos, pericalazais, bi ou tritegumentados, crassinucelados, transversos ou sub-basais, eretos e com a micrópila formada pelo endostômio, pois o

tegumento interno excede o externo (Corner 1949, 1976). O megagametofito apresenta desenvolvimento do tipo *Polygonum* (Corner 1976, Johri *et al.* 1992, Heusden 1992, Svoma 1998).

Apesar de todos os relatos anteriores, nenhum estudo estrutural, histoquímico e/ou ultraestrutural foi realizado para esclarecer os processos de termogênese, emissão de odores, abertura e fechamento das pétalas, formação da câmara de polinização, dentre outros aspectos relacionados aos eventos reprodutivos dos representantes da família.

2. Biologia Floral

De acordo com Gottsberger (1994), Silberbauer-Gottsberger *et al.* (2003) e Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger (2006), a antese ocorre em duas etapas distintas, devido à diferença temporal entre a receptividade dos estigmas e a liberação do pólen, evitando, desta forma, a autopolinização. Supõe-se que a maioria das espécies seja autocompatível, mas a polinização cruzada se faz necessária uma vez que há evidente dicogamia, ou seja, fases pistilada e estaminada nitidamente diferentes.

Na fase pistilada, os estigmas ficam recobertos por secreção pegajosa que, no final dessa fase, faz com que os estigmas se juntem impedindo a germinação de seus próprios grãos de pólen durante a fase estaminada (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Os insetos polinizadores são atraídos até as flores em ambas as fases, pistilada e estaminada, e permanecem no interior da câmara de polinização, alimentando-se de pétalas, aquecendo-se e utilizando as flores como local de acasalamento. Quando o pólen é liberado, os insetos entram em contato com este, ficando aptos a transportá-lo para outras flores receptivas. Terminada a liberação do pólen, as pétalas entram em abscisão, expondo os insetos; nesta ocasião, novas flores na fase pistilada liberam os odores que atraem os insetos, efetivando-se a polinização (Gottsberger 1994, Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Há relatos de quatro tipos de polinizadores em Annonaceae: tripes, moscas, besouros e abelhas. Em uma única espécie, baratas foram registradas como polinizadores (Nagamitsu e Inoue 1997).

Poucas espécies de Annonaceae apresentam tripes como polinizadores exclusivos ou adicionais, tais como: *Bocageopsis multiflora*, *Xylopia amazonica* (Webber e Gottsberger 1995, Webber 1996) e *Popowia pisocarpa* (Momose *et al.* 1998).

Xylopia aromatica é a única Annonaceae do Cerrado em que tripes são os principais polinizadores. As flores brancas são comumente orientadas em posição inclinada

à ereta e, durante a antese que ocorre principalmente durante o dia, as seis pétalas emitem forte odor adocicado. Durante a primeira fase funcional, apenas os estigmas estão receptivos, o que caracteriza as flores como protogínicas. Esta fase feminina inicia-se bem cedo e termina no final do dia; durante este período, os insetos entram livremente nas flores, pois as pétalas internas delimitam uma abertura apical. Besouros grandes podem comer a superfície das pétalas, mas dificilmente conseguem danificar os verticilos reprodutivos, pois estes estão protegidos pelas pétalas internas parcialmente fechadas. Na manhã do segundo dia, as flores entram na fase estaminada, na qual as anteras entram em deiscência, os estigmas não são mais receptivos e as pétalas internas tornam-se completamente fechadas. Tripes e besouros tornam-se cobertos por pólen. No final do segundo dia, as pétalas entram em abscisão e os insetos voam para outras flores, podendo promover a polinização (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Polinização realizada por moscas é suspeitada em *Annona ambotay*, devido à presença de “janelas translúcidas” que caracterizam certas espécies polinizadas por moscas (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003), e em espécies de *Sapranthus*, que apresentam flores de coloração púrpura e odor desagradável (Olsen 1992).

Dentre as espécies australianas de *Pseuduvaria*, várias são polinizadas por moscas. Segundo Silberbauer-Gottsberger *et al.* (2003), indivíduos de *Pseuduvaria froggatti* apresentam flores com pétalas de coloração externa creme e vinho internamente. Durante a antese, duas grandes glândulas, espessas, ovais e de coloração púrpura, situadas nas margens das pétalas internas, começam a secretar néctar através de pequenas aberturas do tecido nectarífero, que atrai grande número de moscas (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003).

São poucas as famílias de plantas que apresentam besouros como polinizadores únicos ou predominantes, caso de Annonaceae. A diferenciação floral nas espécies que têm os besouros como polinizadores tem ocorrido, de modo que espécies com flores maiores e mais robustas são principalmente polinizadas por grandes besouros, enquanto flores mais delicadas e menores, por pequenos besouros. As flores da maioria das Annonaceae não abrem suas pétalas internas durante a antese, formando a câmara de polinização. Atraídos por odores específicos, os besouros entram nas flores apertando-se por entre as pétalas ou utilizando aberturas existentes na base ou ápice das pétalas internas (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006). O tamanho da câmara, a quantidade de alimento disponível e a espessura das pétalas estão correlacionados com o tamanho, número e voracidade dos besouros associados,

selecionando os insetos que adentram a câmara e protegendo os verticilos reprodutivos (Gottsberger 1970, 1994, Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

As espécies polinizadas por besouros normalmente apresentam flores pêndulas ou inclinadas, amarelas, verdes ou avermelhadas, protogínicas e com forte odor de frutos maduros ou em decomposição (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Xylopia benthami e *Anaxagorea brevipes* (Webber 1996, KÜchmeister *et al.* 1998), *Polyalthia korinti* (Ratnayake *et al.* 2006), *X. crinita* e *X. excellens* (Webber 1996, KÜchmeister *et al.* 1998) e *Guatteria foliosa* (Webber 1996) apresentam pequenos besouros como polinizadores. A maioria dos pequenos besouros polinizadores de Annonaceae pertencem às famílias Nitidulidae, Curculionidae, Chrysomelidae e Staphylinidae (Gottsberger 2012).

As flores de *Duguetia furfuracea* formam câmaras florais relativamente pequenas. Durante a antese, as bases das pétalas internas fecham-se sobre os órgãos reprodutivos e produzem odores semelhantes aos de frutos maduros, o que atrai coleópteros Nitidulidae, que penetram e abrigam-se no interior das flores. A antese é diurna e não há elevação de temperatura (Gottsberger 1970, 1994, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

A polinização por besouros grandes é considerada uma forma especializada e derivada, que se desenvolveu em várias famílias de Angiospermas. Dentre as Annonaceae, muitas espécies de *Annona* e certas *Duguetia* são polinizadas por besouros Dynastinae, uma subfamília de Scarabaeidae, principalmente do gênero *Cyclocephala* (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006, Gottsberger 2012).

Annona coriacea é uma planta comum e conspícua do Cerrado e apresenta um ritmo de florescimento de aproximadamente quarenta e oito horas, durante o qual a temperatura floral aumentará por duas noites sucessivas. Na primeira noite, as flores estão na fase pistilada, evidente pelos estigmas recobertos por um líquido viscoso e transparente, e ocorre termogênese. O primeiro aumento de temperatura torna-se detectável entre 18h30min e 19 horas, e a temperatura continua aumentando até atingir um pico de aproximadamente 34°C entre 20h30min e 21h30min. Depois disso, a flor vai gradualmente resfriando, até finalmente voltar à temperatura ambiente. Na tarde do segundo dia, por volta das 18horas, a temperatura floral começa a elevar-se novamente, chegando ao pico por volta das 20 horas, aproximadamente meia hora ou uma hora antes que na primeira noite. Durante esse segundo aumento de temperatura, as anteras tornam-se deiscentes e

tétrades de pólen são liberadas. Por volta de 20h30min as pétalas entram em abscisão, marcando o fim da antese (Gottsberger 1994, 2012, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

Segundo Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger (2006), a intensidade do odor das flores parece estar relacionada ao aumento de temperatura, ou seja, a elevação da temperatura causa emissão de pronunciados e fortes componentes odoríferos. Inicialmente, próximo à temperatura ambiente, as flores produzem fraco odor de fruto. No pico da termogênese floral, o odor torna-se forte e desagradável. São as fortes fragrâncias emitidas pela flor aquecida que atraem os besouros *Dynastinae*.

No pico de temperatura, o número de besouros que chegam às flores aumenta. Depois deste momento, a flor começa a resfriar e o número de visitantes diminui, sendo que, próximo das 22 horas, não há aproximação de novos besouros. Uma vez que os besouros entram na câmara floral, começam a alimentar-se de regiões da base das três pétalas internas, onde se localizam tecidos nutritivos. No segundo aumento de temperatura, as flores atraem mais besouros, que se unem aos primeiros e, juntos, tornam-se cobertos por pegajosas tétrades de pólen recentemente liberadas. Nesta fase, o pólen torna-se o principal alimento para esses insetos. Os besouros saem das flores quando ocorre a abscisão das pétalas, cerca de meia hora antes de outras flores que estão na fase pistilada atingirem o pico de temperatura. Os besouros voam carregando o pólen até as flores receptivas, quentes e funcionais na primeira noite, realizando assim a polinização (Gottsberger 1994, 2012, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

De acordo com Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger (2006), o processo de polinização em *A. coriacea* apenas funciona bem em noites relativamente quentes, pois, para ocorrer o aumento da temperatura das flores, a temperatura ambiente deve estar acima de 21°C. Se a temperatura ambiente estiver menor, as flores não entram em antese, não ocorre termogênese e, conseqüentemente, os besouros não são atraídos.

As flores de *A. crassiflora* também exibem termogênese. Nesta espécie, a termogênese parece ser um processo muito sensível à temperatura ambiente. Se a temperatura ambiente permanecer abaixo de 24 ou 25°C, a temperatura floral eleva-se levemente. Se a temperatura ambiental depois das 19 horas for de 25°C ou mais, a temperatura floral chega até a 34 ou 35°C, isto é, 10°C acima da temperatura ambiente. A antese dura apenas uma noite. A elevação de temperatura ocorre durante a fase pistilada nas primeiras horas da noite e a emissão de odores florais promove a atração de besouros *Dynastinae*. A partir das 19 horas, besouros *Cyclocephala atricapilla* chegam às flores e

entram na câmara floral. Normalmente por volta da meia-noite, entre 22 e 24 horas, os estames tornam-se deiscentes e, junto com o pólen, caem no interior da câmara floral formada pelas pétalas internas curvadas. Depois da meia-noite, as pétalas se separam do receptáculo floral e caem, abrigando muitos besouros até o próximo dia, quando eles saem recobertos pelas tétrades pegajosas de pólen e voam até as flores recentemente abertas, polinizando-as (Gottsberger 1994, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006).

A análise da literatura revela que espécies de *Annona* têm ritmos florais de uma, duas ou três noites, com fases pistilada e estaminada coordenadas, de modo que a transferência de pólen é altamente eficiente.

O fenômeno de polinização por abelhas foi recentemente registrado na família. Abelhas da família Meliponidae visitam as flores de Annonaceae apenas quando estas estão liberando pólen, mas não têm papel na polinização, pois não entram em contato com os estigmas quando estão receptivos (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 2003). Porém, Carvalho e Webber (2000) observaram que flores de *Unonopsis guatterioides* são visitadas por abelhas macho de *Eulaema bombiformis* (Euglossini), abelhas Meliponidae e coleópteros Chrysomelidae. As Euglossini, ao se aproximarem das flores em antese, primeiro pairam no ar em frente às flores e, em seguida, pousam e pairam sucessivas vezes. Nesse movimento, estabelecem um contato muito rápido entre o abdômen e os estigmas e estames. Assim, quando as flores estão liberando pólen, este adere facilmente aos pelos do corpo e das patas da abelha, que se torna um importante vetor (Carvalho e Webber 2000).

Outra espécie polinizada por abelhas é *Unonopsis stipitata* (Teichert *et al.* 2009), cujos principais visitantes são abelhas machos de *Eulaema bombiformis* e *Euglossa imperialis*. As flores de ambas as espécies polinizadas por abelhas têm atividade diurna, e já não exibem muitos caracteres morfológicos e funcionais associados à polinização feita por besouros.

3. Espécies estudadas

Para o presente trabalho, foram selecionadas sete espécies de Annonaceae, típicas do bioma Cerrado, pertencentes a quatro dos maiores gêneros da família. São elas: *Annona coriacea* Mart., *A. crassiflora* Mart., *A. dioica* A. St.-Hil., *A. emarginata* (Schltdl.) H.Rainer, *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff., *Guatteria australis* A. St.-Hil. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.

Annona coriacea Mart. (Figura 1) é popularmente conhecida como araticum-do-campo, cabeça-de-negro ou marolo, e ocorre em Cerrado típico, fisionomias campestres de

Cerrado e, ocasionalmente, em cerradão. É um arbusto ou árvore de pequeno porte, com casca clara e áspera, folhas simples, alternas, subsésseis ou curto-pecioladas, coriáceas, glabras e verde-escuras. As flores são solitárias, amarelo-rosadas, grandes e de pétalas muito carnosas. O fruto é um sincarpo com até 25cm de comprimento e numerosas sementes de até 1,5cm de comprimento (Durigan *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005, Silva-Júnior 2005). Seus frutos são muito apreciados *in natura* ou na forma de doces. Na medicina popular, suas folhas, sementes e casca são utilizadas para curar diarreias (Silva-Júnior 2005). A madeira pode ser empregada na confecção de objetos leves como brinquedos, pois é mole e pouco resistente. Possui importância ornamental, podendo ser utilizada na arborização de ruas. Os frutos são comestíveis e a espécie é útil para reflorestamentos mistos de áreas degradadas, devido a sua adaptação a solos pobres e pelo fato dos frutos serem apreciados pela fauna (Lorenzi 2002a).



Figura 1: *Annona coriacea*. **A.** Aspecto geral da planta. **B.** Detalhe de ramo com flor.

Annona crassiflora Mart. (Figura 2), popularmente conhecida como araticum, cabeça-de-negro ou pinha-do-Cerrado, ocorre em fisionomias campestres de Cerrado, em Cerrado típico e em cerradão. É um arbusto ou árvore de caule tortuoso, com casca espessa, áspera e corticosa, e ramos jovens com pilosidade ferrugínea. As folhas são simples, alternas, geralmente elípticas e curto-pecioladas. As flores são verde-amareladas, grandes, carnosas, isoladas e axilares. O fruto é sincárpico, amarelo-esverdeado a ferrugíneo, com até 15 cm de comprimento, polpa levemente adocicada e aroma agradável (Lorenzi 2002b, Durigan *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005). A árvore é recomendada para arborização de ruas estreitas e seus frutos são comestíveis e muito apreciados pelas

populações rurais do Brasil Central, inclusive sendo comercializados em feiras (Lorenzi 2002b). Segundo Silva-Junior (2005) e Kuhlmann e Fagg (2012), as sementes servem como inseticida e, na medicina popular, são utilizadas para curar diarreia e como indutoras de menstruação.



Figura 2: *Annona crassiflora*. **A.** Aspecto geral da planta. **B.** Ramo com botões florais. **C.** Detalhe de uma flor. **D.** Conjunto de pétalas, desprendido do receptáculo após a polinização.

Annona dioica A.St.-Hil. (Figura 3), espécie popularmente conhecida como araticum e cabeça-de-negro, ocorre em fisionomias campestres de Cerrado, em Cerrado típico e em bordas ou áreas perturbadas de cerradão. É um arbusto de até 2m de altura, com ramos pilosos emergindo de um xilopódio. As folhas são alternas, simples, coriáceas, subsésseis, verde-claras, com base obtusa a arredondada e ápice arredondado e apresentam face superior com pêlos esparsos e inferior densamente pilosa. Suas flores são isoladas, amarelo-esverdeadas, carnosas e axilares. O fruto é verde-claro, de formato ovado a

globoso, com até 15cm de comprimento (Durigan *et al.* 2004). De acordo com Paulino-Neto e Teixeira (2006), é uma espécie androdioica, com 2,07 indivíduos masculinos para cada indivíduo hermafrodita. Segundo Pott e Pott (1994), os frutos e folhas desta espécie são utilizados no combate ao reumatismo e, as sementes, para curar diarreia.



Figura 3: *Annona dioica*. **A.** Aspecto geral da planta. **B.** Flor hermafrodita. **C.** Detalhe de uma flor com o besouro polinizador no seu interior, alimentando-se do tecido nutritivo. **D.** Flor estaminada.

Annona emarginata (Schltdl.) H.Rainer (Figura 4) é um arbusto ou árvore com até 20m de altura presente em matas de galeria e brejos. As folhas são ovadas, obovadas, elípticas ou circulares, membranáceas a cartáceas, verdes, com tricomas simples esparsos. As inflorescências são opostas às folhas, com uma a três flores de coloração amarela ou creme, com pétalas e sépalas internamente glabras e externamente pilosas. O fruto é elipsoide ou globoso, amarelado e compostos por frutíolos parcialmente conatos (Koek-Noorman e Maas 1992).



Figura 4: *Annona emarginata*. **A.** Ramo com flor (seta). **B.** Detalhe de ramo com flor evidenciando abertura da câmara de polinização.

Duguetia furfuracea (A.St.-Hil.) Saff. (Figura 5) é popularmente conhecida como araticum, marolinho-do-cerrado ou pinha-de-guará, apresenta $2n=24$ (Morawetz e Benko-Isepon 2003) e ocorre em fisionomias campestres de Cerrado, em Cerrado típico e em bordas ou áreas perturbadas de cerradão (Durigan *et al.* 2004). São arbustos que chegam a 2m de altura, com ramos geralmente partindo da base e laterais rentes ao chão. As folhas são simples, alternas, com cerca de 10cm de comprimento e 3cm de largura, com base e ápice agudos, pilosas em ambas as faces, com tricomas e escamas estrelados, apresentam coloração verde-pálida, com reflexos prateados na face abaxial e pecíolo curto (Koek-Noorman e Maas 2003, Durigan *et al.* 2004). De acordo com Koek-Noorman e Maas (2003), *D. furfuracea* apresenta inflorescências opostas às folhas ou, algumas vezes, supra-axilares, com uma a três flores, raramente cinco. Já segundo Durigan *et al.* (2004), a espécie possui flores solitárias, róseo-alaranjadas, carnosas, em pedúnculos opostos às folhas. O fruto é verde-claro, globoso a estrobiliforme, com até 8cm de diâmetro e apresenta frutíolos livres na maturação (Durigan *et al.* 2004). Os frutos também são completamente recobertos por tricomas e escamas estrelados (Koek-Noorman e Maas 2003). As sementes dessa espécie, quando pulverizadas e diluídas em água, podem ser utilizadas como antiparasitas, principalmente contra piolhos (Corrêa 1926).



Figura 5: *Duguetia furfuracea*. **A.** Aspecto geral da planta. **B.** Flor em antese. **C.** Detalhe da flor, mostrando os besouros polinizadores alimentando-se.

Guatteria australis A. St.-Hil. (Figura 6) é uma árvore de Cerrado com 8 a 12m de altura, popularmente conhecida como pindaíba-preta. Apresenta tronco curto, revestido por casca quase lisa, e copa frondosa muito ramificada. As folhas são simples, alternas, discoloras e glabras na face superior. As flores são solitárias, axilares, de 1 a 2cm de comprimento com pétalas velutinas. O fruto é composto por vários frutíolos drupoides de cor púrpura ou violácea, brilhantes, glabros, contendo apenas uma semente. A madeira pode ser utilizada para fabricação de objetos leves, os frutos são muito procurados por pássaros, e é recomendada para arborização urbana (Lorenzi 2002b).

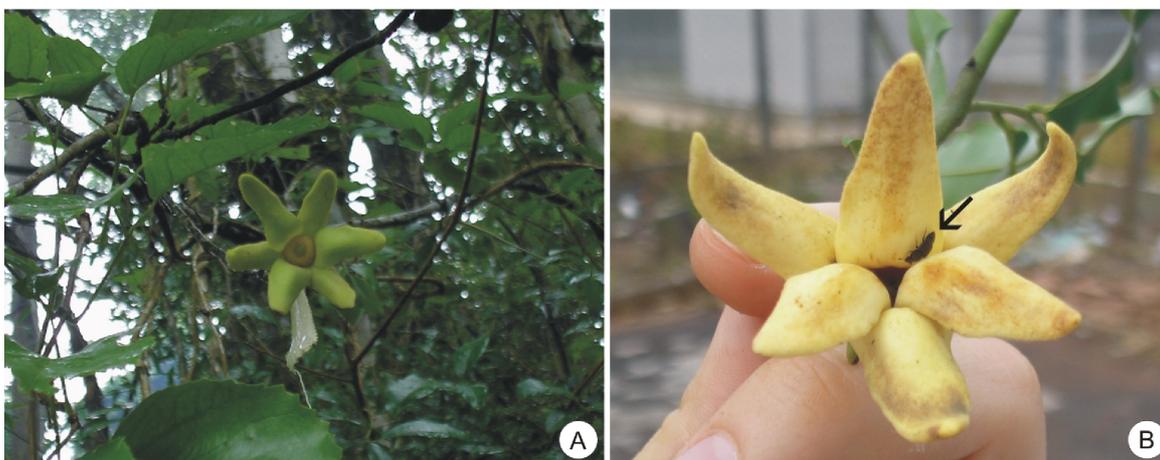


Figura 6: *Guatteria australis*. **A.** Detalhe de ramo portando flor com pétalas em expansão. **B.** Flor em antese, com besouro polinizador (seta).

Xylopia aromatica (Lam.) Mart. (Figura 7) é popularmente conhecida como pimenta-de-macaco ou pindaíba-do-campo e ocorre em fisionomias campestres de Cerrado, em Cerrado típico e em cerradão (Lorenzi 2002a, Durigan *et al.* 2004). É uma árvore pequena, de tronco ereto e ramos pubescentes. Apresenta folhas simples, alternas, dísticas, lanceoladas, curto-pedunculadas, pubescentes em ambas as faces. As flores são axilares, isoladas ou em pequenos grupos e brancas (Lorenzi 2002a, Durigan *et al.* 2004). O fruto é múltiplo livre, com frutíolos deiscentes compondo um polifóliculo, verdes por fora e avermelhados internamente. As sementes são elipsoides, de coloração preta, com arilo bilobado de cor creme-avermelhada (Silva-Junior *et al.* 2005). Pode ser empregada na arborização de ruas estreitas e no paisagismo em geral e seus frutos são muito procurados por pássaros (Lorenzi 2002a). As flores produzem óleo aromático para perfumaria e, na medicina popular, os frutos são considerados digestivos, vermífugos e tônicos, e as folhas e a casca são anti-inflamatórias (Silva-Junior *et al.* 2005).



Figura 7: *Xylopia aromatica*. **A.** Aspecto geral da planta. **B.** Ramo com botões florais e uma flor em antese.

4. Objetivo Geral

Embora a biologia floral de Annonaceae seja bastante explorada na literatura, detalhes sobre aspectos estruturais, histoquímicos e ultraestruturais das flores dessas plantas, especialmente no bioma Cerrado, ainda são desconhecidos.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo estrutural, histoquímico e ultraestrutural das flores de sete espécies de Annonaceae, frequentes no bioma Cerrado, selecionadas em função de pertencerem a quatro dos maiores gêneros da família.

5. Referências Bibliográficas

- 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: 105-121.
- Briechle-Mäck, M. 1993. Aspects of floral ontogeny and comparative anatomy of gynoecium and fruit in the genera *Annona* and *Rollinia*. *Annonaceae Newsletter* 9: 48-50.

- Carvalho, R., Webber, A.C. 2000. Biologia floral de *Unonopsis guatterioides* (A. D.C.) R.E. Fr., uma Annonaceae polinizada por Euglossini. *Revista Brasileira de Botânica* 23(4): 421-425.
- Chatrou, L.W., Pirie, M.D., Erkens, R.H.J., Couvreur, T.L.P., Neubig, K.M., Abbott, J.R., Mols, J.B., Maas, J.W., Saunders, R.M.K., Chase, M.W. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 5-40.
- Corner, E.J.H. 1949. The Annonaceous seed and its four integuments. *New Phytologist* 48(3): 332-346.
- Corner, E.J.H. 1976. The seeds of dicotyledons. vol.1. Cambridge: University Press.
- Corrêa, M.P. 1926. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. vol.1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Doyle, J.A., Sauquet, H., Scharaschkin, T., Le Thomas, A. 2004. Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). *International Journal of Plant Science* 165 (Suppl. 4): S55-S67.
- Durigan, G., Baitello, J.B., Franco, G.A.D.C., Siqueira, M.F. 2004. Plantas do Cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica.
- Gottsberger, G. 1970. Beiträge zur biologie von Annonaceen-blüten. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 118: 237-279.
- Gottsberger, G. 1990. Pollination and flower evolution in Neotropical Annonaceae. *Annonaceae Newsletter* 8: 35-36.
- Gottsberger, G. 1994. As anonáceas do Cerrado e a sua polinização. *Revista Brasileira de Biologia* 54(3): 391-402.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I. 2006. In the evening when the beetles come: pollination in Annonaceae e *Philodendron*. In: Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I. (Eds.). *Life in the Cerrado: a South American tropical seasonal ecosystem. Pollination and seed dispersal*. vol. 2. Ulm: Reta Verlag.
- Gottsberger, G. 2012. How diverse are Annonaceae with regard to pollination? *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 245-261.
- Heusden, E.C.H. van. 1992. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. *Blumea, Supplement* 7: 7-36.

- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B., Srivastava, P.S. 1992. Comparative embryology of Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. 2008. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Jürgens, A. 2009. The hidden language of flowering plants: floral odors as a key for understanding angiosperm evolution? *New Phytologist* 183: 240-243.
- Koek-Noorman, J., Maas, P.J.M. 1992. Systematic position and subdivision of *Rollinia*. In: Maas, P.J.M., Westra, L.Y.Th. *Flora Neotropica Monographs* 57: 55-183.
- Koek-Noorman, J., Maas, P.J.M. 2003. Internal relationships in *Duguetia*. In: Maas, P.J.M., Westra, L.Y.Th., Chatrou, L.W. *Flora Neotropica Monographs* 88: 59-271.
- Küchmeister, H., Webber, A.C., Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G. 1998. A polinização e sua relação com a termogênese em espécies de *Arecaceae* e *Annonaceae* da Amazônia Central. *Acta Amazonica* 28(3): 217-245.
- Kuhlmann, M., Fagg, C. 2012. Frutos e sementes do Cerrado atrativos para fauna: guia de campo. Brasília: Editora Rede de Sementes do Cerrado.
- Lorenzi, H. 2002a. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. vol. 1. 4ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Lorenzi, H. 2002b. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. vol. 2. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Maas, P.J.M., Kamer, H.M, Junikka, L., Mello-Silva, R., Rainer, H. 2001. *Annonaceae* from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia* 52(80): 65-98.
- Maas, P., Rainer, H., Lobão, A. 2013. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>. Acesso em: 09 de março de 2013.
- Machado, R.S., Barbosa, S.B., Campos, C.J. 2005. Cerrado Palmeira da Serra. São Carlos: Editora Rima.
- Mendonça, R.C., Felfili, J. M., Silva Jr., M.C., Rezende, A.V., Nogueira, P.E., Walter, B.M.T., Filgueiras, T.S. 1998. Flora vascular do Cerrado. In: Sano, S.M., Almeida, S.P. (Eds). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa/CPAC.
- Momose, K., Nagamitsu, T., Inoue, T. 1998. Thrips cross-pollination of *Popowia pisocarpa* (*Annonaceae*) in a lowland dipterocarp forest in Sarawak. *Biotropica* 30(3): 444-448.

- Morawetz, W., Benko-Isepon, A.M. 2003. Karyology. In: Maas, P.J.M., Westra, L.Y.Th., Chatrou, L.W. Flora Neotropica Monographs 88: 36-41.
- Nagamitsu, T., Inoue, T. 1997. Cockroach pollination and breeding system of *Uvaria elmeri* (Annonaceae) in a lowland mixed-dipterocarp forest in Sarawak. American Journal of Botany 84(2): 208-213.
- Olsen, J.M. 1992. Flower mining by moth larvae vs. pollination by beetles and bees in the cauliflorous *Sapranthus palanga* (Annonaceae) in Costa Rica. Flora 187: 9-15.
- Paulino-Neto, H.F., Teixeira, R.C. 2006. Florivory and sex ratio in *Annona dioica* St.Hil.(Annonaceae) in the Pantanal at Nhecolândia, southwestern Brazil. Acta Botanica Brasilica 20(2): 405-409.
- Pontes, A.F., Barbosa, M.R.V., Maas, P.J.M. 2004. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. Acta Botanica Brasilica 18(2): 281-293.
- Pott, A., Pott, V.J. 1994. Plantas do Pantanal. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, CPAP. Brasília: Serviço de Produção de Informação *apud* Santos, P.R.D., Morais, A.A., Braz-Filho, R. 2003. Alkaloids from *Annona dioica*. Journal of the Brazilian Chemical Society 4(3): 396-400.
- Ratnayake, R.M.C.S., Gunatilleke, I.A.U.N., Wijesundara, D.S.A., Saunders, R.M.K. 2006. Reproductive biology of two sympatric species of *Polyalthia* (Annonaceae) in Sri Lanka. I. Pollination by curculionid beetles. International Journal of Plant Science 167(3): 483-493.
- Ratnayake, R.M.C.S., Gunatilleke, I.A.U.N., Wijesundara, D.S.A., Saunders, R.M.K. 2007. Pollination ecology and breeding system of *Xylopia championii* (Annonaceae): Curculionid beetle pollination, promoted by floral scents and elevated floral temperatures. International Journal of Plant Science 168: 1255-1268.
- Ribeiro, J.E.L.S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., Sothers, C.A., Costa, M.A.S., Brito, J.M., Souza, M.A.D., Martins, L.H.P., Lohmann, L.G., Assunção, P.A.C.L., Pereira, E.C., Silva, C.F., Mesquita, M.R., Procópio, L.C. 1999. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: Inpa.
- Richardson, J.E., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens, R.H.J., Pirie, M.D. 2004. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. Philosophical Transactions of the Royal Society B 359: 1495-1508.
- Schatz, G.E. 1987. Systematic and ecological studies of Central American Annonaceae. Tese de doutorado, University of Wisconsin, Madison.

- Setten, K. van, Koek-Noorman, J. 1992. Fruits and seeds of Annonaceae. Morphology and its significance for classification and identification. *Bibliotheca Botanica* 142: 1-101.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G., Webber, A.C. 2003. Morphological and functional flower characteristics of new and old world Annonaceae with respect to their mode of pollination. *Taxon* 52: 701-718.
- Silva Júnior, M.C., Santos, G.C., Nogueira, P.E., Munhoz, C.B.R., Ramos, A.E. 2005. 100 Árvores do Cerrado: guia de campo. Brasília: Editora Rede de Sementes do Cerrado.
- Simpson, M.G. 2006. *Plant Systematics*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Souza, V.C., Lorenzi, H. 2012. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Svoma, E. 1998. Studies on the embryology and gynoecium structures in *Drimys winteri* (Winteraceae) and some Annonaceae. *Plant Systematics and Evolution* 209: 205-229.
- Teichert, H., Dötterl, S., Zimma, B., Ayasse, M., Gottsberger, G. 2009. Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology* 11: 29-37.
- Thien, L.B., Azuma, H., Kawano, S. 2000. New perspectives on the pollination biology of basal angiosperms. *International Journal of Plant Science* 161 (Suppl. 6): S225-S235.
- Tsou, C.H., Johnson, D.M. 2003. Comparative development of aseptate and septate anthers of Annonaceae. *American Journal of Botany* 90(6): 832-848.
- Webber A.C., Gottsberger G. 1995. Floral biology and pollination of *Bocageopsis multiflora* and *Oxandra euneura* in Central Amazonia, with remarks on the evolution of stamens in Annonaceae. *Feddes Repertorium* 106: 515-524.
- Webber, A.C. 1996. *Biologia floral, polinização e aspectos fenológicos de algumas Annonaceae na Amazônia Central*. Tese de doutorado, INPA-FUA, Manaus.

Os resultados obtidos neste trabalho foram reunidos em cinco artigos científicos para publicação:

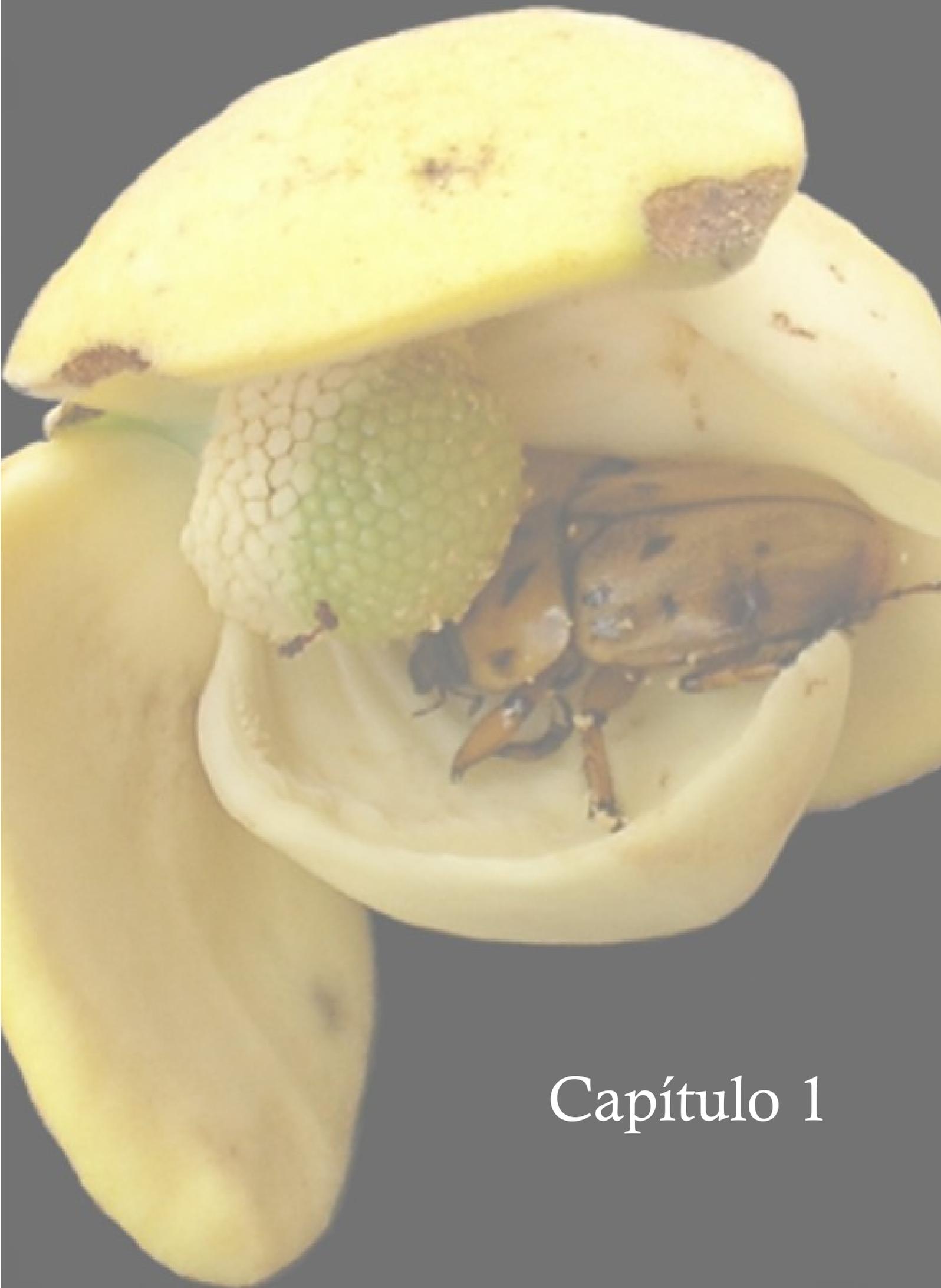
Capítulo 1: Tecido nutritivo em pétalas de *Annona* (Annonaceae): estrutura, ultraestrutura e papel no processo reprodutivo. Redigido segundo as normas da revista *Flora*.

Capítulo 2: Nectários florais em *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae): estrutura, secreção e aspectos funcionais. Redigido segundo as normas da revista *Flora*.

Capítulo 3: Estrutura da antera e ontogênese do pólen de Annonaceae e suas possíveis implicações taxonômicas. Redigido segundo as normas da revista *Plant Systematics and Evolution*.

Capítulo 4: Megasporogênese e megagametogênese em espécies de Annonaceae. Redigido segundo as normas da revista *Acta Botanica Brasilica*.

Capítulo 5: Potencial filogenético de caracteres florais de Annonaceae do Cerrado. Redigido segundo as normas da revista *Botanical Journal of The Linnean Society*.



Capítulo 1

**Tecido nutritivo em pétalas de *Annona* (Annonaceae): estrutura,
ultraestrutura e papel no processo reprodutivo**

Natália Arias Galastri^(a,b), Élder Antônio Sousa Paiva^(a), Denise Maria Trombert Oliveira^(a)

(a) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil.

(b) Faculdade de Tecnologia de Jahu, Coordenadoria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Rua Frei Galvão s/nº, Jardim Pedro Ometto, Jaú, SP 17212-650, Brasil.

Autor para correspondência: dmtoliveira@icb.ufmg.br

Resumo

A estrutura floral de muitas Annonaceae apresenta modificações específicas nas pétalas, os chamados tecidos nutritivos (TNs), que constituem adaptações à cantarofilia. Dado o pequeno conhecimento dessas estruturas, o objetivo deste trabalho é descrever a organização estrutural e ultraestrutural do TN em espécies de *Annona* do Cerrado (*A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *A. emarginata*), buscando correlacionar estrutura e função. Botões florais e flores durante a antese foram coletados e processados segundo técnicas usuais. O TN encontra-se na porção adaxial da região basal das pétalas internas de *A. dioica*, das pétalas internas e externas de *A. emarginata* e restrito às margens da região basal das pétalas internas em *A. crassiflora* e *A. coriacea*. A porção nutritiva apresenta epiderme uniestratificada, com células de citoplasma denso, papilosas em *A. emarginata*, radialmente alongadas em *A. dioica*, e cuboides a radialmente alongadas em *A. crassiflora* e *A. coriacea*. O mesofilo é parenquimático, formado por células de formatos e tamanhos variados, com citoplasma denso. Em todas as espécies, observam-se idioblastos fenólicos e, em *A. emarginata*, também ocorrem idioblastos cristalíferos. Em *A. dioica*, *A. crassiflora* e *A. emarginata*, observam-se, subjacentes ao TN, grandes células com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático, e esclereídes. Ocorre amido em grande quantidade no TN de todas as espécies estudadas e, em algumas delas, verificou-se a presença de idioblastos lipídicos. As células do TN apresentam matriz citoplasmática densa, rica em mitocôndrias, dictiossomas e plastídios com grandes grãos de amido. É possível inferir que a oferta de alimento nestas regiões específicas das pétalas reduz a possibilidade de predação dos verticilos férteis, contribuindo para o sucesso reprodutivo destas plantas. Conclui-se então que, nas Annonaceae estudadas, as regiões diferenciadas nas pétalas, com grande reserva de amido, efetivamente atuam como recompensa floral aos insetos polinizadores.

Palavras-chave: Annonaceae, *Annona*, tecido nutritivo, ultraestrutura celular.

Introdução

Recompensas florais podem ser consideradas como componentes florais utilizados por animais que, em decorrência disso, visitam repetidas vezes as flores, podendo realizar a polinização. Sem dúvida, pólen e néctar são as principais recompensas primárias oferecidas pelas flores entomófilas, no entanto, numerosas recompensas alternativas têm sido descritas em expressivo número de plantas, permitindo a adoção de uma gama de polinizadores pouco comuns (Simpson e Neff, 1981).

Tecidos nutritivos (TNs) são recompensas oferecidas por algumas flores aos polinizadores como alternativas ao pólen e ao néctar (Simpson e Neff, 1981). Segundo Faegri e Pijl (1979), TNs atuam na nutrição dos polinizadores e, algumas vezes, também podem funcionar como atrativos aos insetos visitantes. Pijl (1960) descreveu os TNs como massas sólidas de tecido comestível, próximas aos esporângios, que podem constituir importantes atrativos aos visitantes florais. No entanto, nenhum estudo anatômico dos TNs foi realizado até o momento.

A maioria das espécies de Annonaceae apresenta flores hermafroditas e protogínicas, com receptáculo plano ou hemisférico. São flores com perianto trímero, composto por três sépalas livres ou levemente concrecidas e por dois verticilos de três pétalas cada, o externo geralmente com pétalas mais espessas e carnosas que o interno (Judd et al., 2008; Ribeiro et al., 1999; Pontes et al., 2004; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

Uma característica marcante das flores dessa família é a posição das pétalas internas sobre os verticilos reprodutivos durante a antese, formando a “câmara de polinização” ou “câmara floral” (Gottsberger, 1970). Nesta câmara, odores específicos são produzidos e atraem besouros, que encontram ambiente aquecido e repleto de alimento (tecidos do perianto e pólen), insetos do sexo oposto para a cópula, além de abrigo e proteção contra a luz solar e predadores (Gottsberger, 1990, 1994; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006; Ratnayake et al., 2007).

Annonaceae é uma das poucas famílias de plantas que apresentam coleópteros como polinizadores predominantes ou únicos (Silberbauer-Gottsberger et al., 2003, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006). As espécies polinizadas por coleópteros apresentam, normalmente, flores pêndulas ou inclinadas, amarelas, verdes ou avermelhadas, e o tamanho da câmara, a quantidade de alimento disponível e a espessura das pétalas estão correlacionados com o tamanho, o número e a voracidade dos besouros associados (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

Segundo Schatz (1987), a biologia floral de muitas Annonaceae revela modificações específicas nas pétalas, como adaptações à cantarofilia. Entre as espécies polinizadas por besouros, a especialização das pétalas em resposta aos visitantes escarabeídeos tem seguido duas direções: pétala inteira extremamente grossa e carnosas, e ela mesma, sem modificações, serve como recompensa floral, ou apenas uma porção da pétala está modificada como área alimentícia especializada.

Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger (2006) descreveram que flores polinizadas por grandes besouros apresentam estruturas especializadas na face adaxial ou nas margens das pétalas internas, que são ingeridas por estes insetos. São corpos de alimentação e/ou TNs, que apresentam células ricas em amido, lipídios, taninos e mucilagem, embora nem todas essas substâncias estejam, necessariamente, presentes ao mesmo tempo. Aparentemente, este é o único alimento disponível para os besouros no estágio inicial da fase pistilada, pois o pólen só é liberado e pode ser consumido na fase estaminada, que é

posterior (Silberbauer-Gottsberger et al., 2003; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

Embora a biologia floral de Annonaceae seja explorada na literatura, detalhes sobre aspectos estruturais, histoquímicos e ultraestruturais das flores dessas plantas ainda são desconhecidos.

Assim, o objetivo deste trabalho é descrever a anatomia e ultraestrutura do TN de quatro espécies de *Annona*, comparando-os entre si e discutindo sua função e importância na reprodução dessas espécies.

Material e Métodos

O material vegetal foi coletado em fragmentos de Cerrado nas proximidades do município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, numa região entre 22°41'28,55"S e 22°58'28,67"S e 48°16'43,83"W e 48°30'23,46"W. As espécies coletadas foram: *A. coriacea* Mart., *A. crassiflora* Mart., *A. dioica* A.St.-Hil. e *A. emarginata* (Schltdl.) H.Rainer, escolhidas por serem espécies frequentes no Cerrado e por estarem em locais que favoreciam as observações noturnas.

Ramos férteis foram herborizados e incluídos no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, registrados sob os números 154419 (*Annona coriacea*; Galastri, N.A. 8), 154417 (*Annona crassiflora*; Galastri, N.A. 6), 154422 (*Annona dioica*, flores estaminadas, Galastri, N.A. 11), 154423 (*Annona dioica*, flores hermafroditas, Galastri, N.A. 12) e 154421 (*Annona emarginata*, Galastri, N.A. 10).

Foram coletadas pétalas em três momentos: cerca de duas horas antes da antese; na fase pistilada da antese, quando os estigmas tornam-se receptivos; e na fase estaminada da antese, na qual ocorre a liberação do pólen. Foram utilizados cinco indivíduos de cada espécie, sendo processadas cerca de quinze pétalas por indivíduo.

Os estudos anatômicos foram realizados em material fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas ou em formalina-ácido acético-etanol 50% (Johansen, 1940) por 48 horas, e conservados em etanol 70% (Jensen, 1962).

Após desidratação em série etílica e inclusão a frio (Paiva et al., 2011) em 2-hidroxi-etil-metacrilato Leica[®], o material foi seccionado em micrótomo rotativo com cerca de 8µm de espessura, obtendo-se secções transversais e longitudinais. As secções foram

coradas com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al., 1964, modificado), montando-se com Entellan[®].

Testes histoquímicos foram realizados em secções a mão livre de amostras fixadas reidratadas e também em material fixado e incluído. Para identificar polissacarídeos ácidos e pectinas, utilizou-se vermelho de rutênio (Jensen, 1962); para evidenciar lignina, floroglucinol em meio ácido (Sass, 1951); para a localização de substâncias lipídicas, Sudan IV (Johansen, 1940); para a detecção de amido, lugol (Johansen, 1940); para verificar a ocorrência de compostos fenólicos, cloreto férrico, acrescido de carbonato de sódio (Johansen, 1940); para observação de terpenoides, reagente de NADI (David e Carde, 1964); e, para localizar proteínas, foi utilizado azul mercúrio de bromofenol (Mazia et al., 1953).

O laminário preparado foi analisado, sendo as imagens obtidas digitalmente em microscópio Olympus BX41 com câmara digital Olympus C-7070 WZ acoplada.

As observações em campo foram feitas em datas e horários que variaram para cada espécie: *A. dioica*, *A. coriacea* e *A. crassiflora*, conforme observações prévias apresentam antese noturna (Gottsberger, 1989a; 1994; 1999; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006), portanto, as observações foram realizadas das 18 às 24 horas; já para *A. emarginata*, a literatura não apresenta dados de biologia floral, por isso foram alternadas observações diurnas e noturnas. Foram observadas as alterações de coloração das flores, a presença de odores, os insetos visitantes, as regiões florais ingeridas por eles e a ocorrência de termogênese, esta última utilizando o Termômetro Termopar HI 98704 da Hanna Instruments[®].

Para microscopia eletrônica de transmissão, foram coletadas amostras em regiões pré-definidas pelos estudos em microscopia de luz, das pétalas de *A. crassiflora* e *A. emarginata*, tomadas como modelos para as análises ultraestruturais devido à primeira ser muito semelhante à *A. coriacea* e *A. dioica* e, à segunda, ser a mais distinta dentre as espécies. Para acompanhar possíveis alterações ao longo do período de antese, amostras foram obtidas em três momentos deste processo, a saber: (1) na pré-antese, cerca de uma hora antes do início da emissão de odores; (2) na fase pistilada, que se inicia com a emissão de odores e termogênese (quando presente) e, (3) na fase estaminada, quando ocorre a abscisão dos estames e a liberação do pólen. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) e processadas segundo métodos usuais (Roland,

1978). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 a 60 KV, obtendo-se imagens digitais.

Para observação ao microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2), desidratadas em série etílica, submetidas à secagem ao ponto crítico e metalizadas com ouro (Robards, 1978). As amostras foram, então, examinadas ao microscópio eletrônico de varredura Fei Company Quanta 200, e as imagens obtidas por captura digital.

Resultados

Observações em campo

Annona coriacea, *A. crassiflora* e *A. emarginata* apresentam flores hermafroditas e protogínicas. Dentre as espécies estudadas, *A. dioica* é a única androdioica, ou seja, apresenta indivíduos que produzem flores hermafroditas e indivíduos apenas com flores estaminadas.

Em *A. emarginata* (Fig. 1A), a antese é diurna com duração de dois dias. Nas demais espécies a antese é noturna. Em *A. crassiflora* (Fig. 1B-C), tem duração de apenas uma noite. Em *A. coriacea* (Fig. 1D-E), duração de duas noites. E, em *A. dioica* (Fig. 1F-G), duração de uma noite nos indivíduos masculinos e de duas noites nos indivíduos hermafroditas.

Em *A. emarginata*, no primeiro dia, os estigmas tornam-se receptivos, caracterizando a fase pistilada da antese e, apenas no segundo dia é que o pólen é liberado, caracterizando a fase estaminada da antese que termina por volta das 12h. Em *A. coriacea* e nas flores hermafroditas de *A. dioica*, na primeira noite da antese, a flor apresenta-se na fase pistilada e o pólen é liberado apenas na segunda noite, sendo que as pétalas caem mais ou menos ao mesmo tempo em que outras flores estão entrando na fase pistilada, por volta das 20h30min. Em *A. crassiflora*, a fase pistilada inicia-se por volta das 18h30min e a fase estaminada por volta das 22h da mesma noite. Já nas flores estaminadas de *A. dioica*, a antese tem duração de apenas uma noite, na qual ocorre a deiscência das anteras e a liberação do pólen.

A flores liberam forte odor de fruto maduro em *A. emarginata* e de fruto em decomposição em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*.

A termogênese ocorre apenas em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*. Foram observados pequenos besouros Nitidulidae visitando as flores de *A. emarginata* e besouros grandes *Cyclocephala* nas flores das outras espécies.

Nas flores de *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*, verifica-se que, assim que os processos de termogênese e liberação de odores iniciam-se, por volta das 18h, besouros *Cyclocephala* são atraídos, entram na câmara de polinização e começam a consumir tecidos localizados na base das pétalas internas. Em *A. coriacea* e *A. dioica*, verifica-se que a maioria dos besouros permanece dentro da câmara floral, comendo a base das pétalas internas até a noite seguinte, quando o pólen é liberado, tornando-se o principal alimento disponível. Em *A. crassiflora*, a liberação do pólen ocorre na mesma noite, por volta das 22h.

Em *A. emarginata*, os pequenos besouros são atraídos, entram na câmara de polinização e alimentam-se da superfície adaxial das pétalas internas e externas, até o pólen ser liberado.

Em *A. crassiflora* e *A. emarginata*, a câmara floral apresenta uma abertura apical que permite que os besouros entrem e saiam das flores a qualquer momento, diferentemente das flores de *A. coriacea* e *A. dioica* que, devido à disposição imbricada das pétalas internas, formam câmaras fechadas, sem aberturas.

As regiões que são ingeridas pelos insetos são os TNs descritos ultraestruturalmente pela primeira vez neste trabalho.

Os besouros polinizadores, ao visitarem as flores dessas espécies, consomem apenas as regiões específicas de TN, não se observando predação de outras partes florais. Porém, observa-se predação de outras regiões das flores por grandes besouros que visitavam as flores, mas não conseguem adentrar a câmara de polinização, ficando do lado de fora da flor; estes visitantes constituem predadores, não tendo nenhuma função na polinização.

Morfologia e aspectos estruturais

Aspectos estruturais e morfológicos do TN se mantêm nas fases de pré-antese, pistilada e estaminada da antese.

Em *A. dioica*, o TN é corrugado e encontra-se na face adaxial da região basal das pétalas internas (Fig. 1H); em *A. crassiflora* (Fig. 1I) e *A. coriacea* (Fig. 1J), este se restringe às margens da região basal das pétalas internas e, em *A. emarginata*, observa-se TN na face adaxial das porções basal e mediana das pétalas internas e externas (Fig. 1K-L). A presença de TN nas pétalas internas e externas de *A. emarginata* é explicada pela

conação entre as pétalas desta espécie, formando um TN único que reveste toda a extensão da câmara de polinização.

Nas quatro espécies estudadas, o TN pode ser distinto do restante da pétala pela textura, coloração e/ou indumento presente. Anatomicamente, observa-se um tecido com células de citoplasma muito denso e grande reserva amilífera (Fig. 2A-C) e, subjacente a ele, um tecido parenquimático de células vacuoladas com menor quantidade de amido (Fig. 2 A-B, D).

Observa-se que o TN é consumido pelos insetos visitantes, em detrimento de outras porções (Fig. 2E-F). Na região nutritiva, a epiderme apresenta cutícula ornamentada e espessa apenas em *A. emarginata* (Fig. 2G), sendo lisa e delgada em *A. coriacea*, *A. crassiflora* (Fig. 2F) e *A. dioica*. A epiderme é uniestratificada, com células de paredes delgadas, citoplasma denso, núcleos pouco ou não evidentes, papilosas em *A. emarginata* (Fig. 2H), radialmente alongadas em *A. dioica* (Fig. 2I) e cuboides a radialmente alongadas em *A. crassiflora* (Fig. 2J) e *A. coriacea* (Fig. 2K). Ocorrem estômatos nas quatro espécies (Fig. 2G, J), porém em baixa densidade.

Em todas as espécies estudadas, observam-se tricomas tectores simples (Fig. 2F, I-K), de paredes espessadas e lignificadas, com conteúdo fenólico ou péctico. Em *A. emarginata*, os tricomas tectores ficam restritos à região mediana das pétalas internas e externas. Em *A. dioica* e *A. crassiflora*, também ocorrem tricomas de paredes delgadas, pecto-celulósicas e de conteúdo péctico.

O mesofilo é parenquimático, formado por células de formatos e tamanhos variados, com citoplasma denso (Fig. 3A-B). Em *A. emarginata*, as células apresentam paredes delgadas, com núcleos evidentes (Fig. 3C); em *A. dioica*, *A. crassiflora* e *A. coriacea*, observam-se paredes celulares levemente espessadas e núcleos não evidentes (Fig. 3A-B, D). Em todas as espécies, há células com conteúdo péctico e idioblastos fenólicos (Fig. 3A-B); em *A. coriacea* e *A. emarginata*, também ocorrem idioblastos lipídicos (Fig. 3C) e, apenas em *A. emarginata*, observam-se idioblastos cristalíferos contendo pequenas drusas (Fig. 3E).

Subjacente ao TN de *A. crassiflora*, *A. dioica* e *A. emarginata*, observam-se células volumosas com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático (Fig. 3E-F), as quais, muitas vezes, comprimem completamente o protoplasto. Também subjacente ao TN em *A. coriacea* e *A. emarginata*, existem braquiesclereídes em grupos (Fig. 3D, G) ou isoladas, de paredes lignificadas e muito espessadas, algumas com protoplasto ativo (Fig. 3G) e outras com acúmulo de compostos fenólicos. Em *A. coriacea* e *A. dioica*, também

ocorrem esclereídes de paredes lignificadas pouco espessadas (Fig. 3D) com protoplasto ativo. Em *A. crassiflora*, são observadas apenas esclereídes isoladas.

Em todas as espécies, observam-se feixes vasculares colaterais (Fig. 3F, H), mas não há emissão de traços para o interior do TN; alguns feixes vasculares em *A. coriacea* podem apresentar fibras gelatinosas externas ao floema (Fig. 3H).

Em *A. dioica*, espécie com indivíduos de flores hermafroditas e outros apenas com flores estaminadas, o TN é mais espesso nas primeiras, que mostram de dezenove a vinte e nove camadas no mesofilo, contra oito a dezoito nas estaminadas.

Os testes realizados apontam que ocorre amido, em grande quantidade, no TN e na epiderme de todas as espécies estudadas. No entanto, nota-se menor quantidade de amido na epiderme de ambas as pétalas de *A. emarginata*, quando comparada com a das outras espécies. Verifica-se a presença de idioblastos lipídicos em *A. coriacea* e *A. emarginata*. Proteínas de reserva e terpenoides não foram detectados em nenhuma das espécies estudadas.

Verificou-se o consumo do TN, e apenas desta região, por insetos que adentraram a câmara floral e que, aparentemente, também realizaram a polinização durante a fase pistilada; na fase estaminada, o pólen passa a ser o principal alimento dos visitantes florais.

Aspectos ultraestruturais

Na fase de pré-antese, o TN de *A. crassiflora* é formado por células de citoplasma denso, no qual predominam mitocôndrias e plastídios (Fig. 4A-B). O núcleo é volumoso com nucléolo conspícuo (Fig. 4C). Observa-se formação de espaço subcuticular de pequenas dimensões, de ocorrência restrita; nestes, parece haver acúmulo de secreção (Fig. 4D). As mitocôndrias são globoides a ovaladas e apresentam cristas desenvolvidas (Fig. 4C, E). Os plastídios são ovalados ou globoides e apresentam grãos de amido que ocupam grande parte do volume destas organelas (Fig. 4B, F). Ocorre, geralmente, um único e desenvolvido vacúolo, no qual se observa acúmulo de material fibrilar (Fig. 4A, D). Gotículas de óleo (Fig. 4D) e proteínas (Fig. 4C) também são observadas. Os dictiossomos apresentam de três a cinco cisternas e são pouco numerosos (Fig. 4E). Observam-se plasmodesmos estabelecendo conexão entre as células (Fig. 4C, F). O retículo endoplasmático é pouco desenvolvido, ocorrendo apenas pequenos segmentos (Fig. 4E). Em *A. emarginata*, observam-se as mesmas características ultraestruturais (Fig. 4G, H) descritas para *A. crassiflora*.

Quando os estigmas tornam-se receptivos e inicia-se, caso esteja presente, a termogênese, ocorre a simultânea liberação de odores, com a conseqüente atração dos besouros, e tem início a fase pistilada, na qual ocorre o consumo do TN. Nesta fase, o TN apresenta, assim como na fase anterior, células com matriz citoplasmática densa e grande quantidade de mitocôndrias e plastídios (Fig. 5A-B). O núcleo mantém-se volumoso (Fig. 5B) e com nucléolo evidente. Persiste um único vacúolo com acúmulo de material fibrilar (Fig. 5C). Os plastídios não apresentam modificações estruturais em relação à fase anterior e não há indícios de hidrólise de amido, cujos grãos ocupam grande parte do volume plastidial (Fig. 5A-B, D-E). As mitocôndrias são abundantes (Fig. 5B, E) e apresentam cristas bem desenvolvidas. Nota-se a presença de gotículas de óleo no citosol e acúmulo de material fibrilar no espaço periplasmático (Fig. 5C).

Logo que os estames começam a liberar o pólen, inicia-se a fase estaminada da antese. Nesta, observam-se células de citoplasma denso e com predomínio de mitocôndrias e plastídios, muito semelhante ao que se observa nas fases anteriores (Fig. 6A). O vacúolo desenvolvido, geralmente único, continua apresentando material fibrilar (Fig. 6B-F). Os plastídios permanecem apresentando grãos de amido, porém um pouco menores que nas outras fases (Fig. 6C-F). Observa-se aumento da quantidade de material fibrilar no espaço periplasmático (Fig. 6A-B, D-E). Após essa fase, ocorre a abscisão das pétalas.

Discussão

As análises realizadas neste trabalho confirmam a existência de um tecido de nutrição em flores de *Annona*, como forma de recompensa aos insetos polinizadores que as visitam. Nas observações de campo, notou-se que esse TN é ingerido pelos besouros visitantes, constituindo uma efetiva fonte de nutrição durante a fase pistilada da antese, diminuindo a incidência de predação dos órgãos reprodutivos.

TNs têm, geralmente, composição epidérmica ou parenquimática e contêm grande quantidade de açúcar, amido, proteínas ou lipídios, ou ainda combinações variadas destas substâncias (Simpson e Neff, 1983). Nas espécies estudadas, observa-se apenas reserva de amido e, *A. coriacea* e *A. emarginata*, alguns idioplastos lipídicos também. De acordo com as observações realizadas, as áreas com células nutritivas são consumidas pelos visitantes florais, normalmente besouros, que atuam como vetores de pólen em Annonaceae (Simpson e Neff, 1983; Schatz, 1987; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003).

A biologia reprodutiva de *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* e de muitas outras espécies da família é bastante descrita na literatura (Gottsberger 1989a, 1994, 1999,

Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006); contudo, apenas o presente trabalho qualificou diretamente e ao nível ultraestrutural a região consumida como TN, no qual testes histoquímicos confirmaram a presença de grande quantidade de amido em todas as espécies, servindo como recompensa aos polinizadores.

A presença de células com núcleos evidentes, citoplasma denso e rico em organelas, evidencia um tecido com alta taxa metabólica, típico de estruturas secretoras (Paiva e Martins, 2011).

O material fibrilar, observado no interior dos vacúolos das células do TN, provavelmente é constituído de carboidratos, o que, segundo Paiva e Martins (2011), é característico de secreções com uma matriz polissacarídica.

A organização ultraestrutural das células do TN, em *A. crassiflora* e *A. emarginata*, revelou que, pouco antes da queda das pétalas, ainda há grande quantidade de amido no TN e de material fibrilar, possivelmente carboidratos, nos espaços periplasmáticos de suas células. Isso indica que a planta, provavelmente, não reabsorve a reserva não utilizada, havendo uma expressiva perda energética.

A atração, comum em Annonaceae, de besouros com aparelhos bucais mastigadores e muito destrutivos parece ter favorecido a formação de TNs, os quais podem desviar os besouros dos órgãos reprodutivos. De acordo com Gottsberger (1974), o oferecimento de TNs ou de outras estruturas especiais reduz os efeitos negativos causados às flores pelos grandes polinizadores.

Segundo Heusden (1992), muitos gêneros de Annonaceae possuem um tecido glandular, corrugado e/ou carnoso na parte basal da face adaxial das pétalas internas; em outros gêneros, a parte basal é marcada por diferença de cor ou indumento e, algumas vezes, existem duas glândulas ao longo das margens das pétalas internas. Da mesma forma que nas *Annona* aqui analisadas, em várias espécies de Annonaceae já estudadas observaram-se TNs ricos em amido e com alguns idioblastos lipídicos na face adaxial da base das pétalas internas (Olensen, 1992; Norman e Clayton, 1986; Norman et al., 1992; Aguiar et al., 2000). Em *A. sericea*, Webber (1981) relatou que os besouros entram na flor e permanecem em seu interior, consumindo a porção basal das pétalas, até que ocorra a queda das mesmas. Em *Uvariadendron*, os besouros visitantes foram encontrados alimentando-se, principalmente, da superfície tuberculada interna das pétalas, que apresenta um tecido espesso e carnoso (Gottsberger et al., 2011).

Assim, a presença de um tecido de nutrição, rico em amido, localizado, na maioria das espécies, na superfície adaxial das pétalas internas, parece ser característica comum às

Annonaceae, provavelmente, contribuindo positivamente para o sucesso reprodutivo da família.

Annona emarginata apresenta TN epidérmico papiloso, assim como observado por Webber e Gottsberger (2003) em espécies de *Duguetia*, enquanto que os TNs de *A. dioica*, *A. coriacea* e *A. crassiflora* diferenciam-se, basicamente, pela região das pétalas internas nas quais ocorrem. Isso pode ser explicado pelo tipo de polinizador que visita essas flores, sendo pequenos besouros Nitidulidae e Staphylinidae na primeira espécie, e grandes besouros Dynastinae, uma subfamília de Scarabaeidae, nas demais (Gottsberger, 1989a, 1989b, 1990, 1999; Aguiar et al., 2000; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

O TN com epiderme papilosa, de cutícula ornamentada presente em *A. emarginata* pode auxiliar os insetos visitantes na percepção do local onde está a recompensa floral, onde se localiza o TN. Segundo Whitney et al. (2011), insetos reconhecem pelo tato os diferentes órgãos da planta e orientam-se por esse tipo de célula até a região do néctar.

A presença de TNs estruturalmente tão semelhantes em *A. dioica*, *A. coriacea* e *A. crassiflora* pode ser explicada pelo fato de que essas três espécies apresentam como principal ou exclusivo polinizador o coleóptero *Cyclocephala atricapilla*, Dynastinae (Gottsberger, 1999). De acordo com Gottsberger (1986), contrário ao que se pensava, a relação entre flores cantarófilas e besouros Dynastinae não é muito específica, ou seja, a mesma espécie de coleóptero pode visitar e polinizar grande número de espécies, o que é fortalecido pelas semelhanças estruturais das flores observadas no presente trabalho que atraem as mesmas espécies de coleópteros.

Nas espécies em que o TN ocorre em ambas as margens das pétalas internas, como em *A. crassiflora* e *A. coriacea*, essa posição condiciona a movimentação dos coleópteros por toda a câmara de polinização em busca de alimento, favorecendo o contato destes com os órgãos reprodutivos da flor e aumentando a eficiência da polinização, assim como também descrito por Aguiar et al. (2000).

Com base em recentes estudos moleculares, o gênero *Rollinia* foi incluído em *Annona* (Rainer, 2007). Isso pode explicar o fato do TN de *A. emarginata* diferir das demais espécies analisadas de *Annona*, pois tem caracteres morfológicos típicos de *Rollinia*; além disso, a diferença do período da antese, que é diurna em *A. emarginata* e noturna nas demais espécies, também pode justificar a presença de variação estrutural.

Schatz (1987) distinguiu os TNs em áreas alimentícias e corpos de alimentação: as áreas alimentícias são regiões indistintas externamente do restante da pétala, enquanto corpos de alimentação apresentam modificações estruturais que implicam na diferenciação

da região nutritiva do restante da pétala quanto à textura e à elevação. No entanto, esse conceito parece não ser aplicável às espécies de *Annona* estudadas, uma vez que existe um tecido com reserva nutritiva que é consumido pelos besouros. Assim, o termo “tecido nutritivo” parece ser o mais indicado.

Para as espécies aqui estudadas, não se encontrou nenhuma região glandular nas pétalas, apenas a presença de tecidos com grande reserva amilífera. No entanto, segundo Kiill e Costa (2003), *Annona squamosa* apresenta, na região basal das pétalas, uma cavidade na qual se encontram glândulas secretoras.

Apesar dos TNs serem recompensas não muito caras para a planta e que asseguram o efetivo serviço dos polinizadores, eles são raramente encontrados nas angiospermas, pois esse tipo de recompensa parece ser contrabalançado pela alta taxa de danos. Além disso, em sistemas que apresentam besouros que utilizam os TNs como recompensas florais, as flores devem ser robustas, grandes e durar vários dias, o que torna o custo de produção das flores comparativamente maior (Simpson e Neff, 1983). No entanto, em Annonaceae, esse sistema parece ser vantajoso, uma vez que é um grupo quase que exclusivamente polinizado por coleópteros.

Foi observado em campo que os besouros que visitam as flores das quatro *Annona* estudadas e que são efetivos polinizadores, alimentam-se apenas das áreas de TN, evidenciando seletividade no consumo das pétalas, assim como observaram Aguiar et al. (2000) para *A. muricata*. Essa seletividade parece ser imposta por limites estruturais, tais como por esclereídes e braquiesclereídes, que tornam as pétalas mais rígidas e pouco palatáveis, como também descrito para *A. muricata* (Aguiar et al. 2000), por grandes células com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático, ou mesmo por combinação de ambas.

A predação de outras regiões das flores, além do TN, normalmente é feita por insetos pilhadores, que não realizam a polinização. Observações pessoais em campo mostraram que a maioria dos besouros pilhadores são muito grandes para adentrar a câmara de polinização, ficando do lado de fora e consumindo, indistintamente, tecidos do perianto. Segundo Webber (1996), Kùchmeister et al. (1998) e Gottsberger et al. (1998a), nas espécies de *Duguetia* por eles estudadas, quando as flores só são visitadas por besouros *Cyclocephala*, seus polinizadores efetivos, apenas as regiões de TN são danificadas, enquanto que besouros Chrysomelidae permanecem do lado externo da flor, apenas predando as pétalas. Isso também ocorre em *Cymbopetalum euneurum*, na qual os besouros *Cyclocephala undata* entram na câmara floral e alimentam-se de TNs na base das pétalas

internas e de pólen, mas não causam danos aos verticilos reprodutivos, mesmo quando existe um número elevado de insetos dentro da flor (Webber e Gottsberger, 1993). Cabe ainda ressaltar que estes polinizadores apresentam aparelhos bucais mastigadores, que poderiam danificar completamente uma flor. Deste modo, a presença de TN parece contribuir para a redução de grande parte das predações que poderiam ocorrer nos verticilos florais, ao mesmo tempo que funciona como uma recompensa ao inseto polinizador.

O TN das quatro espécies estudadas é, aparentemente, o único alimento disponível para os besouros no início da antese, pois o pólen é liberado apenas na fase estaminada, quando pode ser consumido. Isso também foi observado em outras espécies de Annonaceae por Silberbauer-Gottsberger et al. (2003).

Nas espécies estudadas, o TN é constituído por células ricas em amido, mas também se observam lipídios, compostos fenólicos e mucilagem. Outras espécies que apresentaram amido e lipídios nos corpos de alimentação são *Sapranthus palanga* (Olsen, 1992), *Assimina obovata*, *Assimina pygmaea* (Norman e Clayton, 1986), *Duguetia riparia*, *D. ulei* (Gottsberger et al., 1998a) e em *A. muricata* (Aguiar et al., 2000).

Quando os besouros comem os TNs ingerem, portanto, amido, lipídios, mucilagem e compostos fenólicos, como indicado pelos testes histoquímicos realizados neste trabalho. No entanto, compostos fenólicos são, tipicamente, citados como inibidores de herbivoria (Glynn et al., 2004; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003), o que não é o caso nestas flores, pois os besouros polinizadores não são inibidos pela presença de tais compostos. De acordo com Gottsberger et al. (1998b), é notável que compostos fenólicos sejam apreciados pelos besouros, porque são largamente utilizados pelas plantas como proteção contra predação e, aparentemente, as espécies de *Cyclocephala* têm vencido essa barreira anti-herbívora.

Segundo Barbehenn e Constabel (2011), taninos podem defender as plantas contra insetos herbívoros devido à sua toxicidade e/ou deterrência, e não têm efeito na digestão proteica desses animais. A toxicidade dos taninos resulta da sua oxidação, que forma semiquinonas, quinonas e outras espécies reativas de oxigênio, que afetam diretamente os tecidos intestinais. A habilidade dos insetos que toleram a digestão de taninos vem de uma variedade de defesas bioquímicas e físicas existentes em seus intestinos, incluindo alto pH, antioxidantes e um revestimento protetor que reveste o intestino médio (Barbehenn e Constabel, 2011).

Outro grupo de compostos fenólicos que afetam o desenvolvimento de insetos herbívoros são os glicosídeos fenólicos (Boeckler et al., 2011). Essas substâncias funcionam como deterrentes e prejudicam o desenvolvimento de insetos generalistas (Glynn et al., 2004), mas podem estimular a alimentação e a oviposição, beneficiando o desenvolvimento de insetos especialistas (Rank et al., 1998). Estudo com espécies especialistas de besouros Chrysomelidae mostraram efeitos positivos desses fenólicos no desenvolvimento (Donaldson e Lindroth, 2004).

Glicosídeos fenólicos têm sido descritos como sendo utilizados por herbívoros especialistas para sua própria defesa, tais como coleópteros *Chrysomela populi* e *Phratora vitellinae* (Pasteels et al., 1990). Esses besouros são capazes de converter salicina ingerida das plantas em salicilaldeído, que é estocado em reservatórios glandulares e secretado quando atacado por inimigos naturais, pois esses compostos desencorajam seus predadores, como formigas, e também têm propriedades antimicrobianas (Pasteels et al., 1990).

Nada foi encontrado sobre a resistência ou suscetibilidade aos fenólicos por besouros Nitidulidae ou Dynastinae, que são os grupos polinizadores das espécies estudadas, mas existem outros coleópteros que não são repelidos pela existência de fenólicos, até mesmo utilizando-os para defesa, o que poderia justificar o fato dos TNs terem grande quantidade de fenólicos e não repelirem os besouros visitantes. Assim, estudos a respeito dos tipos de compostos fenólicos e suas ações em outros grupos de Coleoptera fazem-se necessários para a compreensão destas relações.

A maioria das espécies de *Annona* do Cerrado apresentam flores hermafroditas e protogínicas, e *A. dioica*, espécie androdioica, constitui exceção. Paulino-Neto e Teixeira (2006) encontraram a proporção de 2,07 flores estaminadas para cada flor hermafrodita. Os autores também observaram maior predação por besouros das flores hermafroditas, sendo os danos encontrados principalmente nas pétalas, o que corrobora o que foi observado em campo durante a realização deste trabalho. Paulino-Neto e Teixeira (2006) esperavam maior predação das flores estaminadas, devido à maior quantidade de alimento, e explicaram o fato das flores hermafroditas terem sido mais predadas devido à produção de um exsudado estigmático. No entanto, os autores não referiram a ocorrência de TN, como relatado neste trabalho para ambos os tipos de flores, o qual é mais espesso nas flores hermafroditas do que nas estaminadas, podendo, portanto, explicar a maior predação daquelas flores. Some-se a isso o fato de que flores hermafroditas de *A. dioica* apresentam antese de duas noites, enquanto as flores estaminadas de apenas uma, logo o maior tempo de exposição pode explicar o aumento da predação.

Conclui-se então que, nas Annonaceae, ocorrem regiões especializadas nas pétalas com células de núcleos evidentes, citoplasma denso rico em mitocôndrias, dictiossomas, plastídios e com grande reserva de amido que, efetivamente, atuam como recompensa floral aos insetos polinizadores, constituindo, tecidos com alta taxa metabólica e função de nutrição, ou seja, TNs.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade em pesquisa de D.M.T. Oliveira e E.A.S. Paiva. A Wilma de Grava Kempinas e a Silvia Rodrigues Machado, pela cessão de equipamentos. Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, pelo processamento das amostras e pela cessão de equipamentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. A Renato de Mello Silva, pela identificação das espécies.

Referências

- Aguiar, J.R., Bueno, D.M., Freitas, B.M., Soares, A.A., Costa, J.T.A., 2000. Tecido nutritivo em flores de gravioleira, *Annona muricata* L. Rev. Cienc. Agron. 31(1/2), 51-55.
- Barbehenn, R.V., Constabel, C.P., 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72, 1551-1565.
- Boeckler, G.A., Gershenzon, J., Unsicker, S.B., 2011. Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* 72, 1497-1509.
- David, R., Carde, J.P., 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus de Academie des Sciences, Paris, Série D 258, 1338-1340.
- Donaldson, J.R., Lindroth, R.L., 2004. Cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) performance in relation to variable phytochemistry in juvenile aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Environ. Entomol.* 33(5), 1505-1511.
- Faegri, K., Pijl, L. van der, 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford.

- Glynn, C., Rönnberg-Wästljung, A-C., Julkunen-Tiitto, R., Weih, M., 2004. Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entomol. Exp. Appl.* 113, 1-14.
- Gottsberger, G., 1970. Beiträge zur biologie von Annonaceen-blüten. *Österr. Bot. Z.* 118, 237-279.
- Gottsberger, G., 1974. The structure and function of the primitive angiosperm flower – a discussion. *Acta Bot. Neerl.* 23(4), 461-471.
- Gottsberger, G., 1986. Some pollination strategies in neotropical savannas and forests. *Plant Syst. Evol.* 152, 29-45.
- Gottsberger, G., 1989a. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* spp. (Annonaceae) in Brazil. *Plant Syst. Evol.* 167, 165-187.
- Gottsberger, G., 1989b. Comments on flower evolution and beetle pollination in the genera *Annona* and *Rollinia* (Annonaceae). *Plant Syst. Evol.* 167, 189-194.
- Gottsberger, G., 1990. Pollination and flower evolution in Neotropical Annonaceae. *Annonaceae Newsl.* 8, 35-36.
- Gottsberger, G., 1994. As anonáceas do Cerrado e a sua polinização. *Rev. Brasil. Biol.* 54(3), 391-402.
- Gottsberger, G., 1999. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biol.* 14, 143-152.
- Gottsberger, G., Meinke, S., Porembski, S., 2011. First records of flower biology and pollination in African Annonaceae: *Isolona*, *Piptostigma*, *Uvariadendron*, *Monodora* and *Uvariopsis*. *Flora* 206, 498-510.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., 2006. In the evening when the beetles come: pollination in Annonaceae e *Philodendron*. In: Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I. (Eds.), *Life in the Cerrado: a South American tropical seasonal ecosystem. Pollination and seed dispersal.* vol. 2. Reta Verlag, Ulm, pp. 138-159.
- Gottsberger, G., Webber, A.C., Hildenbrand, M., 1998a. Nährgewebe in Annonaceenblüten und ihre bedeutung bei der bestäubung. *Jahrestagung Deutsch. Ges. Tropenökologie, Bielefeld. Bielefelder Ökologische Beiträge* 12, 162.

- Gottsberger, G., Webber, A.C., Hildenbrand, M., 1998b. Nutritious tissues in flowers of Annonaceae. *Annonaceae Newsl.* 12, 25-26.
- Heusden, E.C.H. van, 1992. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. *Blumea, Supplement* 7, 7-36.
- Jensen, W.A., 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2008. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 3ed. Sinauer Associates: Massachusetts.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A-138A.
- Kiill, L.H.P., Costa, J.G., 2003. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. *Cienc. Rural* 33(5), 851-856.
- Küchmeister, H., Webber, A.C., Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G., 1998. A polinização e sua relação com a termogênese em espécies de Arecaceae e Annonaceae da Amazônia Central. *Acta Amazon.* 28(3), 217-245.
- Mazia, D., Brewer, P.A., Albert, M., 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.* 104, 57-67.
- Norman, E.M., Clayton, D., 1986. Reproductive biology of two Florida pawpaws: *Asimina obovata* and *A. pygmaea* (Annonaceae). *Bull. Torrey Bot. Club* 113(1), 16-22.
- Norman, E.M., Rice, K., Cochran, S., 1992. Reproductive biology of *Asimina parviflora* (Annonaceae). *Bull. Torrey Bot. Club* 119(1), 1-5.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Olsen, J.M., 1992. Flower mining by moth larvae vs. pollination by beetles and bees in the cauliflorous *Sapranthus palanga* (Annonaceae) in Costa Rica. *Flora* 187, 9-15.
- Paiva, E.A.S., Martins, L.C., 2011. Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Aust. J. Bot.* 59, 91-98.
- Paiva, E.A.S., Pinho, S.Z., Oliveira, D.M.T., 2011. Large plant samples: how to process for

- GMA embedding? In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R.C.N. (Eds.), Light microscopy: methods and protocols. Springer/Humana Press, New York, pp. 37-49.
- Pasteels, J.M., Duffey, S., Rowell-Rahier, M., 1990. Toxins in chrysomelid beetles: possible evolutionary sequence from the new synthesis to derivation from food-plant chemicals. *J. Chem. Ecol.* 16, 211-222.
- Paulino-Neto, H.F., Teixeira, R.C., 2006. Florivory and sex ratio in *Annona dioica* St.Hil.(Annonaceae) in the Pantanal at Nhecolândia, southwestern Brazil. *Acta Bot. Bras.* 20(2), 405-409.
- Pijl, L. van der, 1960. Ecological aspects of flower evolution. I. Phyletic evolution. *Evolution* 14, 403-416.
- Pontes, A.F., Barbosa, M.R.V., Maas, P.J.M., 2004. Flora paraibana: Annonaceae Juss. *Acta Bot. Bras.* 18(2), 281-293.
- Rainer, H., 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.St-Hil. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 108B, 191-205.
- Rank, N.E., Köpf, A., Julkunen-Tiitto, R., Tahvanainen, J., 1998. Host preference and larval performance of the salicylate-using leaf beetle *Phratora vitellinae*. *Ecology* 72(9), 618-631.
- Ratnayake, R.M.C.S., Gunatilleke, I.A.U.N., Wijesundara, D.S.A., Saunders, R.M.K., 2007. Pollination ecology and breeding system of *Xylopia championii* (Annonaceae): Curculionid beetle pollination, promoted by floral scents and elevated floral temperatures. *Int. J. Plant Sci.* 168, 1255-1268.
- Ribeiro, J.E.L.S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., Sothers, C.A., Costa, M.A.S., Brito, J.M., Souza, M.A.D., Martins, L.H.P., Lohmann, L.G., Assunção, P.A.C.L., Pereira, E.C., Silva, C.F., Mesquita, M.R., Procópio, L.C., 1999. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central. Inpa, Manaus, pp. 121-135.
- Robards, A.W., 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Hall, J.L. (Ed.), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York, pp.343-403.
- Roland, A.M., 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall, J.L. (Ed.), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York, pp. 1-62.

- Sass, J.E., 1951. Botanical microtechnique. Iowa State University, Ames.
- Schatz, G.E., 1987. Systematic and ecological studies of Central American Annonaceae. Thesis, University of Wisconsin, Madison.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G., Webber, A.C., 2003. Morphological and functional flower characteristics of new and old world Annonaceae with respect to their mode of pollination. *Taxon* 52, 701-718.
- Simpson, B.B., Neff, J.L., 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 68, 301-322.
- Simpson, B.B., Neff, J.L., 1983. Evolution and diversity of floral rewards. In: Jones, C.E., Little, R.J. (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology*. Science Academy, New York, pp. 142-159.
- Webber, A.C., 1981. Alguns aspectos da biologia floral de *Annona sericea* Dun.(Annonaceae). *Acta Amazon.* 11(1), 61-65.
- Webber, A.C., 1996. Biologia floral, polinização e aspectos fenológicos de algumas Annonaceae na Amazônia Central. Tese de doutoramento, INPA-FUA, Manaus.
- Webber, A.C., Gottsberger, G., 1993. Floral biology and pollination of *Cymbopetalum euneurum* in Manaus, Amazônia. *Annonaceae Newsl.* 9, 25-28.
- Webber, A.C., Gottsberger, G., 2003. Floral biology and pollination. In: Maas, P.J.M, Westra, L.Y.TH., Chatrou, L.W. (Org.), *Duguetia* (Annonaceae). *Flora Neotr. Monogr* 88, 50-53.
- Whitney, H.M., Bennett, V.K.M., Dorling, M., Sandbach, L., Prince, D., Chittka, L., Glover, B.J., 2011. Why do so many petals have conical epidermal cells? *Ann. Bot.* 108, 609-616.

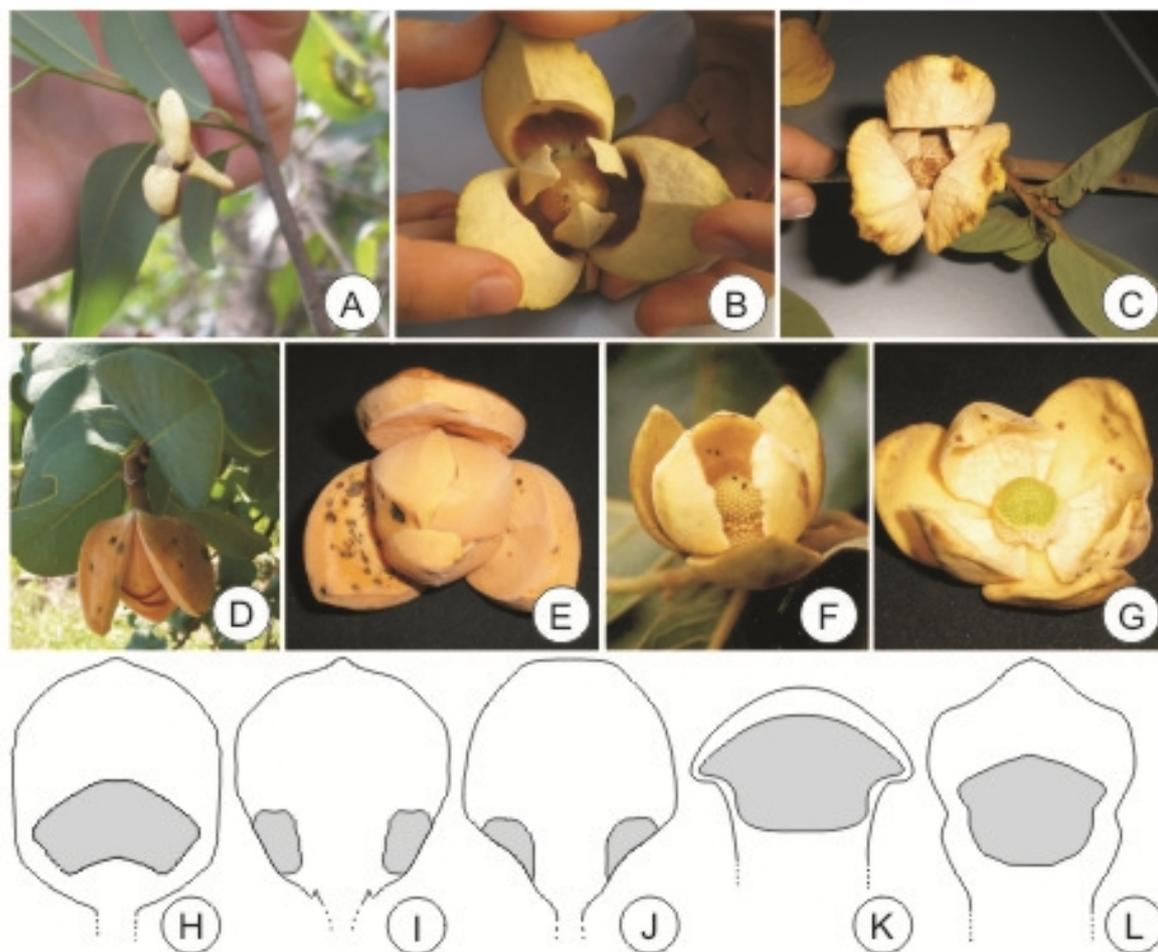


Fig. 1. Fotos das flores e diagrama das pétalas de *Annona coriacea* (D-E, J), *A. crassiflora* (B-C, I), *A. dioica* (F-H) e *A. emarginata* (A, K-L). A-G. Aspecto geral da flor em antese. H-K. Diagrama da pétala interna, mostrando as regiões de tecido nutritivo (áreas em cinza). L. Diagrama da pétala externa (tecido nutritivo: área cinza).

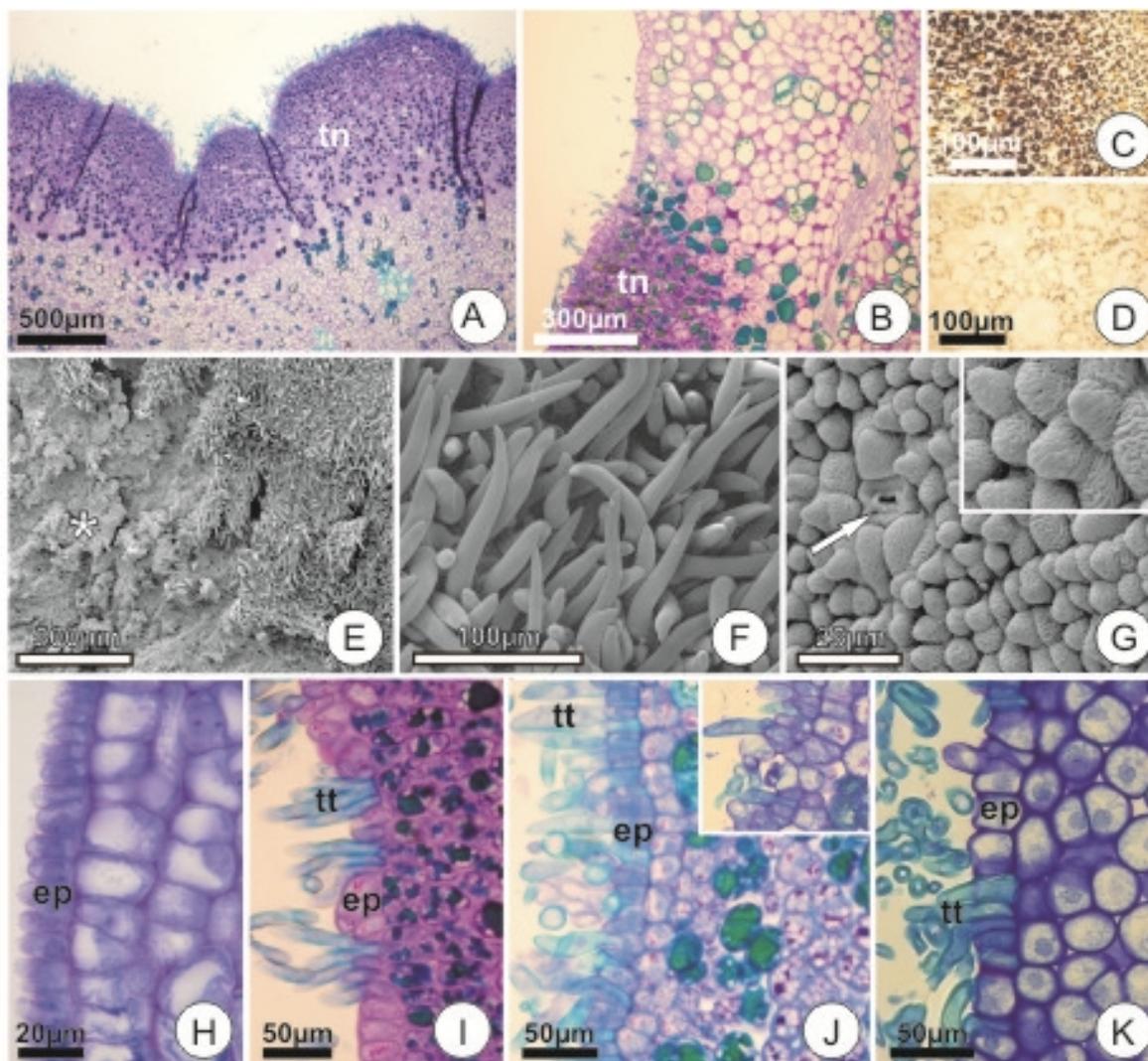


Fig. 2. Tecido nutritivo de *Annona coriacea* (K), *A. crassiflora* (C-F, J), *A. dioica* (A-B, I) e *A. emarginata* (G-H). Secções transversais (A, C-D, H-K), secção longitudinal (B). A-B. Tecido nutritivo e tecido subjacente. C-D. Teste com lugol, revelando amido, respectivamente, no tecido nutritivo e não nutritivo. E. Tecido nutritivo em vista frontal, evidenciando uma região que foi raspada por coleópteros (asterisco). F. Tricomas do tecido nutritivo em vista frontal. G. Epiderme papilosa em vista frontal, com células de cutícula ornamentada (destaque na figura); com presença de estômato (seta). H. Epiderme papilosa. I. Epiderme com tricomas tectores. J. Epiderme tricomatosa, com estômato entre os tricomas (destaque). K. Epiderme com tricomas tectores. (ep = epiderme; tn = tecido nutritivo; tt = tricoma tector).

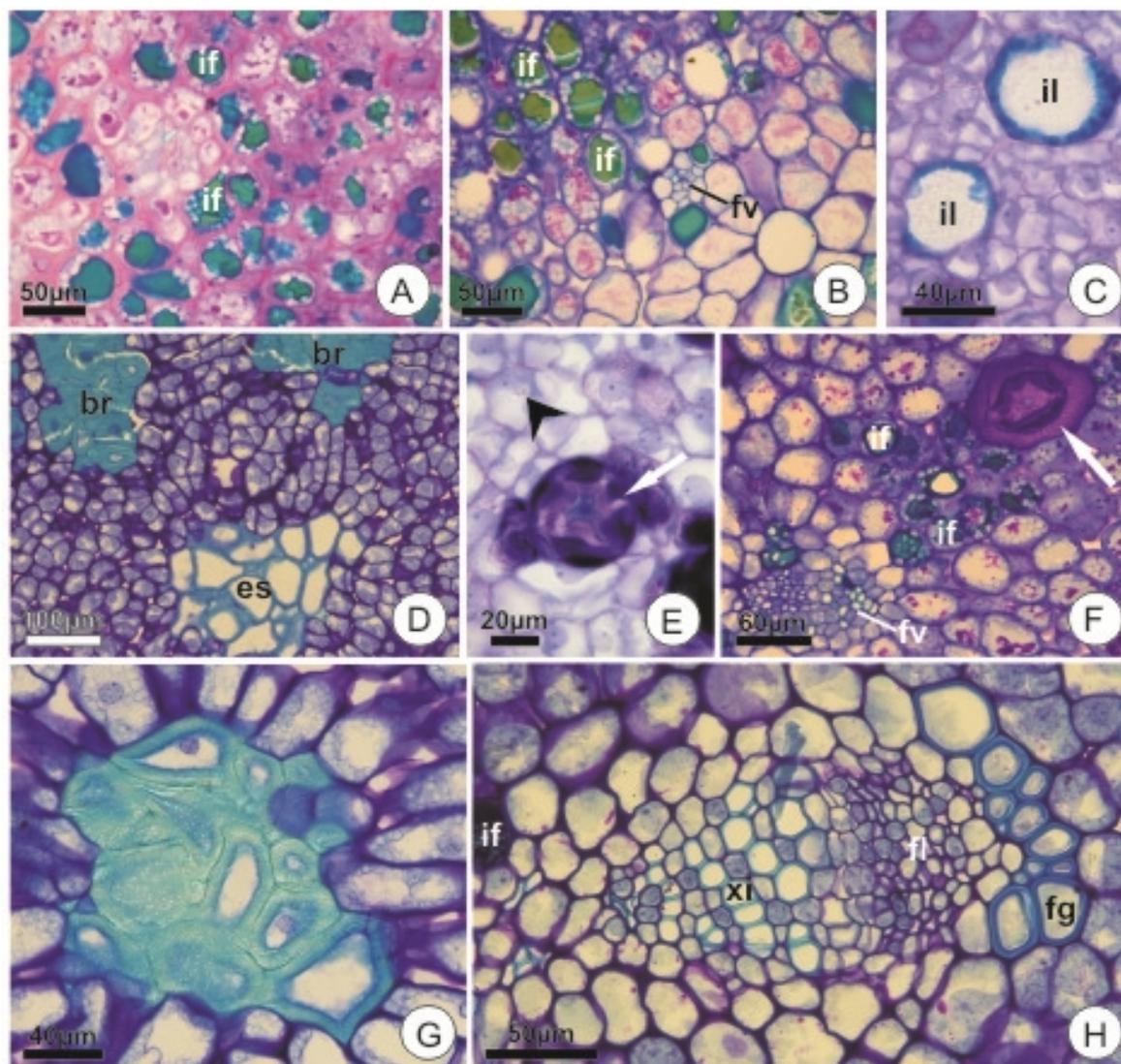


Fig. 3. Tecido nutritivo de *Annona coriacea* (D, G-H), *A. crassiflora* (F), *A. dioica* (A-B) e *A. emarginata* (C, E). Secções transversais (A-B, D, F-H), secções longitudinais (C, E). A-B. Mesofilo nutritivo com grande quantidade de idioblastos fenólicos. C. Mesofilo com idioblastos lipídicos. D. Esclereídes do mesofilo nutritivo. E. Detalhe de idioblasto com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático (seta) e idioblasto cristalífero (ponta de seta). F. Mesofilo nutritivo, evidenciando idioblastos com acúmulo de pectatos no espaço periplasmático (seta) e feixe vascular colateral. G. Detalhe de um grupo de esclereídes. H. Detalhe de um feixe vascular com fibras gelatinosas externas ao floema. (br = braquiesclereíde; es = esclereíde; fg = fibra gelatinosa; fl = floema; fv = feixe vascular; if = idioblasto fenólico; il = idioblasto lipídico; xi = xilema).

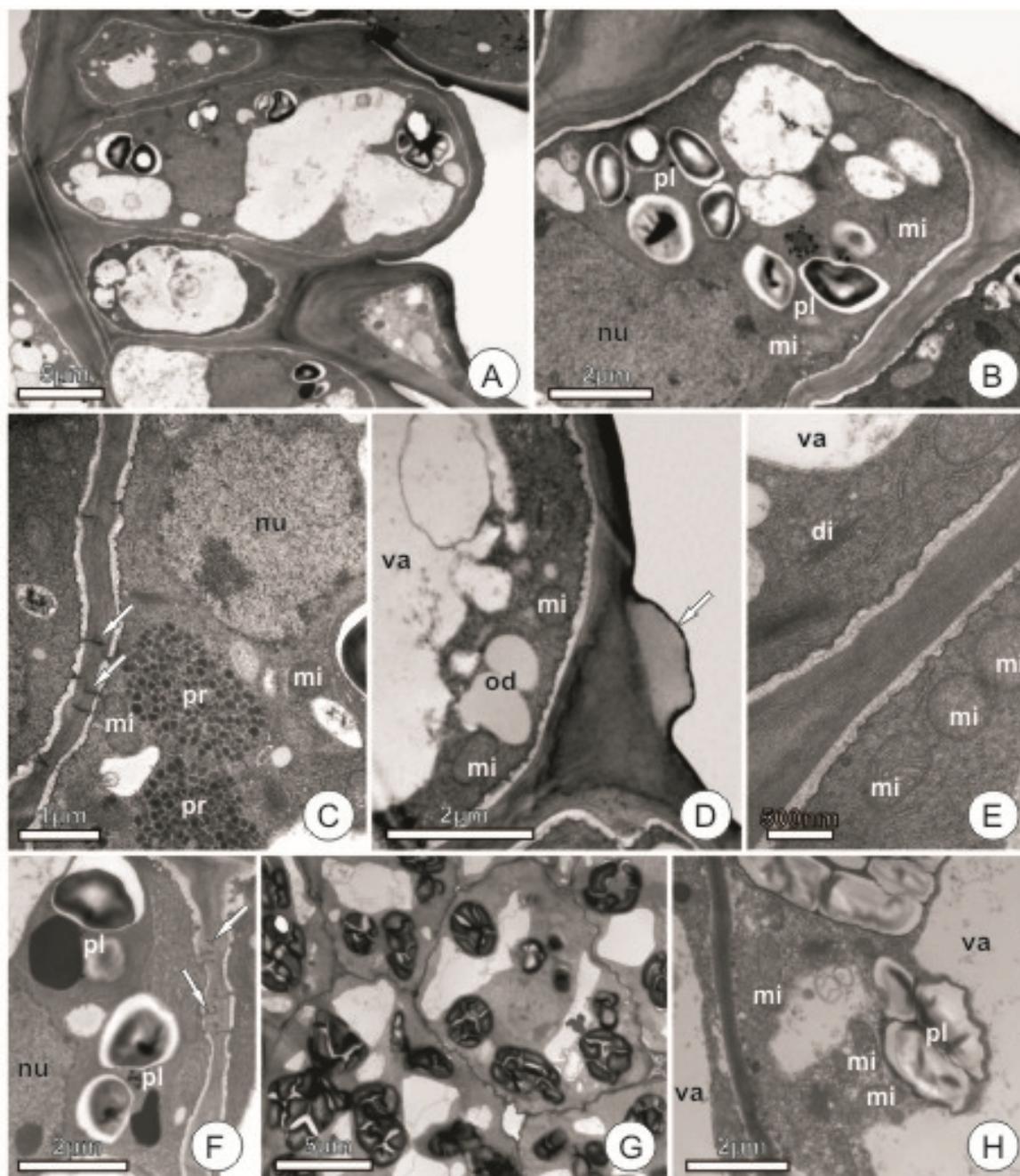


Fig. 4. Aspectos ultraestruturais do tecido nutritivo de *Annona crassiflora* (A-F) e *A. emarginata* (G-H) na fase pré-antese. A. Vista geral da epiderme nutritiva, evidenciando células de citoplasma denso. B. Detalhe de uma célula epidérmica. C. Células adjacentes conectadas por plasmodesmos (seta); observam-se proteínas no citoplasma. D. Detalhe do acúmulo de secreção no espaço subcuticular. E. Detalhe do citoplasma com mitocôndrias e dictiossomos. F. Detalhe dos plastídios com grãos de amido; note a presença de plasmodesmos (seta), conectando as células adjacentes. G. Vista geral do parênquima nutritivo. H. Detalhe evidenciando mitocôndrias e plastídios. (di = dictiossomo; mi = mitocôndria; nu = núcleo; od = gotícula de óleo; pl = plastídio; pr = proteína; va = vacúolo).

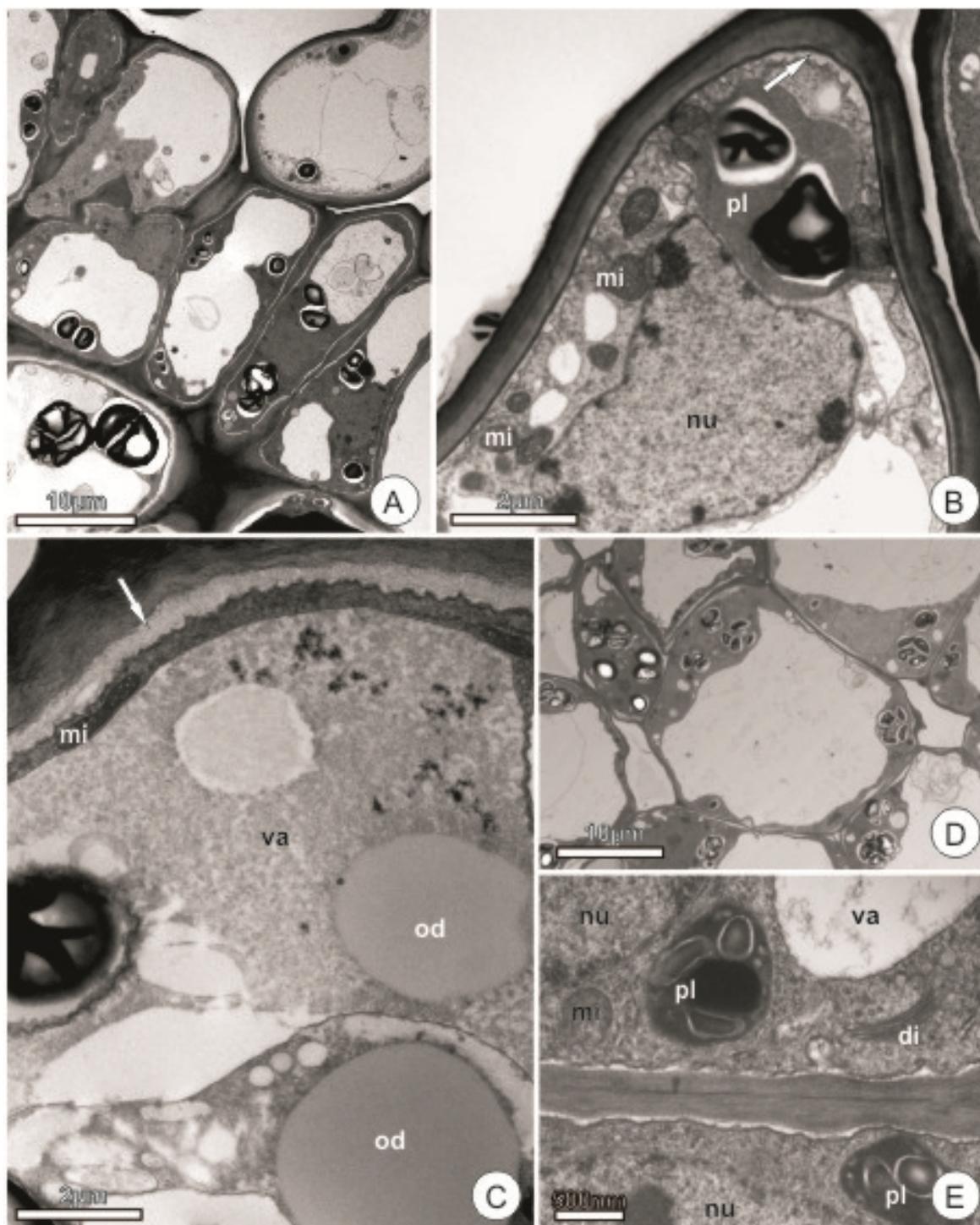


Fig. 5. Aspectos ultraestruturais do tecido nutritivo de *Annona crassiflora* (A-C) e *A. emarginata* (D-E) na fase pistilada. A. Vista geral da epiderme nutritiva, evidenciando células de citoplasma denso. B. Detalhe de uma célula epidérmica, evidenciando a presença de mitocôndrias e plastídio; a seta aponta o acúmulo de material fibrilar no espaço periplasmático. C. Célula epidérmica com gotículas de óleo no citosol e acúmulo de material fibrilar no espaço periplasmático (seta). D. Vista geral do parênquima nutritivo. E. Detalhe do citoplasma com mitocôndrias, dictiossomos e plastídios. (di = dictiossomo; mi = mitocôndria; nu = núcleo; od = gotícula de óleo; pl = plastídio; va = vacúolo).

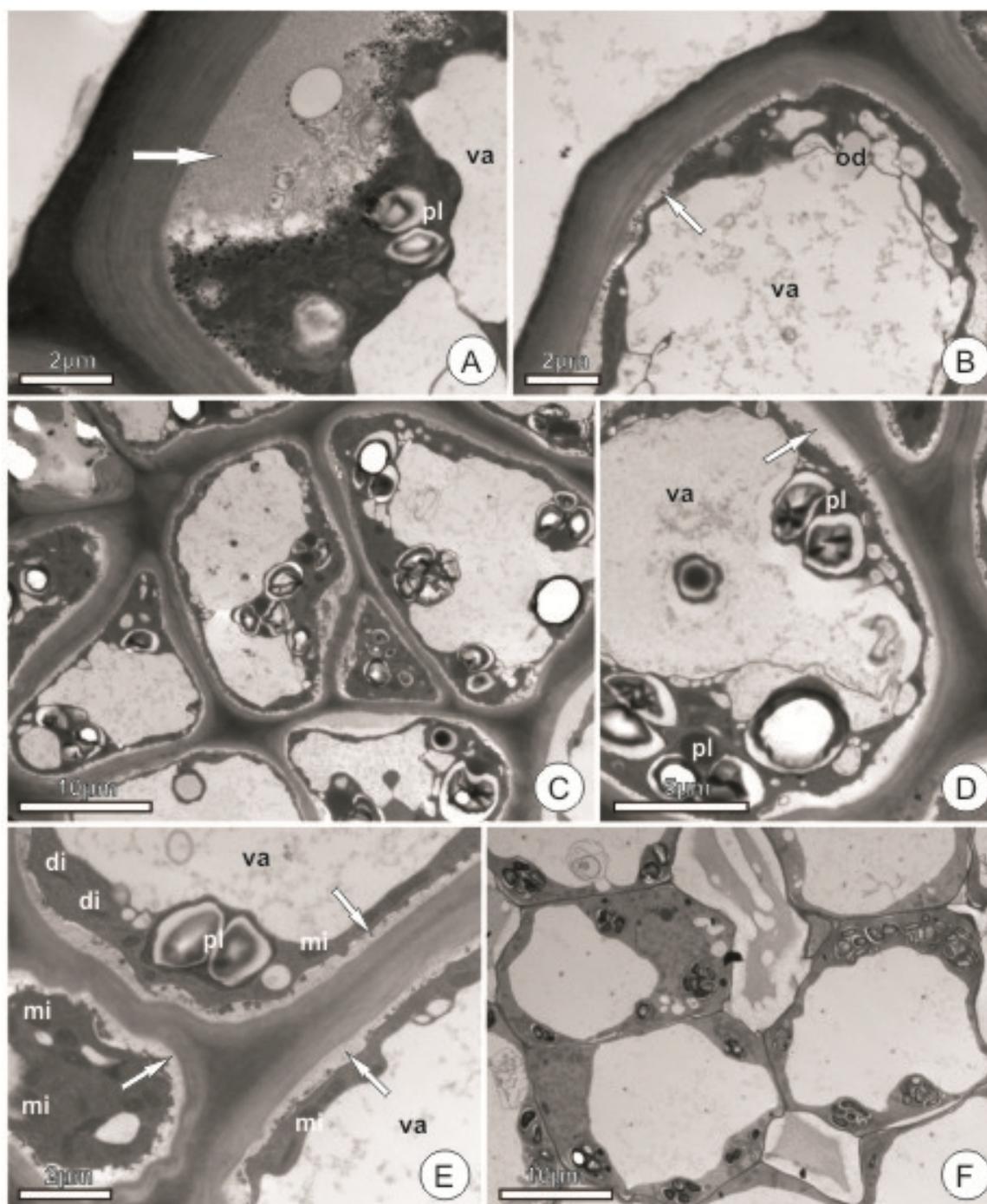


Fig. 6. Aspectos ultraestruturais do tecido nutritivo de *Annona crassiflora* (A-E) e *A. emarginata* (F) na fase estaminada. A. Detalhe de célula epidérmica, evidenciando o acúmulo de material fibrilar no espaço periplasmático (seta). B. Detalhe de célula epidérmica, mostrando a presença de material fibrilar no interior de um grande vacúolo e o acúmulo deste mesmo material no espaço periplasmático (seta). C. Vista geral do parênquima nutritivo. D. Detalhe de uma célula, destacando a presença de plastídios apresentando grãos de amido. E. Detalhe mostrando citoplasma rico em mitocôndrias e dictiossomos; vacúolos com material fibrilar em seu interior e acúmulo deste mesmo material no espaço periplasmático (seta). F. Vista geral do parênquima nutritivo. (di = dictiossomo; mi = mitocôndria; od = gotícula de óleo; pl = plastídio; va = vacúolo).



Capítulo 2

Nectários florais em *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae): estrutura, secreção e aspectos funcionais

Natália Arias Galastri^(a,b), Denise Maria Trombert Oliveira^(a) e Élder Antônio Sousa Paiva^(a)

(a) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil.

(b) Faculdade de Tecnologia de Jahu, Coordenadoria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Rua Frei Galvão s/nº, Jardim Pedro Ometto, Jaú, SP 17212-650, Brasil.

Autor para correspondência: epaiva@icb.ufmg.br

Resumo

São poucos os relatos de nectários florais (NFs) em Annonaceae, acerca dos quais inexistem estudos anatômicos. Apresenta-se aqui o registro inédito de NFs para *Xylopia*, descrevendo a organização anatômica e ultraestrutural destes nectários em *Xylopia aromatica*. Para tanto, flores em pré-antese e fases pistilada e estaminada da antese foram coletadas e processadas segundo técnicas usuais de microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura. As pétalas internas apresentam, na região proximal, uma curvatura que forma a câmara de polinização, em cuja porção interna a epiderme, desprovida de estômatos, está envolvida na síntese de néctar. O nectário é formado por uma epiderme secretora e tecido subglandular parenquimático, de células vacuoladas e ricas em amido. Na pré-antese, as células epidérmicas apresentam citoplasma denso, no qual predominam mitocôndrias, plastídios e dictiosomos. A membrana plasmática é sinuosa, formando um espaço periplasmático conspícuo, no qual se observa início de acúmulo de secreção. Os plastídios apresentam grãos de amido. Assim que os estigmas se tornam receptivos, inicia-se a fase pistilada da antese, na qual ocorre a liberação do néctar. As células mantêm as características descritas na fase anterior, com destaque para a intensa hidrólise de amido e maior acúmulo de secreção no espaço periplasmático. O néctar viscoso, cujo volume é suficiente apenas para tornar úmida a superfície do nectário, é consumido pelos tripes, que atuam como polinizadores. Há indícios de acúmulo do néctar no espaço subcuticular e liberação deste pela ruptura da cutícula. A fase estaminada tem início com a liberação do pólen. Nesta fase, o nectário apresenta células epidérmicas com intensa vesiculação e indícios da presença de néctar nas vesículas e vacúolos; nesta fase a ausência de amido é característica marcante, o que é observado também no tecido subglandular. Após esta fase, ocorre a abscisão das pétalas. Em *X. aromatica*, a disposição do nectário parece assegurar o contato do inseto com os estigmas, facilitando a polinização.

Palavras-chave: Annonaceae, néctar, recompensa floral, *Xylopia*.

Introdução

Xylopia, um dos maiores gêneros de Annonaceae, com cerca de 150 espécies (Souza e Lorenzi, 2012; Judd et al., 2008), apresenta flores hermafroditas e trímeras, formadas por um verticilo de três sépalas parcialmente ou quase totalmente concrecidas e dois verticilos de três pétalas cada (Heusden, 1992). O androceu é formado por numerosos estames, podendo também ocorrer estaminódios e, o gineceu é dialicarpelar com numerosos carpelos (Heusden, 1992; Webber, 1996).

Xylopia aromatica, popularmente conhecida como pimenta-de-macaco ou pindaíba-do-campo, ocorre em fisionomias campestres de Cerrado, em Cerrado típico e em cerradão (Lorenzi, 1992; Durigan et al., 2004). Apresenta flores hermafroditas, brancas, eretas, com pequena câmara de polinização formada pelo fechamento das pétalas internas e, durante a antese, emitem um forte odor adocicado, sendo a única Annonaceae do Cerrado em que tripes (Thysanoptera) são os principais polinizadores, sendo polinizadores secundários besouros do gênero *Cillaeus* (Nitidulidae) e, eventualmente, certos Staphylinidae e

Chrysomelidae (Gottsberger, 1970, 1994; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

A espécie apresenta antese diurna com duração de dois dias. No primeiro dia apenas os estigmas estão receptivos, o que caracteriza as flores como protogínicas. Esta fase pistilada inicia-se bem cedo e termina no final do dia e, durante ela, insetos entram livremente nas flores. Grandes besouros podem comer a superfície das pétalas, mas dificilmente conseguem destruir os órgãos reprodutivos, pois estes estão protegidos pelas pétalas internas parcialmente fechadas. Na manhã do segundo dia, as flores entram na fase estaminada, na qual as anteras estão deiscentes e os estigmas não mais receptivos. Tripes e besouros tornam-se cobertos por grãos de pólen. No final do segundo dia, as pétalas caem e os insetos começam a voar para outras flores, efetivando a polinização (Gottsberger, 1994; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

A eficiência da polinização realizada por tripes depende da dinâmica de transferência do pólen por esses insetos. Assim, a disponibilidade de pólen e néctar como recompensa, a interação pólen-estigma, a arquitetura da parede do pólen e o mecanismo de adesão do pólen aos tripes, são fatores importantes na interação tripes-flores (Ananthkrishnan, 1993).

Poucos são os trabalhos estruturais referentes a *Xylopia*, e não constam na literatura dados estruturais e ultraestruturais de estruturas secretoras encontradas neste gênero, especialmente para *X. aromatica*. A presença de nectários florais em Annonaceae é apenas citada por Heusden (1992), sem referência a nenhuma espécie. Assim, este trabalho objetiva descrever a estrutura e a ultraestrutura do nectário floral de *X. aromatica*, sendo o primeiro relato efetivo de nectário para o gênero e para a família.

Material e Métodos

Botões florais e flores em antese foram coletadas em cinco indivíduos de *X. aromatica* (Lam.) Mart. ocorrentes em fragmentos de Cerrado nas proximidades do município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, sob as coordenadas 22°43'5,1"S e 48°20'58,1"W. Ramos férteis foram herborizados e incluídos no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais (Galastri, N.A. 7, BHCB 154418).

Conforme literatura disponível, a espécie apresenta antese diurna, o que levou as observações em campo serem concentradas das 6 às 18 horas. Para a verificação da

existência de nectários foram utilizadas tiras para detecção de glicose nas amostras de secreção.

Os estudos anatômicos foram realizados em material fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e conservados em etanol 70% (Jensen, 1962).

Após desidratação em série etílica e inclusão a frio (Paiva et al., 2011) em 2-hidroxiethyl-metacrilato (Leica[®]), o material foi seccionado em micrótomo rotativo com cerca de 7µm de espessura, obtendo-se secções transversais e longitudinais. As secções foram coradas com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al., 1964, modificado) e montadas em Entellan[®].

Testes histoquímicos foram realizados em secções a mão livre de amostras fixadas reidratadas e também em material fixado e incluído. Para identificar polissacarídeos ácidos e pectinas, utilizou-se vermelho de rutênio (Jensen, 1962); para evidenciar lignina, floroglucinol em meio ácido (Sass, 1951); Sudan IV, para a localização de substâncias lipídicas (Johansen, 1940); lugol, para a detecção de amido (Johansen, 1940); cloreto férrico, acrescido de carbonato de sódio, para verificar a ocorrência de compostos fenólicos (Johansen, 1940); e, para localizar proteínas, foi utilizado azul mercúrio de bromofenol (Mazia et al., 1953).

O laminário preparado foi analisado e as imagens obtidas em microscópio Zeiss Axioskop 40 com câmara digital acoplada.

Para microscopia eletrônica de transmissão foram coletadas amostras em regiões pré-definidas pelos estudos em microscopia de luz. Para acompanhar possíveis alterações estruturais ao longo do período de antese, amostras foram obtidas em três momentos deste processo, a saber: (1) na pré-antese, cerca de doze horas antes da abertura das pétalas; (2) no início da fase pistilada, caracterizada pelo forte odor adocicado e estigmas receptivos e, (3) no início da fase estaminada, quando ocorre a abscisão dos estames e a liberação do pólen. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) e processadas segundo métodos usuais (Roland, 1978). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit (Philips/FEI Company, Eindhoven, Netherlands) 80 KV.

Para observação ao microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2), desidratadas em série etílica,

submetidas à secagem ao ponto crítico, coladas em suportes de alumínio e metalizadas com ouro (Robards, 1978). As amostras foram, então, examinadas ao microscópio eletrônico de varredura Fei Company Quanta 200 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands).

Resultados

Morfologia e aspectos estruturais

As flores de *X. aromatica* são hermafroditas, eretas e trímeras, formadas por três sépalas e dois verticilos de três pétalas cada. As três pétalas internas são livres, mas justapostas na base, avermelhadas na região proximal e brancas nas regiões mediano-distal. Elas apresentam, na região proximal, uma curvatura que forma a câmara de polinização; esta câmara é pequena, formada apenas pela base das pétalas internas e parcialmente fechada, pois existe uma abertura apical e aberturas laterais, por entre as pétalas. Na porção interna desta câmara, cuja epiderme é secretora, observou-se a secreção de néctar, caracterizando um nectário floral (NF). O néctar é viscoso e não muito abundante, sendo consumido por tripes (Thysanoptera).

As pétalas internas apresentam grandes diferenças anatômicas entre as regiões proximal (Figs. 1A-E), que corresponde à câmara de polinização, e mediano-distal (Figs. 1A, F). Na câmara de polinização, a epiderme na face adaxial é diferenciada em duas regiões: basal e mediano-apical.

Na câmara de polinização, a região basal é composta por células cuboides a levemente alongadas no sentido anticlinal (Fig. 1C), recoberta por cutícula evidente, com tricomas tectores de extremidade arredondada, paredes espessas e lignificadas, e sem estômatos. Na região mediano-apical da câmara, onde se observa a secreção de néctar, a epiderme apresenta células alongadas dispostas em paliçada, de paredes delgadas, citoplasma denso e núcleos evidentes (Fig. 1D). Observa-se ainda que, na região do nectário, a epiderme é desprovida de estômatos, além de atuar na união das pétalas internas, à semelhança do zíper (Fig. 1E), possibilitando a formação da câmara de polinização, que fornece abrigo, proteção e alimento aos polinizadores. As células epidérmicas, dispostas em paliçada, apresentam dilatação na porção distal, sendo revestidas por cutícula lisa e bem aderida, não tendo sido observada a presença de poros ou rupturas cuticulares (Fig. 1G).

Na região do nectário, o mesofilo das pétalas internas, que constitui o tecido subglandular, é parenquimático, com células de formatos e tamanhos variados, entremeadas por idioblastos fenólicos com conteúdo amorfo ou particulado (Figs. 1D-E).

A vascularização é feita por feixes vasculares colaterais abertos, os quais não emitem traços em direção às células secretoras da região do nectário.

Na região mediano-distal das pétalas internas, em ambas as faces, a epiderme apresenta células cuboides a papilosas com citoplasma mais denso próximo à face periclinal externa da parede (Fig. 1F), entremeadas por idioblastos fenólicos e tricomas tectores simples de paredes espessas e lignificadas, não sendo observados estômatos (Fig. 1H).

Aspectos ultraestruturais do Nectário

Na fase caracterizada como pré-antese, a epiderme secretora apresenta células de citoplasma denso, no qual predominam mitocôndrias, plastídios e dictiossomos (Figs. 2A-C). O núcleo é volumoso (Fig. 2A) e, geralmente, ocorre um único vacúolo, no qual se observa acúmulo de material fibrilar (Figs. 2A-B). A membrana plasmática é sinuosa, formando um espaço periplasmático conspícuo, no qual se observam indícios de acúmulo de secreção (Figs. 2D-E). As mitocôndrias são numerosas, globoides a ovaladas e apresentam cristas desenvolvidas (Figs. 2C, E). Os plastídios são ovalados ou globoides e apresentam grãos de amido que ocupam grande parte do volume destas organelas (Figs. 2B-C). Os dictiossomos apresentam de cinco a sete cisternas e são encontrados em grande número (Figs. 2D-E). Observam-se gotículas de óleo (Fig. 2D) dispersas no citosol. O retículo endoplasmático é pouco desenvolvido.

Assim que os estigmas tornam-se receptivos, inicia-se a fase pistilada da antese, na qual ocorre a liberação do néctar. As células mantêm as características descritas na fase anterior (Figs. 3 A-C), com destaque para as intensas alterações estruturais dos plastídios e grãos de amido. Os plastídios apresentam estroma rarefeito ou indistinto (Fig. 3A). Observa-se redução de densidade nos grãos de amido, os quais se tornam indistintos em alguns plastídios, dando origem a material particulado similar ao observado no interior de vacúolos (Figs. 3A-B) e maior acúmulo de material no espaço periplasmático. Observa-se um grande vacúolo central, no qual há acúmulo de material fibrilar (Figs. 3C-E). As mitocôndrias e os dictiossomos são abundantes e mantêm as características observadas na fase de pré-antese (Fig. 3C). Observam-se poucas gotículas de óleo (Fig. 3E) dispersas no citosol. Há indícios de acúmulo do néctar no espaço subcuticular e liberação deste pela ruptura da cutícula (Figs. 3D-E). O néctar é viscoso e pouco volumoso, suficiente apenas para tornar úmida a superfície do nectário.

A fase estaminada tem início com a liberação do pólen. Nesta fase, o nectário apresenta células da epiderme secretora com citoplasma rico em organelas (Figs. 4A-B). Mitocôndrias, plastídios e dictiossomos persistem como organelas mais representativas, entretanto, observa-se, em algumas células, expressivo aumento do retículo endoplasmático liso (Fig. 4C). Cabe ressaltar, ainda, o elevado número de vesículas e a fusão destas gerando microvacúolos e vacúolos maiores, os quais se apresentam repletos de material floculado (Fig. 4D). Nesta fase, os plastídios são pouco numerosos e apresentam sistema de endomembrana inconspícuo e estroma elétron-denso, sem indícios da presença de amido ou outro material de reserva. Após essa fase, ocorre a abscisão das pétalas.

As células parenquimáticas do mesofilo, na região do nectário, apresentam um amplo vacúolo central que armazena substâncias fenólicas, o restante do citoplasma fica restrito a uma estreita faixa periférica com poucas organelas, dentre as quais se destacam plastídios com grãos de amido (Fig. 4E). Estas células constituem o tecido subglandular e não mostram alterações relevantes desde a fase pré-antese, salvo a hidrólise gradual do amido ao longo da fase secretora.

Discussão

As flores de *X. aromatica* apresentam características morfológicas típicas da família, como perianto trímero formado por três sépalas e dois verticilos de três pétalas cada, androceu constituído por numerosos estames e gineceu dialicarpelar com numerosos carpelos (Heusden, 1992; Judd et al., 2008). No entanto, a presença de nectário em flores de Annonaceae foi apenas citada por Endress (1994) para a família e por Silberbauer-Gottsberger et al. (2003) para algumas espécies polinizadas por moscas, mas nunca foi relatado para *Xylopia* e nem descrito estrutural e ultraestruturalmente, sendo este um dado inédito.

De acordo com Simpson e Neff (1981), recompensas florais são componentes florais utilizados por animais que, por causa disso, visitam várias vezes as flores, podendo então polinizá-las. Dentre as recompensas florais, pólen e néctar são as principais recompensas primárias (Faegri e Pijl, 1979; Simpson e Neff, 1981). O néctar é um elemento importante na manutenção da relação planta-polinizador, sendo a principal recompensa floral aos polinizadores (Faegri e Pijl, 1979).

Em Annonaceae, o tamanho da câmara de polinização, a coloração das flores e o sistema de recompensa atuam selecionando os insetos que são atraídos e que, efetivamente,

conseguem entrar em suas flores; estes também precisam ser considerados na evolução da polinização do grupo (Gottsberger, 1994; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006).

Em *X. aromatica*, tripes (Thysanoptera) são os principais polinizadores (Gottsberger, 1970, 1994; Webber, 1996; Silberbauer-Gottsberger et al., 2003; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 2006). Tripes frequentemente ingerem o néctar e sugam o conteúdo do pólen deixando apenas a parede deste (Kirk, 1984) e, segundo Endress (1994), poucas são as plantas que apresentam tripes como polinizadores, e estas, geralmente, apresentam flores com estreitas aberturas em direção ao centro da flor, numerosos estames compactamente arranjados, coloração branca e recompensas como pólen e néctar, todas características também encontradas nas flores de *X. aromatica*.

A morfologia e a anatomia de nectários têm sido descritas para vários grupos de plantas (Fahn, 1979) e, de modo geral, nectários consistem de epiderme modificada, com ou sem tricomas, e parênquima especializado para a síntese, acumulação e liberação do néctar (Fahn, 1979, 1988; Paiva e Machado, 2008).

A presença de citoplasma denso, núcleo volumoso, numerosas mitocôndrias, dictiossomas, ribossomos e plastídios com grãos de amido nas células secretoras do nectário de *X. aromatica*, são características comuns aos tecidos produtores de néctar previamente descritos (Fahn, 1979, 1988; Wist e Davis, 2006; Paiva e Machado, 2008).

Precedendo a secreção, a quantidade de amido é grande e observa-se um subsequente declínio, devido à hidrólise deste, com a liberação do néctar em *X. aromatica*, o que ocorre na maioria dos nectários florais já estudados (Fahn, 1988; Paiva e Machado, 2008). A presença de numerosos plastídios contendo amido e da grande quantidade de mitocôndrias no momento da secreção são evidências de secreção écrina (Zer e Fahn, 1992; Paiva e Machado, 2008).

As alterações estruturais que ocorrem nos plastídios, bem como a fusão destas organelas e a aparente conversão em vacúolos também constituem característica comum da dinâmica plastidial em diversos nectários, conforme relatado por Paiva e Machado (2008).

A presença de um grande número de células com acúmulo de compostos fenólicos no tecido interno ao nectário de *X. aromatica* pode ser uma proteção contra a herbivoria. Segundo Taiz e Zeiger (2004), compostos fenólicos agem como repelentes alimentares a uma grande variedade de animais e muitos herbívoros têm significativa redução de seu crescimento e sobrevivência quando são adicionados fenólicos em suas dietas.

De acordo com Fahn (1979, 1988), o néctar consiste principalmente de açúcares, mas pode conter outras substâncias. Os açúcares mais comuns são sacarose, frutose e

glicose, mas pode ocorrer mucilagem, proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos orgânicos, ácido ascórbico, íons minerais, fosfatos e alcaloides. Para Faegri e Pijl (1979), o néctar não é uma pura solução de carboidratos, pois também se pode encontrar variáveis proporções de aminoácidos e lipídios.

Geralmente, a concentração de açúcares no néctar fica entre 25 e 75 %, variando também a proporção de glicose, frutose e sacarose. Essa variação parece não estar correlacionada com as diferentes classes de polinizadores, mas, por outro lado, a quantidade de néctar produzido (Faegri e Pijl, 1979). Baixa concentração de açúcar significa menos energia disponível no néctar, no entanto, o néctar também pode fornecer água aos animais visitantes.

Em *X. aromatica*, a coloração branca das pétalas, a presença do nectário e a liberação de odor forte e adocicado, efetivamente atraem os Thysanoptera até as flores. No primeiro dia da antese, eles alimentam-se do néctar e, no segundo dia, além desta recompensa, há também o pólen. Segundo Saunders (2010), o néctar seria uma alternativa ao doce e pegajoso exsudado estigmático da maioria das flores de Annonaceae durante a fase pistilada.

De acordo com Ananthakrishnan (1982), a efetiva polinização realizada por tripses depende do tempo de florescimento, da quantidade de recompensas florais (pólen e néctar) e da facilidade de acesso às flores e às recompensas. Em *X. aromatica*, o nectário está localizado na região das pétalas internas, onde elas aproximam-se dos estigmas, o que garante que o inseto, ao ser levado até o nectário para se alimentar, toque os estigmas e os polinize, caso estejam carregando pólen de outra flor.

Por fim, nectários são estruturas importantes para que o processo de polinização ocorra e mais estudos florais em Annonaceae devem ser realizados para verificar a existência de nectários em outras espécies. É possível que a presença de um abundante exsudado estigmático confunda o observador quanto à presença ou ausência de nectários florais em suas flores, dificultando e subestimando o registro de sua ocorrência.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade em pesquisa de D.M.T. Oliveira e E.A.S. Paiva. A Wilma de Grava Kempinas pela cessão de equipamentos. Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, pelo processamento das amostras e pela cessão de equipamentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. Ao Dr. Renato de Mello Silva pela identificação da espécie.

Referências

- Ananthakrishnan, T.N., 1982. Thrips and pollination biology. *Curr. Sci.* 51, 168-172.
- Ananthakrishnan, T.N., 1993. The role of thrips in pollination. *Curr. Sci.* 65, 262-264.
- Durigan, G., Baitello, J.B., Franco, G.A.D.C., Siqueira, M.F., 2004. Plantas do Cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. Editora Páginas& Letras, São Paulo.
- Endress, P.K., 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge.
- Faegri, K., Pijl, L. van der, 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford.
- Fahn, A., 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- Fahn, A., 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108, 229-257.
- Gottsberger, G., 1970. Beiträge zur biologie von Annonaceen-blüten. *Österr. Bot. Z.* 118, 237-279.
- Gottsberger, G., 1994. As anonáceas do Cerrado e a sua polinização. *Rev. Brasil. Biol.* 54, 391-402.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., 2006. In the evening when the beetles come: pollination in Annonaceae e *Philodendron*. In: Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I. (Eds.), Life in the Cerrado: a South American tropical seasonal ecosystem. Pollination and seed dispersal, vol. 2. Reta Verlag, Ulm, pp. 138-159.
- Heusden, E.C.H. van, 1992. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. *Blumea, Supplement 7*, 7-36.
- Jensen, W.A., 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman, San Francisco.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use

- in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A-138A.
- Kirk, W.D.J., 1984. Pollen-feeding in thrips (Insecta: Thysanoptera). *J. Zool. (London)* 204, 107-117.
- Lorenzi, H., 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 2. Editora Plantarum, Nova Odessa.
- Mazia, D., Brewer, P.A., Albert, M., 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.* 104, 57-67.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Paiva, E.A.S., Machado, S.R., 2008. The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Ann. Botany* 101, 125-133.
- Paiva, E.A.S., Pinho, S.Z., Oliveira, D.M.T., 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia, H., Melo, R.C.N. (Eds.), *Light microscopy: methods and protocols*. Springer/Humana Press, New York, pp. 37-49.
- Robards, A.W., 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Hall, J.L. (Ed.), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York, pp. 343-403.
- Roland, A.M., 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall, J.L. (Ed.), *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York, pp. 1-62.
- Sass, J.E., 1951. *Botanical microtechnique*. Iowa State University, Ames.
- Saunders, R.M.K., 2010. Floral evolution in the Annonaceae: hypotheses of homeotic mutations and functional convergence. *Biol. Rev.* 85, 571-591.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G., Webber, A.C., 2003. Morphological and functional flower characteristics of new and old world Annonaceae with respect to their mode of pollination. *Taxon* 52, 701-718.
- Simpson, B.B., Neff, J.L., 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 68, 301-322.

- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2012. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre, pp. 316-326.
- Webber, A.C., 1996. Biologia floral, polinização e aspectos fenológicos de algumas Annonaceae na Amazônia Central. Tese de doutorado, INPA-FUA, Manaus.
- Wist, T.J., Davis, A.R., 2006. Floral nectary production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Ann. Bot.* 97, 177-193.
- Zer, H., Fahn, A., 1992. Floral nectaries of *Rosmarinus officinalis* L. Structure, ultrastructure and nectar secretion. *Ann. Bot.* 70, 391-397.

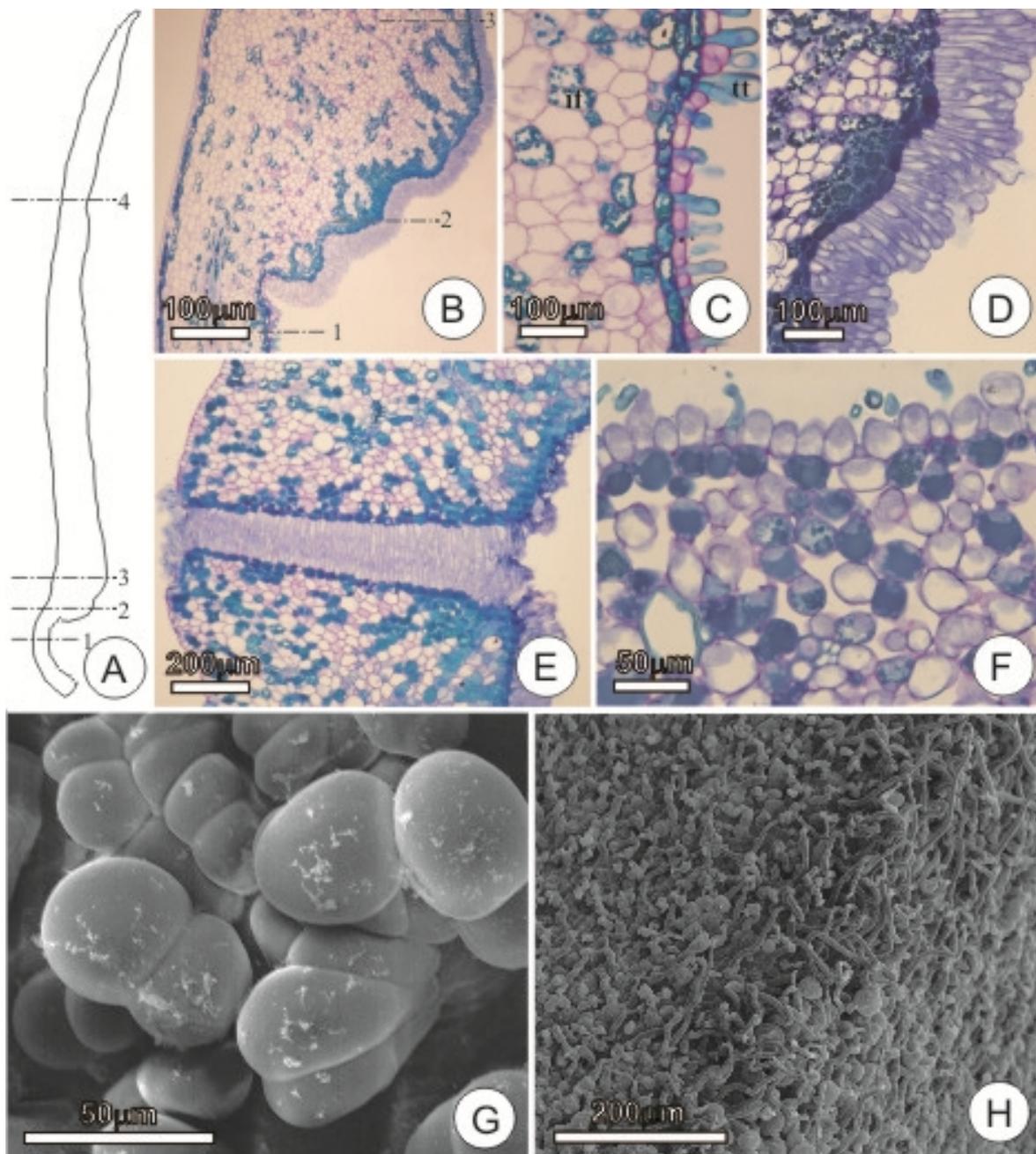


Fig. 1. Organização estrutural das pétalas internas das flores de *Xylopia aromatica*. A. Diagrama mostrando pétala em secção longitudinal. Os números indicam a posição mostrada nas imagens B (números 1 a 3) e F (número 4). B. Secção longitudinal da região proximal, correspondente à câmara de polinização; notar, na porção mediano-apical, epiderme com células de citoplasma denso que compõem o nectário floral. C. Região proximal da câmara de polinização (número 1); observam-se tricomas tectores. D. Nectário (número 2); notar epiderme formada por células dispostas em paliçada. E. Detalhe da união entre as pétalas internas à semelhança do zíper. F. Região mediano-distal da pétala interna (número 4); notar células papilosas com citoplasma mais denso próximo à parede periclinal externa. G-H. Respectivamente, vista frontal da região do nectário, e da região mediano-distal da pétala interna. (if: idioblasto fenólico; tt: tricoma tector).

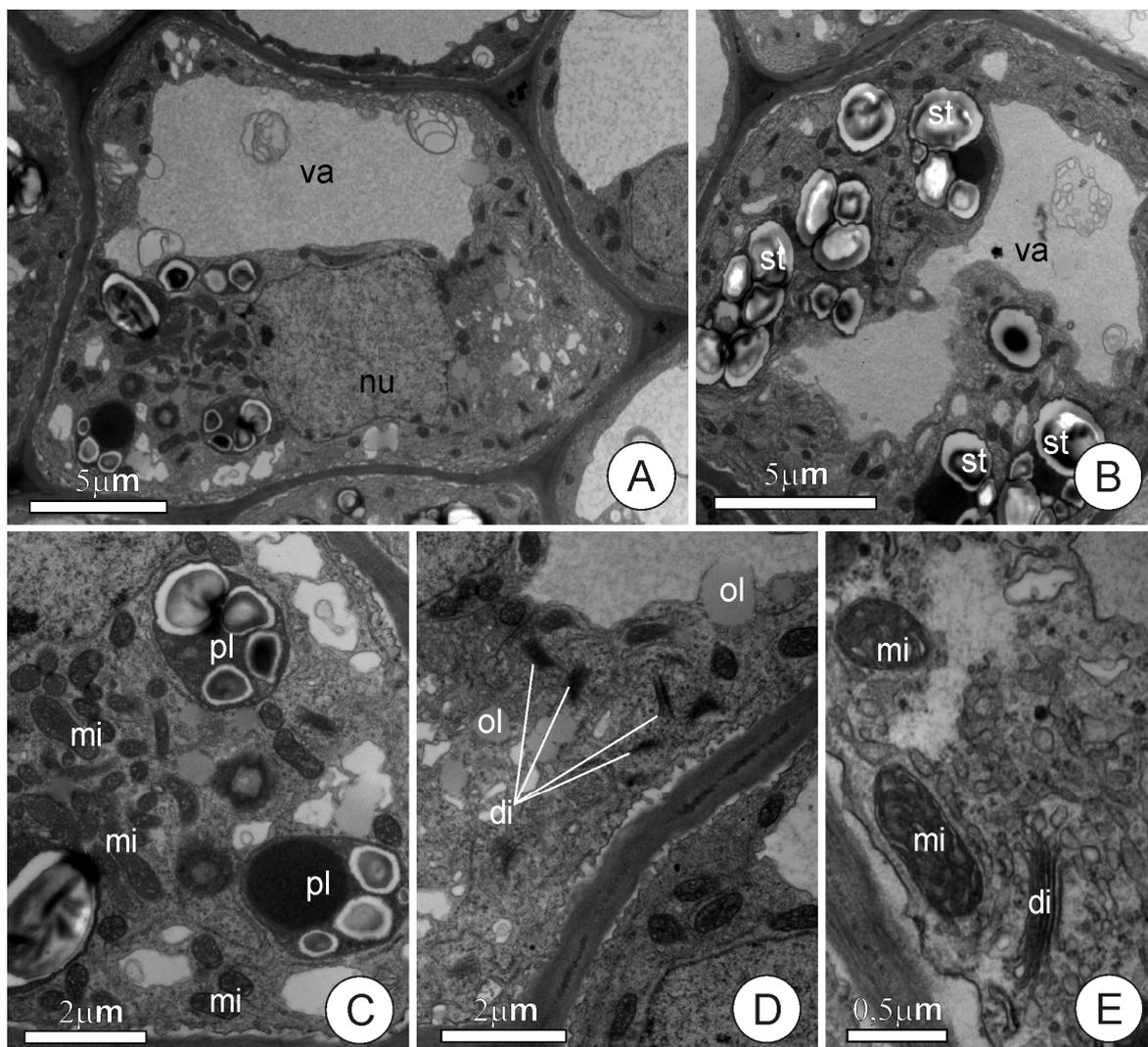


Fig. 2. Organização ultraestrutural da epiderme secretora do nectário floral na pré-antese. **A.** Célula secretora exibindo núcleo volumoso e citoplasma rico em organelas, sobretudo plastídios e mitocôndrias. **B.** Detalhe de célula secretora com plastídios e grãos de amido. **C.** Detalhe da célula secretora, mostrando o elevado número de mitocôndrias associadas aos plastídios. **D.** Citoplasma com dictiossomos, gotas de óleo e retículo endoplasmático. **E.** Detalhe da célula evidenciando mitocôndrias e dictiossomo. (di: dictiossomo; mi: mitocôndria; nu: núcleo; ol: óleo; pl: plastídio; st: amido; va: vacúolo).

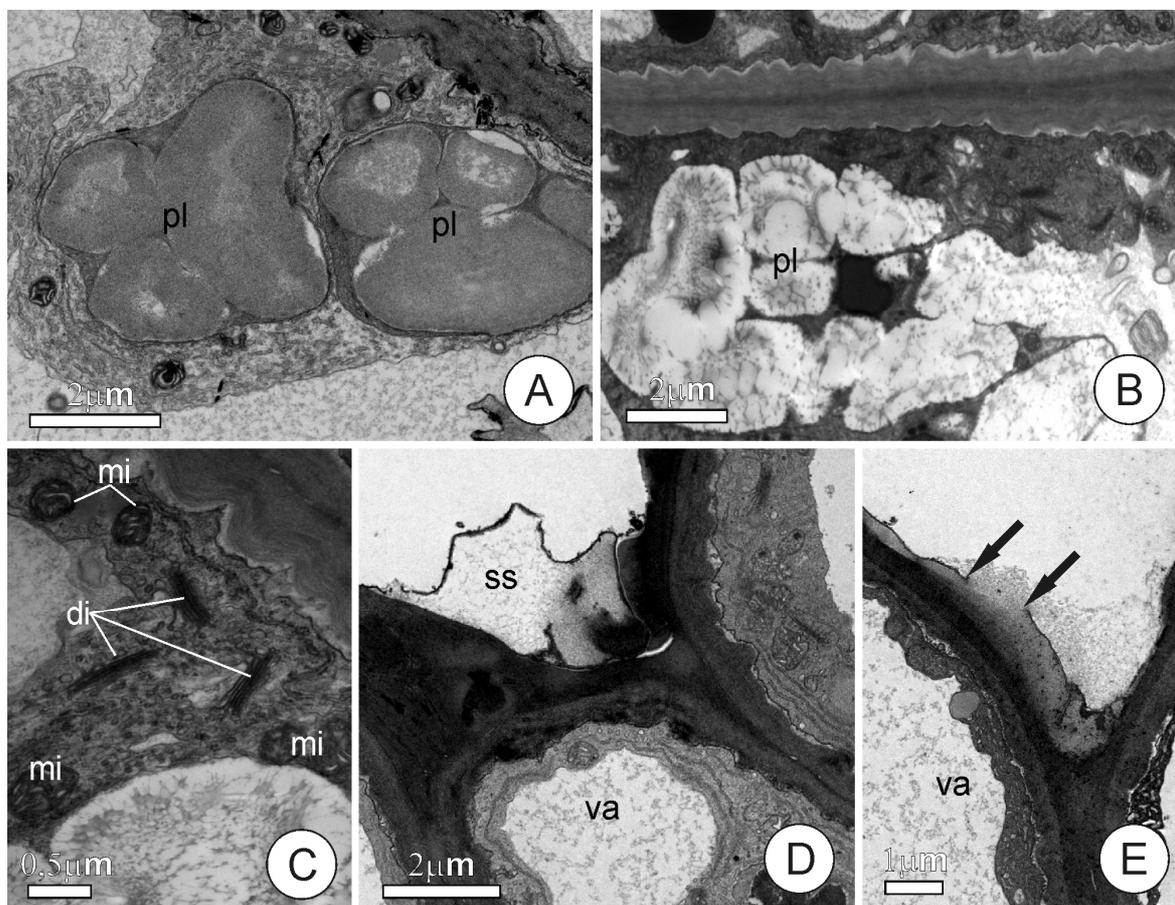


Fig. 3. Organização ultraestrutural da epiderme secretora do nectário floral na fase pistilada da antese. **A-B.** Detalhes da célula secretora com plastídios de grãos de amido; notar as alterações estruturais nestes. **C.** Citoplasma com mitocôndrias e dictiossomos. **D.** Detalhe da célula secretora, mostrando o acúmulo do néctar no espaço subcuticular e no interior de vacúolos. **E.** Detalhe da célula secretora, evidenciando a região de ruptura da cutícula (seta). (di: dictiossomo; mi: mitocôndria; pl: plastídio; ss: espaço subcuticular; va: vacúolo).

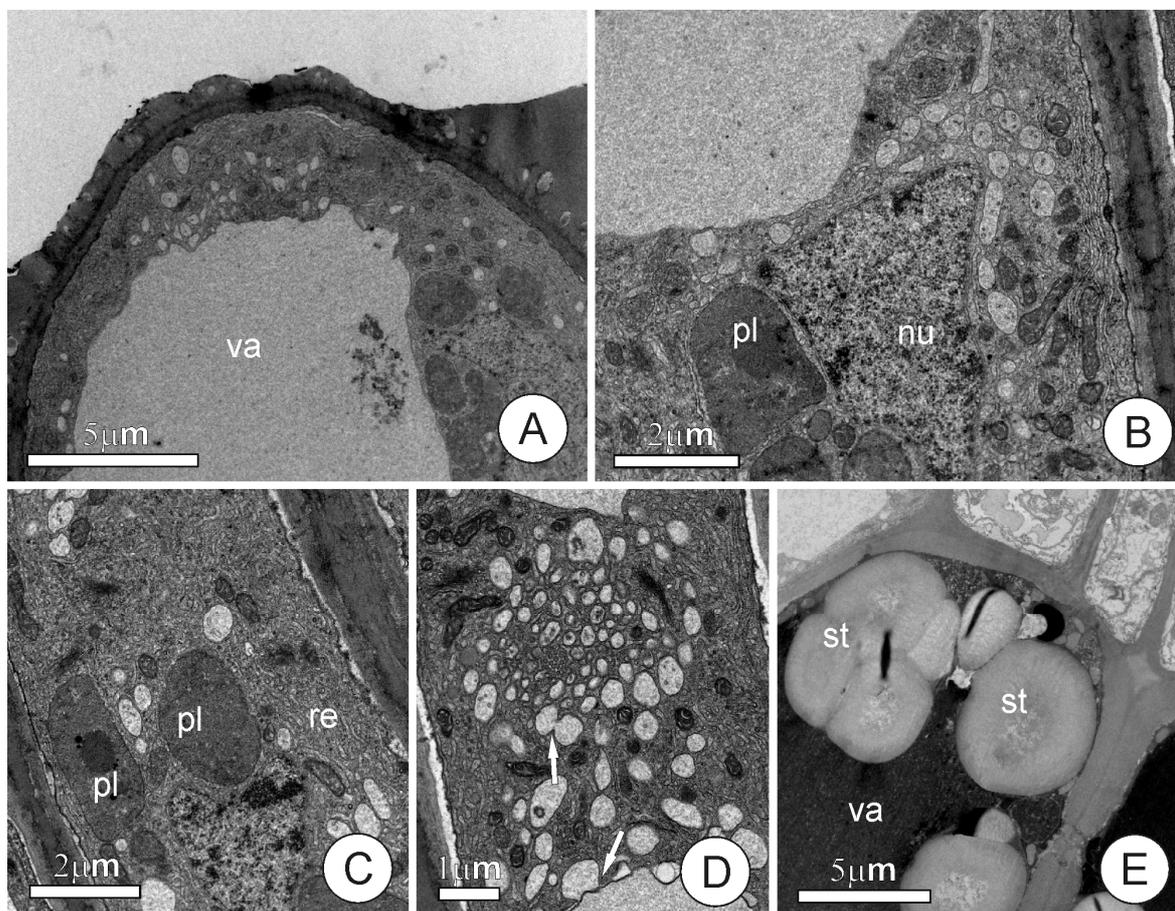


Fig. 4. Organização ultraestrutural da epiderme secretora do nectário floral na fase estaminada da antese. **A.** Célula secretora evidenciando o acúmulo de néctar no interior de vacúolos. **B.** Célula secretora exibindo núcleo volumoso e citoplasma rico em organelas. **C.** Detalhe evidenciando um expressivo aumento do retículo endoplasmático liso. **D.** Detalhe da célula secretora, mostrando o elevado número de vesículas e a fusão destas (seta) gerando microvacúolos e vacúolos maiores. **E.** Célula parenquimática adjacente à epiderme secretora; notar presença de grãos de amido com sinais de hidrólise e vacúolo central com substâncias fenólicas. (nu: núcleo; pl: plastídio; re: retículo endoplasmático liso; st: amido; va: vacúolo).



Capítulo 3

**ESTRUTURA DA ANTERA E ONTOGÊNESE DO PÓLEN DE ANNONACEAE E
SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS**

Natália Arias Galastri e Denise Maria Trombert Oliveira

N. A. Galastri

Departamento de Botânica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil.

Coordenadoria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Faculdade de Tecnologia de Jahu, Rua Frei Galvão s/nº, Jardim Pedro Ometto, Jaú, SP 17212-650, Brasil.

e-mail: nagalastri@yahoo.com.br

D. M. T. Oliveira

Departamento de Botânica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil

e-mail: dmtoliveira@icb.ufmg.br

Resumo

A morfologia do pólen é muito estudada em Annonaceae, sendo relevante para o entendimento de relações filogenéticas, no entanto, informações sobre a ontogênese polínica são escassas. Considerada esta importância, este trabalho objetivou caracterizar a microsporogênese e microgametogênese de *Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *Duguetia furfuracea*, *Guatteria australis* e *Xylopia aromatica*, espécies típicas do Cerrado. Para tanto, anteras em diversas fases foram coletadas e processadas usualmente. Em todas as espécies, a antera é biteca, tetrasporangiada e extrorsa. A formação da parede da antera é do tipo básico, com epiderme uniestratificada, endotécio com espessamentos parietais filiformes, duas camadas medianas e o tapete variável, amebóide em *A. emarginata* e *D. furfuracea*, e glandular nas demais. Septos individualizam as células arquesporiais em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica*, sendo parenquimáticos nesta última e tapetais nas outras. As camadas medianas são parcialmente reabsorvidas e o tapete completamente consumido durante a ontogênese. Formam-se vários microsporocitos por esporângio, com paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo volumoso. Inicia-se a meiose, formando díades (meiose I) e tétrades isobilaterais e/ou tetraédricas (meiose II). A meiose é sucessiva, exceto em *X. aromatica* que exibe o padrão simultâneo. Após a diferenciação dos microsporos, ocorre mitose, formando a célula vegetativa, maior e mais vacuolada, e a célula generativa, menor, fusiforme e periférica. A célula generativa é, então, englobada pela vegetativa, deslocando-se até próximo de seu núcleo. Simultaneamente, diferencia-se a parede do grão de pólen, constituída por intina e exina evidentes. O pólen é liberado por deiscência longitudinal, agrupado em tétrades em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica*, e disposto em mônades nas outras espécies. Este trabalho reforça que caracteres estruturais e ontogenéticos do pólen podem fornecer significativa contribuição à sistemática e filogenia de Annonaceae e à compreensão de seu *status* entre as Angiospermas basais. Chama a atenção que anteras septadas relacionam-se à formação de pólen composto e, dentre as *Annona* estudadas, *A. emarginata* é a mais distinta.

Palavras-chave: microsporogênese simultânea, microsporogênese sucessiva, antera septada, tapete.

Introdução

Annonaceae é a maior família basal de Angiosperma (Doyle et al. 2004; Doyle e Le Thomas 2012) e inclui aproximadamente 135 gêneros e 2.500 espécies, com distribuição predominantemente tropical (Doyle et al. 2004). A maioria das espécies apresenta flores hermafroditas e protogínicas, com receptáculo plano ou hemisférico (Heusden 1992; Ribeiro et al. 1999; Judd et al. 2008). O androceu é formado por numerosos estames com filetes curtos ou ausentes, raramente diferenciados do conectivo, podendo também ocorrer

estaminódios (Heusden 1992; Simpson 2006; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 2006; Judd et al. 2008).

Anteras tetrasporangiadas e não septadas são as mais comumente encontradas dentre as Angiospermas, mas, em Annonaceae, também ocorrem anteras septadas com as células arquesporais individualizadas por septos estéreis, formados pelo tapete ou por este e pelas camadas medianas (Johri et al.1992; Tsou e Johnson 2003).

Também se observa grande diversidade no desenvolvimento e na formação do pólen nesta família, que pode ser liberado na forma de mônades, tétrades ou políades, com diferentes mecanismos de coesão entre os grãos (Heusden 1992; Tsou e Fu 2002, 2007).

A morfologia do pólen tem sido extensivamente estudada em Annonaceae (Walker 1971a; Le Thomas 1980, 1981; Waha e Morawetz 1988) e a palinologia é considerada significativa para o entendimento de relações filogenéticas na família (Doyle et al. 2004; Doyle e Le Thomas 1997, 2012). No entanto, considerando a grande variabilidade existente, as informações sobre ontogenia do pólen ainda são escassas (Waha 1985, 1987; Waha e Hesse 1988; Gabarayeva 1995; Tsou e Fu 2002, 2007; Lora et al. 2009a) e as interpretações referentes a muitos aspectos evolutivos são hipotéticas ou carecem de forte suporte.

Como é comum em grandes famílias de Angiospermas, existem ainda muitas controvérsias taxonômicas e filogenéticas em Annonaceae. Dada a grande diversidade estrutural floral na família, é de se esperar que a ampliação dos estudos embriológicos, ainda tão escassos, possa ajudar a solucionar diversas dessas questões.

Assim, este trabalho objetivou descrever a estrutura da antera e os processos de microsporogênese e microgametogênese em sete espécies de Annonaceae, típicas do Cerrado, pertencentes a quatro dos maiores gêneros da família, a fim de reconhecer padrões e indicar potenciais diferenças que contribuam para novas análises taxonômicas e filogenéticas da família.

Material e Métodos

Foram coletadas anteras de botões florais e flores em antese de *Annona coriacea* Mart., *A. crassiflora* Mart., *A. dioica* A. St.-Hil., *A. emarginata* (Schltdl.) H.Rainer, *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff., *Guatteria australis* A. St.-Hil. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. em fragmentos de Cerrado nas proximidades do município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil (entre 22°41'28,55"S a 22°58'28,67"S e 48°16'43,83"W a 48°30'23,46"W). Ramos férteis foram herborizados e incluídos no Herbário BHCB do

Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, sob os seguintes números de registro e do coletor: *A. coriacea* (154419, Galastri, N.A. 8), *A. crassiflora* (154417, Galastri, N.A. 6), *A. dioica* com flores estaminadas (154422, Galastri, N.A. 11), *A. dioica* com flores hermafroditas (154423, Galastri, N.A. 12), *A. emarginata* (154421, Galastri, N.A. 10), *D. furfuracea* (154424, Galastri, N.A. 13), *G. australis* (154420, Galastri, N.A. 9) e *X. aromatica* (154418, Galastri, N.A. 7).

O material foi fixado em solução de formalina-ácido acético-etanol 50% (Johansen 1940) por 48 horas, conservado em etanol 70% (Jensen 1962) e desidratado em série etílica com posterior inclusão a frio (Paiva et al. 2011) em 2-hidroxietil-metacrilato (Leica[®]). A secção do material foi realizada em micrótomo rotativo com cerca de 7 μ m de espessura, obtendo-se séries transversais e longitudinais. As secções foram, então, coradas com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al. 1964, modificado) e montadas em Entellan[®].

Testes histoquímicos foram realizados em material fixado e incluído. Para identificar polissacarídeos ácidos e pectinas, utilizou-se vermelho de rutênio (Jensen 1962); para evidenciar lignina, floroglucinol em meio ácido (Sass 1951); para a localização de substâncias lipídicas, Sudan IV (Johansen 1940); para a detecção de amido, lugol (Johansen 1940); para verificar a ocorrência de compostos fenólicos, cloreto férrico acrescido de carbonato de sódio (Johansen 1940); para localizar proteínas, foi utilizado azul mercúrio de bromofenol (Mazia et al. 1953).

O laminário preparado foi analisado, e as imagens obtidas em microscópio Zeiss Axioskop 40 com câmara digital acoplada.

Resultados

Estrutura da antera

A antera de todas as espécies é biteca, tetrasporangiada (Fig. 1A) e extrorsa.

A formação da parede da antera é do tipo básico, em que a camada mediana externa e o endotécio têm a mesma origem, bem como a camada mediana interna e o tapete originam-se em comum (Fig. 1B). A epiderme é uniestratificada de células tangencialmente alongadas, vacuoladas e com núcleos evidentes (Fig. 1C). O endotécio apresenta células radialmente alongadas com paredes de espessamentos filiformes arqueados e lignificados (Fig. 1C-D), exceto sob o estômio. As duas camadas medianas são formadas por células tangencialmente alongadas, vacuoladas e com núcleos evidentes (Fig.

1C). O tapete é ameboide (Fig. 1E), de células de citoplasma denso e núcleos evidentes em *A. emarginata* e *D. furfuracea*, e glandular (Fig. 1F-G), de células cuboides de paredes delgadas, citoplasma denso e núcleos evidentes em *A. coriacea*, *A. dioica*, *A. crassiflora*, *X. aromatica* e *G. australis*.

As anteras de *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica* apresentam septos que individualizam as células arquesporiais, sendo parenquimáticos em *X. aromatica* (Fig. 1F), e apenas tapetais nas outras espécies (Fig. 1G). *Duguetia furfuracea*, *G. australis* e *A. emarginata* apresentam anteras asseptadas (Fig. 1H).

Durante a microsporogênese e a microgametogênese, as camadas medianas são parcialmente consumidas e o tapete é completamente reabsorvido (Fig. 1I).

Em meio ao tapete de *A. emarginata* e, posteriormente, entre seus grãos de pólen, observam-se drusas (Fig. 1D). Com exceção de *A. emarginata*, nas demais espécies, as paredes das células tapetais são digeridas e forma-se um periplasmódio ou sincício (Fig. 1J), que é completamente consumido até o final do desenvolvimento do pólen.

Devido à completa reabsorção do tapete ao longo do desenvolvimento do grão de pólen de *A. crassiflora*, *A. coriacea* e *A. dioica*, os septos das anteras desintegram-se completamente, pois sua origem é exclusivamente tapetal (Fig. 1K). Já em *X. aromatica*, como os septos são formados por várias camadas além do tapete, eles mantêm-se até a deiscência da antera (Fig. 1L).

Microsporogênese

Em anteras muito jovens, contidas em botões florais, as células do tecido esporogênico dividem-se e originam vários microsporocitos, arranjados em uma única fileira no sentido longitudinal da antera, os quais apresentam paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo volumoso, sendo bem diversos das células dos estratos parietais (Fig. 2A-B).

Nas espécies de anteras septadas, os microsporocitos são individualizados pelo tapete em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* (Fig. 2B), ou pelo tapete e pelas camadas medianas em *X. aromatica* (Fig. 2C).

Uma camada de calose é depositada ao redor de cada microsporocito (Fig. 2C), que então inicia a meiose, formando, inicialmente, uma díade na meiose I (Fig. 2D-F) e, posteriormente, uma tétrade na meiose II (Fig. 2G-K). Ocorrem tétrades isobilaterais e tetraédricas em *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica* (Fig. 2H) e *X. aromatica*, e apenas isobilaterais em *A. emarginata* (Fig. 2J), *D. furfuracea* (Fig. 2I) e *G. australis*. Com

exceção de *X. aromatica*, que apresenta meiose simultânea (Fig. 2K), as outras espécies estudadas apresentam meiose sucessiva, com formação de parede individualizando os microsporos ao final de cada fase da divisão (Fig. 2G-J).

Em todas as espécies estudadas, durante a meiose, a díade e a tétrade formadas permanecem envoltas pela camada de calose que envolvia o microsporocito (Fig. 2F-G, J), de modo que os microsporos mantêm-se unidos.

A tétrade formada é individualizada formando mônades apenas em *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*, permanecendo indivisa nas outras espécies.

Microgametogênese

Após a formação dos microsporos, começa a deposição da esporoderme, concomitante à vacuolação e crescimento do grão de pólen (Fig. 2L-M). Em *A. emarginata*, primeiramente forma-se a exina e a intina (Fig. 2N) e, só depois é que ocorre o crescimento do grão de pólen.

Em *A. crassiflora*, *A. coriacea* e *A. dioica*, a deposição da esporoderme inicia-se na região proximal dos microsporos (Fig. 2M). Enquanto a parede do pólen é depositada, os grãos continuam crescendo, sendo delimitados pelo revestimento de calose (Fig. 3A). Então, os grãos de pólen sofrem rotação de 180°, a esporoderme passa a ser distal e ocorre a união da tétrade pela região proximal (Fig. 1J, 3B-D). A seguir, substâncias pécticas depositam-se do centro para a periferia da tétrade, formando a intina (Fig. 3E-F).

Em *X. aromatica*, devido à esporogênese simultânea, a tétrade de microsporos não se separa, permanecendo unida pela região proximal, e a deposição da esporoderme acontece apenas na porção distal de cada grão de pólen (Fig. 2L, 3G).

Após a estruturação da esporoderme, inicia-se a primeira mitose (Fig. 3G). Desta divisão, formam-se a célula vegetativa, maior e mais vacuolada, e a célula generativa, menor, fusiforme, localizada perifericamente (Fig. 3H-I). A célula generativa é, então, englobada pela célula vegetativa e vai se deslocando até bem próximo do núcleo da célula vegetativa (Fig. 3J-L).

A parede do grão de pólen é constituída por intina e exina muito distintas (Fig. 3L), exceto em *G. australis* (Fig. 3M). A exina é espessa e ornamentada em *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica* e *A. emarginata* (Fig. 3L), delgada e ornamentada em *D. furfuracea* (Fig. 3K) e espessa e lisa em *X. aromatica* (Fig. 1L, 3G). Em *G. australis*, observa-se exina reduzida e lisa e intina espessa e evidente (Fig. 3M).

No momento da antese o pólen é bicelular (Fig. 3K-M), liberado em tétrades em *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica* (Fig. 1K) e *X. aromatica* (Fig. 1L), e em mônades em *A. emarginata* (Fig. 3N), *D. furfuracea* e *G. australis* (Fig. 3M). O pólen apresenta reserva proteica em todas as espécies, e amido não é observado somente nos grãos de pólen de *G. australis*. Em *X. aromatica*, além da reserva de amido no pólen, observam-se grãos de amido por entre os grãos de pólen, constituindo resquícios do tapete.

O pólen de *A. emarginata* e *D. furfuracea* é inaperturado (Fig. 3K). Em *G. australis*, observa-se uma zona de abertura que circunda todo o grão de pólen, ou seja, o pólen é zonaperturado (Fig. 3O). Nas outras espécies, onde o pólen é liberado em tétrades, a região germinativa encontra-se na junção da tétrade, na porção proximal de cada grão de pólen (Fig. 3P).

Nas sete espécies, a liberação do pólen é dada por deiscência longitudinal das anteras. A abertura ocorre entre os esporângios de cada teca e após sua fusão, na região em que se encontram somente células de paredes delgadas, formando o estômio (Fig. 1I).

Discussão

As espécies investigadas apresentam diferenças importantes nos processos de microgametogênese e microsporogênese. A literatura indica a uniformidade de muitos caracteres embriológicos em Annonaceae (Periasamy e Swamy 1961; Johri et al, 1992; Svoma 1998; Tsou e Johnson 2003), no entanto algumas diferenças marcantes são encontradas e podem ser significativas para análises taxonômicas e filogenéticas (Tabela 1).

A formação da parede da antera das sete espécies estudadas é do tipo básico, assim como proposto por Johri et al. (1992) para a família.

Dentre as espécies analisadas, apenas *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis* apresentam antera tetrasporangiada e asseptada, o tipo mais comum de antera encontrado nas Angiospermas (Johri et al. 1992; Tsou e Johnson 2003). Nas outras três espécies de *Annona* e em *X. aromatica*, há anteras septadas, descritas também para outras Annonaceae (Herms 1907; Periasamy e Thangavel 1988; Heusden 1992; Johri et al. 1992; Tsou e Johnson 2003). Segundo Tsou e Johnson (2003), as anteras septadas podem ser do tipo tapetal (tipo T), aqui registrado em *A. crassiflora*, *A. coriacea* e *A. dioica*, e do tipo parenquimático (tipo P), documentado apenas em *X. aromatica*.

Contrapondo-se os dados aqui apresentados e os da literatura, o tipo de septo parece ser constante no gênero *Xylopia*. A literatura registra que, como *X. aromatica*, *X.*

aethiopica (Lecomte 1896), *X. nigricans* (Periasamy e Thangavel 1988), *X. arenaria* e *X. parviflora* (Tsou e Johnson 2003), possuem septo parenquimático, não havendo descrição diversa desta. Para *Annona*, é típica a ocorrência de septo tapetal, aqui observado em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*, além de previamente documentado para *A. squamosa* (Juliano 1935; Periasamy e Kandasamy 1981), *A. muricata* (Juliano 1935), *A. glabra*, *A. montana* (Tsou e Fu 2002; Tsou e Johnson 2003) e *A. cherimola* (Lora et al. 2009a).

Annona emarginata, contudo, apresenta anteras asseptadas, mas deve-se destacar que a espécie foi incluída neste gênero apenas recentemente, a partir do trabalho de Rainer (2007), que transferiu espécies de *Rollinia* para *Annona* em função de análises moleculares de trnL, rpl16 e ITS2 (Rainer et al., dados não publicados). Em *Rollinia*, ocorrem septos tapetais em espécies como *R. mucosa* (Tsou e Johnson 2003), mas também há anteras asseptadas como em *A. emarginata*. Essas observações indicam que o ancestral comum a *Annona* e *Rollinia* deve apresentar septo tapetal, como já sugerido por Tsou e Johnson (2003). O estado asseptado das anteras de *A. emarginata* pode, então, ser visto como uma reversão, que pode ser relacionada à produção de mônades.

A existência de septos nas anteras permite maior contato entre as células do tapete e as unidades polínicas (Tsou e Johnson 2003), o que resulta em nutrição mais eficiente durante o desenvolvimento do pólen e, conseqüentemente, em maior crescimento destes (Walker 1971a), apesar de levar à diminuição do número de células esporogênicas.

Outra análise interessante é que estames septados também parecem estar associados com a formação de pólen composto na família, pois anteras septadas foram aqui relatadas apenas em espécies que produzem tétrades (*A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica* e *X. aromatica*), enquanto que as espécies que formam mônades (*A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*) apresentam anteras asseptadas. Isso também foi observado por Walker (1971a), Guinet e Le Thomas (1990) e Tsou e Johnson (2003), que consideraram a presença de pólen composto e antera septada como estados derivados em Annonaceae.

Outra variação observada neste trabalho refere-se aos microsporocitos, que apresentam meiose simultânea em *X. aromatica* e sucessiva nas demais espécies. Para *Annona*, a maioria das espécies tem sido descrita como tendo meiose sucessiva, com desenvolvimento centrífugo da placa celular que divide as células-filhas (Juliano 1935; Tsou e Fu 2002; Tsou e Johnson 2003), assim como observado para as *Annona* aqui analisadas. Porém, para *Xylopia*, Periasamy e Thangavel (1988) e Tsou e Johnson (2003) descreveram meiose sucessiva, o que não corrobora o registrado para *X. aromatica*, que apresenta desenvolvimento centrípeto da parede celular.

A formação de tétrades de grãos de pólen é comum nas Annonaceae e tem sido descrita para muitos gêneros da família (Walker 1971a, 1971b; Le Thomas 1980, 1981; Johri et al. 1992; Tsou e Johnson 2003; Tsou e Fu 2002, 2007). Este aspecto é consistente dentro dos gêneros, e é de significância na determinação de relações filogenéticas.

Todas as *Annona* já estudadas por Periasamy e Kandasamy (1981), Tsou e Johnson (2003) e Lora et al. (2009a) apresentam pólen liberado em tétrades. Das quatro espécies de *Annona* estudadas, apenas *A. emarginata* dispersa mônades polínicas, o que pode ser explicado pelo fato desta espécie até há pouco tempo, pertencer ao gênero *Rollinia*. Segundo Walker (1971a) e Le Thomas et al. (1992), o pólen de *Rollinia* é simples e liberado individualmente; Tsou e Johnson (2003), ao estudar *R. mucosa*, também confirmaram a liberação do pólen em mônades, o que pode ser indicativo de que este é um estado típico do gênero, que não corrobora a inclusão de *Rollinia* em *Annona*.

Dentre as *Xylopia* já estudadas, *X. aethiopica* (Lecomte 1896), *X. arenaria*, *X. parviflora* (Tsou e Johnson 2003) e *X. nigricans* (Periasamy e Thangavel 1988) liberam tétrades de grãos de pólen, assim como *X. aromatica*. *Duguetia furfuracea* apresenta grãos de pólen solitários, assim como observado para outras *Duguetia* por Walker (1971a), Le Thomas et al. (1994) e Le Thomas (2003). E *Guatteria australis*, assim como as espécies de *Guatteria*, *Guatterriopsis* e *Guatteriella* estudadas por Walker (1971a) e Morawetz e Waha (1985), apresentam grãos de pólen liberados em mônades.

Da análise desses dados pode-se concluir que a liberação do pólen em mônades, tétrades ou poliades é uma característica constante dentro de cada gênero tradicional de Annonaceae. Em gêneros com nova circunscrição, a partir de análises filogenéticas moleculares, fazem-se necessários estudos mais amplos sobre o desenvolvimento do pólen, caso de *Annona*, especialmente das espécies que pertenciam a *Rollinia* antes de Rainer (2007).

Segundo Walker (1971a), a liberação do pólen em agregados pode aumentar a eficiência da polinização, pois mais grãos de pólen são transferidos por um único polinizador. Outro benefício da dispersão polínica em grupos é a proteção contra a desidratação e a entrada de patógenos através das finas paredes da abertura dos poros do pólen.

Comparativamente, poucos estudos têm focado na coesão entre os grãos de pólen da tétrade em Annonaceae. Su e Saunders (2003) disseram que em *Pseuduvaria*, ocorre coesão simples entre as paredes dos grãos de pólen, devido à redução da exina. Tsou e Fu (2002, 2007) e Lora et al. (2009a) demonstraram um mecanismo envolvendo um envelope

de calose-celulose em *Annona* que durante o processo de digestão da calose, é apenas parcialmente digerido, e o remanescente da estrutura calose-celulose gradualmente se liga à fina camada periférica de exina dos quatro microsporos. Devido à contração da estrutura de calose-celulose e à expansão dos microsporos, os quatro microsporos sofrem uma rotação de 180°, resultando em uma inversão das paredes proximal e distal e na união dos microsporos pelo sistema de ligação calose-celulose, formando uma tétrade permanente, com a exina mais fina na parede proximal. Isso também foi aqui observado em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*, indicando que pode haver um padrão na formação das tétrades do gênero *Annona*.

Um dos caracteres mais significativos na análise dos grãos de pólen é o tipo, a posição e o número de aberturas presentes. O pólen de *A. emarginata* e *D. furfuracea* é inaperturado, como descrito para a maioria das Annonaceae já documentadas (Veloso e Barth 1962; Walker 1971a; Knox 1984; Le Thomas et al. 1992, 1994; Le Thomas 2003; Lora et al. 2009a).

Waha e Hesse (1988) propuseram a utilização dos caracteres da intina para o reconhecimento das áreas de abertura do pólen; até então, eram exclusivamente empregadas as modificações da exina, negligenciando as da intina. Assim, tem-se pólen com exina inaperturada, mas com intina com área que funciona como abertura, que também foi observado por Chaowasku et al. (2008). Deste modo, fazem-se necessários estudos em microscopia eletrônica de transmissão para concluir se o pólen de *A. emarginata* e *D. furfuracea* são inaperturados, ou se apresentam modificações da intina, pois em microscopia de luz essa análise não é possível.

O pólen zonaperturado descrito para *G. australis*, também foi descrito para outras espécies de *Guatteria* e para *Guatteriopsis*, *Guatteriella* e *Heteropetalum* (Morawetz e Waha 1985), mas Walker (1971a) registrou pólen dissulcado para os referidos gêneros e Veloso e Barth (1962) relataram, para *G. australis*, *G. dusenii* e *G. salicifolia*, pólen inaperturado.

Nas outras espécies em que o pólen é liberado em tétrades, o poro por onde germina o tubo polínico encontra-se na junção da tétrade, na região proximal de cada grão de pólen, assim como descrito para outras Annonaceae (Periasamy e Swamy 1959; Walker 1971a; Rosell et al. 1999; Gabarayeva 1993). Segundo Hesse et al. (2009), considerando-se apenas o pólen maduro, a abertura nas tétrades será sempre proximal, devido à rotação de 180° que ocorre durante o desenvolvimento e coesão entre os grãos, onde o polo distal torna-se proximal.

Outro caráter importante a se considerar é a esporoderme, com exina espessa e ornamentada em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *A. emarginata*, reduzida e ornamentada em *D. furfuracea*, espessa e lisa em *X. aromatica* e reduzida e lisa em *G. australis*. Esses dados corroboram os de Walker (1971a), que descreveu para *Annona* e *Xylopia* a presença de espessa exina, para *Duguetia*, exina delgada, e para *Guatteria*, exina altamente reduzida com intina visível e espessa.

De acordo com Knox (1984), caracteres como o espessamento da exina, ornamentação, tipo de abertura e presença de diferentes componentes adesivos na superfície, têm significado adaptativo. É possível estabelecer conexão entre a estrutura do pólen e os mecanismos de polinização, pois, segundo o autor, o tipo de polinização está relacionado com o tipo de esporoderme, que tende a ser espessa e ornamentada nas espécies que possuem polinização por animais. Esta generalização não parece ser aplicável a Annonaceae, pois *G. australis* e *X. aromatica*, assim como *Annona* e *Duguetia*, apresentam cantarofilia e, portanto, deveriam formar grãos de pólen com esporoderme semelhante, o que não se observa.

Com relação à presença de reservas, com exceção de *G. australis*, o pólen das outras seis espécies apresenta amido. Reserva de amido no grão de pólen só foi observada anteriormente em *A. cherimola* (Lora et al. 2009a). Essa reserva provavelmente favorece o crescimento do tubo polínico, além de fornecer alimento aos besouros e tripes que visitam e polinizam as espécies de *Annona*, *Duguetia* e *Xylopia* estudadas. Esses insetos podem ingerir o pólen inteiro ou, no caso dos tripes, podem apenas sugar o conteúdo dos grãos de pólen (Saunders 2010). Reserva proteica foi encontrada no pólen das sete espécies estudadas, sendo um relato inédito para Annonaceae. Provavelmente, estas reservas também atuam como recompensa aos insetos polinizadores.

No momento da dispersão, o pólen das sete espécies estudadas é bicelular. Segundo Knox (1984), a maioria das Angiospermas dispersa o pólen nesta condição. No entanto, em *A. cherimola*, Rosell et al. (1999) relataram a dispersão de pólen tricolular e Lora et al. (2009b) observaram a liberação de uma mistura de grãos em ambos os estados. Os estudos de Lora et al. (2009b) mostraram que, em *A. cherimola*, embora tanto o pólen bi quanto tricolular germinem, o tricolular apresenta germinação mais rápida. A presença dos dois tipos de pólen pode ser considerada como uma estratégia para aumentar a chance de fertilização, já que o pólen bicelular tem germinação lenta e grande longevidade, enquanto o pólen tricolular apresenta germinação rápida e pequena longevidade (Rosell et al. 2006; Lora et al. 2009b).

Conclui-se, então, que a microsporogênese e microgametogênese em Annonaceae apresentam peculiaridades marcantes que podem ser utilizadas na identificação de gêneros ou espécies. *Guatteria australis* distingue-se das espécies dos outros gêneros estudados pelo pólen zonaperturado, com exina reduzida e intina espessa, e liberado em mônades. *Xylopia aromatica* apresenta meiose simultânea, anteras com septos parenquimáticos e pólen sem ornamentação da exina e liberado em tétrades. Todas as *Annona*, com exceção de *A. emarginata*, apresentam anteras com septos tapetais e pólen liberado em tétrades com exina espessa e ornamentada. *Annona emarginata*, anteriormente em *Rollinia*, apresenta anteras asseptadas e pólen liberado em mônades, diferindo amplamente do encontrado nas outras espécies de *Annona*, o que é um indício que os dois gêneros compartilham características estruturais que parecem insuficientes para corroborar sua fusão. Na análise da embriologia masculina, *A. emarginata* assemelha-se mais a *D. furfuracea*, espécie que também apresenta anteras asseptadas, pólen inaperturado, com exina delgada, liberado em mônades.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida a Denise Maria Trombert Oliveira. A Wilma de Grava Kempinas pela cessão de equipamentos. Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, pela cessão de equipamentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. A Renato de Mello Silva, pela identificação das espécies.

Referências

- Chaowasku T, Mols J, Van der Ham RWJM (2008) Pollen morphology of *Miliusa* and relatives (Annonaceae). *Grana* 47: 175–184
- Doyle JA, Le Thomas A (1997) Significance of palynology for phylogeny of Annonaceae: experiments with removal of pollen characters. *Plant Syst Evol* 206: 133–159
- Doyle JA, Le Thomas A (2012) Evolution and phylogenetic significance of pollen in Annonaceae. *Bot J Linn Soc* 169: 190–221
- Doyle JA, Sauquet H, Scharaschkin T, Le Thomas A (2004) Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). *Int J Plant Sci* 165 (4 Suppl.): S55–S67

- Gabarayeva NI (1993) Sporoderm development in *Asimina triloba* (Annonaceae). II. The developmental events after callose dissolution. Grana 32: 210–220
- Gabarayeva NI (1995) Pollen wall and tapetum development in *Anaxagorea brevipes* (Annonaceae): sporoderm substructure, cytoskeleton, sporopollenin precursor particles, and the endexine problem. Rev Palaeobot Palyno 85: 123–152
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I (2006) In the evening when the beetles come: pollination in Annonaceae e *Philodendron*. In: Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I (eds) Life in the Cerrado: a South American tropical seasonal ecosystem. Pollination and seed dispersal, v 2. Reta Verlag, Ulm, pp 138–159
- Guinet P, Le Thomas A (1990) Current knowledge and interpretation of the pollen characters in Annonaceae and Leguminosae, subfamily Mimosoideae. Rev Palaeobot Palyno 64: 109–127
- Herns WB (1907) Contributions to the life history of *Asimina triloba*. Ohio Nat 8: 211–217
- Hesse M, Halbritter H, Weber M (2009) *Beschorneria yuccoides* and *Asimina triloba* (L.) Dun: examples for proximal polar germinating pollen in angiosperms. Grana 48: 151–159
- Heusden ECH van (1992) Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. Blumea, Supplement 7: 7–36
- Jensen WA (1962) Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman, San Francisco
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS (1992) Comparative embryology of Angiosperms. Springer, Berlin
- Juliano JB (1935) Morphological contributions on the genus *Annona*. Philipp Agric 24: 528–541
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2008) Plant systematics: a phylogenetic approach, 3ed. Sinauer Associates, Massachusetts
- Knox RB (1984) The pollen grain. In: Johri BM (ed) Embryology of Angiosperms. Springer, Berlin

- Lecomte H (1896) Sur la formation du pollen chez les Anonacées. Bull Mus His Nat (Paris) 2: 152–153
- Le Thomas A (1980) Ultrastructure characters of the pollen grains of African Annonaceae and their significance for the phylogeny of primitive angiosperms (first part). Pollen and Spores 22: 267–342
- Le Thomas A (1981) Ultrastructure characters of the pollen grains of African Annonaceae and their significance for the phylogeny of primitive angiosperms (second part). Pollen and Spores 22: 267–342
- Le Thomas A (2003) Palynology. In: Maas PJM, Westra LYTh, Chatrou LW and collaborators (eds) *Duguetia* (Annonaceae). Flora Neotropica: Monograph 88: 41–44
- Le Thomas A, Waha M, Morawetz W (1992) Palynology. In: Maas PJM, Westra LYTh and collaborators (eds) *Rollinia*. Flora Neotropica: Monograph 57: 31–36
- Le Thomas A, Lugardon B, Doyle JA (1994) Pollen ultrastructures and relationships of *Fusaea* (Baillon) Safford and *Duguetia* A. Saint-Hilaire (Annonaceae). Rev Palaeobot Palyno 83: 55–64
- Lora J, Testillano PS, Risueño MC, Hormaza JI, Herrero M (2009a). Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae): implications for the evolution of aggregated pollen. BMC Plant Biol 9: 129–138
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2009b) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): implications for pollen evolution. Am J Bot 96: 802–808
- Mazia D, Brewer PA, Albert M (1953) The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. Biol Bull 104: 57–67
- Morawetz W, Waha M (1985) A new pollen type, C-banded and fluorochrome counterstained chromosomes, and evolution in *Guatteria* and related genera (Annonaceae). Plant Syst Evol 150: 119–141
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368–373
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT (2011) Large plant samples: how to process for GMA

- embedding? In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN (eds) Light microscopy: methods and protocols. Springer/Humana Press, New York, pp 37–49
- Periasamy K, Kandasamy MK (1981) Development of the anther of *Annona squamosa* L. *Ann Bot* 48: 885–893
- Periasamy K, Swamy BGL (1959) Studies in the Annonaceae I: microsporogenesis in *Cananga odorata* and *Miliusa wightiana*. *Phytomorphology* 9: 251–263
- Periasamy K, Swamy BGL (1961) Studies in the Annonaceae. II. The development of ovule and seed in *Cananga odorata* and *Miliusa wightiana*. *J Indian Bot Soc* 40: 206–216
- Periasamy K, Thangavel S (1988) Anther development in *Xylopia nigricans*. *Proc Indian Acad Sci (Plant Sci)* 98: 251–255
- Rainer H (2007) Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.St-Hil. *Ann Naturhist Mus Wien* 108B: 191–205
- Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM, Souza MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção PACL, Pereira EC, Silva CF, Mesquita MR, Procópio LC (1999) Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central. Inpa, Manaus, pp. 121–135
- Rosell P, Herrero M, Saúco VG (1999) Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). In vivo characterization and optimization of in vitro germination. *Sci Hort* 81: 251–265
- Rosell P, Saúco VG, Herrero M (2006) Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. *Sci Hort* 109: 97–100
- Sass JE (1951) Botanical microtechnique. Iowa State University, Ames
- Saunders RMK (2010) Floral evolution in the Annonaceae: hypotheses of homeotic mutations and functional convergence. *Biol Rev* 85: 571–591
- Simpson MG (2006) Plant systematics. Elsevier Academic Press, San Diego
- Su YCF, Saunders RMK (2003) Pollen structure, tetrad cohesion and pollen-connecting threads in *Pseuduvaria* (Annonaceae). *Bot J Linn Soc* 143: 69–78

- Svoma E (1998) Studies on the embryology and gynoecium structures in *Drimys winteri* (Winteraceae) and some Annonaceae. *Plant Syst Evol* 209: 205–229
- Tsou CH, Fu YL (2002) Tetrad pollen formation in *Annona* (Annonaceae): proexine formation and binding mechanism. *Am J Bot* 89: 734–747
- Tsou CH, Fu YL (2007) Octad pollen formation in *Cymbopetalum* (Annonaceae): the binding mechanism. *Plant Syst Evol* 263: 13–23
- Tsou CH, Johnson DM (2003) Comparative development of aseptate and septate anthers of Annonaceae. *Am J Bot* 90: 832–848
- Veloso HP, Barth OM (1962) Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil meridional. I. Magnoliaceae, Annonaceae, Lauraceae e Myristicaceae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 60: 59–93
- Walker JW (1971a) Pollen morphology, phytogeography and phylogeny of the Annonaceae. *Contrib Gray Herb* 202: 1–132
- Walker JW (1971b) Unique type of Angiosperm pollen from the family Annonaceae. *Science* 172: 565–567
- Waha M (1985) Ultrastruktur und systematische bedeutung des pollens bei *Bocageopsis*, *Ephedranthus*, *Malmea* und *Unonopsis* (Annonaceae). *Plant Syst Evol* 150: 165–177
- Waha M (1987) Different origins of fragile exines within the Annonaceae. *Plant Syst Evol* 158: 23–27
- Waha M, Hesse M (1988) Aperture types within *Sapranthus* and *Polyalthia* (Annonaceae). *Plant Syst Evol* 161: 135–146
- Waha M, Morawetz W (1988) Pollen evolution and systematics in Annonaceae with special reference to the disulcate Australian endemic genera. *Plant Syst Evol* 161: 1–12

Tabela 1 Dados comparativos referentes à embriologia masculina dos gêneros estudados de Annonaceae, disponíveis na literatura e, em particular, neste trabalho. Os números indicam, no rodapé da tabela, as espécies e os trabalhos referidos; os estados em negrito são compartilhados pelas espécies já estudadas desses gêneros.

Caráter	<i>Annona</i>	<i>Duguetia</i>	<i>Guatteria</i>	<i>Xylopia</i>
Formação da parede da antera	Básico ^(2, 17)	Básico ⁽¹⁷⁾	Básico ⁽¹⁷⁾	Básico ⁽¹⁷⁾
Septo	Asseptado ⁽¹⁷⁾ Tapetal ^(1, 2, 4, 3, 17)	Asseptado ^(6, 17)	Asseptado ^(6, 17)	Parenquimatoso ^(2, 6, 10, 14, 17)
Meiose	Sucessiva ^(1, 2, 4, 13, 17) Simultânea ⁽³⁾	Sucessiva ⁽¹⁷⁾	Sucessiva ⁽¹⁷⁾	Sucessiva ^(2, 10) Simultânea ⁽¹⁷⁾
Tipo de tétrade	Isobilateral ^(3, 17) Tetraédrica e isobilateral ⁽¹⁷⁾	Isobilateral ⁽¹⁷⁾	Isobilateral ⁽¹⁷⁾	Isobilateral ⁽¹⁰⁾ Tetraédrica e isobilateral ⁽¹⁷⁾
Início da deposição da exina	Concomitante ao crescimento do pólen ^(1, 17) Antes do crescimento do pólen ⁽¹⁷⁾	Concomitante ao crescimento do pólen ⁽¹⁷⁾	Concomitante ao crescimento do pólen ⁽¹⁷⁾	Concomitante ao crescimento do pólen ⁽¹⁷⁾
Revestimento de calose	Prévio à meiose ^(1, 4, 17)	Prévio à meiose ⁽¹⁷⁾	Prévio à meiose ⁽¹⁷⁾	Prévio à meiose ⁽¹⁷⁾
Ligação da tétrade	Calose-celulose ⁽¹⁷⁾	Não relatado	Não relatado	Simplex ⁽¹⁷⁾
Superfície Exina	Ornamentada: ^(5, 6, 17)	Ornamentada ^(6, 8, 12, 17)	Lisa ⁽⁶⁾	Lisa ⁽¹⁷⁾
Espessura da Exina	Delgada ⁽²⁾ Espessa ^(2, 4, 6, 17)	Delgada ^(5, 6, 8, 12, 17)	Delgada ^(5, 6, 16, 17)	Espessa ^(5, 6, 17) Reduzida ⁽⁶⁾ Não tem exina ⁽²⁾
Liberação do pólen	Mônade ^(2, 6, 11, 17) Díade ⁽³⁾	Mônade ^(6, 8, 12, 17)	Mônade ^(6, 16, 17) Políade ⁽⁵⁾	Tétrade ^(2, 6, 10, 14, 17) Políade ⁽⁶⁾

	Tétrade ^(1, 2, 3, 4, 6, 17)			Não isolados ⁽⁵⁾
Abertura do Pólen	Inaperturado ^(1, 5, 6, 11, 17) Abertura proximal ^(6, 17)	Inaperturado ^(5, 6, 8, 12, 17)	Inaperturado ⁽⁵⁾ Dissulcado ⁽⁶⁾ Zonaperturado ^(16, 17)	Inaperturado ⁽⁵⁾ Poro proximal ^(6, 17)
Pólen na dispersão	Bicelular ^(3, 17) Tricelular ^(7, 15) Bi e tricelular ^(1, 9)	Bicelular ⁽¹⁷⁾	Bicelular ⁽¹⁷⁾	Bicelular ^(10, 17)
Cristais	No tapete ^(2, 17) Entre os grãos de pólen ⁽¹⁷⁾	Não relatado	Não relatado	Entre os grãos de pólen ⁽²⁾
Reserva de amido na célula vegetativa	No pólen ^(1, 17)	No pólen ⁽¹⁷⁾	Não relatado	No pólen ⁽¹⁷⁾ Entre os grãos de pólen ⁽²⁾
Reserva de proteína na célula vegetativa	No pólen ⁽¹⁷⁾	No pólen ⁽¹⁷⁾	No pólen ⁽¹⁷⁾	No pólen ⁽¹⁷⁾
Tipo de Tapete	Glandular ^(1, 2, 3, 17) Ameboide ⁽¹⁷⁾ Periplasmódio ^(3, 13, 17)	Ameboide ⁽¹⁷⁾ Periplasmódio ⁽¹⁷⁾	Glandular ⁽¹⁷⁾	Glandular ^(10, 17)

(1) Lora et al. (2009a), *Annona cherimola*; (2) Tsou e Johnson (2003), *Annona glabra*, *A. montana*, *Artabotrys hexapetalus*, *Asimina triloba*, *Cananga odorata*, *Cymbopetalum brasiliense*, *Fissistigma oldhamii*, *Froesiodendron amazonicum*, *Goniothalamus amuyon*, *Hornschuchea polyantha*, *Monodora minor*, *Porcelia magnifruca*, *Rollinia mucosa*, *Xylopiia arenaria*, *Xylopiia parviflora*; (3) Periasamy e Kandasamy (1981), *Annona squamosa*; (4) Tsou e Fu (2002), *Annona glabra* e *A. montana*; (5) Veloso e Barth (1962), *Guatteria australis*, *Guatteria dusenii*, *Guatteria salicifolia*, *Rollinia rugulosa*, *Rollinia exalbida*, *Rollinia sericea*, *Duguetia lanceolata*, *Xylopiia brasiliensis*, *Porcelia macrocarpa*; (6) Walker (1971a), *Guatteria*, *Annona*, *Rollinia*, *Xylopiia*, *Duguetia* e outros gêneros de Annonaceae; (7) Rosell et al. (1999), *Annona cherimola*; (8) Le Thomas et al. (1994), *Duguetia furfuracea* e *Duguetia spixiana*, *Fusaea longifolia*; (9) Lora et al. (2009b), *Annona cherimola*; (10) Periasamy e Thangavel (1988), *Xylopiia nigricans*; (11) Le Thomas et al. (1992), *Rollinia*; (12) Le Thomas (2003), *Duguetia stelechantha*, *D. spixiana* e *D. furfuracea*; (13) Juliano (1935), *Annona squamosa* e *A. muricata*; (14) Lecomte (1896), *Xylopiia aethiopica*; (15) Rosell et al. (2006), *Annona cherimola*; (16) Morawetz e Waha (1985), *Guatteria*, *Guatteriopsis*, *Guatteriella* e *Heteropetalum*; (17) este estudo.

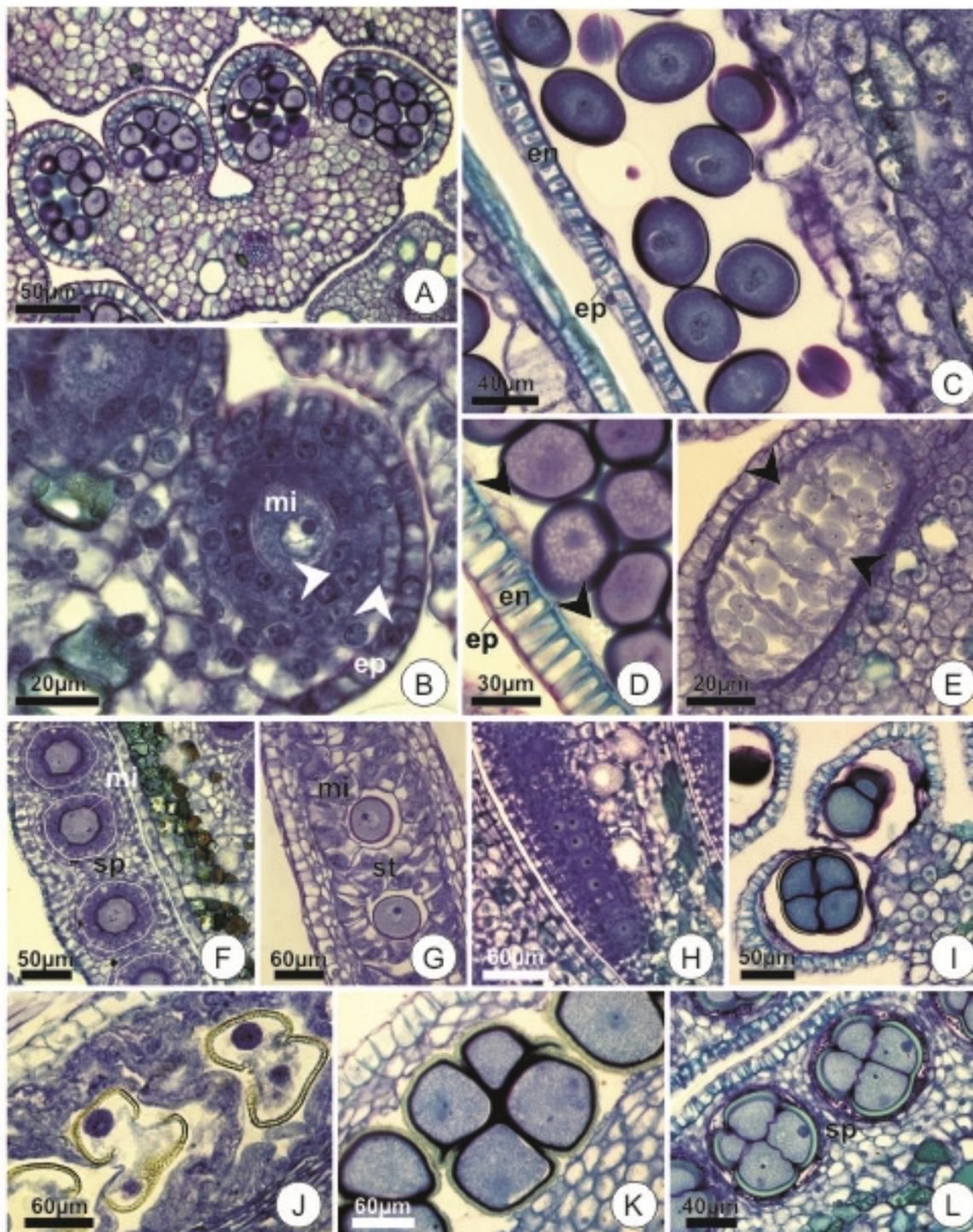


Fig. 1 Estrutura da antera. *Annona coriacea* (G, J-K), *Annona dioica* (B), *Annona emarginata* (A, D-E), *Guatteria australis* (C, H) e *Xylopia aromatica* (F, I, L). Secções longitudinais (C-H, J-L). Secções transversais (A, B, I). A. Vista geral da antera. B-C. Detalhe da parede da antera. D. Detalhe do endotécio; observam-se cristais (ponta de seta) por entre os grãos de pólen. E. Microsporos jovens entremeados pelo tapete amebóide; observam-se cristais (ponta de seta). F. Antera com septo parenquimático. G. Antera com septo tapetal. H. Antera asseptada. I. Antera pouco antes da deiscência, observar o estômio. J. Formação de periplasmódio e união de microsporos. K. Tétrade de pólen. L. Tétrades de grãos de pólen com exina espessa e lisa, separadas pelos septos parenquimáticos. (en = endotécio; ep = epiderme; mi = microsporocito; sp = septo parenquimático; st = septo tapetal).

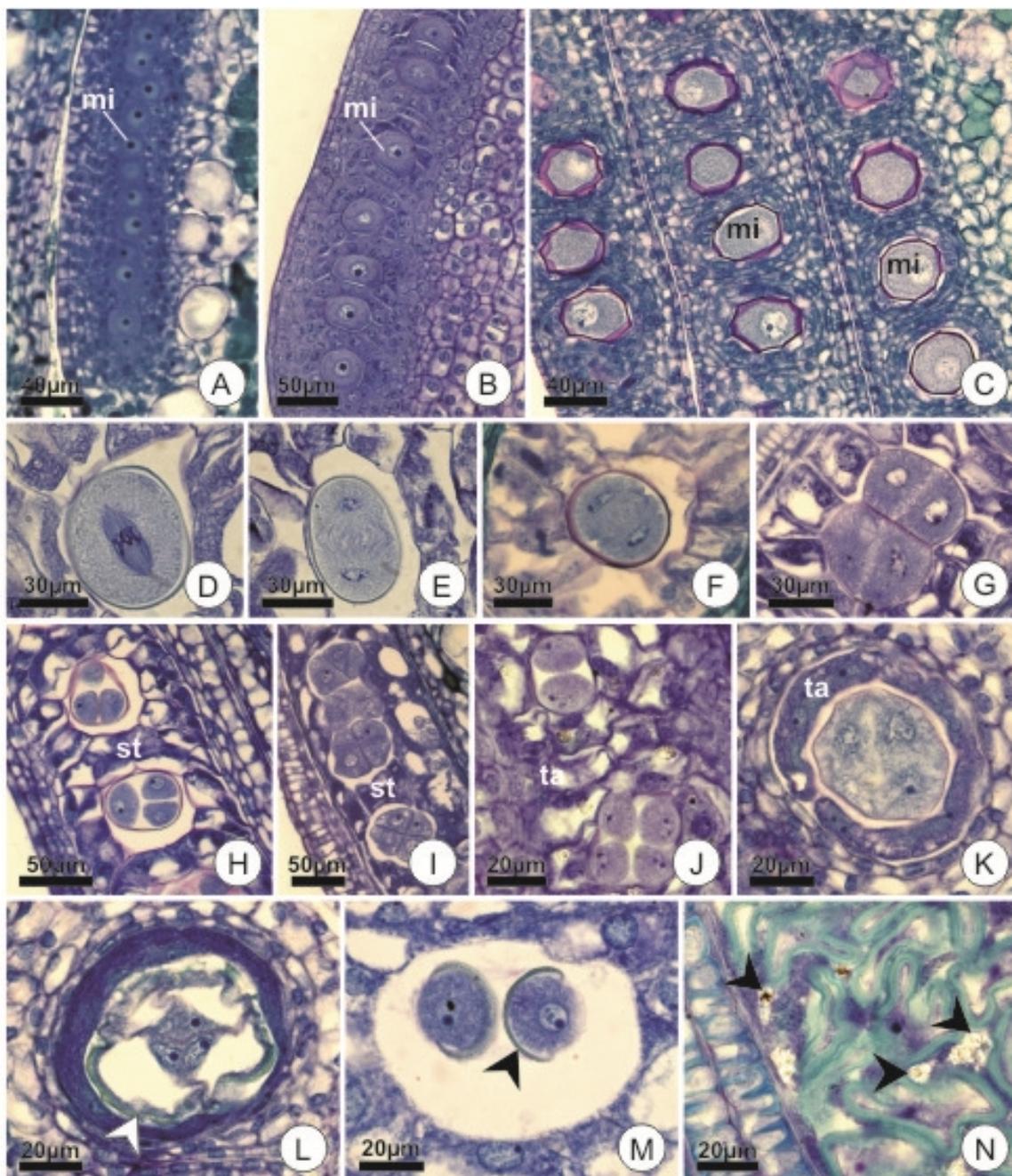


Fig. 2 Microsporogênese e microgametogênese em *Annona coriacea* (B, D-E), *Annona crassiflora* (F, M), *Annona dioica* (H), *Annona emarginata* (J, N), *Duguetia furfuracea* (G, I), *Guatteria australis* (A) e *Xylopia aromatica* (C, K-L). Secções longitudinais (A-J, M-N). Secções transversais (K-L). A-B. Microsporocitos. C. Depósito de calose ao redor de cada microsporocito. D. Início da primeira fase da meiose. E-F. Primeira fase da meiose. G-H. Formação de tétrades tetraédricas na segunda fase da meiose. I-J. Meiose sucessiva com formação de tétrades isobilaterais ao final da segunda fase da meiose. K. Meiose simultânea. L. Tétrade de microsporos com início do depósito de exina na porção distal destes (ponta de seta). M. Microsporos com início do depósito de exina em sua porção proximal (ponta de seta). N. Microsporos com exina já bem espessa; observam-se cristais (ponta de seta) no tapete amebóide. (mi = microsporocito; st = septo tapetal; ta = tapete).

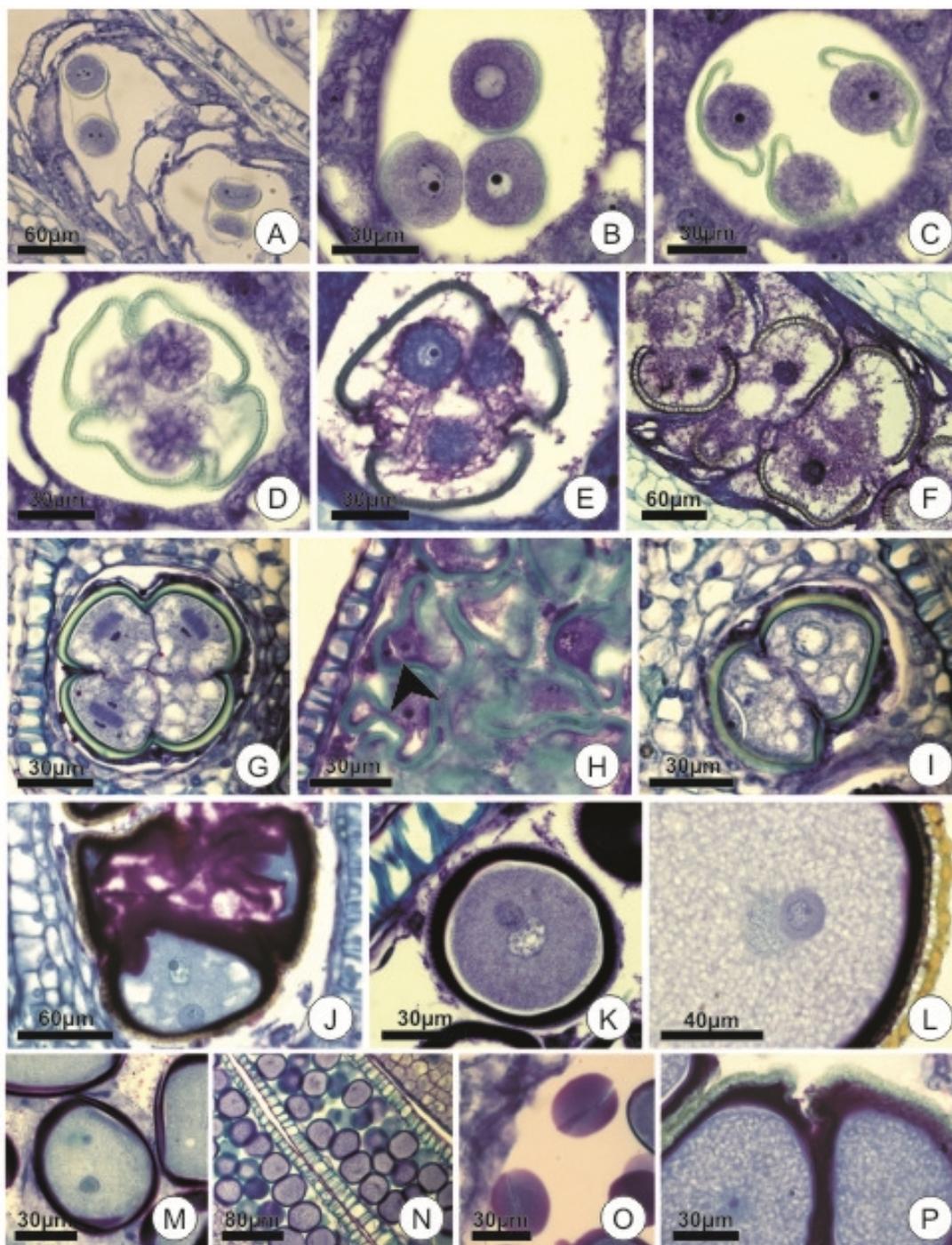
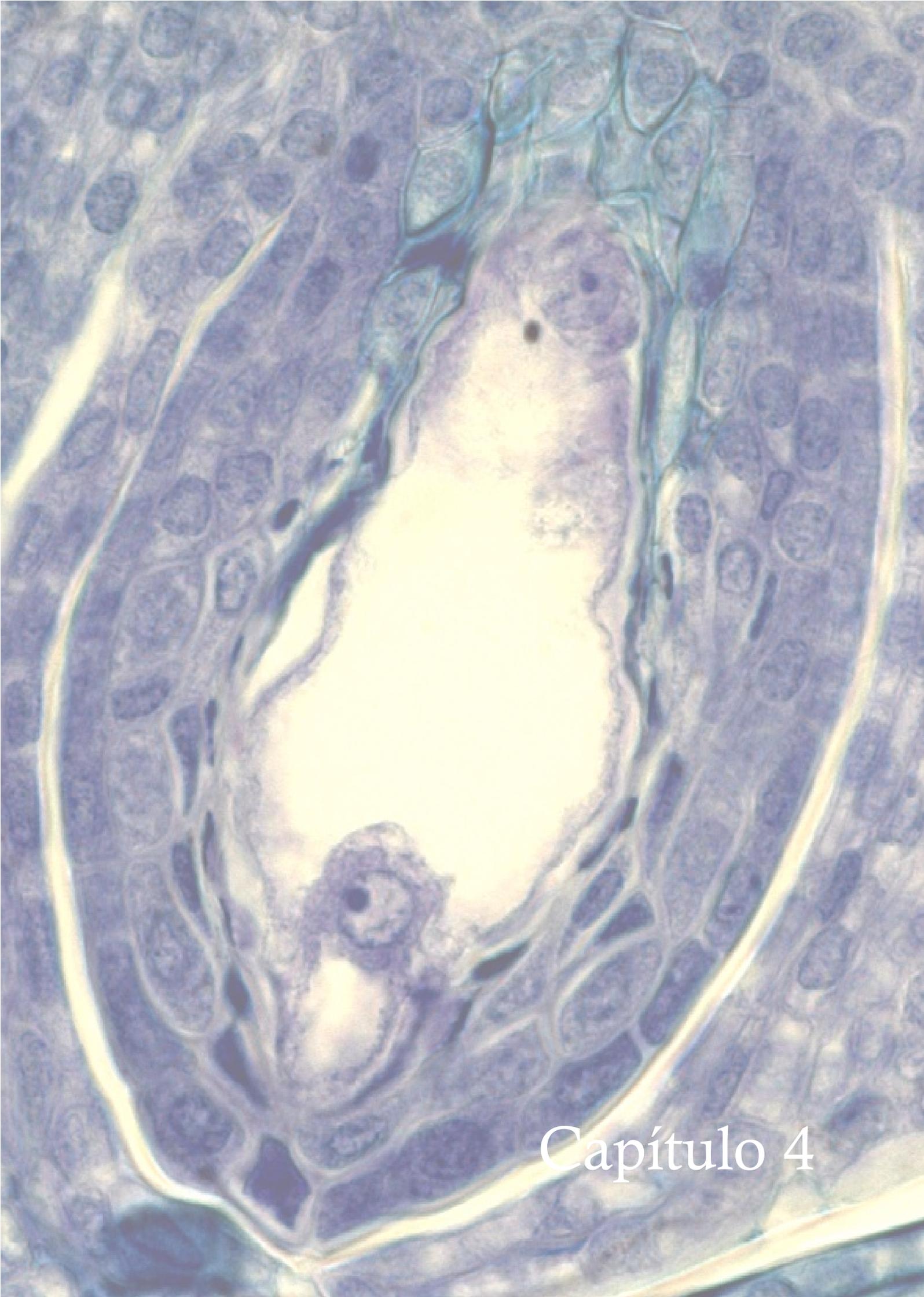


Fig. 3 Microgametogênese e grão de pólen de *Annona coriacea* (A, F), *Annona crassiflora* (J), *Annona dioica* (B-E, L, P), *Annona emarginata* (H, N), *Duguetia furfuracea* (K), *Guatteria australis* (M, O) e *Xylopia aromatica* (G, I). Secções longitudinais (A, F-P). Secções transversais (B-E). A. Microsporos em crescimento e formação da exina na região proximal destes. B-C. Rotação de 180° dos microsporos. D. União dos microsporos da tétrade. E-F. Formação da intina. G-I. Primeira mitose, com formação da célula vegetativa e da célula generativa. J. Englobamento da célula generativa pela célula vegetativa. K. Aproximação entre a célula generativa e o núcleo da célula vegetativa; ao redor dos grãos de pólen observam-se resquícios do tapete. L. Detalhe do pólen, com intina evidente e exina espessa e ornamentada. M. Pólen com exina lisa e reduzida. N. Mônades. O. Pólen zonaperturado. P. Região de abertura de tétrade de pólen.



Capítulo 4

Megasporogênese e megagametogênese em espécies de Annonaceae

Natália Arias Galastri^(a,b) e Denise Maria Trombert Oliveira^(a)

(a) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil.

(b) Faculdade de Tecnologia de Jahu, Coordenadoria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Rua Frei Galvão s/nº, Jardim Pedro Ometto, Jaú, SP 17212-650, Brasil.

Autor para correspondência: dmtoliveira@icb.ufmg.br

Resumo

(Megasporogênese e megagametogênese em espécies de Annonaceae). Incluída em Magnoliales, Annonaceae é a maior família dentre as Angiospermas basais e conta com relativamente poucos dados sobre a embriologia feminina. Neste trabalho, são descritas a megasporogênese e a megagametogênese de *Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *Duguetia furfuracea*, *Guatteria australis* e *Xylopia aromatica*, Annonaceae típicas do Cerrado, a fim de reconhecer padrões e indicar diferenças potencialmente relevantes para as análises taxonômicas e filogenéticas da família. Para tanto, óvulos de botões florais em diversas fases de desenvolvimento e flores em antese foram coletados e processados convencionalmente. Os óvulos das sete espécies são bitegmentados e pericalazais. Com exceção de *D. furfuracea*, que apresenta óvulo anacampilótropo, as demais espécies possuem óvulo anátropo. Exceto *X. aromatica*, que apresenta vários óvulos por capelo e placentação parietal, as outras espécies apresentam um óvulo por carpelo, raramente dois, e placentação basal. No início da formação do óvulo crassinucelado, diferencia-se uma única célula arquesporial, que se expande e constitui o megasporocito. Esta célula passa por meiose, originando uma tétrade linear de megasporos. Em seguida, os três megasporos micropilares degeneram, o megasporo calazal torna-se funcional e origina o megagametofito. Ocorrem três mitoses sucessivas e incompletas, originando oito núcleos, quatro no polo micropilar e quatro calazais. Segue-se a citocinese, originando sete células: três antípodas (calazais), o aparelho oosférico com duas sinérgides e uma oosfera (micropilares), e a célula central, resultante da migração de dois núcleos para a região central do megagametofito. Esse desenvolvimento caracteriza o tipo *Polygonum*, ocorrendo acúmulo de amido em todas as espécies. As espécies investigadas apresentam considerável uniformidade no desenvolvimento embriológico feminino, corroborando generalizações encontradas na literatura.

Palavras-chave: Saco embrionário, megagametofito, óvulo, *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Xylopia*.

Introdução

Incluída em Magnoliales (APG III 2009), Annonaceae é a maior família dentre as Angiospermas basais (Doyle *et al.* 2004; Doyle & Le Thomas 2012) e inclui, aproximadamente, 135 gêneros e 2.500 espécies com distribuição predominantemente tropical (Doyle *et al.* 2004).

A morfologia floral de Annonaceae é bem conhecida. Ocorrem flores hermafroditas e protogínicas, com receptáculo plano ou hemisférico (Heusden 1992; Ribeiro *et al.* 1999; Judd *et al.* 2008). O gineceu é, geralmente, dialicarpelar e composto por três a numerosos carpelos, espiraladamente arranjados (Heusden 1992; Simpson 2006). O estilete pode estar ou não presente, sendo ausente ou muito curto na maioria dos gêneros (Heusden 1992). O ovário é súpero e a placentação parietal ou basal, havendo de um a vários óvulos por carpelo (Heusden 1992; Judd *et al.* 2008).

Estudos sobre a biologia reprodutiva das Angiospermas basais têm recebido maior atenção nos últimos anos, pois fornecem valiosas informações a respeito das tendências evolutivas do grupo. Para Annonaceae, há vários registros sobre os mecanismos reprodutivos, mas existem relativamente poucos dados referentes à ontogenia do gineceu, em especial sobre a embriologia feminina. Os trabalhos existentes registram óvulos anátropos, crassinucelados, bi ou tritegmentados, pericalazais, com megagametofito do tipo *Polygonum* (Corner 1976; Heusden 1992; Svoma 1998; Johri *et al.* 1992); apesar da constância desses registros, ainda são escassas as espécies e gêneros amostrados, dificultando o estabelecimento de generalizações.

Diante disso, o presente trabalho objetivou descrever os processos de megasporogênese e megagametogênese em sete espécies de Annonaceae, típicas do Cerrado, pertencentes a quatro dos maiores gêneros da família, a fim de reconhecer padrões e indicar potenciais diferenças que contribuam para o reconhecimento de tendências evolutivas nesta família basal das Angiospermas.

Material e Métodos

As coletas de óvulos de botões florais e flores em antese de sete espécies selecionadas foram realizadas em fragmentos de Cerrado nas proximidades do município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil (entre 22°41'28,55"S a 22°58'28,67"S e 48°16'43,83"W a 48°30'23,46"W). Ramos férteis das várias espécies foram herborizados e incluídos no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, sob os seguintes números de registro e coletor: *Annona coriacea* Mart. (154419, Galastri, N.A. 8), *A. crassiflora* Mart. (154417, Galastri, N.A. 6), *A. dioica* A. St.-Hil.com flores estaminadas (154422, Galastri, N.A. 11), *A. dioica* A. St.-Hil.com flores hermafroditas (154423, Galastri, N.A. 12), *A. emarginata* (Schltdl.) H.Rainer (154421, Galastri, N.A. 10), *Duguetia furfuracea* (A. St.-

Hil.) Saff. (154424, Galastri, N.A. 13), *Guatteria australis* A. St.-Hil. (154420, Galastri, N.A. 9) e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (154418, Galastri, N.A. 7).

A fixação das amostras foi feita em solução de formalina-ácido acético-etanol 50% (Johansen 1940) por 48 horas, a conservação em etanol 70% (Jensen 1962), seguindo-se desidratação em série etílica e posterior inclusão a frio (Paiva *et al.* 2011) em 2-hidroxietilmetacrilato (Leica®). Para a obtenção de séries transversais e longitudinais, o material foi seccionado em micrótomo rotativo com cerca de 7µm de espessura. As secções foram, então, coradas com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964, modificado) e montadas em Entellan®.

Foram realizados os seguintes testes histoquímicos em material fixado e incluído: floroglucinol em meio ácido para evidenciar lignina (Sass 1951); sudan IV para a localização de substâncias lipídicas (Johansen 1940); vermelho de rutênio para identificar polissacarídeos ácidos e pectinas (Jensen 1962); lugol para detecção de amido (Johansen 1940); cloreto férrico, acrescido de carbonato de sódio, para verificar a ocorrência de compostos fenólicos (Johansen 1940); azul mercúrio de bromofenol para localizar proteínas (Mazia *et al.* 1953).

A análise do laminário e a obtenção de imagens foram feitas em microscópio Zeiss com câmara digital Axioskop 40 acoplada.

Resultados

Estrutura do óvulo

Os óvulos das sete espécies são bastante homogêneos, todos bitegmentados (Fig. 1A). Com exceção de *D. furfuracea*, que apresenta óvulo anacampilótropo (Fig. 1B), as demais espécies possuem óvulo anátropo (Fig. 1C). Exceto *X. aromatica*, que apresenta vários óvulos por carpelo (Fig. 1D) e placentação parietal, as outras espécies apresentam apenas um óvulo por carpelo, raramente dois, e placentação basal (Fig. 1B-C).

O tegumento externo é formado por cinco a sete camadas de células aproximadamente cuboides, de paredes delgadas, citoplasma denso e núcleos bem evidentes (Fig. 1E). O tegumento interno é constituído por duas camadas de células similares às do externo (Fig. 1E), sendo multisseriado junto ao endostômio (Fig. 1A, E). O poro micropilar é sempre constituído apenas pelo endostômio, pois o tegumento interno excede o externo (Fig. 1A, B, E). Em ambos os tegumentos, podem ocorrer idioblastos fenólicos.

Em todas as espécies, o nucelo apresenta de três a quatro camadas de células cuboides de paredes delgadas, citoplasma denso e núcleos bem evidentes (Fig. 1E-F), internamente às quais se distingue a célula arquesporial (Fig. 1F), caracterizando o óvulo crassinucelado.

Na região calazal, observam-se alguns poucos idioblastos fenólicos, intensa atividade mitótica e ampla vascularização (Fig. 1A-B); a calaza é expandida, sendo os óvulos pericalazais (Fig. 1A-B). Nota-se, também, a presença de hipóstase diferenciada em *D. furfuracea*, *G. australis* e *X. aromatica*, formada por algumas células fenólicas.

Megasporogênese

O processo de megasporogênese mostrou-se constante nas sete espécies avaliadas. No início da formação do óvulo, diferencia-se uma única célula arquesporial (Fig. 1F), que apresenta maior tamanho e núcleo mais volumoso que as demais células nucleares.

Durante o desenvolvimento, a célula arquesporial expande-se pelo aumento de seu vacuoma, constituindo o megasporocito (Fig. 2A). Segue-se, então, a meiose, sendo possível observar o adensamento dos cromossomos na metáfase I (Fig. 2B). Como resultado da primeira fase da meiose, ocorre divisão no plano transversal, originando duas células dispostas no eixo calaza-micropila (Fig. 2C). Em seguida, ocorre a segunda fase da meiose, na qual cada uma dessas células divide-se novamente (Fig. 2D), originando uma tétrade linear de megasporos (Fig. 2D-F). Nesse momento, já se verifica que o megasporo calazal é maior e mais vacuolado que os demais (Fig. 2E-F).

Sequencialmente, os três megasporos micropilares degeneram e são reabsorvidos, de modo que apenas o megasporo calazal é funcional; este aumenta pela ampliação do vacuoma, originando o megagametofito jovem (Fig. 2G).

Megagametogênese

Como na megasporogênese, a megagametogênese das Annonaceae estudadas também se mostrou constante.

O núcleo único destes megagametofitos monospóricos passa, então, por três mitoses sucessivas e incompletas. Na primeira mitose, formam-se dois núcleos e cada um migra para um dos polos do megagametofito, mas não ocorre citocinese (Fig. 3A-C). Na segunda mitose, formam-se mais dois núcleos, mantendo-se dois no polo micropilar (Fig. 3D) e dois calazais (Fig. 3E-F), ainda sem citocinese (Fig. 3D-F). Na terceira mitose, formam-se oito núcleos, quatro no polo calazal (Fig. 3G) e quatro micropilares.

A partir da fase octonucleada, inicia-se a citocinese no megagametofito, com a consequente formação de sete células. Ocorre celularização, delimitando três núcleos no polo calazal, diferenciando-se as antípodas (Fig. 4A), células pequenas, de paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo evidente, persistentes até a fecundação; o quarto núcleo calazal migra para o centro do megagametofito, similar ao que ocorre também a partir do polo micropilar (Fig. 4B). Os três núcleos remanescentes no polo micropilar formam o aparelho oosférico, enquanto os dois núcleos na região equatorial do megagametofito constituem a célula central (Fig. 4B-D), bastante vacuolada; apenas em *X. aromatica* pode-se observar a fusão dos núcleos polares compondo o núcleo secundário (Fig. 4D).

O aparelho oosférico é formado por duas sinérgides (Fig. 4E) e pela oosfera (Fig. 4B, F), que apresentam paredes delgadas e núcleos evidentes. O reconhecimento dos dois tipos celulares micropilares pode ser feito pela posição do núcleo nas células, mais micropilar nas sinérgides (Fig. 4E) e mais calazal na oosfera (Fig. 4B, F). O aparelho filiforme das sinérgides é pouco distinto, sendo evidente apenas em *G. australis* (Fig. 4G).

Esse padrão de desenvolvimento caracteriza o tipo *Polygonum*. Em todas as espécies, verificou-se que o megagametofito apresenta grãos de amido.

Discussão

As Annonaceae estudadas apresentam intensa uniformidade nos processos de megasporogênese e megagametogênese, confirmando o registrado sobre caracteres embriológicos na família (Periasamy & Swamy 1961; Svoma 1998). Na Tabela 1, encontra-se a compilação dos dados referentes à embriologia feminina dos gêneros de Annonaceae estudados, tanto os registrados na literatura quanto no presente trabalho, confirmando a constância dos caracteres.

Os óvulos das sete espécies estudadas são bitegmentados e crassinucelados, assim como descrito por Corner (1949; 1976) e Johri *et al.* (1992) para outras Annonaceae. Seis das espécies descritas apresentam óvulos anátropos, conferindo com o registrado na família até o momento (Juliano 1935; Corner 1949; 1976; Lampton 1957; Coleman 1966; Mohana Rao 1975; 1982; Johri *et al.* 1992; Igersheim & Endress 1997; Svoma 1997; 1998; Lora *et al.* 2010); apenas *D. furfuracea* apresenta óvulos anacampilótopos, registro inédito para Annonaceae.

As espécies deste trabalho apresentam óvulos pericalazais, conforme Corner (1949; 1976), Lampton (1957), Svoma (1998) e Endress & Armstrong (2011) descreveram para as

espécies de Annonaceae por eles estudadas, contrastando com *Artabotrys hexapetalus*, cujo óvulo não possui pericalaza evidente (Svoma, 1997). De acordo com Corner (1949; 1976), Lampton (1957), Mohana Rao (1975; 1979; 1982), Igersheim & Endress (1997) e Svoma (1997; 1998), a micrópila é formada apenas pelo endostômio, pois o tegumento interno das Annonaceae excede o externo, como ocorre nas espécies aqui estudadas.

Em *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*, a placentação é basal como descrito por Mohana Rao (1975; 1979) para *Artabotrys odoratissimus* e *Polyalthia longifolia*, respectivamente. Já em *X. aromatica*, a placentação é parietal, conforme relatado por Galastri (2008) para *X. emarginata*. Analisando-se os dados aqui obtidos e a literatura (ver Tabela 1), nota-se relação direta entre o número de óvulos por ovário e a placentação, estando a formação de um ou poucos óvulos vinculada à placentação basal e de mais óvulos à parietal nas Annonaceae.

Hipóstase evidente foi encontrada apenas nos óvulos de *D. furfuracea*, *G. australis* e *X. aromatica*. Nenhuma das *Annona* aqui estudadas possui hipóstase diferenciada em seus óvulos. Nos óvulos de *Asimina triloba* (Lampton 1957) e na maioria das espécies estudadas por Svoma (1998), exceto em *Uvaria sp.* e em *X. malayana*, observou-se hipóstase desenvolvida. Tais dados indicam que a ocorrência e grau de diferenciação da hipóstase são variáveis na família, mesmo ao nível genérico, como pode ser observado em *Xylopia*, e que novos estudos, abrangendo um maior número de gêneros, são necessários para verificar a distribuição dos estados desse caráter em Annonaceae.

Nas sete espécies estudadas, o desenvolvimento do megagametofito é do tipo *Polygonum* (Maheshwari 1950), conforme também descrito para as demais Annonaceae até então já estudadas (Juliano 1935; Lampton 1957; Periasamy & Swamy 1961; Coleman 1966; Johri *et al.* 1992; Igersheim & Endress 1997; Svoma 1997; 1998; Judd *et al.* 2008; Lora *et al.* 2010).

No megagametofito, chama atenção que as antípodas das sete espécies estudadas são evidentes e não degeneram antes da fecundação, o que contraria as observações até então realizadas para outras Annonaceae por Herms (1907), Juliano (1935), Lampton (1957) e Svoma (1997; 1998), que verificaram antípodas efêmeras e que se desorganizam precocemente.

Neste trabalho, a formação de núcleo secundário na célula central foi observada apenas em *X. aromatica*. De acordo com Lora *et al.* (2010), em *A. cherimola* os núcleos polares não se fundem, concordando com o encontrado nas espécies de *Annona* do presente trabalho. Em *Cananga odorata* e *Miliusa wightiana*, também não há fusão dos núcleos

polares (Periasamy & Swamy 1961). Herms (1907) e Lampton (1957) relataram que os núcleos polares permanecem lado a lado por um longo período até que se fundem, originando um núcleo secundário em *Asimina triloba*. O que poderia explicar o fato da fusão nuclear não ter sido observada nas outras espécies estudadas é que, segundo Svoma (1998), a fusão dos núcleos polares acontece, na maioria das vezes, durante a fecundação, processo cuja análise não foi objetivo deste trabalho.

Certa uniformidade nos dados embriológicos femininos também é observada quando se analisam os trabalhos existentes para outras famílias de Angiospermas basais. Dentro de Magnoliales, ordem que inclui Annonaceae, Degeneriaceae, Eupomatiaceae, Himantandraceae, Magnoliaceae e Myristicaceae (APG III 2009), os óvulos são anátropos, crassinucelados e bitegmentados, o megagametofito apresenta desenvolvimento do tipo *Polygonum* e a placentação e o número de óvulos por carpelo é variável (Matsui *et al.* 1993; Doweld & Shevryyova 1998; Xião & Xu 2006; Xião & Yuah 2006).

As características da embriologia feminina de Magnoliales e Winterales, até então descritas, também são bastante homogêneas (Svoma 1998). Contudo, quando se analisam espécies de Laurales e Piperales, nota-se intensa heterogeneidade. Em Laurales, ocorrem óvulos anátropos (Heo *et al.* 1998; Kimoto & Tobe 2001; 2003; 2008; Kimoto *et al.* 2006), hemianátropos (Heo *et al.* 1998; 2004), anfitropos (Kimoto & Tobe 2001) e ortótropos (Kimoto & Tobe 2001), uni ou bitegmentados (Heo *et al.* 1998; 2004; Kimoto & Tobe 2001; 2003; 2008; Kimoto *et al.* 2006) e megagametofito do tipo *Polygonum* (Heo *et al.* 1998; 2004; Kimoto & Tobe 2001; 2003; 2008; Kimoto *et al.* 2006) ou *Allium* (Heo *et al.* 2004). Em Piperales, observam-se óvulos mais homogêneos, todos ortótropos, crassinucelados e bitegmentados (Lei *et al.* 2002; González & Rudall 2003; Arias & Williams 2008; Madrid & Friedman 2008; 2009; Samain *et al.* 2010), mas o megagametofito pode ser de diversos tipos, dentre eles *Drusa* (Lei *et al.* 2002; Arias & Williams 2008), *Penaea* (Arias & Williams 2008) e *Polygonum* (González & Rudall 2003; Arias & Williams 2008; Madrid & Friedman 2008).

Neste trabalho verificou que a estrutura do óvulo e os processos de megasporogênese e megagametogênese são muito constantes em Annonaceae, o que é esperado quando se considera que as estruturas femininas tendem a ser mais conservativas nas famílias de Angiospermas. Quanto a Magnoliales, os dados embriológicos femininos, também bastante homogêneos entre as famílias, reforçam que se trata de ordem bem apoiada, compartilhando muitos aspectos estruturais.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida a Denise Maria Trombert Oliveira. A Wilma de Grava Kempinas pela cessão de equipamentos. Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, pela cessão de equipamentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. A Renato de Mello Silva, pela identificação das espécies.

Referências Bibliográficas

- Arias, T. & Williams, J.H. 2008. Embryology of *Manekia naranjoana* (Piperaceae) and the origin of tetrasporic, 16-nucleate female gametophytes in Piperales. **American Journal of Botany** 95(3): 272-285.
- 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: 105-121.
- Coleman, M.A. 1966. Floral anatomy and morphology of *Rollinia* St. Hil. **Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo** 4(2): 45-51.
- Corner, E.J.H. 1949. The Annonaceous seed and its four integuments. **New Phytologist** 48 (3): 332-346.
- Corner, E.J.H. 1976. **The seeds of dicotyledons**. v.1. Cambridge, University Press.
- Doweld, A.B. & Shevryyova, N.A. 1998. Carpology, seed anatomy and taxonomic relationships of *Galbulimina* (Himantandraceae). **Annals of Botany** 81: 337-347.
- Doyle, J.A.; Sauquet, H.; Scharaschkin, T. & Le Thomas, A. 2004. Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). **International Journal of Plant Science** 165 (4 Suppl.): S55-S67.
- Doyle, J.A. & Le Thomas, A. 2012. Evolution and phylogenetic significance of pollen in Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 169: 190-221.
- Endress, P.K. & Armstrong, J.E. 2011. Floral development and floral phyllotaxis in *Anaxagorea* (Annonaceae). **Annals of Botany** 108: 835–845.

- Galastri, N.A. 2008. **Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dioica* A. St.-Hil., *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae)**. Dissertação de mestrado, UNESP, Botucatu.
- González, F. & Rudall, P.J. 2003. Structure and development of the ovule and seed in Aristolochiaceae, with particular reference to *Saruma*. **Plant Systematics and Evolution** 241: 223-244.
- Heo, K.; Werff, H.V.D. & Tobe, H. 1998. Embryology and relationships of Lauraceae (Laurales). **Botanical Journal of the Linnean Society** 126: 295-322.
- Heo, K.; Kimoto, Y.; Riveros, M. & Tobe, H. 2004. Embryology of Gomortegaceae (Laurales): characteristics and character evolution. **Journal of Plant Research** 117: 221-228.
- Herns, W.B. 1907. Contributions to the life history of *Asimina triloba*. **Ohio Naturalist** 8: 211-217.
- Heusden, E.C.H. van. 1992. **Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution**. Blumea Supplement 7: 7-36.
- Igersheim, A. & Endress, P.K. 1997. Gynoecium diversity and systematics of the Magnoliales and Winteroids. **Botanical Journal of the Linnean Society** 124: 213-271.
- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, W.H. Freeman.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book.
- Johri, B.M.; Ambegaokar, K.B. & Srivastava, P.S. 1992. **Comparative embryology of Angiosperms**. Berlin, Springer-Verlag.
- Juliano, J.B. 1935. Morphological contributions on the genus *Annona*. **Philippine Agricultural Scientist** 24: 528-541.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2008. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts, Sinauer Associates.
- Kimoto, Y. & Tobe, H. 2001. Embryology of Laurales: a review and perspectives. **Journal of Plant Research** 114: 247-267.

- Kimoto, Y. & Tobe, H. 2003. Embryology of Siparunaceae (Laurales): characteristics and character evolution. **Journal of Plant Research** 116: 281-294.
- Kimoto, Y. & Tobe, H. 2008. Embryology of Hortonioideae and Monimioideae (Monimiaceae, Laurales): characteristics of the 'lower' monimiods. **Botanical Journal of the Linnean Society** 158: 228–241.
- Kimoto, Y.; Utami, N. & Tobe, H. 2006. Embryology of *Eusideroxylon* (Cryptocaryeae, Lauraceae) and character evolution in the family. **Botanical Journal of the Linnean Society** 150: 187-201.
- Lampton, R.K. 1957. Floral morphology in *Asimina triloba* Dunal. I. Development of ovule and embryo sac. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 84(3): 151-156.
- Lei, L.-G.; Wu, Z-Y.& Liang, H-X. 2002. Embryology of *Zippelia begoniaefolia* (Piperaceae) and its systematic relationships. **Botanical Journal of the Linnean Society** 140: 49-64.
- Lora, J.; Hormaza, J.I. & Herrero, M. 2010. The progamic phase of an early-divergent angiosperm, *Annona cherimola* (Annonaceae). **Annals of Botany** 105: 221-231.
- Madrid, E.N. & Friedman, W.E. 2008. Female gametophyte development in *Aristolochia labiate* Willd. (Aristolochiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 158: 19-29.
- Madrid, E.N. & Friedman, W.E. 2009. The developmental basis of an evolutionary diversification of female gametophyte structure in *Piper* and Piperaceae. **Annals of Botany** 103: 869-884.
- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms.**New York, MacGraw Hill.
- Matsui, M.; Imaichi, R. & Kato, M. 1993. Ovular development and morphology in some Magnoliaceae species. **Journal of Plant Research** 106: 297-304.
- Mazia, D.; Brewer, P.A. & Albert, M. 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. **Biological Bulletin** 104: 57-67.
- Mohana Rao, P.R. 1975. Seed anatomy of *Artabotrys odoratissimus* with a discussion on chalaza, integumentary bundles and ruminant endosperm. **Phytomorphology** 25: 215-228.

- Mohana Rao, P.R. 1979. Seed and fruit anatomy in *Polyalthia longifolia* (Annonaceae). **Botanische Jahrbücher für Systematik** 101(1): 83-89.
- Mohana Rao, P.R. 1982. Seed and fruit anatomy in *Asimina triloba*, with a discussion on the affinities of Annonaceae. **Botanische Jahrbücher für Systematik** 103(1): 47-57.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373.
- Paiva, E.A.S.; Pinho, S.Z. & Oliveira, D.M.T. 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia, H. & Melo, R.C.N. (eds.). **Light microscopy: methods and protocols**. New York, Springer/Humana Press. Pp. 37-49.
- Periasamy, K. & Swamy, B.G.L. 1961. Studies in the Annonaceae. II. The development of ovule and seed in *Cananga odorata* and *Miliusa wightiana*. **Journal Indian Botanic Society** 40: 206-216.
- Rainer, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.St-Hil. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien** 108B: 191-205.
- Ribeiro, J.E.L.S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira, E.C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R. & Procópio, L.C. 1999. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**. Manaus, Inpa. Pp. 121-135.
- Samain, M. S.; Vrijdaghs, A.; Hesse, M.; Goetghebeur, P.; Rodriguez, F.J.; Stoll, A.; Neinhuis, C. & Wanke, S. 2010. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany** 105: 677-688.
- Sass, J.E. 1951. **Botanical microtechnique**. Ames, Iowa State University.
- Simpson, M.G. 2006. **Plant systematics**. San Diego, Elsevier Academic Press.
- Svoma, E. 1997. Seed development and function in *Artabotrys hexapetalus* (Annonaceae). **Plant Systematics and Evolution** 207: 205-223.

- Svoma, E. 1998. Studies on the embryology and gynoecium structures in *Drimys winteri* (Winteraceae) and some Annonaceae. **Plant Systematics and Evolution** 209: 205-229.
- Xião, D. & Xu, F. 2006. Megasporogenesis and development of female gametophyte in *Manglietia decidua* (Magnoliaceae). **Annales Botanici Fennici** 43: 437-444.
- Xião, D. & Yuan, Z. 2006. Embryogenesis and seed development in *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae). **Journal of Plant Research** 119: 163-166.

Tabela 1. Compilação referente à embriologia feminina dos gêneros estudados de Annonaceae, incluindo os dados disponíveis na literatura e os produzidos neste trabalho. Os números indicam, no rodapé da tabela, os trabalhos e espécies referidos; os estados de caracteres destacados em negrito são compartilhados pelos quatro gêneros e, quando grifados, são comuns a todas as espécies já analisadas de cada gênero.

Caráter	<i>Annona</i>	<i>Duguetia</i>	<i>Guatteria</i>	<i>Xylopia</i>
Tipo de óvulo	<u>Anátropo</u> ^(1, 2, 3, 4, 5, 6)	<u>Anacampilótropo</u> ^(5, 6)	Anátropo ⁽⁶⁾	<u>Anátropo</u> ^(2, 5, 6)
Óvulo quanto ao nucelo	Crassinucelado ^(1, 2, 3, 5, 6) Tenuinucelado ⁽¹⁾	Crassinucelado ^(5, 6)	Crassinucelado ⁽⁶⁾	Crassinucelado ^(2, 5, 6)
Número de tegumentos	Bitegumentado ^(2, 3, 5, 6)	Bitegumentado ^(5, 6)	Bitegumentado ⁽⁶⁾	Bitegumentado ^(2, 5, 6)
Pericalaza	Presente ^(2, 5, 6)	Presente ^(5, 6)	Presente ⁽⁶⁾	Presente ^(2, 5, 6)
Hipóstase	Presente ⁽²⁾	Presente ^(5, 6)	Presente ⁽⁶⁾	Presente ^(2, 5, 6)
Número de óvulos por carpelo	<u>Um</u> ^(4, 5, 6)	<u>Um</u> ^(5, 6)	Um ⁽⁶⁾	<u>Vários</u> ^(2, 5, 6)
Placentação	<u>Basal</u> ^(5, 6)	<u>Basal</u> ^(5, 6)	Basal ⁽⁶⁾	<u>Parietal</u> ^(5, 6)
Tipo de Megagametofito	<u>Polygonum</u> ^(2, 3, 6)	<u>Polygonum</u> ⁽⁶⁾	<u>Polygonum</u> ⁽⁶⁾	<u>Polygonum</u> ^(2, 6)
Reservas do Megagametofito	Amido ^(2, 3, 6)	Amido ⁽⁶⁾	Amido ⁽⁶⁾	Amido ^(2, 6)
Tipo de tétrade	Linear ^(1, 6) Em forma de T ^(1, 2)	Linear ⁽⁶⁾	Linear ⁽⁶⁾	Linear ⁽⁶⁾ Em forma de T ⁽²⁾
Antípodas	Persistentes ⁽⁶⁾ Efêmeras ^(1, 2)	Persistentes ⁽⁶⁾	Persistentes ⁽⁶⁾	Persistentes ⁽⁶⁾ Efêmeras ⁽²⁾
Célula central	<u>Núcleos polares individualizados</u> ^(2, 3, 6)	<u>Núcleos polares individualizados</u> ⁽⁶⁾	<u>Núcleos polares individualizados</u> ⁽⁶⁾	<u>Núcleos polares individualizados</u> ⁽²⁾ Núcleo secundário ⁽⁶⁾
Micrópila	Endostomal ^(2, 3, 5, 6)	Endostomal ^(5, 6)	Endostomal ⁽⁶⁾	Endostomal ^(2, 5, 6)

(1) Juliano (1935), *A. squamosa* e *A. muricata*; (2) Svoma (1998), *A. montana*, *X. malayana*, *X. aromatica* e *X. emarginata*; (3) Lora *et al.* (2010), *A. cherimola*; (4) Coleman (1966), *Rollinia emarginata*, *R. mucosa*, *R. sericea* (atualmente *A. emarginata*, *A. mucosa* e *A. sericea sensu* Rainer 2007); (5) Galastri (2008), *A. dioica*, *D. furfuracea* e *X. emarginata*; (6) este trabalho, com *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *D. furfuracea*, *G. australis* e *X. aromatica*.

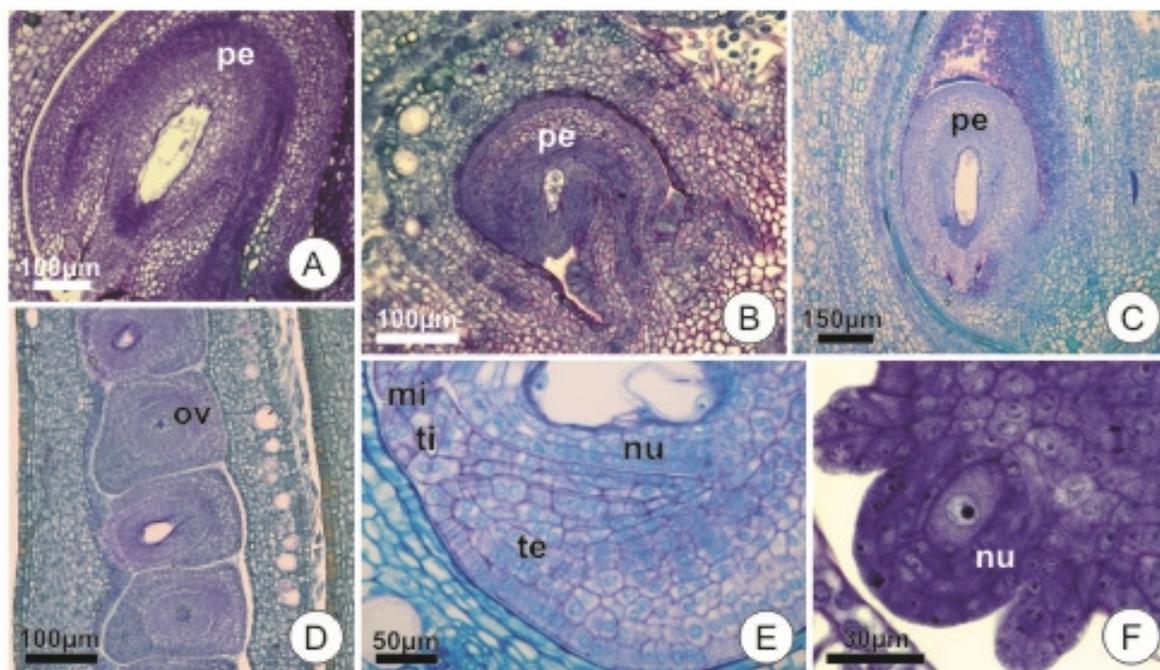


Figura 1. Óvulo de *Annona dioica* (A, C, F), *Duguetia furfuracea* (B, E) e *Xylopia aromatica* (D). Secções longitudinais (A, C-D, F). Secções transversais (B, E). A. Óvulo anátropo com micrópila endostomal; observar a pericalaza. B. Óvulo anacampilótropo; observar a pericalaza. C. Carpelo com um único óvulo basal. D. Ovário com vários óvulos de placentação parietal. E. Detalhe dos tegumentos e do nucelo. F. Óvulo em formação, evidenciando célula arquesporrial e nucelo multisseriado. (mi = micrópila; nu = nucelo; ov = óvulo; pe = pericalaza; te = tegumento externo; ti = tegumento interno).

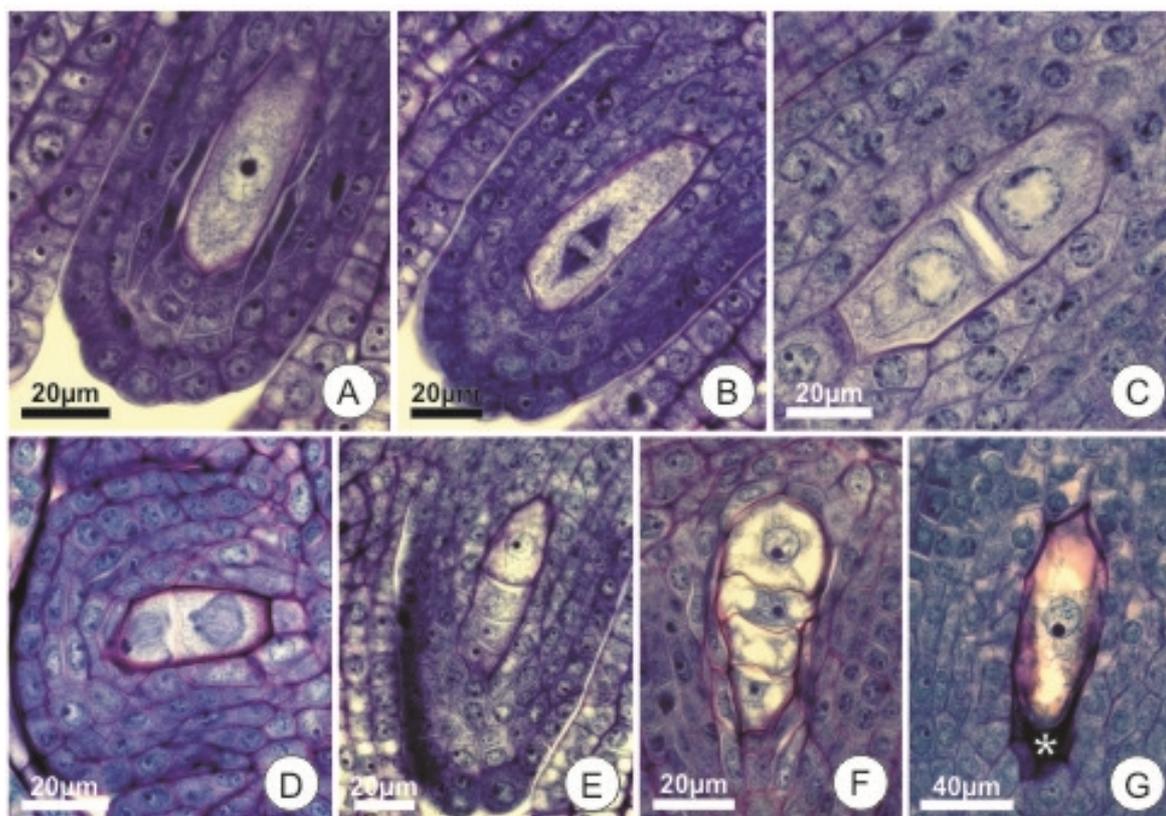


Figura 2. Megasporogênese em *Annona coriacea* (C), *Annona crassiflora* (G), *Annona dioica* (A, B, E) e *Duguetia furfuracea* (D, F). Secções longitudinais. A. Megasporocito. B. Início da primeira fase da meiose. C. Citocinese individualizando duas células-filhas na primeira fase da meiose. D. Início da segunda fase da meiose. E-F. Formação da tétrade linear de megasporos; notar que o megasporo calazal é maior que os demais, que já mostram sinais de morte celular em F. G. Megagametofito jovem (asterisco indica resquícios dos megasporos reabsorvidos).

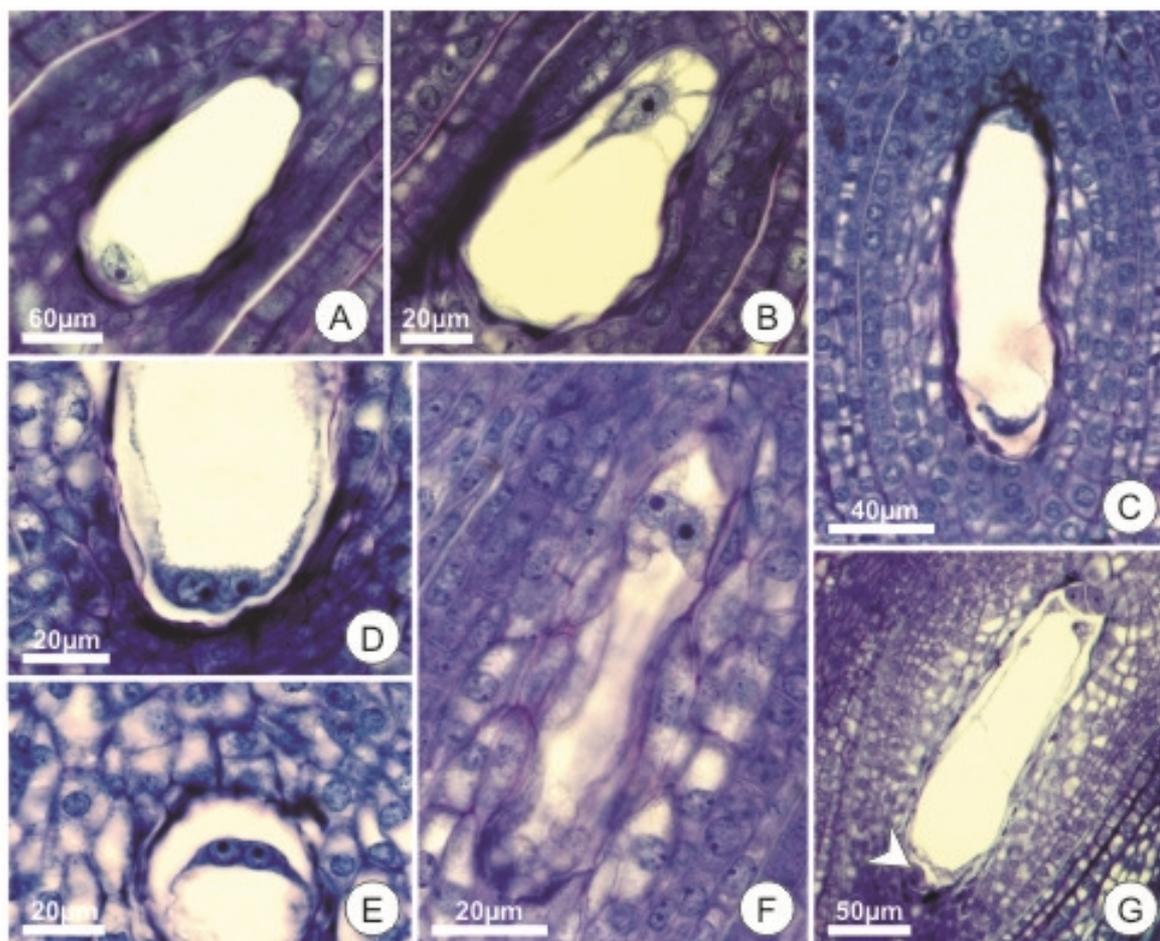


Figura 3. Início da megagametogênese em *Annona dioica* (D-E, G), *Annona emarginata* (F), *Duguetia furfuracea* (A-B) e *Guatteria australis* (C). Secções longitudinais. A-C. Primeira mitose; observa-se um núcleo no polo calazal (A), um núcleo no polo micropilar (B); em C, observar os núcleos em ambos os pólos. D-F. Segunda mitose; nota-se a presença de dois núcleos no polo micropilar (D) e dois no polo calazal (E-F). G. Terceira mitose; notar os quatro núcleos do polo calazal; no polo micropilar, a imagem revela apenas um dos quatro núcleos (ponta de seta).

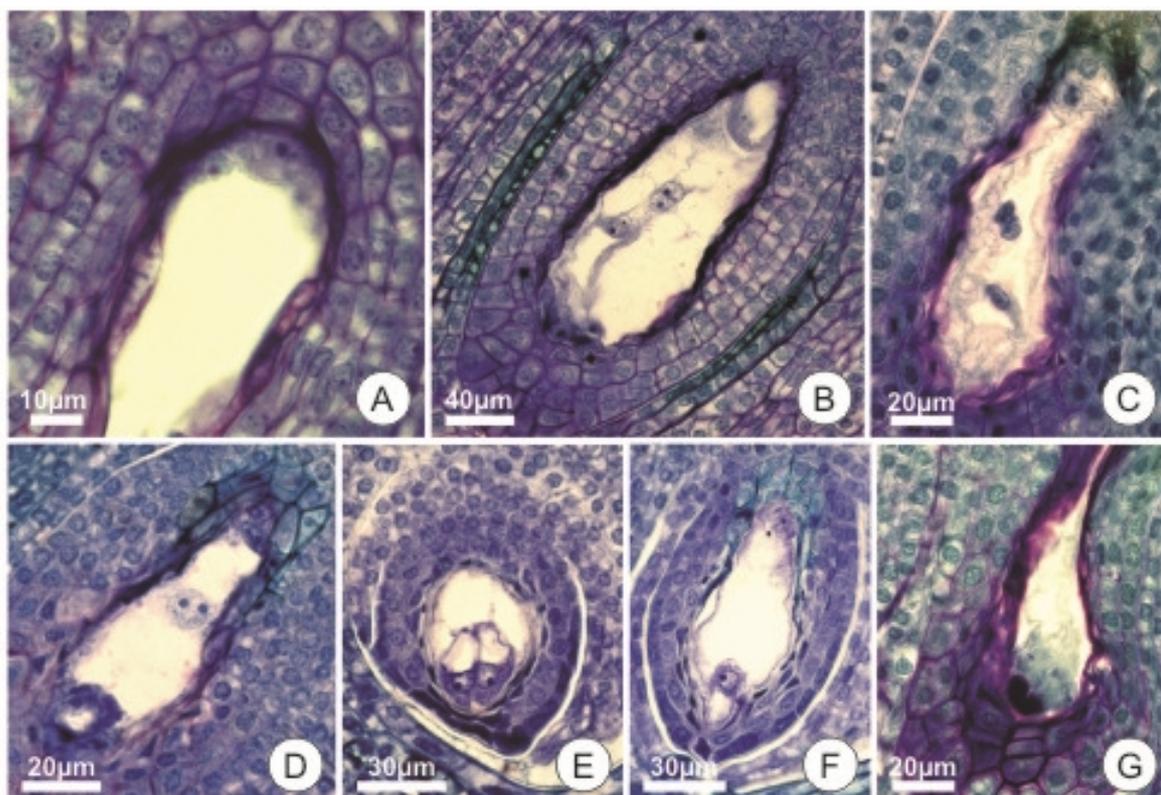


Figura 4. Fase final da megagametogênese com a formação do megagametofito do tipo *Polygonum* em *Annona coriacea* (B), *Annona emarginata* (A), *Guatteria australis* (C, G) e *Xylopia aromatica* (D-F). Secções longitudinais. A. Antípodas. B-C. Oosfera e célula central binucleada. D. Célula central com núcleo secundário. E. Sinérgides. F. Oosfera. G. Sinérgides com aparelho filiforme evidente.



Capítulo 5

Potencial filogenético de caracteres florais de Annonaceae do Cerrado

Natália Arias Galastri^(1,2), Fernando Augusto Oliveira Silveira⁽¹⁾, Denise Maria Trombert Oliveira⁽¹⁾

(1) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil.

(2) Faculdade de Tecnologia de Jahu, Coordenadoria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Rua Frei Galvão s/nº, Jardim Pedro Ometto, Jaú, SP 17212-650, Brasil.

Autor para correspondência: dmtoliveira@icb.ufmg.br

RESUMO

Apesar de Annonaceae ser a nona família mais representativa do Cerrado e os caracteres florais já terem sido utilizados em análises filogenéticas do grupo, não foram considerados caracteres anatômicos. Assim, este trabalho objetivou avaliar a relevância de caracteres estruturais de flores de Annonaceae do Cerrado, utilizando métodos filogenéticos comparativos, para inferir a respeito do potencial uso desses caracteres na compreensão da evolução floral da família. Para tanto, flores de *Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata*, *Duguetia furfuracea*, *Guatteria australis* e *Xylopia aromatica* foram coletadas e processadas segundo técnicas usuais de microscopia de luz e eletrônica de varredura; foi realizada análise de similaridade com os dados qualitativos, baseada no agrupamento de ligação única e distância de Manhattan para a construção do fenograma. A partir da listagem de 218 caracteres, analisada neste trabalho, reconhece-se que os mais informativos provêm da corola, em especial das pétalas internas. A posição de *A. emarginata* evidencia as diferenças dessa espécie em relação às outras *Annona*, mostrando que a inclusão de *Rollinia* em *Annona* não se fundamenta com base na estrutura floral e deveria ser revista. A análise do fenograma também aponta que, considerando-se somente espécies do Cerrado, *Xylopia* está mais próximo de *Annona* que *Duguetia*, o que não corrobora os trabalhos filogenéticos já existentes.

Palavras-chave: Fenograma, corola, *Annona*, *Rollinia*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Xylopia*.

INTRODUÇÃO

A associação entre polinizadores e aspectos florais específicos levou à evolução das síndromes de polinização. Acredita-se que as estruturas relacionadas à reprodução estão sob forte pressão de seleção, pois atuam diretamente no sucesso reprodutivo das espécies. No caso das plantas zoófilas, as preferências do polinizador representam forte pressão de seleção sobre os caracteres florais, sendo a atração dos polinizadores e o sucesso na transferência do pólen os principais alvos da seleção natural durante a evolução (Faegri & Pijl, 1979).

No entanto, existem poucas evidências a respeito de como as estruturas florais foram se alterando ao longo do tempo, o que dificulta a avaliação da direção da evolução dos sistemas de polinização e enaltece a importância de trabalhos morfológicos e anatômicos com flores. Neste sentido, Uriarte *et al.* (2010) apontaram a relevância de se estudarem os caracteres para explicar a estrutura de comunidades ecológicas.

Incluída em Magnoliales (APG III, 2009), Annonaceae, a maior família dentre as angiospermas basais, apresenta distribuição predominantemente tropical e inclui, aproximadamente, 135 gêneros e 2.500 espécies (Doyle *et al.*, 2004). Por meio de árvores filogenéticas moleculares, Chatrou *et al.* (2012) sugeriram que Annonaceae deve ser dividida em quatro clados: (1) o clado monogenérico Anaxagoreoideae; (2) o clado Ambavioideae, com os gêneros *Ambavia*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Cyathocalyx*, *Mezzettia* e *Tetrameranthus*; (3) o clado Annonoideae, que abrange sete tribos (Bocageae, Xylopieae, Duguetieae, Guatterieae, Annoneae, Monodoreae e Uvarieae); e (4) o clado de Malmeoideae, também dividido em sete tribos (Piptostigmateae, Malmeeae, Maasieae, Monocarpieae, Miliuseae, Fenerivieae e Dendrokingstonieae).

Várias chaves taxonômicas já foram publicadas e mudanças taxonômicas a nível genérico têm sido realizadas, a maioria delas baseada em estudos filogenéticos moleculares. Diversas mudanças recentes podem ser identificadas, incluindo a descrição de novos gêneros (Couvreur *et al.*, 2009) e a recircunscrição de gêneros, como *Annona* que passou a abranger *Rollinia* (Rainer, 2007).

No Brasil, Annonaceae compreende 29 gêneros e 388 espécies (Maas *et al.* 2013) e figura em nono lugar dentre as famílias mais representativas do Cerrado (Mendonça *et al.*, 2008). Segundo Maas *et al.* (2001), na região centro-leste do Brasil, que engloba o bioma Cerrado, os gêneros mais comuns de Annonaceae são *Annona*, com cerca de 28 espécies, *Duguetia*, com 20 espécies, *Guatteria* com 41 espécies, *Rollinia* com 13 e *Xylopia* com 10 espécies.

Annonaceae desempenha importante papel ecológico em termos de diversidade de espécies, especialmente em ecossistemas tropicais (Couvreur *et al.*, 2012). Para Annonaceae, há relatos de polinização por tripes, moscas, besouros e abelhas. No entanto, no Cerrado, há predominância da cantarofilia, com flores robustas, grandes, inclinadas e com forte odor de fruto em decomposição (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006).

Caracteres florais já foram utilizados em análises filogenéticas da família como morfologia e ultraestrutura do pólen (Walker, 1971; Doyle & Le Thomas, 1997, 2012), mas não foram incluídos caracteres anatômicos, apenas morfológicos e ecológicos. Assim, os caracteres anatômicos florais permanecem desconsiderados e são promissores, especialmente em grupos com biologia floral tão peculiar quanto Annonaceae.

Assim, este trabalho consiste em uma avaliação da relevância de caracteres anatômicos de flores de sete espécies de Annonaceae do Cerrado, associados a caracteres morfológicos e ecológico-funcionais, utilizando métodos filogenéticos comparativos para

inferir a respeito do potencial uso desses caracteres para compreender a evolução floral da família.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas espécies de *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*, quatro dos maiores gêneros de Annonaceae, listados entre os mais representativos para o Cerrado (Maas *et al.*, 2001). Botões florais e flores em antese de *Annona coriacea* Mart., *A. crassiflora* Mart., *A. dioica* A. St.-Hil., *A. emarginata* (Schltdl.) H.Rainer, *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff., *Guatteria australis* A. St.-Hil. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. foram coletados em fragmentos de Cerrado nas proximidades do município de Botucatu, São Paulo, Brasil (22°41'28,55"S a 22°58'28,67"S e 48°16'43,83"W a 48°30'23,46"W). Essas espécies foram escolhidas por serem frequentes no Cerrado e por haver espécimes em locais seguros para a realização de observações noturnas sobre a biologia floral. Além disso, a ecologia da polinização da maioria destas espécies é bem conhecida (Gottsberger, 1989, 1994, 1999; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006), o que permite realizar inferências ecológico-evolutivas. Os vouchers foram depositados no BHCB sob os seguintes números de registro: *A. coriacea* (154419), *A. crassiflora* (154417), *A. dioica* com flores estaminadas (154422), *A. dioica* com flores hermafroditas (154423), *A. emarginata* (154421), *D. furfuracea* (154424), *G. australis* (154420) e *X. aromatica* (154418).

As observações em campo foram realizadas em diferentes horários, conforme o período de antese de cada espécie: noturna (entre 18 e 24 horas) para *A. dioica*, *A. coriacea* e *A. crassiflora* (Gottsberger, 1989, 1994, 1999; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006). Diurna (entre 06 e 18 horas) para *X. aromatica* (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006) e crepuscular (entre 15 e 22 horas) para *Duguetia furfuracea* (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006; Paulino-Neto, 2009). Observações diurnas e noturnas foram realizadas para *A. emarginata* e *G. australis* porque não há dados sobre a biologia floral na literatura.

Em campo foram feitas observações relativas à coloração das peças florais, à presença de odores, aos insetos visitantes, às regiões florais ingeridas por eles e à ocorrência de termogênese, esta utilizando o Termômetro Termopar HI 98704 K-J-T (Hanna Instruments®).

Os estudos anatômicos foram realizados em material fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas ou em formalina-ácido acético-etanol 50% (Johansen, 1940) por 48 horas, sendo todas as amostras dos vários verticilos florais conservados em etanol 70% (Jensen, 1962).

O material foi desidratado em série etílica, incluído a frio (Paiva *et al.*, 2011) em 2-hidroxietil-metacrilato (Leica[®]), seccionado em micrótomo rotativo com cerca de 8µm de espessura. As secções transversais e longitudinais foram coradas com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964, modificado) montando-se em Entellan[®]. O laminário preparado foi fotografado em microscópio Zeiss Axioskop 40 com câmara digital acoplada.

Foram realizados testes histoquímicos em secções a mão livre, utilizando-se amostras fixadas reidratadas e também em material incluído. Para evidenciar lignina, utilizou-se floroglucinol em meio ácido (Sass, 1951); para a localização de substâncias lipídicas, Sudan IV (Johansen, 1940); para identificar polissacarídeos ácidos e pectinas, vermelho de rutênio (Jensen, 1962); para a detecção de amido, lugol (Johansen, 1940); para verificar a ocorrência de compostos fenólicos, cloreto férrico acrescido de carbonato de sódio (Johansen, 1940) e para localizar proteínas, azul mercúrio de bromofenol (Mazia *et al.*, 1953). O laminário preparado foi fotografado em microscópio Zeiss Axioskop 40 com câmara digital acoplada.

Para microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2), desidratadas em série etílica, submetidas à secagem ao ponto crítico e metalizadas com ouro (Robards, 1978), sendo examinadas ao microscópio eletrônico de varredura Fei Company Quanta 200.

Para avaliar a evolução dos caracteres estruturais das flores da Annonaceae, foi realizada uma análise de agrupamento com os dados qualitativos (caracteres codificados para presença ou ausência). A análise de similaridade baseou-se no agrupamento de ligação única e distância de Manhattan para a construção do fenograma. O fenograma representa as proximidades fenotípicas entre os *taxa* (Agrawal & Fishbein, 2006). Para contrastar o fenograma com o filograma, a história evolutiva dos *taxa* foi reconstruída por meio de uma superárvore ultramétrica com base nos sete terminais. A superárvore foi construída no Phylomatic (<http://phylodiversity.net/phyloomatic/>) e em seguida, as politomias foram resolvidas com base nas filogenias disponíveis (Chatrou *et al.*, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises realizadas, foram estabelecidos 218 caracteres para as análises, os quais se encontram listados no Anexo S1 e documentados pelas Figuras S1-S5. A codificação dos caracteres pode ser vista na Tabela S1.

Valor filogenético potencial dos caracteres florais

O peso relativo dos caracteres referentes a aspectos ecológico-funcionais da flor, sua morfologia geral, ao cálice, à corola (estes subdivididos em caracteres das pétalas externas e das internas), ao androceu e ao gineceu podem ser verificados na Tabela 1.

Verifica-se que, considerando-se a estrutura das pétalas internas, 71,7% dos caracteres são informativos, ou seja, caracteres que apresentam pelo menos uma variação interespecífica.

Também são muito relevantes os caracteres ecológico-funcionais (66,7% de caracteres informativos), os quais também são intimamente relacionados às pétalas internas, seja por considerar a antese, que expõe tais pétalas, seja por incluir a termogênese e a emissão de odores, ambos vinculados às pétalas internas, como já referido por Galastri *et al.* (Capítulo 1, neste volume).

Cerca de 64% dos caracteres gerais da flor são importantes como informativos, e estes incluem vários aspectos também relacionados às pétalas internas, como a formação da câmara de polinização, que consiste na curvatura destas sobre os órgãos reprodutivos, e a presença de tecidos nutritivos que, conforme relatado por Galastri *et al.* (Capítulo 1, neste volume), encontra-se apenas na face adaxial das pétalas internas na maioria das espécies.

Um caráter morfológico informativo das flores é o formato do receptáculo floral que, em Annonaceae, pode ser côncavo, plano ou convexo. De acordo com Heusden (1992), o receptáculo em *Xylopia* é côncavo nas espécies neotropicais e parte das espécies africanas, assim como observado neste trabalho para *X. aromatica*, funcionando como um andróforo. Este trabalho também documenta o receptáculo côncavo para *G. australis*, o qual, por apresentar epiderme formada por células de paredes espessadas e lignificadas, provavelmente contribui para proteger os carpelos dos insetos visitantes (Dias *et al.*, 1998; Ratnayake *et al.*, 2007). Em *X. aromatica*, Dias *et al.* (1998) consideraram que o anel que se posiciona ao redor dos carpelos e que eleva os estames é de natureza apendicular, formado pela fusão das sépalas, pétalas e filetes na porção basal, portanto um hipanto apendicular, e que, na porção apical, é formado pela fusão apenas dos filetes em um tubo

estaminal. As observações deste trabalho, porém, não corroboram tal descrição, não havendo conação no androceu de nenhuma das espécies aqui estudadas, nem mesmo em *X. aromatica*.

O androceu, apesar de reunir apenas 52,5% de caracteres informativos, apresenta muitos aspectos importantes para a delimitação de gêneros, como a presença e a natureza de septos nas anteras (asseptada, com septos tapetais ou com septos parenquimáticos), a forma de dispersão do pólen (em mônades ou tétrades) e o tipo de abertura do pólen (inaperturado, zonaperturado ou com poros na região de união dos grãos de pólen da tétrade).

Não foram encontrados estaminódios nas espécies estudadas, nem mesmo em *X. aromatica*, apesar dos relatos de Heusden (1992) para o gênero, e de Dias *et al.* (1998) e Webber (1996) para esta espécie. Como nesta espécie os estames estão inseridos em diferentes alturas devido à presença do receptáculo côncavo, uma mesma secção passa pela altura dos filetes em alguns estames, pela altura do conectivo em outros e pelas anteras em outros, o que pode dar a falsa impressão de que ocorrem estames (aqueles cuja secção passou pelas anteras) e estaminódios (aqueles cuja secção passou pelo filete ou conectivo).

Pela análise da Tabela 1, verifica-se que os caracteres do gineceu foram os filogeneticamente mais conservativos (apenas 41,7% dos caracteres informativos). Galastri & Oliveira (Capítulo 4, neste volume) já destacaram este aspecto, que é esperado visto que os processos de megasporogênese e megagametogênese tendem a ser conservativo nas famílias.

Segundo Briehle-Mäck (1993), para *Annona* e *Rollinia*, existem três tipos de estigmas: no primeiro tipo, as papilas estigmáticas apenas se tocam e são completamente recobertas por secreções; no segundo, os estigmas são alongados e aproximadamente do mesmo diâmetro, com suas partes basais conatas pela epiderme; e, no terceiro tipo, as partes basais dos estigmas apresentam estruturas que se tocam, provocando a fusão epidérmica. As quatro *Annona* estudadas e *G. australis* apresentam fusão da parte basal de seus estigmas, apenas *D. furfuracea* e *X. aromatica* não apresentam formação do *compitum*, nas quais as papilas da epiderme estigmática apenas se tocam, sendo os carpelos completamente livres uns dos outros; os estigmas estão aderidos pela secreção mucilaginosa liberada por eles, conforme descrito também por Svoma (1998).

Durante a antese, os estigmas, o canal estilar e a região placentária tornam-se recobertos por mucilagem e, provavelmente, atuam na recepção do grão de pólen e na condução, hidratação e nutrição do tubo polínico durante o seu crescimento. A presença de

epiderme papilosa e secretora no estilete e na região de placentação também foi observada por Svoma (1998).

Assim, para a qualificação de espécies e gêneros, mostram-se mais relevantes os estudos estruturais e ultraestruturais da corola, em especial das pétalas internas, incluindo-se aspectos ecológico-funcionais e morfológicos gerais da flor, referentes à corola.

Sobre a evolução das flores de Annonaceae do Cerrado

O fenograma produzido encontra-se no lado direito da Figura 1. Ele representa o agrupamento de espécies de acordo com a similaridade morfológica. As relações evolutivas das espécies estudadas encontra-se ao lado esquerdo da Figura 1 e as linhas indicam a correspondência entre as espécies no fenograma e no filograma, em conjunto com o filograma resultante da compilação de dados da literatura (Chatrou *et al.*, 2012).

Duguetia furfuracea apresenta como caracteres exclusivos antese crepuscular, óvulo anacampilótopo e a presença de escamas e tricomas estrelados na epiderme de sépalas, pétalas e ovário. Caracteres exclusivos de *G. australis* são a abertura das pétalas cerca de dois meses antes dos verticilos reprodutivos se tornarem maduros, e pólen zonaperturado com exina pouco evidente. Já *X. aromatica* apresenta como caracteres diagnósticos idioblastos proteicos no mesofilo de sépalas e pétalas, células papilosas de citoplasma mais denso junto à parede periclinal externa na região mediano-apical das pétalas, conação das pétalas internas à semelhança do zíper, nectário floral, antera com septos parenquimáticos, microsporogênese simultânea e formação do núcleo secundário no megagametofito. Dentre as espécies analisadas, *X. aromatica* é a que detém maior número de peculiaridades.

Dentre as *Annona*, *A. emarginata* é a mais distinta, separando-se do grupo formado pelas outras três *Annona* (Fig. 1). Esta espécie apresenta polinização diurna, pequenos besouros como principais polinizadores (Nitidulidae e Staphylinidae) e ausência de termogênese, enquanto as outras três *Annona* apresentam antese noturna, termogênese e grandes besouros Dynastinae (Scarabaeidae) como polinizadores. Enquanto *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* apresentam tecido nutritivo apenas nas pétalas internas, em *A. emarginata*, o tecido nutritivo é observado nas pétalas internas e externas, as quais apresentam uma projeção alar não encontrada em nenhum outro gênero. Diferenças são observadas até mesmo no tecido nutritivo, muito semelhante entre *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*, com epiderme de células cuboides e tricomas tectores simples não glandulares, enquanto *A. emarginata* apresenta epiderme nutritiva papilosa, assim como

em *D. furfuracea*. A antera e o pólen de *A. emarginata* também se assemelham mais aos de *G. australis* e *D. furfuracea*, que apresentam anteras asseptadas, tapete ameboide e pólen inaperturado e liberado em mônades, enquanto as outras três *Annona* possuem anteras com septos tapetais, tapete glandular e pólen liberado em tétrades, com a região germinativa na junção dos grãos de pólen da tetrade. Analisando-se o fenograma obtido (Fig. 1), *A. emarginata* figura como grupo irmão das demais *Annona*.

A partir do registro das muitas características distintivas entre *A. emarginata* e as demais *Annona*, coloca-se em questão a recente inclusão do gênero *Rollinia* em *Annona* feita por Rainer (2007), em função de análises moleculares de *trnL*, *rpl16* e ITS2 que ainda não foram publicadas. Assim, a inclusão de *Rollinia* em *Annona* parece não ser muito adequada, tornando difícil o reconhecimento de sinapomorfias para o gênero recircunscrito. Isso indica que novos estudos estruturais e filogenéticos são necessários, a fim de verificar se realmente é pertinente a inclusão de *Rollinia* em *Annona*.

Annona coriacea, *A. crassiflora* e *A. dioica* apresentam caracteres florais muito semelhantes, tais como antese noturna, forte odor de fruto em decomposição, presença de termogênese, pétalas internas com tecidos nutritivos, anteras com septos tapetais, pólen liberado em tétrades e, como principal polinizador, segundo Gottsberger (1994), o besouro *Cyclocephala atricapilla*. Espécies que utilizam o mesmo nicho ecológico, segundo a teoria da exclusão competitiva, geralmente não podem coexistir. No entanto, essas três espécies ocorrem todas no mesmo local, possivelmente porque apresentam épocas de floração diferentes (Gottsberger, 1994). Assim, não ocorre sobreposição de florada, não ocorrendo competição por polinizadores entre as espécies.

De forma geral, o fenótipo parece seguir a filogenia. A exceção são os gêneros *Duguetia* e *Xylopia*. No Cerrado, *Xylopia* é fenotipicamente mais próximo de *Annona* que *Duguetia*, mas, filogeneticamente, *Duguetia* está mais próximo, o que sugere que a filogenia não determina totalmente a morfologia e anatomia floral na família.

CONCLUSÕES

A partir da extensa listagem de caracteres analisada neste trabalho, reconhece-se que os mais informativos provêm da corola, em especial das pétalas internas, devendo ser utilizados, preferencialmente, para a caracterização de gêneros e espécies e para a análise da evolução floral de Annonaceae.

A posição de *A. emarginata* no fenograma aqui apresentado evidencia uma maior distância dessa espécie em relação às outras *Annona*, o que sugere que a inclusão de *Rollinia* em *Annona* deveria ser revista.

O fenograma também aponta que, dentre as espécies de Cerrado, *Xylopia* é fenotipicamente mais próxima de *Annona* que *Duguetia*, sugerindo que a filogenia não determina totalmente a morfologia e anatomia floral em Annonaceae.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade em pesquisa de D.M.T. Oliveira. A Wilma de Grava Kempinas pela cessão de equipamentos. Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, pelo processamento das amostras e pela cessão de equipamentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. A Renato de Mello Silva, pela identificação das espécies.

REFERÊNCIAS

- Agrawal AA, Fishbein M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87: S132–S149.
- 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: 105–121.
- Briechle-Mäck M. 1993. Aspects of floral ontogeny and comparative anatomy of gynoecium and fruit in the genera *Annona* and *Rollinia*. *Annonaceae Newsletter* 9: 48–50.
- Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHJ, Couvreur TLP, Neubig KM, Abbott JR, Mols JB, Maas JW, Saunders RMK, Chase MW. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 5–40.
- Couvreur TLP, Ham RWJM van der, Mbele YM, Mbago FM, Johnson DM. 2009. Molecular and morphological characterization of a new montypic genus of Annonaceae, Mwasumbia, from Tanzania. *Systematic Botany* 34: 26–276.

- Couvreur TLP, Maas PJM, Meinke S, Johnson DM, Kleber PJA. 2012. Keys to the genera of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 74–83.
- Dias MC, Castro MM, Kinoshita LS, Semir J. 1998. Hipanto e tubo estaminal em *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Annonaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 21: 81–88.
- Doyle JA, Le Thomas A. 1997. Phylogeny and geographic history of Annonaceae. *Géographie physique et Quaternaire* 51: 353–361.
- Doyle JA, Sauquet H, Scharaschkin T, Le Thomas A. 2004. Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). *International Journal of Plant Science* 165 (4 Suppl.): S55–S67.
- Doyle JA, Le Thomas A. 2012. Evolution and phylogenetic significance of pollen in Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 190–221.
- Faegri K, Pijl L van der. 1979. *The principles of pollination ecology*. 3 ed. Oxford, Pergamon Press.
- Gottsberger G. 1989. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* spp. (Annonaceae) in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 167: 165–187.
- Gottsberger G. 1994. As anonáceas do Cerrado e a sua polinização. *Revista Brasileira de Biologia* 54: 391–402.
- Gottsberger G. 1999. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biology* 14: 143–152.
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I. 2006. In the evening when the beetles come: pollination in Annonaceae e *Philodendron*. In: Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I., eds. *Life in the Cerrado: a South American tropical seasonal ecosystem*. Pollination and seed dispersal. Vol. 2: 138–159. Leiden: Reta Verlag.
- Heusden ECH van. 1992. *Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution*. Blumea, Supplement 7: 7–36.
- Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A–138A.

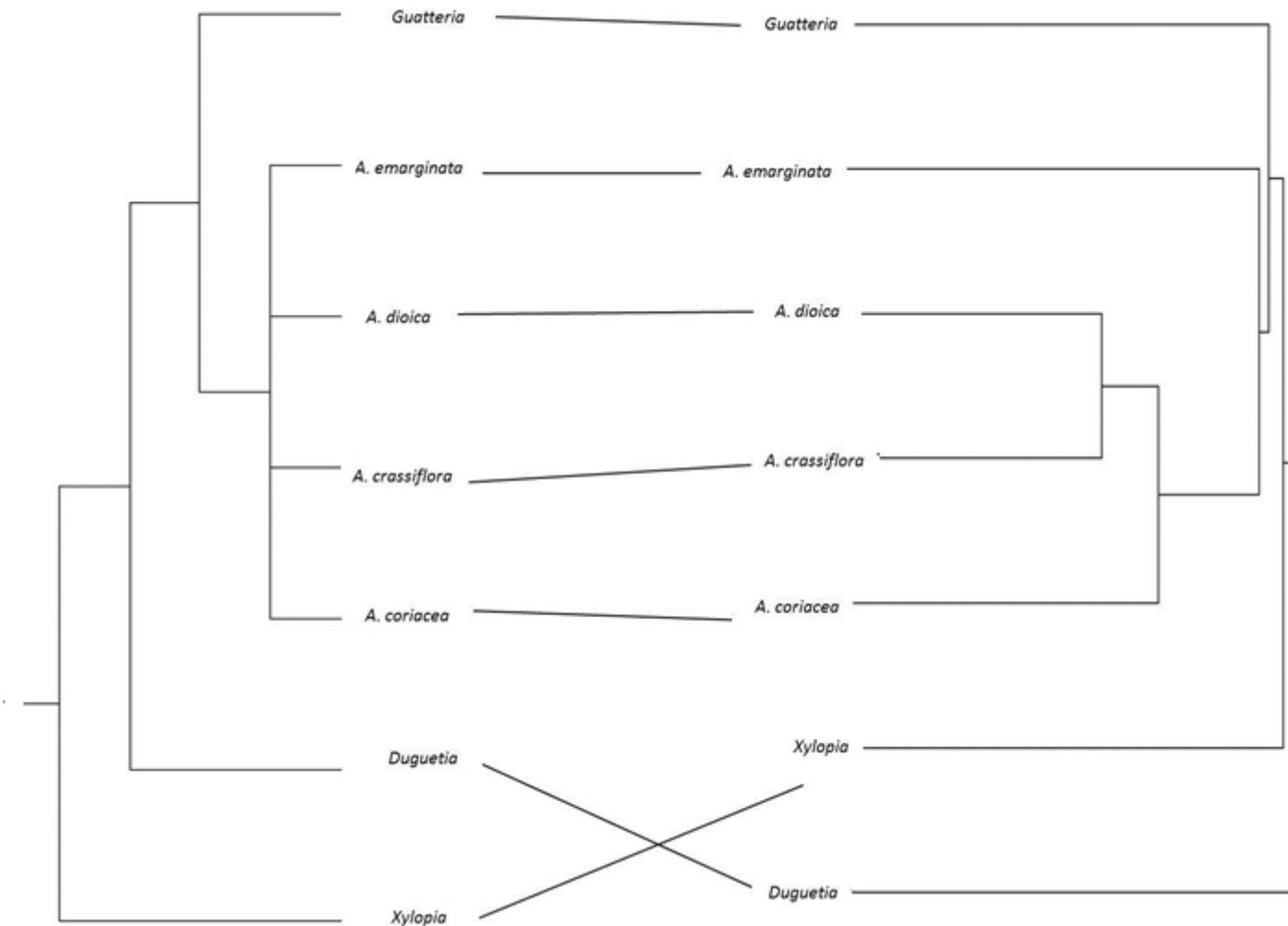
- Maas PJM, Kamer HM, Junikka L, Mello-Silva R, Rainer H. 2001. Annonaceae from central-eastern Brazil. *Rodriguésia* 52(80): 65–98.
- Maas P, Rainer H, Lobão A. 2013. Annonaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>. Acesso em: 09 de março de 2013.
- Mazia D, Brewer PA, Albert M. 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin* 104: 57–67.
- Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Jr MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE, Fagg CW. 2008. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF., eds. *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília, Embrapa Cerrados, 421–1279.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368–373.
- Paulino-Neto HF. 2009. História natural e interações flores-besouros em espécies de Cerrado. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT. 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN, eds. *Light microscopy: Methods and protocols*. New York: Springer/Humana Press, 37–49.
- Rainer H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.St-Hil. *Annalen Naturhistorischen Museums in Wien* 108B: 191–205.
- Ratnayake RMCS, Gunatilleke IAUN, Wijesundara DSA, Saunders RMK. 2007. Pollination ecology and breeding system of *Xylopia championii* (Annonaceae): Curculionid beetle pollination, promoted by floral scents and elevated floral temperatures. *International Journal of the Plant Science* 168: 1255–1268.
- Robards AW. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Hall JL. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 343–403.
- Sass JE. 1951. Botanical microtechnique. Ames: Iowa State University.

- Svoma E. 1998. Studies on the embryology and gynoecium structures in *Drimys winteri* (Winteraceae) and some Annonaceae. *Plant Systematics and Evolution* 209: 205–229.
- Uriarte M, Swenson NG, Chazdon RL, Comita LS, Kress WJ, Erickson D, Montaña JF, Zimmerman JK, Thompson J. 2010. Trait similarity, shared ancestry and the structure of neighbourhood interactions in a subtropical wet forest: implications for community assembly. *Ecology Letters* 13: 1503–1514.
- Walker JW. 1971. Pollen morphology, phytogeography and phylogeny of the Annonaceae. *Contributions from the Gray Herbarium* 202: 1–132.
- Webber AC. 1996. Biologia floral, polinização e aspectos fenológicos de algumas Annonaceae na Amazônia Central. Tese de doutorado, INPA-FUA, Manaus.

Tabela 1. Quantificação de caracteres informativos, não informativos e totais das flores de Annonaceae, com respectivas porcentagens em relação ao total.

Caracteres	Quantificação total		Ecológico-funcionais		Morfologia geral da flor		Cálice		Corola				Androceu		Gineceu	
									Pétalas externas		Pétalas internas					
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Informativos	128	58,7	6	66,7	14	63,6	12	57,1	27	61,4	33	71,7	21	52,5	15	41,7
Não informativos	90	41,3	3	33,3	8	36,4	9	42,9	17	38,6	13	28,3	19	47,5	21	58,3
Total e % do total	218	100	9	4,1	22	10,1	21	9,6	44	20,2	46	21,1	40	18,4	36	16,5

Figura 1. Relações entre o fenograma obtido (à direita) e o filograma (à esquerda) das espécies estudadas de Annonaceae, este resultante da compilação dos dados de Chatrou *et al.* (2012).



INFORMAÇÃO DE SUPORTE

ANEXO S1 - Lista de Caracteres

Caracteres referentes a aspectos ecológico-funcionais

Caráter 1 – Antese diurna: (0) ausente; (1) presente. Das espécies estudadas, apenas *Annona emarginata*, *Guatteria australis* e *Xylopia aromatica* apresentam antese diurna.

Caráter 2 – Antese noturna: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* apresentam antese noturna, que se inicia por volta das 18h30min.

Caráter 3 – Antese crepuscular: (0) ausente; (1) presente. Apenas *Duguetia furfuracea* apresenta antese crepuscular, que se inicia por volta das 16h30min e se estende pelo período noturno.

Caráter 4 – Antese com duração total de 12 horas: (0) ausente; (1) presente. Das sete espécies, apenas *A. crassiflora* apresenta antese com duração de 12 horas, ou seja, na mesma noite, as flores apresentam as fases pistilada e estaminada.

Caráter 5 – Antese com duração total de 48 horas: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *A. crassiflora*, todas as outras espécies estudadas apresentam antese com duração de 48 horas; a fase pistilada ocorre nas primeiras 24 horas, e a fase estaminada no restante do período de antese.

Caráter 6 – Antese com duração total de 72 horas: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies estudadas apresenta antese com essa duração, apesar de ser registrada na literatura para a família.

Caráter 7 – Protoginia: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies estudadas são protogínicas.

Caráter 8 – Termogênese: (0) ausente; (1) presente. Das sete espécies, apenas as que apresentam antese noturna são termogênicas, ou seja, *Annona coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica*.

Caráter 9 – Emissão de odores: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies emitem odores ao longo da antese. Nas espécies em que ocorre termogênese, a liberação de odores é intensificada com o aumento da temperatura floral.

Caracteres referentes a aspectos gerais da flor

Caráter 10 – Simetria actinomorfa: (0) ausente; (1) presente. As flores de todas as espécies apresentam simetria radial.

Caráter 11 – Simetria zigomorfa: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies estudadas apresenta flor com simetria bilateral.

Caráter 12 – Flor homoclamídea: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies apresenta homogeneidade entre sépalas e pétalas.

Caráter 13 – Flor heteroclamídea: (0) ausente; (1) presente. As sete espécies apresentam sépalas e pétalas distintas, portanto, todas são heteroclamídeas.

Caráter 14 – Câmara de polinização apenas com abertura apical: (0) ausente; (1) presente. *Annona crassiflora*, *A. emarginata* e *Guatteria australis* apresentam apenas abertura apical na câmara de polinização; essa abertura permite que os insetos polinizadores entrem e saiam da câmara sem obstáculos.

Caráter 15 – Câmara de polinização apenas com aberturas laterais: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies apresenta apenas aberturas laterais.

Caráter 16 – Câmara de polinização com aberturas apical e laterais: (0) ausente; (1) presente. *Duguetia furfuracea* e *Xylopia aromatica* apresentam uma abertura apical e três aberturas laterais, entre as pétalas internas, da câmara de polinização, o que permite trânsito dos insetos polinizadores.

Caráter 17 – Câmara de polinização sem abertura: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea* e *A. dioica*, não apresentam aberturas, nem apical, nem laterais, os insetos visitantes adentram por entre as pétalas imbricadas e permanecem no interior da flor até a queda das mesmas.

Caráter 18 – Pétala externa com projeção alar: (0) ausente; (1) presente. Apenas *A. emarginata* apresenta uma projeção alar dorsal das pétalas externas, característica típica do gênero *Rollinia*, ao qual essa espécie pertencia antes da inclusão de *Rollinia* em *Annona* por Rainer (2007).

Caráter 19 – Concrecimento entre pétalas externas e internas: (0) ausente; (1) presente. Em *A. crassiflora* e *A. emarginata*, ocorre o concrecimento entre as bases das pétalas internas e externas, o que leva à formação de uma câmara floral apenas com uma abertura apical.

Caráter 20 – Abertura completa de pétalas internas e externas: (0) ausente; (1) presente. Em *Guatteria australis*, as pétalas internas e externas abrem-se completamente cerca de dois meses antes dos verticilos reprodutivos se tornarem maduros. Durante esse tempo as pétalas crescem, triplicando de tamanho. Quando elas atingem o tamanho adequado, ocorre o fechamento das pétalas internas e da base das pétalas externas, formando a câmara de polinização. Só então os estigmas tornam-se receptivos e inicia-se a emissão de odores.

Caráter 21 – Abertura completa apenas de pétalas externas: (0) ausente; (1) presente. Em *A. coriacea*, *A. dioica*, *D. furfuracea* e *X. aromatica*, as pétalas internas permanecem fechadas constituindo a câmara floral, apenas as pétalas externas é que se abrem completamente. Em *A. crassiflora* e *A. emarginata*, nem as pétalas externas nem as internas abrem-se completamente, pois, como elas são concrecidas entre si, abrem-se apenas para formar a abertura da câmara de polinização.

Caráter 22 – Tecido nutritivo na face adaxial da região basal apenas das pétalas internas: (0) ausente; (1) presente. Em *A. dioica*, o tecido nutritivo é restrito à região basal das pétalas internas.

Caráter 23 – Tecido nutritivo nas margens da região basal apenas das pétalas internas: (0) ausente; (1) presente. Em *A. coriacea* e *A. crassiflora*, o tecido nutritivo se encontra restrito às margens da região basal das pétalas internas.

Caráter 24 – Tecido nutritivo na face adaxial das pétalas internas e externas: (0) ausente; (1) presente. *Annona emarginata* e *D. furfuracea* apresentam tecido nutritivo nas pétalas internas e externas.

Caráter 25 – Sistema sexual monoico: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *A. dioica*, todas as espécies são monoicas.

Caráter 26 – Sistema sexual dioico: (0) ausente; (1) presente. *Annona dioica* é a única espécie dioica, com indivíduos que produzem flores estaminadas e indivíduos que produzem flores hermafroditas.

Caráter 27 – Receptáculo côncavo: (0) ausente; (1) presente. *Guatteria australis* e *X. aromatica* apresentam receptáculo côncavo, sendo as únicas espécies que formam frutos múltiplos com frutíolos individualizados (Fig. S1A).

Caráter 28 – Receptáculo convexo: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata* e *D. furfuracea* apresentam receptáculo convexo, produzindo fruto múltiplo do tipo estrobiliforme, com fusão parcial ou completa dos frutíolos (Fig. S1B).

Caráter 29 – Receptáculo plano: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies apresenta receptáculo plano.

Caráter 30 – Hipanto: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies estudadas possui hipanto.

Caráter 31 – Tubo estaminal: (0) ausente; (1) presente. Não é observado tubo estaminal em nenhuma das sete espécies.

Caracteres das Sépalas

Caráter 32 – Conação das sépalas: (0) ausente; (1) presente. Sépalas conatas são observadas apenas em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica*.

Caráter 33 – Tricomas glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem tricomas glandulares em nenhuma das espécies estudadas.

Caráter 34 – Tricomas simples não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Tricomas tectores simples, de paredes espessadas e lignificadas (Figs S1C, D), por vezes com conteúdo fenólico, ocorrem em todas as espécies estudadas, exceto em *D. furfuracea*.

Caráter 35 – Tricomas estrelados não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não são observados tricomas estrelados na face abaxial de nenhuma das espécies.

Caráter 36 – Escamas estreladas não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *D. furfuracea* apresenta escamas estreladas, de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S1E), características do gênero.

Caráter 37 – Drusas nas células epidérmicas da face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona dioica* é a única espécie que apresenta drusas na face abaxial (Fig. S1F).

Caráter 38 – Estômatos em toda a face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Todas espécies apresentam estômatos na face abaxial (Fig. S1G).

Caráter 39 – Idioblastos fenólicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Todas as espécies apresentam idioblastos fenólicos no mesofilo (Fig. S1D).

Caráter 40 – Braquiesclereídes de paredes espessadas e lignificadas no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. As sete espécies apresentam braquiesclereídes em grupos e/ou isoladas de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S1H).

Caráter 41 – Células volumosas, no mesofilo, com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas em *A. crassiflora* são observadas células volumosas com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático, comprimindo, muitas vezes completamente, o protoplasto (Fig. S1I).

Caráter 42 – Idioblastos cristalíferos contendo drusas no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. No mesofilo das sépalas de todas as espécies, com exceção de *A. emarginata*, observam-se células contendo drusas (Fig. S1J).

Caráter 43 – Idioblastos lipídicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Ocorrem idioblastos lipídicos (Fig. S1K) no mesofilo de *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*.

Caráter 44 – Idioblastos proteicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *X. aromatica* apresenta idioblastos proteicos.

Caráter 45 – Vascularização por feixes colaterais: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam vascularização por feixes colaterais (Fig. S1L).

Caráter 46 – Fibras gelatinosas associadas ao feixe vascular: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorre em nenhuma das espécies fibras gelatinosas ao redor dos feixes vasculares.

Caráter 47 – Drusas nas células epidérmicas da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona dioica* e *D. furfuracea* apresentam drusas (Fig. S1M) em algumas células da face adaxial da epiderme.

Caráter 48 – Tricomas glandulares na face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não são observados tricomas glandulares em nenhuma das espécies.

Caráter 49 – Tricomas simples não glandulares na face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Observam-se tricomas tectores simples, de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S1N), alguns com conteúdo fenólico, em *A. crassiflora*, *A. dioica* e *G. australis*.

Caráter 50 – Tricomas estrelados não glandulares na face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *D. furfuracea* apresenta tricomas estrelados, de paredes espessadas e lignificadas.

Caráter 51 – Escamas estreladas não glandulares na face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Na face adaxial epidérmica, não se observam escamas em nenhuma das espécies.

Caráter 52 – Estômatos em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Estômatos só são observados em *G. australis* (Fig. S1O).

Caracteres das Pétalas Externas

Caráter 53 – Conação das pétalas externas: (0) ausente; (1) presente. Não há conação entre as pétalas externas de nenhuma das espécies.

Caráter 54 – Prefloração valvar: (0) ausente; (1) presente. Todas as sete Annonaceae estudadas apresentam pétalas externas com prefloração valvar.

Caráter 55 – Prefloração imbricada: (0) ausente; (1) presente. Não se observa prefloração imbricada em nenhuma das espécies estudadas.

Caráter 56 – Células cuboides na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. A epiderme na face abaxial é formada por células cuboides apenas em *A. emarginata*, *G. australis* e *X. aromatica* (Fig. S2A).

Caráter 57 – Células cuboides a prismáticas e radialmente alongadas na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* apresentam células cuboides a radialmente alongadas constituindo a face abaxial da epiderme (Fig. S2B).

Caráter 58 – Células cuboides a prismáticas e longitudinalmente alongadas na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *D. furfuracea*, as células que compõem a face abaxial da epiderme são cuboides a longitudinalmente alongadas (Fig. S2C).

Caráter 59 – Células papilosas na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não se observam células papilosas em nenhuma das espécies.

Caráter 60 – Drusas nas células epidérmicas da face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Drusas não são observadas nas células epidérmicas.

Caráter 61 – Células com conteúdo fenólico na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *A. coriacea* e *X. aromatica* (Fig. S2A) ocorrem algumas células fenólicas em meio à epiderme. Em *G. australis*, a maioria das células que constituem a epiderme apresenta conteúdo fenólico.

Caráter 62 – Tricomas glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não se observam tricomas glandulares nas espécies estudadas.

Caráter 63 – Tricomas simples não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Tricomas tectores simples, de paredes espessadas e lignificadas (Figs S2A, D), alguns com conteúdo fenólico, ocorrem em todas as espécies, exceto em *D. furfuracea*.

Caráter 64 – Tricomas estrelados não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Tricomas estrelados não foram observados em nenhuma das espécies.

Caráter 65 – Escamas estreladas não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Duguetia furfuracea* apresenta escamas estreladas, de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S2C), na face abaxial da epiderme.

Caráter 66 – Estômatos em toda a face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Todas as espécies apresentam estômatos (Fig. S2B) na epiderme abaxial.

Caráter 67 – Mesofilo homogêneo e parenquimático: (0) ausente; (1) presente. Em *A. crassiflora*, *A. emarginata*, *D. furfuracea*, *G. australis* e *X. aromatica*, o mesofilo é parenquimático, com células de formatos e tamanhos variados (Fig. S2E).

Caráter 68 – Mesofilo heterogêneo com região adaxial colenquimatosa e abaxial parenquimática: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea* e *A. dioica* apresentam o mesofilo diferenciado em duas regiões, uma adaxial, com células de paredes pécticas irregularmente espessadas (Fig. S2D), e uma abaxial, com células de formatos e tamanhos variados (Fig. S2F).

Caráter 69 – Idioblastos fenólicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Observam-se idioblastos fenólicos (Figs S2C, E) no mesofilo de todas as espécies.

Caráter 70 – Braquiesclereídes de paredes espessadas e lignificadas em todo o mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Braquiesclereídes em grupo e/ou isoladas (Fig. S2E) são encontradas por todo o mesofilo das espécies estudadas, exceto *D. furfuracea*.

Caráter 71 – Braquiesclereídes de paredes espessadas e lignificadas restritas à região próxima à inserção da pétala: (0) ausentes; (1) presentes. Em *D. furfuracea*, observam-se braquiesclereídes em grupos apenas na região próxima à inserção das pétalas externas.

Caráter 72 – Células volumosas, no mesofilo, com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona crassiflora*, *A. dioica* e *A. emarginata* apresentam células volumosas com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático (Fig. S2G), que acabam por comprimir completamente o protoplasto. Provavelmente, tais células estão associadas com a retenção de água nas pétalas, mantendo sua turgescência.

Caráter 73 – Idioblastos cristalíferos contendo drusas no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Células contendo drusas (Fig. S2H) são observadas em *A. coriacea*, *A. dioica*, *A. emarginata* e *G. australis*.

Caráter 74 – Idioblastos lipídicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Idioblastos lipídicos (Fig. S2G) são observados em *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*.

Caráter 75 – Idioblastos proteicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *X. aromatica* apresenta idioblastos proteicos (Fig. S2I).

Caráter 76 – Vascularização por feixes colaterais: (0) ausente; (1) presente. Em todas as espécies, a vascularização é feita apenas por feixes colaterais (Fig. S2J).

Caráter 77 – Fibras gelatinosas associadas ao feixe vascular: (0) ausentes; (1) presentes. Observam-se fibras gelatinosas associadas aos feixes vasculares (Fig. S2J) em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *G. australis*. É provável que essas fibras também estejam relacionadas à retenção de água e manutenção da turgescência das pétalas.

Caráter 78 – Espaços intercelulares conspícuos e volumosos no mesofilo, observados na porção mediano-distal das pétalas: (0) ausentes; (1) presentes. Observa-se maior volume dos espaços intercelulares da região mediano-distal das pétalas externas em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica*.

Caráter 79 – Epiderme homogênea na face adaxial, com células cuboides: (0) ausente; (1) presente. Em *A. crassiflora* e *G. australis*, toda a face adaxial apresenta células cuboides (Fig. S2K).

Caráter 80 – Epiderme homogênea na face adaxial, com células prismáticas e radialmente alongadas: (0) ausente; (1) presente. Em *A. coriacea* e *A. dioica*, a face adaxial apresenta células radialmente alongadas (Fig. S2F) em toda a sua extensão.

Caráter 81 – Epiderme homogênea na face adaxial, com células prismáticas e longitudinalmente alongadas: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies possui células longitudinalmente alongadas na face adaxial epidérmica.

Caráter 82 – Epiderme heterogênea na face adaxial, com células papilosas na região proximal e cuboides na mediano-distal: (0) ausente; (1) presente. Devido à porção nutritiva presente em *A. emarginata* e *D. furfuracea*, a região proximal da pétala é formada por células papilosas (Fig. S2L), e a região mediano-apical por células cuboides (Fig. S2M).

Caráter 83 – Epiderme heterogênea na face adaxial, com células cuboides na região proximal e papilosas na mediano-distal: (0) ausente; (1) presente. Em *X. aromatica*, a face adaxial epidérmica apresenta células cuboides (Fig. S2N) na região proximal e células papilosas (Fig. S2O), com maior densidade citoplasmática subjacente à parede periclinal externa, na região mediano-apical.

Caráter 84 – Drusas nas células epidérmicas da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Ocorrem drusas nas células epidérmicas de *G. australis* e *X. aromatica*.

Caráter 85 – Células com conteúdo fenólico na face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Encontram-se células fenólicas na epiderme de *D. furfuracea* e *G. australis*, em maior densidade nesta última espécie.

Caráter 86 – Tricomas glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem tricomas glandulares em nenhuma das espécies.

Caráter 87 – Tricomas simples não glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Com exceção de *A. emarginata* e *D. furfuracea*, as demais espécies apresentam tricomas tectores simples, de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S2K), alguns com conteúdo fenólico, em toda a face adaxial epidérmica.

Caráter 88 – Tricomas simples não glandulares restritos à região não nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona emarginata* apresenta, na região não nutritiva, tricomas tectores simples de paredes espessadas e lignificadas, alguns com conteúdo fenólico.

Caráter 89 – Tricomas simples não glandulares restritos à região nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem tricomas tectores simples na região nutritiva de nenhuma das espécies.

Caráter 90 – Tricomas estrelados não glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem tricomas estrelados por toda a face adaxial epidérmica em nenhuma das espécies.

Caráter 91 – Tricomas estrelados não glandulares restritos à região não nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Na região não nutritiva de *D. furfuracea*, observam-se tricomas estrelados, de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S2P).

Caráter 92 – Tricomas estrelados não glandulares restritos à região nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Na região nutritiva, não são observados tricomas estrelados em nenhuma das espécies.

Caráter 93 – Escamas estreladas não glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem escamas estreladas em nenhuma das espécies.

Caráter 94 – Estômatos em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata* e *G. australis*, estômatos ocorrem em toda a face adaxial (Fig. S2Q).

Caráter 95 – Estômatos restritos à região não nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *D. furfuracea*, estômatos são restritos à região não nutritiva da pétala.

Caráter 96 – Estômatos restritos à região nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Estômatos restritos à região nutritiva não são observados em nenhuma das espécies estudadas.

Caracteres das Pétalas Internas

Caráter 97 – Conação das pétalas internas: (0) ausente; (1) presente. Apenas *X. aromatica* apresenta pétalas internas conatas. A conação ocorre por meio da interdigitação de células radialmente alongadas da região proximal da pétala (Fig. S3A).

Caráter 98 – Prefloração valvar: (0) ausente; (1) presente. As pétalas internas apresentam prefloração valvar em *A. crassiflora*, *A. emarginata* e *X. aromatica*.

Caráter 99 – Prefloração imbricada: (0) ausente; (1) presente. Em *A. coriacea*, *A. dioica*, *D. furfuracea* e *G. australis*, a prefloração das pétalas internas é imbricada. Em função desse tipo de prefloração, *A. coriacea* e *A. dioica* apresentam câmara floral completamente fechada.

Caráter 100 – Células cuboides na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona crassiflora*, *A. emarginata*, *G. australis* e *X. aromatica* apresentam toda a face abaxial epidérmica formada por células cuboides (Fig. S3B).

Caráter 101 – Células cuboides a prismáticas e radialmente alongadas na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *A. coriacea* e *A. dioica*, ocorrem células cuboides a radialmente alongadas (Fig. S3C) constituindo a face abaxial epidérmica.

Caráter 102 – Células cuboides a prismáticas longitudinalmente alongadas na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Duguetia furfuracea* apresenta células prismáticas e longitudinalmente alongadas (Fig. S3D) formando a epiderme na sua face abaxial.

Caráter 103 – Células papilosas na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Nenhuma das espécies apresenta células papilosas na face abaxial.

Caráter 104 – Drusas nas células epidérmicas da face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não se observam drusas na epiderme das espécies estudadas.

Caráter 105 – Células com conteúdo fenólico na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Ocorrem células fenólicas na face abaxial de *D. furfuracea* e *G. australis*.

Caráter 106 – Tricomas glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Nenhuma das espécies estudadas apresenta tricomas glandulares na face abaxial epidérmica.

Caráter 107 – Tricomas simples não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Com exceção de *D. furfuracea*, as demais espécies apresentam tricomas tectores simples de paredes espessadas e lignificadas (Figs S3B, C, E), algumas com conteúdo fenólico.

Caráter 108 – Tricomas estrelados não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em nenhuma das espécies, são encontrados tricomas estrelados na face abaxial.

Caráter 109 – Escamas estreladas não glandulares na face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *D. furfuracea*, observam-se escamas estreladas, de paredes espessadas e lignificadas (Figs S3D, F) na face abaxial epidérmica.

Caráter 110 – Estômatos em toda a face abaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Estômatos são observados em todas as espécies (Fig. S3E), exceto em *X. aromatica*.

Caráter 111 – Mesofilo homogêneo e parenquimático: (0) ausente; (1) presente. O mesofilo é parenquimático e homogêneo (Fig. S3G), formado por células de formatos e tamanhos variados em *A. crassiflora*, *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *X. aromatica*.

Caráter 112 – Mesofilo heterogêneo com região adaxial colenquimatosa e abaxial parenquimática: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea* e *A. dioica* apresentam mesofilo heterogêneo com uma região adaxial, formada por células de paredes irregularmente espessadas (Fig. S3H), e uma região abaxial, de células parenquimáticas de formatos e tamanhos variados (Fig. S3I).

Caráter 113 – Mesofilo heterogêneo com região adaxial parenquimática e abaxial colenquimatosa: (0) ausente; (1) presente. *Guatteria australis* apresenta mesofilo heterogêneo, com região adaxial formada por células parenquimáticas de formatos e tamanhos variados (Fig. S3J) e região abaxial constituída por células de paredes irregularmente espessadas (Fig. S3K).

Caráter 114 – Idioblastos fenólicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Todas as espécies apresentam idioblastos fenólicos no mesofilo (Figs S3B, D, E, J).

Caráter 115 – Braquiesclereídes de paredes espessadas e lignificadas no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Com exceção de *D. furfuracea*, as outras espécies estudadas apresentam braquiesclereídes (Fig. S3L) em grupos e/ou isoladas, de paredes espessadas e lignificadas, ao longo do mesofilo.

Caráter 116 – Braquiesclereídes de paredes espessadas e lignificadas restritas à região próxima à inserção da pétala: (0) ausentes; (1) presentes. Em *D. furfuracea* ocorrem braquiesclereídes em grupos e/ou isoladas, de paredes espessadas e lignificadas, apenas na região próxima à inserção da pétala.

Caráter 117 – Células volumosas, no mesofilo, com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático: (0) ausentes; (1) presentes. *Annona crassiflora*, *A. dioica* e *A. emarginata* apresentam, em todo o mesofilo, células volumosas com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático, que acaba por comprimir completamente o protoplasto (Fig. S3M). Provavelmente, essas células estão relacionadas à retenção de água e manutenção da turgescência das pétalas.

Caráter 118 – Idioblastos cristalíferos contendo drusas no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *G. australis* e *X. aromatica* apresentam idioblastos com drusas no mesofilo.

Caráter 119 – Idioblastos lipídicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Observam-se idioblastos lipídicos (Fig. S3N) em *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*.

Caráter 120 – Idioblastos proteicos no mesofilo: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *X. aromatica* apresenta idioblastos proteicos (Fig. S3O).

Caráter 121 – Vascularização por feixes colaterais: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies são vascularizadas por feixes colaterais (Fig. S3P).

Caráter 122 – Fibras gelatinosas associadas ao feixe vascular: (0) ausentes; (1) presentes. Fibras gelatinosas são observadas ao redor dos feixes vasculares de *A. coriacea* e *G. australis* (Fig. S3P). Acredita-se que também estejam relacionadas à retenção de água e manutenção da turgescência da pétala.

Caráter 123 – Espaços intercelulares no mesofilo conspícuos e volumosos na porção mediano-distal das pétalas: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas em *X. aromatica*, observam-se espaços intercelulares mais volumosos e conspícuos na região mediano-distal.

Caráter 124 – Epiderme homogênea na face adaxial, com células cuboides: (0) ausente; (1) presente. Em *G. australis*, a face adaxial apresenta células cuboides em toda a sua extensão (Fig. S3J).

Caráter 125 – Epiderme homogênea na face adaxial, com células prismáticas radialmente alongadas: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies possui células radialmente alongadas na face adaxial.

Caráter 126 – Epiderme homogênea na face adaxial, com células prismáticas longitudinalmente alongadas: (0) ausente; (1) presente. Em nenhuma das espécies estudadas, ocorrem células longitudinalmente alongadas constituindo a face adaxial.

Caráter 127 – Epiderme heterogênea na face adaxial, com células papilosas na região proximal e cuboides na mediano-distal: (0) ausente; (1) presente. Em *D. furfuracea*, a região proximal da pétala apresenta epiderme papilosa na face adaxial (Fig. S3Q), compondo o tecido nutritivo, enquanto o restante da pétala apresenta células cuboides.

Caráter 128 – Epiderme heterogênea na face adaxial, com células papilosas na região proximal e prismáticas radialmente alongadas na mediano-distal: (0) ausente; (1) presente. Em *A. emarginata*, devido à presença de tecido nutritivo, observa-se uma região proximal formada por células papilosas (Fig. S3R), e uma região mediano-distal com células radialmente alongadas.

Caráter 129 – Epiderme heterogênea na face adaxial, com células prismáticas radialmente alongadas na região proximal e cuboides na mediano-distal: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* apresentam região proximal de células radialmente alongadas (Fig. S3S), compondo o tecido nutritivo, e região mediano-distal de células cuboides (Fig. S3H).

Caráter 130 – Epiderme heterogênea na face adaxial, com células prismáticas radialmente alongadas na região proximal, prismáticas radialmente alongadas na região mediana e papilosas na distal: (0) ausente; (1) presente. *Xylopia aromatica* possui células cuboides na porção proximal (Fig. S3G); células radialmente alongadas na porção mediana da pétala, formando o nectário floral (Fig. S3T); na porção distal, as células papilosas apresentam citoplasma mais denso próximo à face periclinal externa da parede celular (Fig. S3U), provavelmente indicando função secretora.

Caráter 131 – Drusas nas células epidérmicas da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas *X. aromatica* apresenta drusas nas células epidérmicas adaxiais.

Caráter 132 – Células com conteúdo fenólico na face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *D. furfuracea* e *G. australis*, ocorrem células fenólicas na face adaxial da epiderme.

Caráter 133 – Tricomas glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Nenhuma das espécies estudadas apresenta tricomas glandulares na face adaxial.

Caráter 134 – Tricomas simples não glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Tricomas tectores simples (Fig. S3S) são observados em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *G. australis* e *X. aromatica*.

Caráter 135 – Tricomas simples não glandulares restritos à região não nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Em *A. emarginata*, tricomas tectores simples, de paredes espessadas e lignificadas, são observados apenas na região não nutritiva da pétala.

Caráter 136 – Tricomas simples não glandulares restritos à região nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Nas espécies estudadas, não ocorrem tricomas tectores simples apenas na região nutritiva.

Caráter 137 – Tricomas estrelados não glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Nenhuma das espécies apresenta tricomas estrelados em toda face adaxial.

Caráter 138 – Tricomas estrelados não glandulares restritos à região não nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. *Duguetia furfuracea* apresenta tricomas estrelados de paredes espessadas e lignificadas (Fig. S3V) apenas na região não nutritiva da face adaxial.

Caráter 139 – Tricomas estrelados não glandulares restritos à região nutritiva da face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem tricomas estrelados apenas na região nutritiva em nenhuma das espécies.

Caráter 140 – Escamas estreladas não glandulares em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem escamas estreladas nas espécies estudadas.

Caráter 141 – Estômatos em toda a face adaxial: (0) ausentes; (1) presentes. Com exceção de *X. aromatica*, as demais espécies apresentam estômatos em toda face adaxial (Fig. S3X).

Caráter 142 – Nectário: (0) ausente; (1) presente. Nectário floral só é observado em *X. aromatica* (Fig. S3T).

Caracteres referentes ao androceu

Caráter 143 – Flor polistêmone: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam flor com grande número de estames.

Caráter 144 – Conação de estames: (0) ausente; (1) presente. Não ocorre conação entre estames em nenhuma das espécies estudadas (Fig. S4A).

Caráter 145 – Estaminódios: (0) ausentes; (1) presentes. Não se observam estaminódios nas espécies analisadas.

Caráter 146 – Estames laminares: (0) ausentes; (1) presentes. Todas as espécies estudadas possuem estames laminares (Fig. S4A).

Caráter 147 – Estames com filete cilíndrico: (0) ausentes; (1) presentes. Não ocorrem estames com filete cilíndrico em nenhuma das espécies.

Caráter 148 – Filete curto: (0) ausente; (1) presente. O filete é curto nas sete espécies (Fig. S4A).

Caráter 149 – Filete alongado: (0) ausente; (1) presente. Não se observam filetes alongados nas espécies estudadas.

Caráter 150 – Conectivo com prolongamento apical em forma de escudo: (0) ausente; (1) presente. Nas sete espécies, o conectivo apresenta um prolongamento apical em forma de escudo (Fig. S4B), o qual, provavelmente, protege as anteras dos vorazes insetos polinizadores.

Caráter 151 – Espessamento e lignificação das paredes das células epidérmicas do conectivo: (0) ausente; (1) presente. O conectivo apresenta epiderme formada por células de paredes espessadas e lignificadas em todas as espécies analisadas (Fig. S4C).

Caráter 152 – Conectivo com camadas subepidérmicas de células de paredes espessadas e lignificadas: (0) ausente; (1) presente. Apenas *A. coriacea* e *G. australis* apresentam, além da epiderme do conectivo, camadas subepidérmicas com células de paredes espessadas e lignificadas.

Caráter 153 – Antera monoteca: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma espécie tem antera monoteca.

Caráter 154 – Antera biteca: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam antera com duas tecas (Fig. S4D).

Caráter 155 – Antera tetrateca: (0) ausente; (1) presente. Em nenhuma das espécies, ocorre antera tetrateca.

Caráter 156 – Antera introsa: (0) ausente; (1) presente. Das espécies estudadas, nenhuma tem antera introsa.

Caráter 157 – Antera extrosa: (0) ausente; (1) presente. Os estames das sete espécies apresentam anteras extrorsas.

Caráter 158 – Antera tetrasporangiada: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam anteras tetrasporangiadas (Fig. S4D).

Caráter 159 – Antera com deiscência longitudinal: (0) ausente; (1) presente. As sete espécies possuem anteras com deiscência longitudinal (Fig. S4E).

Caráter 160 – Tapete do tipo básico: (0) ausente; (1) presente. O tapete é do tipo básico em todas as espécies estudadas, com a camada média externa e o endotécio de mesma origem, e a camada média interna e o tapete com origem comum (Fig. S4F).

Caráter 161 – Tapete secretor: (0) ausente; (1) presente. *Annona coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *G. australis* e *X. aromatica* apresentam tapete secretor (Fig. S4G).

Caráter 162 – Tapete ameboide: (0) ausente; (1) presente. O tapete de *A. emarginata* e *D. furfuracea* é do tipo ameboide (Fig. S4H).

Caráter 163 – Formação de periplasmódio: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *A. emarginata*, nas outras espécies as células do tapete tornam-se binucleadas e têm suas paredes digeridas formando um periplasmódio ou sincício, que é completamente consumido até o final do desenvolvimento do grão de pólen.

Caráter 164 – Drusas no tapete: (0) ausentes; (1) presentes. Apenas em *A. emarginata*, foi registrada a presença de cristais do tipo drusa no tapete (Fig. S4H).

Caráter 165 – Antera com septos tapetais: (0) ausente; (1) presente. Anteras com septos formados pelo tapete apenas são encontradas em *A. coriacea*, *A. crassiflora* e *A. dioica* (Fig. S4G). Esse tipo de septo desaparece com o desenvolvimento do pólen, conforme o tapete vai sendo consumido.

Caráter 166 – Antera com septos parenquimáticos: (0) ausente; (1) presente. Anteras com septos formados pelo tapete e pelas camadas médias são encontradas apenas em *X. aromatica* (Fig. S4I). Esse tipo de septo permanece até a deiscência, pois, mesmo com o consumo do tapete, as camadas médias continuam formando os septos.

Caráter 167 – Anteras asseptadas: (0) ausente; (1) presente. *Annona emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis* apresentam anteras asseptadas (Fig. S4J).

Caráter 168 – Pólen liberado em mônades: (0) ausente; (1) presente. Mônades (Figs S4J, K) são encontradas em *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*, as três espécies que apresentam anteras asseptadas.

Caráter 169 – Pólen liberado em tétrades: (0) ausente; (1) presente. Tétrades (Figs S4I, L) são observadas em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica*, todas espécies com anteras septadas.

Caráter 170 – Pólen liberado em políades: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das sete espécies libera o pólen em políades.

Caráter 171 – Microsporogênese sucessiva: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *X. aromatica*, as outras espécies estudadas apresentam meiose sucessiva, com formação de parede individualizando os microsporos ao final da meiose I (Fig. S4M).

Caráter 172 – Microsporogênese simultânea: (0) ausente; (1) presente. Apenas *X. aromatica* apresenta meiose simultânea (Fig. S4N).

Caráter 173 – Meiose com formação exclusiva de tétrades isobilaterais: (0) ausente; (1) presente. Em *A. emarginata*, *D. furfuracea* e *G. australis*, a meiose forma apenas tétrades isobilaterais (Fig. S4H).

Caráter 174 – Meiose com formação de tétrades isobilaterais e tetraédricas: (0) ausente; (1) presente. Em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica* e *X. aromatica*, a meiose produz tanto tétrades isobilaterais quanto tetraédricas.

Caráter 175 – Reserva de amido na célula vegetativa do grão de pólen: (0) ausente; (1) presente. Observou-se reserva de amido na célula vegetativa em todas as espécies, com exceção de *G. australis*.

Caráter 176 – Reserva proteica na célula vegetativa do grão de pólen: (0) ausente; (1) presente. Reserva proteica foi observada na célula vegetativa em todas as espécies.

Caráter 177 – Exina delgada: (0) ausente; (1) presente. *Duguetia furfuracea* e *G. australis* apresentam grãos de pólen com exina delgada (Figs S4K, O).

Caráter 178 – Exina espessa: (0) ausente; (1) presente. As quatro espécies de *Annona* e *X. aromatica* formam grãos de pólen com exina espessa (Figs S4L, P).

Caráter 179 – Ornamentação da exina: (0) ausente; (1) presente. A exina é ornamentada nas *Annona* e em *D. furfuracea* (Fig. S4K). Em *G. australis* e *X. aromatica*, a exina é lisa (Figs S4I, O).

Caráter 180 – Pólen inaperturado: (0) ausente; (1) presente. Apenas *A. emarginata* e *D. furfuracea* apresentam pólen inaperturado (Figs S4K, O).

Caráter 181 – Pólen zonaperturado: (0) ausente; (1) presente. Apenas *G. australis* apresenta uma zona de abertura (Fig. S4Q) do pólen.

Caráter 182 – Pólen com abertura na zona proximal de junção da tétrade: (0) ausente; (1) presente. Nas *Annona* e em *X. aromatica*, espécies que apresentam tétrades polínicas, observam-se as aberturas dos grãos na junção das tétrades (Fig. S4L).

Caracteres referentes ao gineceu

Caráter 183 – Conação de carpelos: (0) ausente; (1) presente. Em todas as espécies, os carpelos são livres entre si (Fig. S1B).

Caráter 184 – Gineceu pluricarpelar: (0) ausente; (1) presente. As sete espécies apresentam gineceu formado por numerosos carpelos (Fig. S1B).

Caráter 185 – Estigma curto: (0) ausente; (1) presente. O estigma é curto em *A. crassiflora*, *A. dioica*, *A. emarginata* e *X. aromatica* (Fig. S5A).

Caráter 186 – Estigma alongado: (0) ausente; (1) presente. Estigma alongado pode ser observado em *A. coriacea*, *D. furfuracea* e *G. australis* (Fig. S5B).

Caráter 187 – Concrecimento dos estigmas formando o *compitum* ou cabeça estigmática: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *D. furfuracea* e *X. aromatica*, as outras espécies apresentam a fusão da base dos estigmas constituindo o *compitum* ou cabeça estigmática (Figs S5C, D), que protege o ovário da ação de insetos polinizadores.

Caráter 188 – Estilete curto: (0) ausente; (1) presente. Estilete curto ocorre em *A. dioica*, *A. emarginata* e *D. furfuracea* (Fig. S5C).

Caráter 189 – Estilete longo: (0) ausente; (1) presente. Estilete longo pode ser observado em *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *G. australis* e *X. aromatica* (Fig. S5A).

Caráter 190 – Canal estilar com epiderme secretora: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam canal estilar formado por células papilosas a radialmente alongadas, secretoras, de paredes delgadas e citoplasma denso com reserva amilífera (Fig. S5E).

Caráter 191 – Ovário súpero: (0) ausente; (1) presente. As sete espécies apresentam ovário súpero (Figs S5F, G).

Caráter 192 – Tricomas simples na epiderme ovariana externa: (0) ausentes; (1) presentes. Observam-se tricomas tectores simples na epiderme ovariana externa de *A. coriacea*, *A. crassiflora*, *A. dioica*, *G. australis* e *X. aromatica* (Fig. S5H).

Caráter 193 – Tricomas estrelados na epiderme ovariana externa: (0) ausentes; (1) presentes. Não foram encontrados tricomas estrelados em nenhuma das espécies.

Caráter 194 – Escamas estreladas na epiderme ovariana externa: (0) ausentes; (1) presentes. *Duguetia furfuracea* apresenta escamas estreladas na epiderme ovariana externa (Fig. S5I), aspecto característico do gênero.

Caráter 195 – Um óvulo por carpelo: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *X. aromatica*, as outras espécies apresentam um óvulo por carpelo (Fig. S5F), raramente dois.

Caráter 196 – Vários óvulos por carpelo: (0) ausente; (1) presente. *Xylopia aromatica* é a única espécie que, tipicamente, apresenta vários óvulos por carpelo (Fig. S5G).

Caráter 197 – Placentação basal: (0) ausente; (1) presente. Nas espécies que apresentam apenas um óvulo por carpelo, a placentação é basal (Fig. S5F).

Caráter 198 – Placentação parietal: (0) ausente; (1) presente. Na única espécie com vários óvulos por carpelo, *X. aromatica*, a placentação é parietal (Fig. S5G).

Caráter 199 – Região placentária com células epidérmicas glandulares: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam células epidérmicas glandulares na região placentária (Fig. S5J), uma continuação da epiderme secretora do canal estilar.

Caráter 200 – Óvulo anátropo: (0) ausente; (1) presente. Com exceção de *D. furfuracea*, todas as espécies apresentam óvulos anátropos (Fig. S5K).

Caráter 201 – Óvulo anacampilótropo: (0) ausente; (1) presente. Óvulo anacampilótropo é observado apenas em *D. furfuracea* (Fig. S5L).

Caráter 202 – Óvulo hemianátropo: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies apresenta óvulo hemianátropo, apesar de ser referido para Annonaceae na literatura.

Caráter 203 – Óvulo tenuinucelado: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das Annonaceae estudadas apresenta óvulo tenuinucelado.

Caráter 204 – Óvulo crassinucelado: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies apresentam óvulos crassinucelados.

Caráter 205 – Óvulo unitegmentado: (0) ausente; (1) presente. Não se observam óvulos unitegmentados nas espécies estudadas.

Caráter 206 – Óvulo bitegmentado: (0) ausente; (1) presente. As sete Annonaceae analisadas apresentam óvulos bitegmentados (Figs S5K, L), com o tegumento externo formado por quatro a seis camadas de células, enquanto o tegumento interno é bisseriado.

Caráter 207 – Óvulo tritegmentado: (0) ausente; (1) presente. Não foram encontrados óvulos tritegmentados nas espécies estudadas, apesar dos relatos existentes na literatura para a família.

Caráter 208 – Pericalaza no óvulo: (0) ausente; (1) presente. Todas as espécies estudadas apresentam óvulos pericalazais (Fig. S5K).

Caráter 209 – Hipóstase no óvulo: (0) ausente; (1) presente. Hipóstase evidente é observada apenas nos óvulos de *D. furfuracea*, *G. australis* e *X. aromatica* (Fig. S5L).

Caráter 210 – Reserva de amido no megagametofito: (0) ausente; (1) presente. Nas sete espécies, observa-se reserva amilífera no megagametofito.

Caráter 211 – Tétrade linear de megasporos: (0) ausente; (1) presente. Em todas as espécies, a meiose origina tétrade linear de megasporos (Fig. S5M).

Caráter 212 – Tétrade de megasporos em forma de T: (0) ausente; (1) presente. Não ocorre tétrade de megasporos em forma de T em nenhuma das espécies analisadas.

Caráter 213 – Megagametofito com desenvolvimento do tipo *Polygonum*: (0) ausente; (1) presente. Todas as Annonaceae estudadas apresentam megagametofito com desenvolvimento do tipo *Polygonum*, com três antípodas no polo calazal, duas sinérgides e uma oosfera no polo micropilar, e uma célula central (Fig. S5N).

Caráter 214 – Antípodas persistentes: (0) ausentes; (1) presentes. Nas Annonaceae aqui estudadas, as antípodas são persistentes.

Caráter 215 – Fusão dos núcleos polares formando o núcleo secundário: (0) ausente; (1) presente. Apenas em *X. aromatica*, observa-se formação do núcleo secundário (Fig. S5O).

Caráter 216 – Micrópila endostomal: (0) ausente; (1) presente. Devido ao tegumento interno ser mais longo que o tegumento externo, a micrópila das sete espécies é formada apenas pelo endostômio (Fig. S5J).

Caráter 217 – Micrópila exostomal: (0) ausente; (1) presente. Não ocorre micrópila exostomal dentre as Annonaceae estudadas.

Caráter 218 – Micrópila em ziguezague: (0) ausente; (1) presente. Nenhuma das espécies estudadas apresenta micrópila em ziguezague.

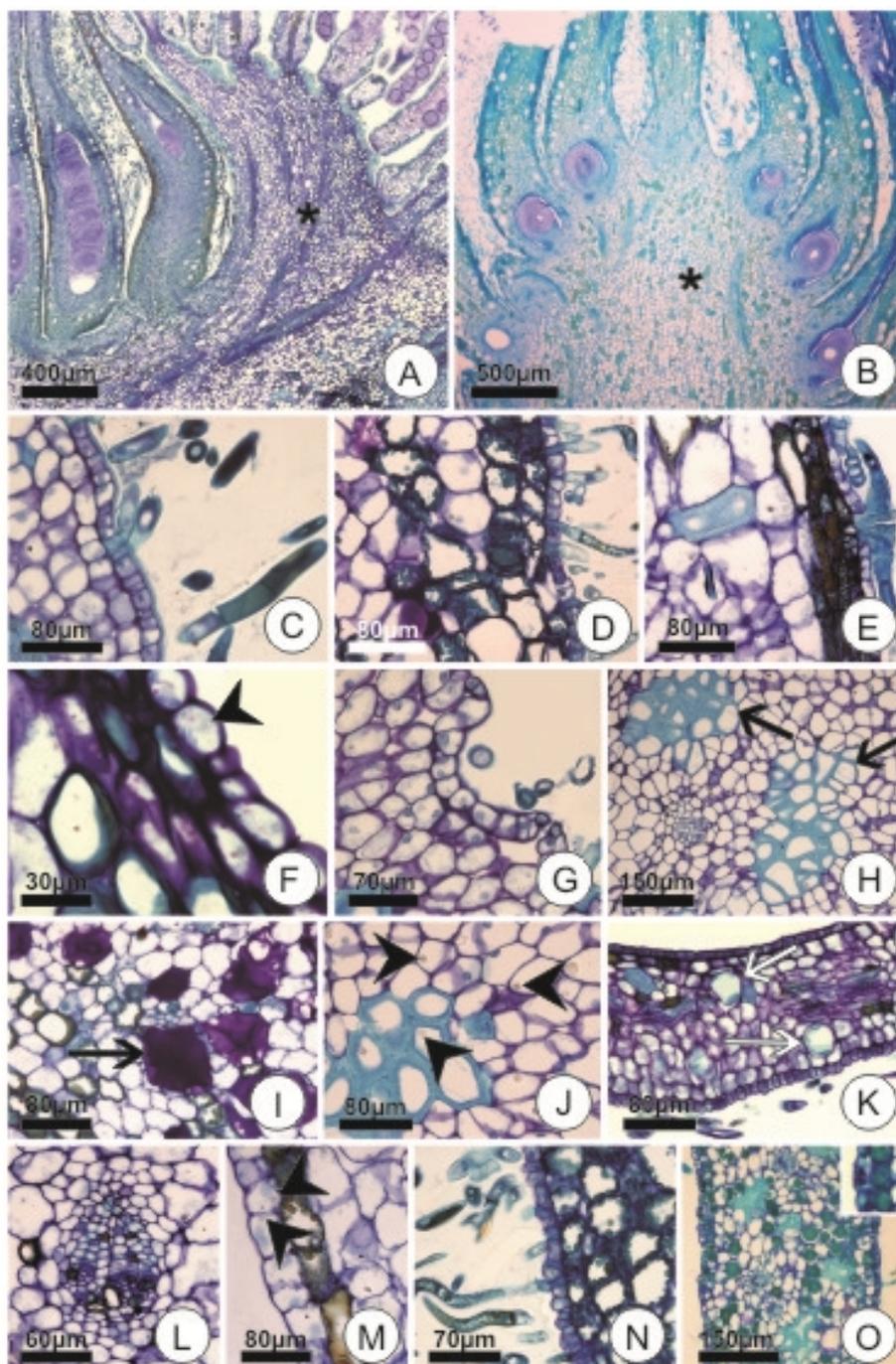


Figura S1. Caracteres florais (A-B) e anatomia das sépalas (C-O) de *Annona coriacea* (C, G-H, J), *Annona crassiflora* (D, I, N), *Annona dioica* (F), *Annona emarginata* (K), *Duguetia furfuracea* (B, E, L-M), *Guatteria australis* (O) e *Xylopia aromatica* (A). Secções transversais (C-J, L-M), secções longitudinais (A-B, K, O). A. Receptáculo côncavo (asterisco). B. Receptáculo convexo (asterisco). C-D. Tricomas tectores simples não glandulares na face abaxial epidérmica. E. Escama estrelada na face abaxial epidérmica. F. Face abaxial epidérmica contendo drusas (ponta de seta). G. Estômato. H. Braquiesclereídes de paredes espessadas (seta). I. Células volumosas com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático (seta). J. Drusas no mesofilo das sépalas (ponta de seta). K. Idioblastos lipídicos no mesofilo (seta). L. Feixe vascular colateral. M. Drusas na face adaxial epidérmica (ponta de seta). N. Tricomas tectores simples não glandulares na face adaxial epidérmica. O. Estômatos na face adaxial das sépalas.

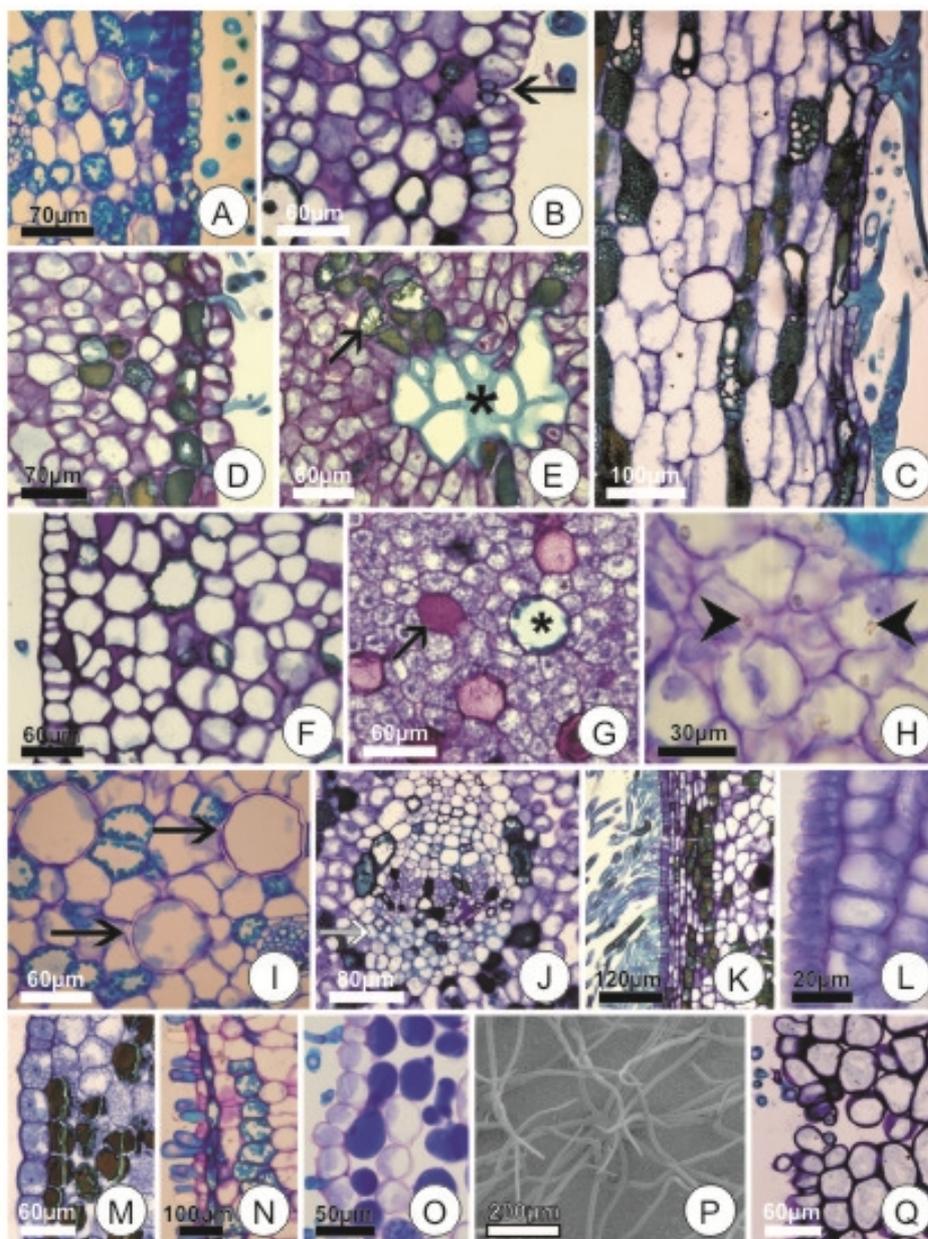


Figura S2. Pétala externa de *Annona coriacea* (Q), *Annona crassiflora* (J-K), *Annona dioica* (B, D-F), *Annona emarginata* (G-H, L), *Duguetia furfuracea* (C, M, P) e *Xylopia aromatica* (A, I, N-O). Secções transversais (A-B, D-J, M-O, Q), secções longitudinais (C, K-L), vista frontal (P). A. Tricomas tectores simples não glandulares na face abaxial. B. Estômato na face abaxial epidérmica (seta). C. Escamas estreladas na face abaxial. D. Tricomas tectores simples na face abaxial. E. Idioblastos fenólicos (seta) e braquiesclereídes no mesofilo (asterisco). F. Mesofilo colenquimatoso e face adaxial epidérmica. G. Idioblastos lipídicos (asterisco) e células com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático (seta) no mesofilo. H. Cristais do tipo drusa no mesofilo (ponta de seta). I. Idioblastos proteicos no mesofilo (seta). J. Feixe vascular colateral; notar a presença de fibras gelatinosas (seta) ao redor do floema. K. Tricomas tectores simples na face adaxial epidérmica. L. Epiderme papilosa do tecido nutritivo. M. Face adaxial de região não nutritiva. N. Face adaxial da região proximal de pétala externa. O. Epiderme adaxial da região mediano-distal de pétala externa; notar a maior densidade citoplasmática próxima à parede periclinal externa. P. Detalhe de tricomas estrelados. Q. Estômato na face adaxial epidérmica.

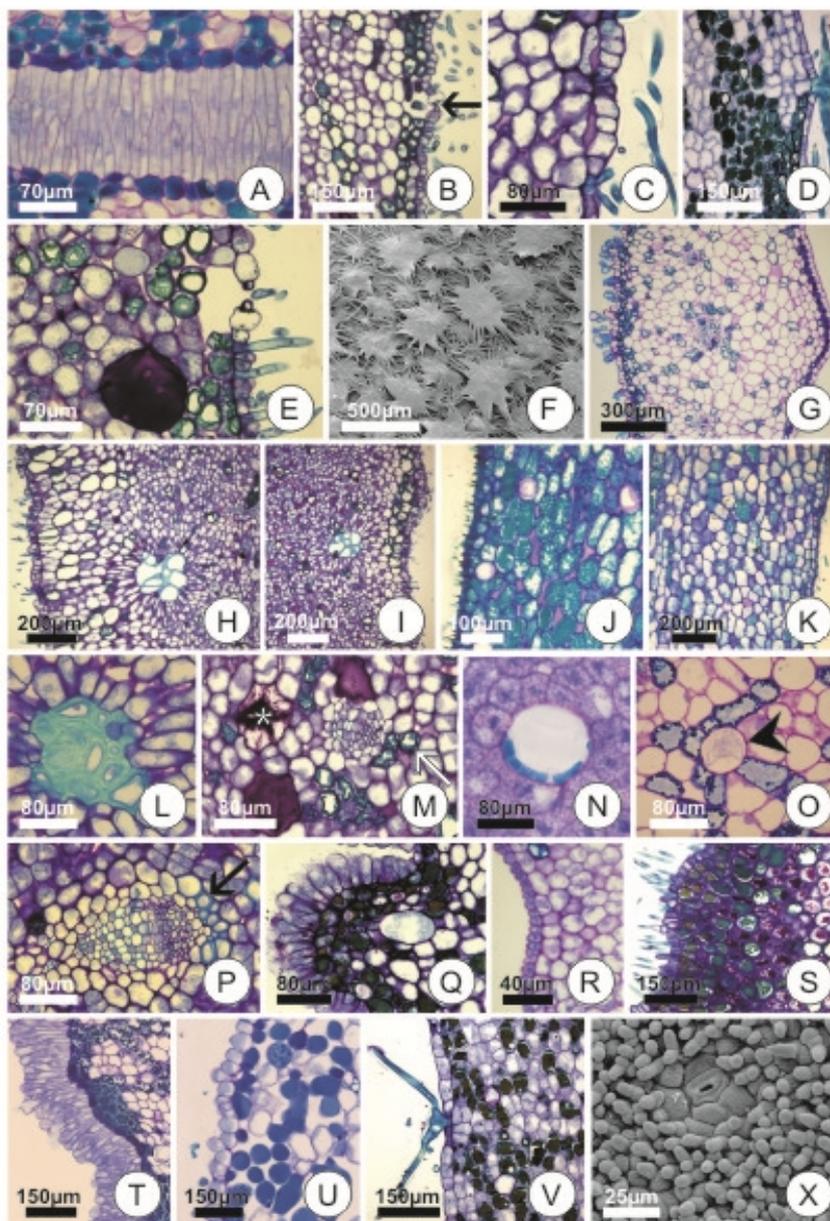


Figura S3. Pétala interna de *Annona coriacea* (B, L, P), *Annona crassiflora* (E, M), *Annona dioica* (C, H-I, S), *Annona emarginata* (N, R, X), *Duguetia furfuracea* (D, F, Q, V), *Guatteria australis* (J-K) e *Xylopia aromatica* (A, G, O, T-U). Secções transversais (A, E, G, L-S, U-V), secções longitudinais (B-D, H-K, T), vistas frontais (F, X). A. Junção entre pétalas internas a semelhança do zíper. B. Tricomas tectores simples não glandulares e estômatos (seta) na face abaxial. C. Tricomas tectores simples na face abaxial. D. Escamas estreladas na face abaxial. E. Estômato na face abaxial. F. Escamas estreladas. G. Mesofilo homogêneo. H-I. Mesofilo heterogêneo, com região região adaxial formada por células de paredes irregularmente espessadas (H), e região abaxial de células parenquimáticas de formatos e tamanhos variados (I). J-K. Mesofilo heterogêneo, com região adaxial formada por células parenquimáticas de formatos e tamanhos variados (J) e região abaxial constituída por células de paredes irregularmente espessadas (K). L. Braquiesclereídes no mesofilo. M. Mesofilo com idioblastos fenólicos (seta) e células com acúmulo de substâncias pécticas no espaço periplasmático (asterisco). N. Idioblasto lipídico. O. Idioblasto proteico (ponta de seta). P. Feixe vascular colateral; notar a presença de fibras gelatinosas (seta) associadas ao floema. Q-S. Região nutritiva da face adaxial. T. Nectário floral. U. Região mediano-distal das pétalas internas; notar a maior densidade citoplasmática próxima da parede periclinal externa. V. Tricoma estrelado na região não nutritiva da face adaxial. X. Estômatos na face adaxial epidérmica.

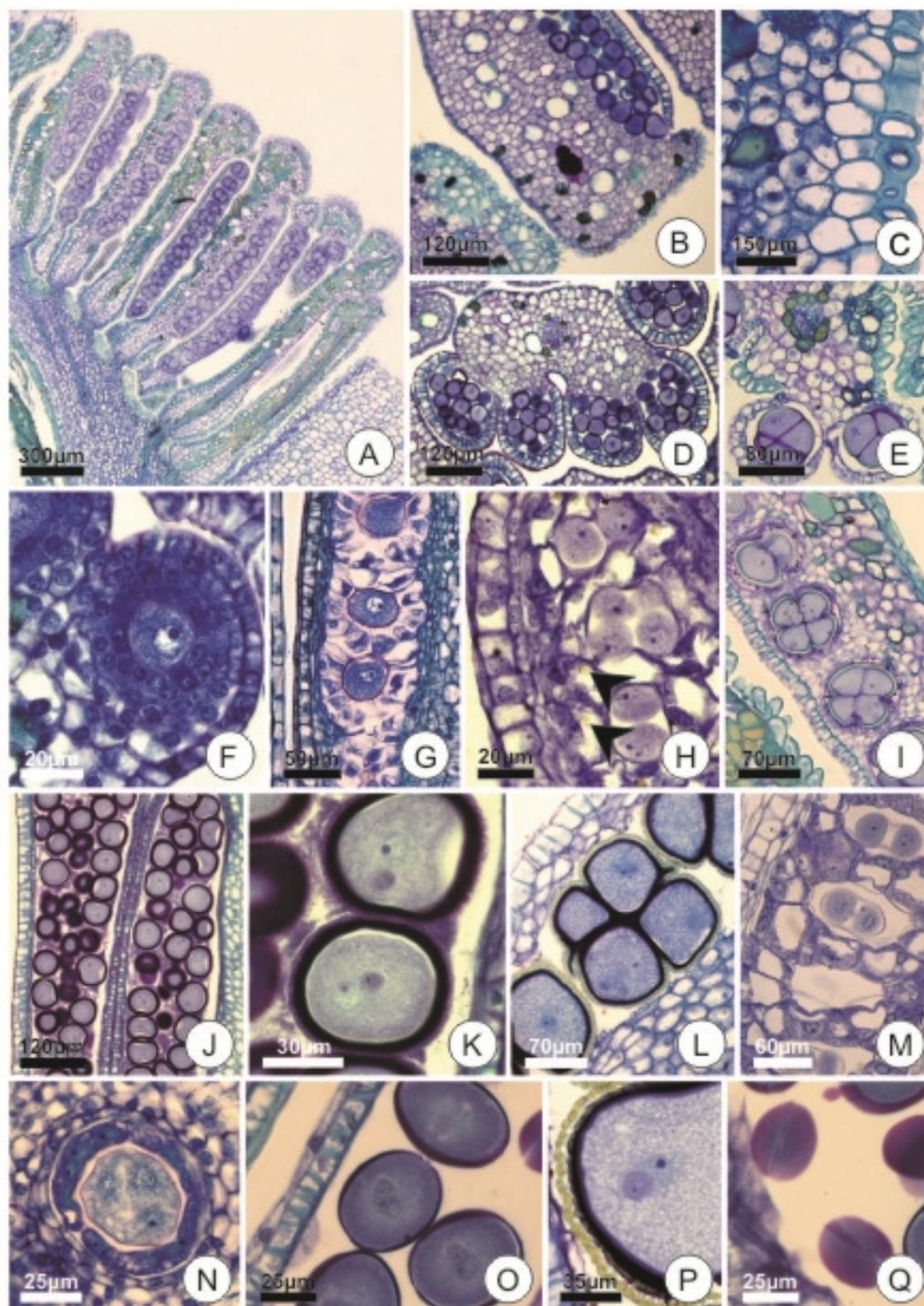


Figura S4. Caracteres do androceu de *Annona coriacea* (M, P), *Annona crassiflora* (F-G), *Annona dioica* (C, L), *Annona emarginata* (B, D, H), *Duguetia furfuracea* (J-K), *Guatteria australis* (O, Q) e *Xylopia aromatica* (A, E, I, N). Secções transversais (C-F, N, P), secções longitudinais (A-B, G-M, O, Q). A. Vista geral dos estames. B. Conectivo em forma de escudo. C. Epiderme do conectivo com células de paredes espessadas e lignificadas. D. Antera tetrasporangiada. E. Antera mostrando o estômio. F. Microsporocito e parede da antera em formação. G. Antera com septos tapetais. H. Tapete ameboide; notar cristais no tapete (ponta de seta). I. Antera com septo parenquimático. J. Antera asseptada. K. Mônade com exina ornamentada. L. Tétrade de pólen. M. Microsporogênese sucessiva. N. Microsporogênese simultânea. O. Mônades de exina delgada e lisa. P. Exina espessa e ornamentada. Q. Pólen zonaperturado.

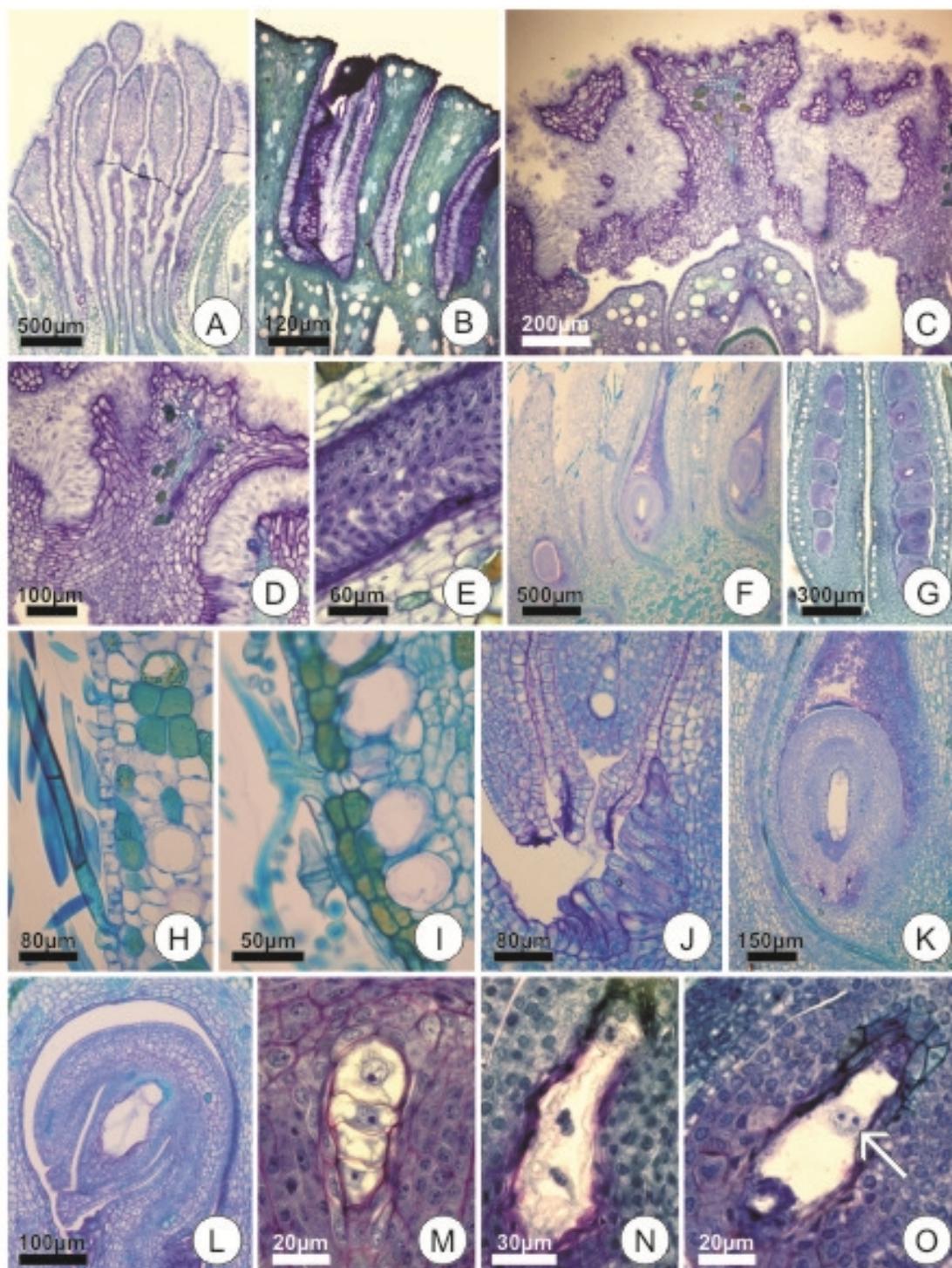


Figura S5. Caracteres referentes ao gineceu de *Annona dioica* (E-F, H, J-K), *Annona emarginata* (C-D), *Duguetia furfuracea* (I, L, N), *Guatteria australis* (B, M) e *Xylopia aromatica* (A, G, O). Secções longitudinais. A. Conjunto de estigmas e estiletes. B-C. Compitum formado pela união dos estigmas. D. Detalhe da fusão dos estigmas formando o compitum. E. Detalhe do canal estilar. F. Ovário súpero com apenas um óvulo por carpelo. G. Ovário súpero com vários óvulos por carpelo. H. Tricomas tectores na epiderme ovariana externa. I. Escama estrelada na epiderme ovaria externa. J. Detalhe da região placentária com células epidérmicas glandulares. K. Óvulo anátropo. L. Óvulo anacampilótropo. M. Tétrade linear de megasporos. N. Megagametofito. O. Célula central com núcleo secundário (seta).



Considerações Finais

O presente trabalho reúne um significativo conjunto de dados estruturais e ultraestruturais inéditos referentes às flores de espécies de Annonaceae típicas do Cerrado. São contribuições que favorecem o entendimento de relações ecológicas dessas plantas com seus polinizadores, bem como apontam aspectos relevantes, com potencial uso tanto taxonômico quanto filogenético.

Nos dois primeiros capítulos, abordaram-se estruturas que atuam como recompensas aos polinizadores, os tecidos nutritivos e o nectário floral, que favorecem a ocorrência da polinização. Deve-se destacar que a presença de nectário floral em *Xylopia aromatica* é registro inédito para o gênero e que este é o primeiro trabalho a caracterizar, ao nível ultraestrutural, os tecidos nutritivos de flores de Annonaceae.

Nos dois capítulos seguintes, foram documentados os processos de esporogênese e de gametogênese, tanto masculina quanto feminina, esta confirmando a grande constância dos caracteres no grupo. A importância dos caracteres estruturais e ontogenéticos do pólen para a sistemática é reforçada por este trabalho, que destaca diversas semelhanças e diferenças que podem, inclusive, ser utilizadas na separação dos gêneros e espécies.

Finalmente, no último capítulo, evidenciou-se a relevância das peculiaridades florais para avaliação de inter-relações específicas, a partir da análise de significativo número de caracteres ecológico-funcionais e estruturais dos vários verticilos das flores de Annonaceae, especialmente da corola.

Como perspectivas, este trabalho aponta para o interesse em se avaliarem, detalhadamente, espécies de outros gêneros da família e típicas de outros ambientes, de modo a ampliar as conclusões que os dados estruturais permitiram tirar com este trabalho.