



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JUCA ABRAMO BARRERA SAN MARTIN

**ASPECTOS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS DA
ANDROSPOROGÊNESE E ANDROGAMETOGÊNESE DE
RHYNCHOSPORA PUBERA (VAHL) BOECKELER
(CYPERACEAE).**

JUCA ABRAMO BARRERA SAN MARTIN

**ASPECTOS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS DA
ANDROSPOROGÊNESE E ANDROGAMETOGÊNESE DE
RHYNCHOSPORA PUBERA (VAHL) BOECKELER
(CYPERACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela

Londrina
2010

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S194a San-Martin, Juca Abramo Barrera

Aspectos estruturais e ultraestruturais da androsporogênese e androgametogênese de *Rhynchospora pubera* (vahl) Boeckeler (Cyperaceae) / Juca Abramo Barrera San Martin. – Londrina, 2010.
48 f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010

Inclui bibliografia.

1. Cyperaceae – Teses. 2. Monocotiledônea – Teses. 3. Citologia genética – Teses. 4. Meiose – Teses. 5. Células – Núcleo – Teses. 6. Microscopia eletrônica – Teses I. Vanzela, André Luis Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V Título.

CDU 582.542.2

JUCA ABRAMO BARRERA SAN MARTIN

**ASPECTOS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS DA
ANDROSPOROGÊNESE E ANDROGAMETOGÊNESE DE
RHYNCHOSPORA PUBERA (VAHL) BOECKELER (CYPERACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath UFRGS –
Porto Alegre – RS

Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010

SAN-MARTIN, Juca Abramo Barrera. **Aspectos estruturais e ultraestruturais da androsporogênese e androgametogênese de *Rhynchospora pubera* (vahl) Boeckeler (Cyperaceae)**. 2010 48 f. Dissertação (Mestrado em biologia molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Cyperaceae é considerada a terceira maior família de monocotiledôneas compreendendo cerca de 120 gêneros, com 4.000 a 5.000 espécies com distribuição cosmopolita. No Brasil, existem de 500 a 600 espécies organizadas em 44 gêneros, preferencialmente de terrenos úmidos e alagados. Esta família apresenta algumas características citológicas importantes como: presença de cromossomos holocinéticos e ocorrência de meiose pós-reducional. Além disso, durante o processo de androsporogênese não ocorre a formação de tétrade e os quatro núcleos resultantes da meiose são contidos em uma única célula chamada Pseudomônade. Três dos quatro núcleos degeneram e apenas um se torna viável, originando a célula vegetativa e a célula generativa. Neste trabalho, buscamos compreender a androsporogênese e androgametogênese de *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckler nos estágios iniciais da meiose, o processo de isolamento de três dos quatro núcleos para posterior degeneração, a formação da Pseudomônade e o desenvolvimento do androgametófito maduro. Para tal, anteras de *R. pubera* foram coletadas em Recife (PE), fixadas para microscopia de luz convencional, para imunocitoquímica para detecção de elementos de parede celular e para microscopia eletrônica de transmissão. Em *R. pubera*, a célula mãe de andrósporo passa por um processo de polarização, com a migração de seu núcleo para a região basal da célula, oposto ao que ocorre com os outros gêneros da família. Este núcleo também passa por um processo de polarização, direcionando seus complexos de poros para a região apical, voltada ao citoplasma. Após a polarização, a célula sofre meiose e apenas um núcleo migra para região central. Os núcleos que permanecem na região basal são isolados por vesículas do Complexo de Golgi, formando cisternas ao redor dos núcleos degenerativos. Estas cisternas originam uma parede celular, que aparece interna à Pseudomônade. Esta parede foi marcada positivamente com os anticorpos JIM7 e JIM13 que reconhecem respectivamente pectina e proteína Arabinogalactano (AGPs). Após o isolamento, os núcleos degenerativos mostraram características ultraestruturais indicativas de morte celular programada. O núcleo funcional sofre a primeira mitose ainda na presença dos núcleos degenerativos, formando a célula vegetativa e a célula generativa. A célula generativa sofre a segunda mitose, originando os núcleos gaméticos, após a degeneração completa dos três núcleos e antes do grão de pólen ser liberado da antera.

Palavras-chave: Cyperaceae. Microsporogênese. Envelope nuclear. PMC. Microscopia eletrônica de transmissão.

SAN-MARTIN, Juca Abramo Barrera. **Structural and ultrastructural aspects of androsporogênese e androgamentogênese de *Rhynchospora pubera* (vahl) Boeckeler (Cyperaceae)**. 2010 48 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Cyperaceae is considered the third largest family of monocotyledonous plants comprising about 120 genera, with 4000 to 5000 species with cosmopolitan distribution. In Brazil, there are 500 to 600 species arranged in 44 genera, preferably in moist and flooded land. This family has some important cytologic features such as presence of holocentric chromosomes and occurrence of post-reductional meiosis. Moreover, during the pollen grain development not occur the formation of tetrad and the four nuclei resulting from meiosis are contained in a single cell called pseudomonad. Three of the four nuclei degenerate and only one becomes viable originating the vegetative cell and the generative cell. In this work we described the development of pollen grain of *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckler in the early stages of meiosis, the process of isolation of three of the four nuclei to further degeneration, the formation and development of pseudomonad and male gametophyte. For this, anthers of *R. pubera* were collected in Recife (PE), fixed for conventional light microscopy, immunocytochemistry for the detection of elements in the cell wall and transmission electron microscopy. In *R. pubera* the microspores mother cell undergoes a process of polarization, with the migration of the nucleus to the basal cell, opposite to occurs with other genera of the family. This nucleus also undergoes a process of polarization, directing their pore complexes to the apical region facing the cytoplasm. After polarization, the cell undergoes meiosis, and only one nucleus migrates to the central region. The nuclei that remain in the basal region are isolated by vesicles of Golgi apparatus, forming inner cell wall around the degenerating nuclei. This wall was marked positively with antibodies JIM7 and recognizing JIM13 respectively pectin and protein 10 arabinogalactans (AGPs). After isolation, the nuclei showed degenerative ultrastructural changes indicative of programmed cell death. The nucleus functional undergoes the first mitosis even in the presence of degenerative nuclei, forming a vegetative cell and generative cell. The generative cell undergoes a second mitosis to form the gametic nuclei, after the complete degeneration of the three nuclei and before the pollen is released from the anther.

Keywords: Cyperaceae. Microsporogenesis. Nuclear envelope. PMC. Transmission electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Corte transversal de anteras de *R. pubera* no estágio pré-meiótico. (A) são vistas as cinco camadas de tecido da antera. No tecido esporogênico são vistas as PMCs contendo um núcleo central com cromatina descompactada e um único e grande nucléolo (seta). (EP) epiderme, (ED) endotécio, (ML) camada média, (T) tapete e (ST) tecido esporogênico. Azul de toluidina. 200X. (B) micrografia eletrônica da PMC cercada por uma fina parede de calose (setas) e mostrando muitas gotas de lipídeos (L). (N) Núcleo, (T) tapete. 5800X. (C) Detalhe do núcleo (N) da PMC cercado por um envoltório nuclear (ne) regular. O nucléolo proeminente (nl) é rodeado por um halo eletrólucido (setas). (L) Gotas lipídicas. 9700X. (D) O citoplasma da célula do tapete (T) exhibe a mesma eletrondensidade do citoplasma das PMCs. Notar a presença de organelas citoplasmáticas. (ED) endotécio, (ML) camada média, (ST) tecido esporogênico e (N) núcleo. 5800X..... 26
- Figura 2** – Cortes transversais de anteras em prófase I de *R. pubera*. (A) Várias PMCs exibindo o núcleo na região abaxial. Estes núcleos contêm cromatina compactada bem como retículo nuclear (nr). O nucléolo é lateralmente posicionado. (ML) camada média, (T) tapete, (ST) tecido esporogênico. Azul de toluidina. 1000X. (B) O núcleo (N) está localizado na região abaxial da PMC. Notar as fibras de cromatina compactadas e a presença de uma série de cisternas do retículo nuclear (nr). Detalhe-conexões plasmodesmais estão presentes entre as PMCs. (T) tapete. 5800X. (C) O citoplasma da célula do tapete (T) é mais eletrondenso que o citoplasma da PMC. Notar a presença de vacúolos (V) e o encolhimento do citoplasma (setas) das células do tapete. Retículo nuclear (nr) e nucléolo (nl). 5800X. (D) Envoltório nuclear da PMC mostrando uma dilatação inicial das cisternas perinucleares (setas). 37000X. (E e F) Detalhes do núcleo da PMC. (E) Concentração dos complexos de poro direcionados para o “pool” de organelas da PMC. 97000X. (F) Dilatação das membranas do envoltório nuclear levando à formação do retículo nuclear (membrana interna) (nr) e do retículo endoplasmático (membrana externa) (er). Seta aponta o envoltório nuclear e (cw) parede celular. 58000..... 27

CAPÍTULO 3

- Figura 1** – Diferentes tratamentos para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão da Pseudomônade *R. pubera*. (A) A pseudomônade apresenta um formato de pêra com três núcleos degenerativos (dn) na região larga da célula e um núcleo funcional (fn) mais volumoso na

região mais estreita. Hematoxilina acética. 1.000X. **(B)** Cortes semifinos longitudinais à antera corados com azul de toluidina. Os núcleos degenerativos (dn) se encontram na região basal que estabelece contato com o tapete (T) e o núcleo funcional (fn) está na região apical. 1.000X. **(C)** Técnica do PAS mostrando marcação positiva na parede celular interna (setas), núcleo funcional (fn) e núcleos degenerativos (dn). 1.000X. **(D)** Eletromicrografia da Pseudomônade mostrando os três núcleos degenerativos (dn) isolados na região basal por uma fina parede interna que estabelece contato (setas) com a parede da Pseudomônade. 2.850X..... 39

Figura 2 – **(A)** Núcleo funcional (fn) grande, contendo cromatina bastante descompactada e nucléolo (seta) evidente. 5.800X. **(B)** Detalhe do núcleo degenerativo (dn) com a cromatina compactada em relação ao núcleo funcional, isolado do citoplasma da Pseudomônade pelas cisternas provenientes do Complexo de Golgi. Na porção citoplasmática isolada com o núcleo degenerativo mostrando sinais de contração e presença de organelas. 5.800X. **(C)** Detalhe da figura (2B) mostrando presença de material eletrondenso (seta) dentro das cisternas do Golgi. 26.500X. **(D)** Células do tapete (T) apresentam claros sinais morfológicos de morte, e presença de corpúsculos de Ubisch (cabeça de seta). A Pseudomônade apresenta a parede interna (seta) isolando os núcleos degenerativos (dn). Epiderme (E) e camada média (cm). 2.850X. **(E)** Detalhe da figura (2B) mostrando a fusão das cisternas do Golgi que formam a parede interna. Dentro das cisternas são vistas pequenas vesículas (setas) que parecem originar um cordão de material eletrondenso. 18.500X. **(F)** Corte semifino da antera mostrando a marcação positiva (setas) do anticorpo JIM 13 contra a proteína arabnogalactana. 1.000X. **(G)** Corte semifino da antera mostrando a marcação positiva (setas) do anticorpo JIM 7 contra resíduos metil-esterificados da pectina. 1.000X 40

Figura 3 – **(A – C)** Diferentes fases do desenvolvimento do androgametófito impregnado por nitrato de prata. **(A)** Pseudomônade com a presença dos núcleos degenerativos (setas), núcleo generativo e núcleo vegetativo (vn). **(B)** Androgametófito com as células vegetativa (cv) e generativa. **(C)** Grão de pólen maduro com os núcleos gaméticos (setas) e a célula vegetativa. **(A – C)** 1000X. **(D)** Eletromicrografia de transmissão de uma fase intermediária do desenvolvimento do androgametófito mostrando pequenos vacúolos (*) se fundindo e formando um grande vacúolo central (v). 2.850X. **(E)** Androgametófito maduro com o núcleo da célula vegetativa (nv) com a cromatina descompactada e o núcleo da célula generativa (ng) com a cromatina compactada. Vacúolo (V). 2.850X. **(F)** Maior aumento da célula generativa com plastídios (seta) no seu citoplasma e uma membrana (cabeça de seta) isolando-a da célula vegetativa. 18.500X 41

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	9
CAPÍTULO 1	10
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.2 MICROSPOROGÊNESE EM ANGIOSPERMAS.....	11
1.3 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DA FAMÍLIA CYPERACEAE	13
1.4 A MICROSPOROGENÊSE NA FAMÍLIA CYPERACEAE.....	14
JUSTIFICATIVA	17
OBJETIVOS	18
CAPÍTULO 2: EARLY MEIOSIS IN <i>RHYNCHOSPORA PUBERA L.</i> (<i>CYPERACEAE</i>) IS MARKED BY UNCOMMON ULTRASTRUCTURAL FEATURES	19
2.1 ABSTRACT.....	20
2.2 INTRODUCTION	21
2.3 MATERIAL AND METHODS	21
2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	22
CAPÍTULO 3 : MODIFICAÇÕES NO SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS COORDENAM O DESENVOLVIMENTO DA PSEUDOMÔNADE DE <i>RHYNCHOSPORA PUBERA</i> (VAHL) BOECKELER (<i>CYPERACEAE</i>)	29
3.1 INTRODUÇÃO.....	30
3.1.1 Material e Métodos.....	32
3.1.2 Material Vegetal	32
3.1.3 Fixação e Embebição.....	32
3.1.4 Microscopia de Luz	33
3.1.5 Imunofluorescência para Detecção de Elementos da Parede Celular	33
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA TRANSMISSÃO	34
3.2.1 Resultado	34
3.2.2 Discussão.....	36

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 42

REFERÊNCIAS 44

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho encontra-se dividido em três capítulos: o primeiro faz uma abordagem geral sobre androsporogênese e androgametogênese em angiospermas, uma introdução geral a respeito das características citológicas e da incomum microsporogênese da família Cyperaceae. Os dois últimos capítulos estão divididos em dois artigos, que apresentam os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

O primeiro artigo aborda os aspectos iniciais da meiose que antecede a formação do gametófito masculino. Neste artigo respondemos um problema biológico que há tempos fornece discussões na literatura sobre reprodução das Cyperaceae: o momento da polarização dos núcleos funcional e não funcional na pseudomonade. Este artigo foi publicado na edição de outubro de 2009 da revista *Cell Biology International*.

No segundo artigo, reunimos os resultados morfológicos estruturais e ultraestruturais do desenvolvimento da Pseudomonade. Mostramos a formação de uma parede interna que isola os núcleos não funcionais com porções de citoplasma. Este conjunto isolado apresenta características ultraestruturais de morte celular programada. Este segundo manuscrito será enviado para o *Journal of Cell Science*.

Ao final, são apresentadas as considerações finais e as referências bibliográficas dos três capítulos.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

1.2 MICROSPOROGÊNESE EM ANGIOSPERMAS

Nas angiospermas, bem como em outros grupos de vegetais, a geração diplóide é conhecida como o esporófito, o qual se alterna com a geração haplóide chamada gametófito. Diferentemente das plantas mais primitivas, em angiospermas tanto o gametófito feminino (Ginogametófito) quanto o gametófito masculino (Androgametófito) são reduzidos a uma estrutura microscópica dependente dos tecidos do esporófito (Mascarenhas 1989, Cocucci e Mariath 1995). A função do gametófito masculino, chamado grão de pólen, é a produção das células espermáticas. O gametófito feminino, conhecido como saco embrionário, é responsável pela formação da oosfera, dos núcleos polares, das sinérgides e das antípodas.

O desenvolvimento do grão de pólen ocorre dentro da antera que é constituída por quatro camadas de tecidos (epiderme, endotécio, camada média e tapete). Estes tecidos demarcam o lóculo da antera onde estão contidas as células do tecido esporogênico, conhecidas também como Células Mãe de Andrósporos -CMA (Bedinger 1992). A androsporogênese inicia com a divisão meiótica das CMAs formando uma estrutura conhecida como tétrade, sendo cada célula da tétrade chamada de micrósporo. Durante a prófase I ocorre o depósito de calose (β -1,3-Glucana) entre a membrana plasmática e a parede original da CMA (Mariath *et al.* 2003, Enns *et al.* 2005). Este processo é coordenado por um complexo protéico transmembrana, denominado calose sintase (Delmer 1987). A função desta parede ainda não é bem compreendida, porém, propõe-se que ela atue como uma barreira molecular, impedindo o trânsito de moléculas, isolando efetivamente os micrósporos dos tecidos da antera (Heslop-Harrison 1964, Scott *et al.* 2004).

Dois tipos de citocinese podem ocorrer durante a meiose das CMAs: o sucessivo e o simultâneo. No primeiro, a parede de calose é depositada logo após a meiose I, separando as duas células em um estágio chamado díade. Nesta citocinese, os tipos de tétrades resultantes são: (i) isobilateral, (ii) em forma de T, (iii) linear e (iv) decussado (Furness e Rudall 1999, Mariath *et al.* 2003). No tipo simultâneo, não existe uma fase clara de separação entre as meioses I e II, além disso, a parede é depositada com os quatro núcleos haplóides

presentes. As tétrades resultantes deste tipo de citocinese são as tetraédricas (Furness e Rudall 1999).

Cada micrósporo é liberado no lóculo da antera pela ação da enzima calase (β -1,3Glucanase), que é secretada pelas células do tapete e degrada a parede de calose (Mascarenhas 1989, Bedinger 1992, McCormick 2004). Após liberação da tétrade, a síntese de primexina determina o padrão de deposição da parte externa da parede do grão de pólen, a exina (Scott *et al.* 2004). A síntese de primexina ocorre em toda a superfície do grão de pólen, exceto nas regiões das aberturas que são os locais de germinação do tubo polínico (McCormick 1993). A primexina determina o padrão de depósito da parede de exina, a qual é subdividida em sexina ou camada ornamentada mais externa, e a nexina ou camada mais interna. A exina é basicamente formada pela esporopolenina que é resistente, inclusive a ácidos fortes. A esporopolenina é secretada pelas células do tapete (Edlund *et al.* 2004). Na sexina são encontrados a columela e o tectum, ambos responsáveis pela ornamentação (Scott *et al.* 2004). A nexina é subdividida em nexina I e nexina II (mais interna). Abaixo das camadas de nexina, está presente a intina, camada mais interna da parede do pólen formada por celulose e pectina (McCormick 1993, Scott *et al.* 2004).

Simultaneamente à produção da exina e intina, o núcleo do micrósporo migra, pela ação de microtúbulos do citoesqueleto, da região central para a periferia oposta ao poro do pólen (Tanaka 1997). Esse processo foi detectado por Tanaka e Ito (1981) em *Tulipa gesneriana*. Nesta espécie, pequenas concentrações de colcemide em cultura de micrósporos inibiram a mitose assimétrica e bloquearam a produção das células espermáticas pela célula generativa. Concomitante à polarização do micrósporo pelo deslocamento do núcleo, pequenos vacúolos se fundem formando um único e grande vacúolo, o qual comprime o citoplasma contra a parede do pólen (Bedinger 1992).

Como resultado da polarização do micrósporo, o núcleo sofre uma mitose assimétrica originando duas células estrutural e funcionalmente diferentes, uma célula generativa e outra vegetativa (Tanaka 1997). Esta divisão é conhecida como mitose do micrósporo ou mitose polínica. A célula vegetativa é identificada pela sua maior dimensão e tem como função a germinação e o crescimento do tubo polínico, quando o grão de pólen estiver em contato com o estigma. A célula generativa é menor e aparece envolvida por uma unidade de membrana no interior do citoplasma da célula vegetativa. Além disso, apresenta núcleo com cromatina mais compactada. A célula generativa sofre uma segunda divisão mitótica, resultando na formação de duas células espermáticas ou gametas masculinos (Mascarenhas 1989, Bedinger 1992, McCormick 1993, Tanaka 1997). Em 70% das

angiospermas estudadas, a segunda mitose ocorre somente quando o grão de pólen já está liberado da antera (Mariath *et al.* 2003).

Três tipos de desenvolvimento de grão de pólen podem ser distinguidos. No tipo normal, mais amplamente distribuído entre as famílias de angiospermas, o micrósporo cresce e depois sofre a primeira divisão mitótica. No segundo tipo, conhecido como Triglochin, o micrósporo sofre a mitose e depois um aumento de volume. Este tipo é encontrado geralmente em monocotiledôneas como *Triglochin*, *Najas*, *Ruppia*, *Lilaea* e *Aponogeton* (Alimova 2002). No terceiro tipo, conhecido como juncus e descrito para membros das famílias Cyperaceae, Juncaceae e Epacridaceae (Brown e Lemmon 2000), não se forma tétrade.

1.3 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DA FAMÍLIA CYPERACEAE

A família Cyperaceae é considerada a terceira maior das monocotiledôneas, compreendendo entre 4.000 e 5.000 espécies, distribuídas em cerca de 120 gêneros. Esta família apresenta distribuição cosmopolita, existindo no Brasil entre 500 e 600 espécies distribuídas em 44 gêneros, típicos de terrenos úmidos e alagados (Arruda e Neves 2005). Cyperaceae tem se tornado foco de estudos botânicos por mais de um século, principalmente por suas características citológicas: (i) presença de cromossomos holocêntricos ou holocinéticos, (ii) processos de fissão e fusão cromossômica, (iii) meiose pós-reducional ou invertida e (iv) aborto de três dos quatro núcleos resultantes da meiose e formação da Pseudomônade (Kirpes *et al.* 1996, Brown e Lemmon 2000).

O termo holocêntrico é utilizado para contrapor o termo monocêntrico, que se refere aos cromossomos que possuem cinetócoro localizado na constrição primária. O termo holocêntrico se refere àqueles cromossomos que não possuem constrição primária, estando o cinetócoro difuso ao longo do cromossomo. Cromossomos holocêntricos têm sido descritos em invertebrados e em alguns grupos vegetais (Sumner 2003), principalmente em membros da família Cyperaceae, Juncaceae, Droseraceae, Convolvulaceae, Liliaceae e Myristicaceae (Guerra *et al.* 2006, Malheiros *et al.* 1947, Flach 1966, Vanzela *et al.* 1996, Garcia 2001).

Devido à distribuição difusa dos cinetócoros, os cromossomos holocêntricos apresentam outras características, como: a) constrições nucleolares e não secundárias

(Vanzela *et al.* 2000), b) separação paralela das cromátides irmãs na anáfase, e c) predisposição para freqüentes quebras e fusões (Vanzela e Colaço 2002, da Silva *et al.* 2008). Cromossomos holocêntricos, quando fragmentados natural ou artificialmente, podem segregar normalmente durante as divisões celulares. Isto foi reportado quando cromossomos de *Rhynchospora pubera* (Vanzela e Colaço 2002) foram irradiados com raios γ . Neste caso, ocorreram alterações no número e no tamanho dos cromossomos, sem afetar a segregação dos fragmentos envolvidos. Em situação natural, os eventos de agmatoploidia (fissão) e simploidia (fusão) são freqüentemente encontrados e envolvidos com os processos de diferenciação e evolução cariotípica dos membros da família Cyperaceae (Vanzela *et al.* 1996, Luceño e Guerra 1996, da Silva *et al.* 2008).

Outra característica citológica importante encontrada na família Cyperaceae ocorre na meiose. Na anáfase I ocorre separação das cromátides irmãs e durante a anáfase II ocorre segregação dos cromossomos homólogos (da Silva *et al.* 2005). Este tipo de meiose, conhecida como pós-reducional ou invertida (Dopchiz *et al.* 2000), foi descrita em outros gêneros de Cyperaceae, tais como *Carex* (Wahl 1940), *Eleocharis* (Hoshino 1993, da Silva *et al.* 2005) e *Rhynchospora* (Vanzela *et al.* 2000).

1.4 A MICROSPOROGÊNESE NA FAMÍLIA CYPERACEAE

A microsporogênese na família Cyperaceae é peculiar, pois um único micrósporo funcional forma-se ao término da meiose, ao invés dos usuais quatro (Kirpes *et al.* 1996, Vanzela *et al.* 1996, Dopchiz *et al.* 2000, Guerra *et al.* 2006). Dos quatro núcleos formados na meiose, três degeneram e apenas um torna-se funcional. Até a degeneração total, no entanto, os quatro núcleos permanecem em uma disposição tetraédrica, no interior de uma única célula, chamada Pseudomônade (Furness e Rudall 1999, Ranganath e Nagashree 2000, Brown e Lemmon 2000). Em Cyperaceae, durante o desenvolvimento da Pseudomônade, todas as células estabelecem contato com o tapete, em um arranjo conhecido como periférico (Kirpes *et al.* 1996). A Pseudomônade tem formato de pêra, com a parte mais larga estabelecendo contato com as células do tapete. Esta região é chamada de abaxial ou basal, enquanto aquela voltada para o lóculo da antera é a adaxial ou apical (Strandhede 1973).

A polarização não ocorre nas CMA até o final da meiose (Ranganath e Nagashree 2000). Em *Carex blanda* três dos quatro núcleos são deslocados para a extremidade apical, onde são isolados com pequenas porções de citoplasma antes de degenerar (Brown e Lemmon 2000).

Esta organização é comum na maioria dos gêneros da família, uma vez que o poro do pólen é encontrado na região basal. De acordo com a hipótese “poro–tapete”, este tipo de organização é a responsável pela orientação e possível alocação dos núcleos degenerativos (Strandhede 1973, Kirpes *et al.* 1996). Entretanto, em *Rhynchospora* os núcleos degenerativos são situados na região basal, enquanto o núcleo funcional é localizado na região apical da pseudomonade (Tanaka 1949, Furness e Rudall 1999), configurando uma situação contrária à descrita acima para a hipótese “poro–tapete”.

Ao término da polarização da Pseudomônade ocorre a citocinese separando fisicamente cada um dos três núcleos degenerativos do núcleo funcional (Strandhede 1973, Brown e Lemmon 2000). A citocinese dentro da Pseudomônade só ocorre após a formação dos quatro núcleos e o estabelecimento da polaridade. Desta forma, a Pseudomônade se organiza com três micrósporos pequenos não funcionais e um grande funcional (Ranganath e Nagashree 2000). No entanto, existem divergências na literatura com respeito à citocinese. Kirpes *et al.* (1996) sugeriram que a citocinese não ocorre em Cyperaceae, e por este motivo, ocorre a polarização da Pseudomônade com os três núcleos degenerativos na região adaxial. Existem relatos em *Eleocharis palustris* de Pseudomônades que apresentaram uma citocinese incompleta ou com conexões citoplasmáticas entre os micrósporos (Strandhede 1973). Porém, até o presente não foi confirmado se estas Pseudomonades são viáveis (Ranganath e Nagashree 2000).

O motivo que leva à escolha do núcleo funcional ainda é desconhecido, bem como se este é um evento aleatório. Contudo, sabe-se que existe o envolvimento de elementos do citoesqueleto na polarização da Pseudomonade, o que sugere que este evento não é estocástico (Brown e Lemmon 1992, Reinsch e Gonczy 1998, Brown e Lemmon 2000). Os núcleos dos micrósporos degenerativos podem se dividir, mas mesmo assim, entram em processo de degeneração (Strandhede 1973, Ranganath e Nagashree 2000). Isto poderia levantar dúvida sobre a potencial funcionalidade dos quatro núcleos, no entanto, somente um desses micrósporos entra em mitose para originar uma célula vegetativa e outra generativa, seguindo o padrão normal de desenvolvimento das angiospermas.

O processo de degeneração dos três micrósporos não funcionais ainda é desconhecido. Uma hipótese, aventada por Håkasson (1954), seria a dificuldade na nutrição dos micrósporos não funcionais devido à distância destes com o tapete. No entanto, esta hipótese não se sustenta no gênero *Rhynchospora*, porque os micrósporos não funcionais se desenvolvem na região basal em contato com tapete (San Martin *et al.* 2009). Outra hipótese

seria o espaço insuficiente entre os micrósporos não funcionais, o que para Strandhed (1973), poderia desencadear um processo de morte programada.

A história e a vantagem evolutiva do desenvolvimento de um único micrósporo funcional ao invés dos usuais quatro ainda permanecem incertas. Uma suposição seria que o aumento do volume do citoplasma conferiria também um aumento na viabilidade da célula (Ranganath e Nagashree 2000). Esta idéia pode ser sustentada pelo fato de algo similar ocorrer em animais, onde três dos quatro produtos da meiose feminina degeneram, resultando em um aumento no tamanho da célula ovo. Ainda assim, algumas questões permanecem abertas sobre a androsporogênese na família Cyperaceae: 1) Qual o motivo biológico da degeneração de três dos quatro núcleos formados após a meiose? 2) Porque a polarização existe de forma diferente em diferentes gêneros? 3) A seleção dos núcleos funcional e degenerativos é ou não aleatória? 4) A seleção se dá em favor do núcleo funcional ou dos degenerativos? 5) Qual o momento ao longo da meiose e qual o sistema de sinalização celular atuante na escolha dos núcleos?

JUSTIFICATIVA

A microsporogênese na família Cyperaceae é diferente da encontrada na maioria dos grupos vegetais. Este fato torna qualquer representante deste grupo um bom material para estudos estruturais e ultra-estruturais. Neste sentido, o problema biológico eleito para este estudo foi: Como ocorre o processo citológico que precede a degeneração de três dos quatro núcleos ao final da meiose de Cyperaceae, até a formação do androgametófito? Para tal, buscamos compreender a androsporogênese nos estágios iniciais da meiose, o isolamento celular mediado pelo sistema de endomembranas, a formação das Pseudomônades com degeneração de três dos quatro andrósporos (similar ao desenvolvimento do ginósporo) até a formação do grão de pólen maduro. Para buscar este conhecimento dos aspectos celulares e moleculares da microsporogênese de Cyperaceae, foram empregadas técnicas citoquímicas, imunocitoquímicas e microscopia eletrônica de transmissão usando como modelo a espécie *Rhynchospora pubera* (Vahl.) Boeckler.

OBJETIVOS

- Estudar as modificações citológicas que precedem a meiose em *Rhynchospora pubera*, sobretudo quanto à polarização celular;
- Estabelecer os processos de isolamento e degeneração dos núcleos inviáveis na microsporogênese de *R. pubera* sob o ponto de vista ultra-estrutural.
- Caracterizar o processo de eliminação dos três núcleos degenerativos durante a androsporogênese de *Rhynchospora pubera*.
- Estabelecer o tipo de androgametófito formado em *R. pubera*.

CAPÍTULO 2

EARLY MEIOSIS IN *Rhynchospora pubera* L. (Cyperaceae) IS MARKED BY UNCOMMON ULTRASTRUCTURAL FEATURES

Artigo publicado na revista Cell Biology International 33: 1118-1122 (2009).
Fator de Impacto 1,61 (JCR 2008)

Early meiosis of *Rhynchospora pubera* L. (Cyperaceae) is marked by uncommon ultrastructural features

Juca Abramo Barrera San Martín¹, Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade¹ and André Luís Laforga Vanzela^{2,*}

¹ Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, ProPPG, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86051990, Londrina, Paraná, Brazil. (*E-mail address: cgtardeli@uel.br*).

² Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86051990, Londrina, Paraná, Brazil. Fone/Fax: +55 43 3371 4417 (*E-mail address: andrevanzela@uel.br*)

* Corresponding author

2.1 ABSTRACT

The family Cyperaceae has an unusual microsporogenesis, in which tetrad formation does not occur. Besides, other cytological features are important, such as the occurrence of holokinetic chromosomes and post-reductional meiosis. In this study, we examined the ultrastructural features of the pollen mother cell (PMC) of *Rhynchospora pubera*. Anthers of several sizes were analyzed using light and transmission electron microscopy. The PMC before meiosis presented a central nucleus and regular profile of the nuclear envelope. During prophase I, the nucleus was found in the abaxial region of the cell. This cellular polarization was accompanied by other marked ultrastructural features in the nuclear envelope. These morphological changes involved dilations of perinuclear cisterns and polarization of the nuclear pore complexes. Our results show that in *R. pubera*, polarization occurs in the initial phases of microsporogenesis, unlike in other plant species.

Keywords: Cyperaceae. Microsporogenesis. nuclear envelope. PMC. transmission electron microscopy.

2.2 INTRODUCTION

The initial stages of microsporogenesis are marked by several cytoplasmic and nuclear changes. The most common are the increase in cell size and number of organelles, intense nuclear activity, and modifications in the chemical composition of the cell wall (Scott *et al.* 2004). These structural and biochemical changes can differ among angiosperm groups and species and even tissues of the same anther. Microspores of *Pinus banksiana* Lamb. (Li and Dickinson 1987) and *Lycopodium esculentum* Mill. (Polowick and Sawhney 1992) have grooves and invaginations in the nuclear envelope. The development of tetrads in *Tradescantia virginiana* L. occurs inside the vacuoles in the plasmodial tapetum (Furness and Rudall, 1999), and pollen kit substances accumulate unevenly on the surface of early microspores in Chinese cabbage (Xie *et al.* 2005).

Microsporogenesis begins with meiotic division of the pollen mother cell or PMC (Bedinger 1992), and originates a tetrad of haploid cells, which are released as free microspores by callase action (McCormick 1993). Each microspore undergoes an unequal division giving rise to the vegetative and generative cells (Tanaka 1997). Interestingly, the representatives of the family Cyperaceae display an unusual microsporogenesis, where tetrads are absent and where there is the formation of a single functional product called a pseudomonad (Brown and Lemmon 2000, Furnes and Rudall 1999). Besides, this family is characterized by other uncommon cytological features, such as the occurrence of holokinetic (holocentric) chromosomes (Guerra *et al.* 2006, Vanzela and Colaço 2002) and post-reductional meiosis (da Silva *et al.* 2005). *Rhynchospora pubera* is a Brazilian species that is considered a model for the study of holokinetic chromosomes, since it possesses few ($2n = 10$) and large chromosomes and regular meiosis with five bivalents (Luceño *et al.* 1998). However, information about its microsporogenesis, as well as in other Cyperaceae, is fragmented. Besides, the ultrastructural features of the pre-meiotic cells have not been documented. The purpose of this study was to determine the cellular changes that occur in early microsporogenesis of *R. pubera*.

2.3 MATERIAL AND METHODS

Ten individuals of *Rhynchospora pubera* L. (Cyperaceae) were collected in Recife, Pernambuco in Northeast Brazil and were kept in a greenhouse of the Laboratório de

Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas at Universidade Estadual de Londrina, Brazil. Vouchers are kept at the FUEL herbarium.

Anthers were collected, immersed in a fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2.0% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 24 h at room temperature, with constant mixing in a cell shaker, and then grouped by size. These samples were washed in sodium cacodylate buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide, washed again, and dehydrated in a graded ethanol series. Samples were immersed in propylene oxide, treated in a graded propylene/Araldite® series and embedded in Araldite® resin.

Ten anthers were sectioned using an ULTRACUT (Leica). Semi-thin sections (ca. 2 µm) were stained with toluidine blue and examined in order to determine the anther stages. Images from suitable stages were acquired using a Leica DM 4500 B microscope equipped with a DFC 300FX camera and the Leica IM50 4.0 software, in about twenty sections of each phase. Ultra-thin sections (ca. 70 nm) were stained with 9% uranyl acetate and lead citrate (Reynolds's solution) and analyzed using a FEI Tecnai 12 transmission electron microscope at 80 kV. The images were acquired by the Soft Imaging System.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

The young anthers of *Rhynchospora pubera* were formed by five distinct tissues, each of them containing a single layer of cells: epidermis, endothecium, middle layer, tapetum and sporogenous tissue (Fig. 1A). The last one was composed of pollen mother cells. This arrangement indicates that the anther morphology of *R. pubera* follows the common pattern found in higher plants (Bedinger 1992). Along the pre-meiotic stages, meiocytes appear surrounded by a single callose wall (Fig. 1B) which effectively isolates each PMC (Enns *et al.* 2005, Mascarenhas 1989, McCormick 1993). The PMCs were pear-shaped, positioned adjacent to other cells and with the tapetum cells (Fig. 1B). In this stage, plasmodesmata were absent, unlike in rice, where plasmodesmal connections between PMCs and tapetum cells were frequently observed (Mamun *et al.* 2005). Some organelles, e.g., plastids and mitochondria, were difficult to characterize. In this case, the term “chondrioma” can be used in order to denote the organelles with uncertain ontogeny (Mamun *et al.* 2005). Large lipid droplets were also evident (Figs. 1B, C). A large nucleus with unpacked chromatin

was more centrally located (Figs. 1B, C), which was bordered by a regular nuclear envelope (Fig. 1C). These morphological features are common in other groups of monocots, such as the Poaceae (Kirpes *et al.* 1996). The central position of the nucleus in pre-meiosis was reported for other Cyperaceae groups, such as the *Eleocharis* and *Carex* (Brown and Lemmon 2000, Furness and Rudall 1999, Kirpes *et al.* 1996), as well as in other plant groups, e.g., yellow passion fruit (Souza and Pereira 2000). The centrally located nucleolus was surrounded by an electron-lucid halo (Fig. 1C). The cytoplasm of tapetum cells showed an electron density similar to that of PMCs, with numerous organelles sparsely distributed, indicating a regular metabolism (Fig. 1D).

In the prophase I, the PMCs of *R. pubera* were also pear-shaped (Fig. 2A), similar to those microsporocytes found in other Cyperaceae species (Brown and Lemmon 2000, Furness and Rudall 1999, Kirpes *et al.* 1996, Moar and Wilmshurst, 2003, Ranganath and Nagashree 2000). The PMCs were bordered by tapetum cells at the abaxial position, but PMCs side by side showed plasmodesmata connecting them (Fig. 2B). Cytoplasmic connections between PMCs, which were sufficiently broad to permit the passage of organelles and chromosomal materials, were reported in *Lycopersicon esculentum* (Mill.) -Solanaceae (Polowick and Sawhney 1992). These connections can be important to maintain the meiotic synchrony among PMCs of *R. pubera*, as suggested by Heslop-Harison (1966) for other plant species. Plasmodesmata were described also between PMCs and tapetum cells of *Tillandsia albida* (Mez et Purpus) – Bromeliaceae and *Lobivia rauschii* (Zecher) – Cactaceae (Papini *et al.* 1999), but these connections are lost along the maturation process. In *R. pubera*, plasmodesmata were not seen between PMCs and tapetum cells, suggesting that a more physical independence could culminate in an asynchrony of cellular maturation. This was seen when we compared the electron density patterns between PMCs and tapetum cells. In the early stages (Fig. 1D), the two cells displayed similar electron density, while in the late stage (Figs. 2B, C), the tapetum cells were more electron-dense. Besides, vacuolation and cytoplasmic shrinkage were seen in tapetum cells (Fig. 2B). These ultrastructural features can be a sign indicative of the initial stage of programmed cell death (Papini *et al.* 1999, Pennell and Lamb 1997, Wu and Cheung 2000). The cytoplasm of PMCs exhibited a larger number of organelles at the adaxial position, but with mitochondria and plastids undifferentiated and several vacuoles randomly distributed (Figs. 2B, C, E). Small and few lipid droplets were observed (Fig. 2E), when compared with earlier stages. The nuclei appeared at the abaxial region, with more condensed chromatin and nucleoli peripherally located, independent of cell polarization (Figs. 2A, B, C). The opposite positioning of the organelles and the nucleus at

early meiosis of *R. pubera* seems to be different from that described for *Carex blanda* Dewey (Brown and Lemmon 2000). This species shows the prophase nuclei in the central region of the cell. According to Ranganath and Nagashree (2000), cell and organelle polarizations are uncommon before meiosis I. However, our results indicate that in *R. pubera* cellular asymmetry and the polarization of organelles occur in early meiosis. Early microsporogenesis was also characterized by nuclear envelope changes, including an increased number and a polarized disposition of nuclear pore complexes (NPCs). This behavior of NPCs and organelle pool addressed to the adaxial region (Fig. 2E) determines the cellular asymmetry in the prophase I of *R. pubera*. The density of NPCs can be related to the physiological and developmental stages during microsporogenesis, similar to that reported for *Medicago sativa* L. (Shi *et al.* 1991). According to Straatman *et al.* (2000), during pollen development in *Brassica napus*, the vegetative nuclei exhibits a concentration of NPC on surface come back to the generative cell. These authors suggested that cellular polarization is associated with increased metabolic activity and, consequently, with generative cell division. This arrangement of NPCs observed in *R. pubera* was accompanied by an increase in the perinuclear space (Fig. 2D), which can be indicative of intense metabolic activity in early microsporogenesis. These modifications in the nuclear envelope ultrastructure appeared initially as fine expansions of the perinuclear space (Fig. 2D) or as substantial expansions (Figs. 2C, E, F) forming a reticulum inside the nucleus, similar to the nuclear reticulum described by Singh *et al.* (1998). The nuclear reticulum is a continuation of the inner nuclear membrane, in the same way that the endoplasmic reticulum is a continuation of the outer membrane. These modifications can permit a fast exchange of molecules between more internal nuclear regions and the cytoplasm. Singh *et al.* (1998) using the ZIO technique, demonstrated that nuclear vacuoles store Ca^{+2} ions in placental cells of *Lilium regale*, which is associated with cellular secretion.

The third type of modification observed was the formation of grooves (Fig. 2C). These structures were detected as projections of the nuclear envelope in the direction of the nucleoplasm. In this case, the surface of the nuclear membrane has a lobed appearance (Fig. 2C). These structures can be characteristic of a metabolically active cell, since these lobes can increase the contact between the nuclear membrane and the cytoplasm. Thus, our results suggest that in the early prophase of *R. pubera* different ultrastructural changes can be assumed in favor of increasing metabolic activity and consequently guaranteeing the success of meiotic division.

Some aspects of the meiotic process in the family Cyperaceae are still obscure or not well understood. What is the biological motivation for the great investment in cell polarization and increased metabolism in initial prophase, if nuclear degeneration in the pseudomonads will result in the loss of three nuclei after meiosis? Why invest energy in the early meiosis (metabolism and crossing-over) if the formation of the pseudomonads will lead to the establishment of a single functional cell? Is this process similar to what occurs during female gametogenesis in animals? Why does cell polarization in the genera *Eleocharis* and *Carex* (nuclei in the adaxial region) differ from that observed in *Rhynchospora* (nuclei in the abaxial region)? To conclude, the Cyperaceae seem to provide excellent material for applications of cyto-molecular tools for the detection of proteins related to the cytoskeleton and nuclear degeneration, without cell death, since the whole process will culminate in the formation of the microgametophyte.

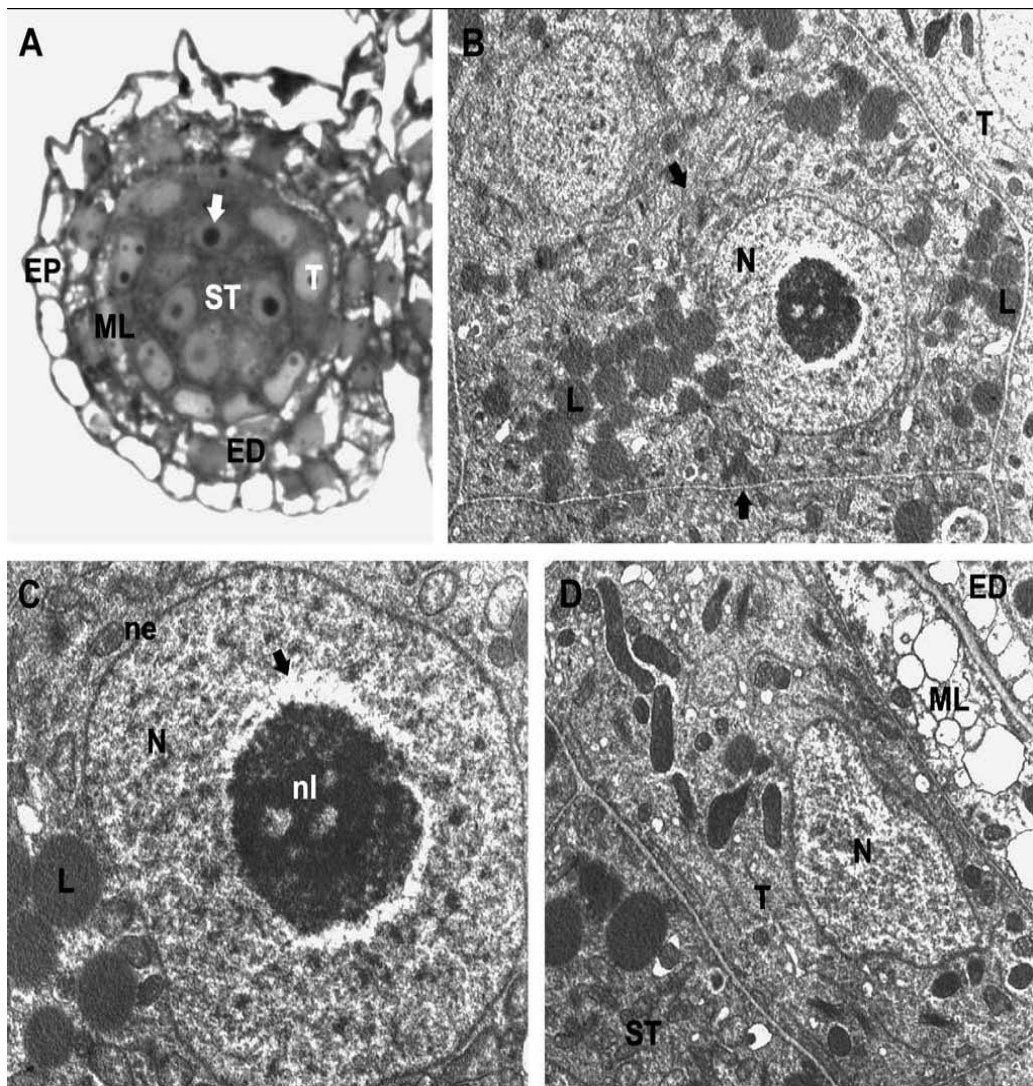


Figure 1 – Cross section of the anther in pre-meiotic stages of *Rhynchospora pubera*. (A) Five tissue types are seen. The sporogenous tissue shows several PMCs containing a central nucleus with unpacked chromatin and a single large nucleolus (arrow). (EP) epidermis, (ED) endothecium, (ML) middle layer, (T) tapetum and (ST) sporogeneous tissue. Toluidine blue. Magnification, 200 ×. (B) Electron micrograph of a PMC surrounded by a thin callose wall (arrows) and showing abundant cytoplasmic lipid droplets (L). (N) Nucleus. (T) tapetum. Magnification, 5800 ×. (C) Detail of the PMC's nucleus (N) surrounded by a regular nuclear envelope (ne). The prominent nucleolus (nl) is encircled by an electron-lucid halo (arrows). (L) lipid droplets. Magnification 9700 ×. (D) Cytoplasm of tapetum cell (T) exhibiting similarity with the PMC cytoplasm in electron density. Note the presence of cytoplasmic organelles. (ED) endothecium, (ML) middle layer, (ST) sporogeneous tissue and (N) nucleus. Magnification, 5800 ×.

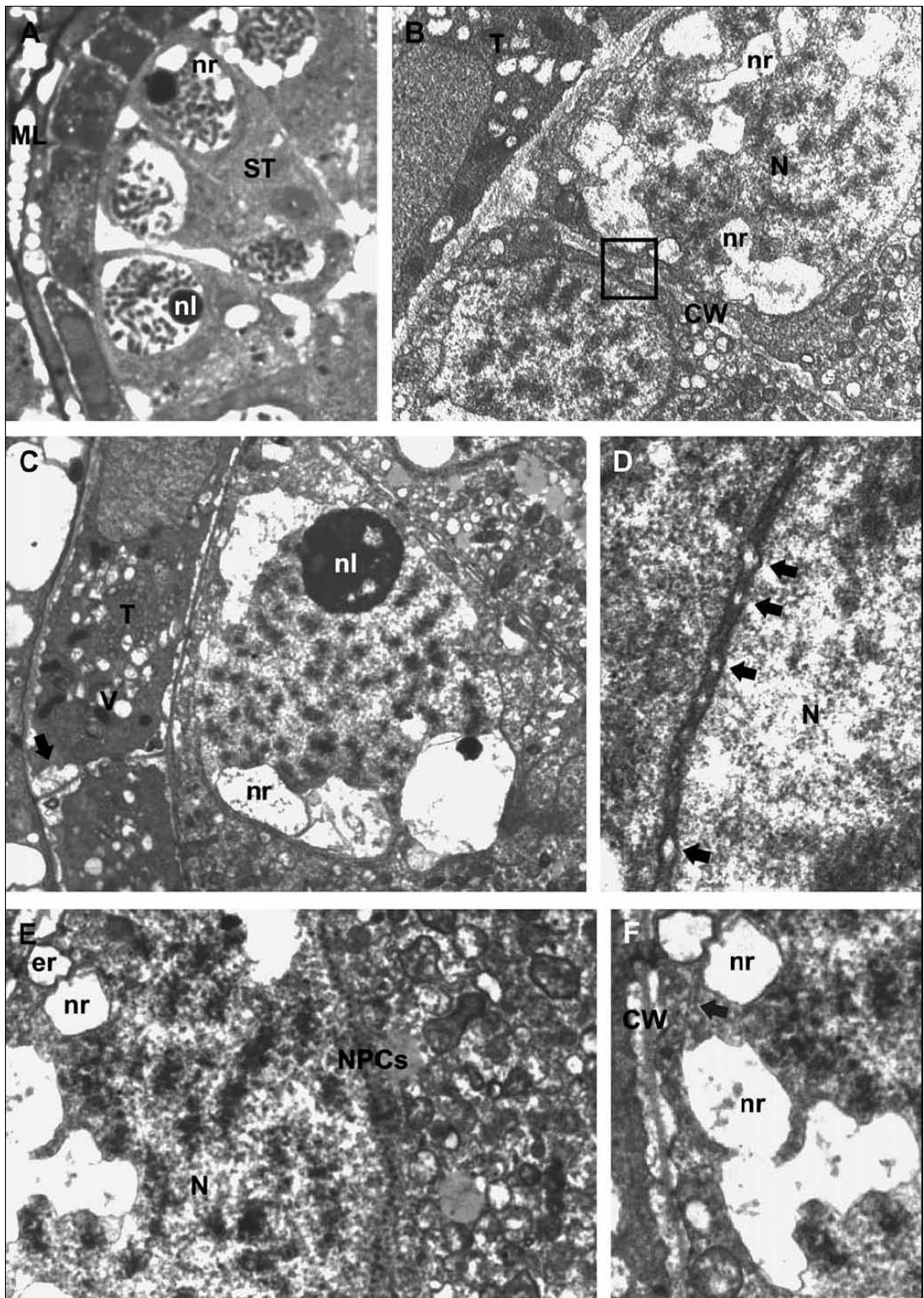


Figure 2 –

Anther in prophase I of *Rhynchospora pubera*. (A) Several PMCs are seen exhibiting a nucleus in the abaxial region. These nuclei contain packed chromatin as well as nuclear reticulum (nr). The nucleoli (nl) are randomly positioned. (ML) middle layer. (T) tapetum. (ST) sporogoneous tissue. Toluidine blue. Magnification, 1000 ×. (B) Nuclei (N) are located in the abaxial region of the PMCs. Chromatin fibers are seen compacted, and several cisterns of nuclear reticulum (nr) are found. Inset-Plasmodesmal connections are present between adjacent PMCs. (T) tapetum.

Magnification, 5800 \times . (C) The cytoplasm of the tapetum cell (T) is more electron-dense than that of the PMC. Note the presence of vacuoles (V) and cytoplasmic shrinkage (arrows) of the tapetum cell. Nuclear reticulum (nr) and nucleolus (nl) are indicated. Magnification 5800 \times . (D) Nuclear envelope of the PMC showing initial dilation of the perinuclear cisterns (arrows). Magnification, 37,000 \times . (E and F) Details of PMC's nucleus (N). (E) The accumulation of the NPCs are directed toward the pool of organelles. Magnification, 9700 \times . (F) Dilations of the nuclear envelope membranes leads to the establishment of the nuclear reticulum (inner membrane) (nr) and of the endoplasmic reticulum (outer membrane) (er). Arrow points to nuclear envelope. cw-cell wall. Magnification, 5800 \times

CAPÍTULO 3

Modificações no sistema de endomembranas coordenam o desenvolvimento da pseudomônade de *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae)

Artigo a ser enviado para a revista *Journal of Cell Science*
Fator de Impacto 6,67 (JCR 2008)

Modificações no sistema de endomembranas coordenam o desenvolvimento da pseudomônade de *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae)

Juca Abramo Barrera San Martín¹, Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade¹, Alexandra Mastroberti², Jorge Ernesto de Araújo Mariath² e André Luís Laforga Vanzela^{3,4}

¹ Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, ProPPG, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86051990, Londrina, Paraná, Brazil. (*E-mail address: cgtardeli@uel.br*).

² Laboratory of Plant Anatomy (LAVeg) – Botany Department – Biosciences Institute Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil – jorge.mariath@ufrgs.br.

³ Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86051990, Londrina, Paraná, Brazil. Fone/Fax: +55 43 3371 4417 (*E-mail address: andrevezela@uel.br*).

⁴ Corresponding authors: andrevezela@uel.br

3.1 INTRODUÇÃO

Ao final da androsporangênese em angiospermas ocorre a formação de uma estrutura chamada tétrade, a qual é composta por quatro células haplóides produzidas ao final da meiose. Entretanto, há grupos que não formam tetrades, e a estrutura correspondente, denominada Pseudomônade, Criptotétrade ou Tétrade monodinamospórica (Brown e Lemmon, 2000), apresenta os quatro núcleos ocupando o mesmo citoplasma (Dunbar, 1973; Strandhede, 1973; Ranganath e Nagashree, 2000). A ocorrência de pseudomônades foi relatada nas famílias Juncaceae (Ranganath e Nagashree, 2000), Cyperaceae (Tanaka, 1949) e Epacridaceae (Furness e Rudall, 1999), porém, somente as duas primeiras são filogeneticamente relacionadas. Possivelmente, a formação da pseudomônade surgiu independentemente em cada um dos grupos ao longo do processo evolutivo. Apesar de existirem fortes indícios de que a ausência de tétrade em Cyperaceae é uma sinapomorfia (Kirpes *et al.*, 1996), Simpson *et al.* (2003) comentaram que pseudomônades são ausentes em

alguns grupos de *Mapanioideae* Aubl, contudo, tais comentários não são baseados em evidências irrefutáveis presentes na literatura especializada. As pseudomônades de Cyperaceae apresentam um arranjo característico, no qual três dos quatro núcleos são agrupados em um pólo da célula, sofrendo posterior degeneração. O quarto núcleo torna-se funcional, ocupa o centro da célula e, durante a androgametogênese, origina as células vegetativa e generativa (Strandhede, 1973).

A pseudomônade apresenta forma de pêra, com a região larga estabelecendo contato com as células do tapete (região basal ou abaxial) e a região mais estreita voltada para o lóculo da antera (região apical ou adaxial) (Dunbar, 1973; Strandhede, 1973). Os núcleos degenerativos das Cyperaceae ocupam o pólo apical, enquanto o núcleo funcional é encontrado na região basal. Em *Carex blanda* Dewey, por exemplo, a meiose ocorre na região central da pseudomônade, com posterior migração dos quatro núcleos para o pólo apical, e retorno do núcleo funcional para a região central (Brown e Lemmon, 2000). Recentemente, San Martin *et al.* (2009) reportaram que no início da meiose de *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckeler, o núcleo da célula mãe de andrósporo (CMA) ocupa a região basal e, após a meiose, o núcleo funcional passa a ocupar a região central, ficando a região basal como o local de degeneração dos três núcleos não funcionais. Estas evidências mostram que os diferentes gêneros de Cyperaceae apresentam notáveis diferenças na organização ultraestrutural da pseudomônade.

Outras características citológicas indicam que várias formas de controle celular estão envolvidas no processo de formação da pseudomônade. Em *Eleocharis mamillata* H.Lindb, *Eleocharis* subser. *Palustres* Svenson (Strandhede, 1973), *Eleocharis subarticulata* Boeckeler (da Silva *et al.*, 2005), *Isolepis cernua* (Vahl) Roem. & Schult. (Dopchiz e Pogggio, 1999) e *Rhynchospora tenerrima* Spreng (Vanzela *et al.*, 2000), os quatro núcleos exibem diferentes aspectos morfológicos, mostrando que estão com diferentes níveis de organização funcional/estrutural na mesma fase do desenvolvimento. Essas informações sugerem algum tipo de isolamento do citoplasma, o qual separa principalmente a área funcional daquelas envolvidas com a degeneração dos núcleos. Há evidências do surgimento de um septo entre os núcleos degenerativos em *Eleocharis palustris* (Dunbar, 1973).

A razão biológica para a seleção do núcleo funcional e a vantagem evolutiva deste processo ainda permanecem desconhecidos. Além disso, outras perguntas permanecem abertas como: i) Quais são os fatores envolvidos na polaridade nas pseudomônades de Cyperaceae? ii) Qual o processo envolvido na degeneração dos três núcleos? e iii) Como os

três núcleos degenerativos são isolados do micrósporo funcional? Neste estudo investigamos o processo de isolamento dos núcleos degenerativos da pseudomônade de *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckler (Cyperaceae), com o objetivo de determinar a ultraestrutura e o processo funcional na ausência de tétrade. Além disso, aspectos envolvendo a morte celular na formação do androgametófito são discutidos.

3.1.1 Materiais e Métodos

3.1.2 Material Vegetal

Cerca de dez indivíduos de *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckler (Cyperaceae) foram coletadas em Recife, Pernambuco. Os exemplares foram mantidos em casa de vegetação do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. As exsiccatas foram depositadas no herbário FUEL.

3.1.3 Fixação e Embebição

Anteras foram coletadas e imersas em solução fixadora contendo 2.5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em 0.1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7.2, por 24 h na temperatura ambiente, em constante agitação, após, foram separadas por tamanho. As anteras foram lavadas em tampão, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1%, lavadas novamente em tampão e desidratadas em série alcoólica crescente. As amostras foram imersas em óxido de propileno, embebidas e emblocadas em resina plástica Araldite[®]. Anteras também foram fixadas em solução contendo etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1, v:v) por 12h e armazenadas a -20°C até serem usadas. As anteras foram digeridas por 3h em 2% (v:v) celulase e 20% (v:v) pectinase. Depois de lavadas em água destilada foram dissecadas em uma gota de ácido acético 45% e esmagadas com lamínula, que foi posteriormente solta em nitrogênio líquido.

3.1.4 Microscopia de Luz

O material emblocado foi cortado em ultramicrótomo (ULTRACUT -Leica) de modo a se obter cortes semi-finos (2 μm) que foram corados com solução azul de tolúidina 2% em borato de sódio. O material esmagado foi corado com hematoxilina acética 1%. Para a detecção de polissacarídeos totais foi utilizada a técnica do PAS, cortes semi-finos (1 μm) foram transferidos para lâmina de vidro, tratados com ácido periódico 1% (m/v) por 4h, e expostos a reativo de Schiff por 16 h, lavados em água destilada e secos em temperatura ambiente. Para a detecção de ribonucleoproteínas as anteras foram tratadas com solução contendo nitrato de prata 1% a 60°C por 12h, posteriormente, as anteras foram dissecadas em uma gota de ácido acético 45%, esmagadas com auxílio da lamínula, que foi solta em nitrogênio líquido. As lâminas foram montadas em Enthelan[®] (Merck). As imagens foram obtidas com fotomicroscópio Leica DM 4500 B equipado com câmera Leica DFC 300FX e com software Leica IM50 4.0.

3.1.5 Imunofluorescência para Detecção de Elementos da Parede Celular

Anteras foram fixadas por imersão em solução contendo 2.5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0.1 M, pH 7.2, por 24h em temperatura ambiente, em constante agitação foram lavadas em tampão. O material foi pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, lavadas novamente, desidratadas em série crescente de etanol, embebidas e emblocadas em resina plástica LRWhite[®] (resin hard grade -London resin). Cortes semi-finos (2 μm) foram aderidos em lâmina de vidro com Poly-L-Lysin (Merck), incubados por 2h a temperatura ambiente com os anticorpos primário todos monoclonais listados na tabela 1 (gentilmente cedidos pelo Dr. J-P. Knox, da University of Leeds, U.K.). Para detecção os cortes foram incubados com anticorpo secundário Goat anti-rat IgG complexado com FITC (Sigma), as lâminas foram montadas em *antifade* contendo cloreto de magnésio. As imagens foram capturadas em epifluorescência (com filtro 450–490nm) do fotomicroscópio Leica DM 4500 B equipado com câmera Leica DFC 300FX e com software Leica IM50 4.0.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Cortes ultrafinos (com 70 nm) foram feitos com auxílio de navalha de diamante (DIATOME, com 45° de inclinação e 3 mm), coletados em telas de cobre com 200 mesh (Electron microscopy science – Hatfield, EUA). As telas foram contrastadas com acetato de uranila (Electron microscopy science – Hatfield, EUA) 9% por 20 minutos a temperatura ambiente, protegidos da luz e citrato de chumbo (solução de Reynolds) também por 20 minutos a temperatura ambiente. O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai 12) com voltagem de 80 kV e as imagens foram capturadas pelo Soft Imaging System, com auxílio do software analySIS[®].

3.2.1 Resultados

As pseudomônades de *R. pubera* foram analisadas utilizando diferentes procedimentos para microscopia de luz. A coloração convencional com haematoxilina férrica mostrou os quatro núcleos dispostos de maneira polarizada (Fig. 1A). Os três núcleos degenerativos apareceram dispostos na região basal, a qual está em contato com as células do tapete (Figs. 1B, C) e o núcleo funcional na região centro-apical (Figs. 1A-C). Os núcleos degenerativos foram sempre menores que o núcleo funcional (Fig. 1A, B, D) e mais corados com azul de toluidina (Fig. 1B). Ao contrário, o núcleo funcional apareceu pouco corado e o nucléolo bastante evidente (Fig. 1B). Na microscopia eletrônica de transmissão os núcleos degenerativos apresentaram maior grau de compactação da cromatina quando comparados ao núcleo funcional (Figs. 1D, 2A e 2B). O nucléolo está presente tanto nos núcleos degenerativos quanto no núcleo funcional (Fig. 1D) e em todos os núcleos o envoltório nuclear aparece bem delimitado (Figs. 2A, B).

O citoplasma envolvendo os núcleos degenerativos foi mais intensamente corado pelo azul de toluidina, destacando as regiões dos três andrósporos degenerativos pequenos frente à região funcional da pseudomônade (Fig. 1B). Todas as regiões citoplasmáticas apresentaram a mesma eletrondensidade quando examinadas sob microscopia eletrônica de transmissão (Figs. 1D, 2B-D). No citoplasma do futuro andrósporo funcional foram encontradas gotas lipídicas dispersas, o que não é visto no citoplasma dos andrósporos não funcionais (Figs. 2A, D). Vacúolos com material no interior, mitocôndrias e outras organelas de difícil distinção foram encontradas tanto no citoplasma funcional quanto nas

porções citoplasmáticas ao redor dos núcleos degenerativos (Figs. 2A-C). Além disso, o citoplasma dos andrósporos não funcionais apresentou sinais de contração (Figs. 2B-D), ao contrário do citoplasma do andrósporo funcional. No momento em que os núcleos degenerativos apareceram isolados, as células do tapete exibiram algumas características morfológicas de degeneração, como maior eletrondensidade do citoplasma, ausência das paredes periclinais voltada para o interior do lóculo, ausência das paredes anticlinais e a presença de corpúsculos de Ubisch (Fig. 2D). As demais camadas da antera, como epiderme e camada média exibiram uma maior integridade (Fig. 2D).

A pseudomônade foi marcada pela presença de uma parede delgada, a qual foi formada entre os núcleos degenerativos (Figs. 1B-D). Esta parede foi positivamente corada pela técnica do PAS evidenciando a presença de açúcares em sua composição (Fig. 1C). A parede interna exibiu contato com a face interna da parede da pseudomônade (Fig. 1D), isolando efetivamente os núcleos degenerativos do núcleo funcional (Figs. 1B e 1D). A parede de exina, contendo columela e *tectum* (Fig. 1D) foi intensamente corada pela técnica de PAS (Fig. 1C). A parede interna foi formada pela fusão de vesículas provenientes do complexo de Golgi, compondo cisternas ao redor dos andrósporos não funcionais (Figs. 2C, E). Dentro destas cisternas, foram observadas pequenas vesículas que aparentemente depositaram um material mais eletrondenso (Fig. 2E), organizado como cordão isolando os núcleos degenerativos (Fig. 2C). As paredes internas foram marcadas positivamente pelo anticorpo JIM13 que reage contra a proteína transmembrana arabinogalactano (AGPs) (Fig. 2F). Esta mesma região foi reconhecida pelo anticorpo JIM07 que detecta uma esterificação do ácido galacturônico em pectinas, a qual é componente da lamela média (Fig. 2G).

Durante a androgametogênese andrósporo funcional é marcado por uma mitose, originando uma célula vegetativa e outra generativa, ainda na presença dos núcleos degenerativos (Fig. 3A). Após a completa degeneração dos três núcleos, o androgametófito apareceu organizado pela célula generativa contida na vegetativa (Fig. 3B). No curso de amadurecimento do androgametófito, a célula generativa sofre a segunda mitose originando as células gaméticas (Fig. 3C). O conjunto composto por células gaméticas e célula vegetativa forma o grão de pólen de *R. pubera*. Quando analisados sob microscopia eletrônica de transmissão, a formação do androgametófito foi marcada inicialmente pela fusão de inúmeros e pequenos vacúolos, culminando em um grande vacúolo central (Fig. 3D). Este vacúolo tem como função o deslocamento do núcleo funcional para periferia da célula antes da primeira mitose (Fig. 3D, E). A célula generativa apareceu isolada da vegetativa por uma membrana

tênue (Fig. 3F) e sua organização foi marcada pela presença de pequenos vacúolos e plastídios (Fig. 3F).

3.2.2 Discussão

Os quatro núcleos reunidos em um único citoplasma caracterizam a ausência de tétrade, típico em Cyperaceae. Tal estrutura é conhecida como pseudomônade (Brown e Lemmon, 2000). As pseudomônades de *R. pubera* exibiram núcleos degenerativos agrupados na região basal, ao contrário do que normalmente ocorre com a maioria dos gêneros da família Cyperaceae (Strandhede, 1965; Furness e Rudall, 1999; Brown e Lemmon, 2000). A razão desta polarização permanece desconhecida, entretanto, algumas hipóteses têm sido formuladas. A primeira e mais aceita na literatura é a da orientação do “poro-tapete” na qual o posicionamento do núcleo funcional é guiado pelo poro do pólen que estabelece contato com as células do tapete, na região basal da pseudomônade, sinalizando o domínio de estabelecimento do núcleo funcional (Romanov, 1959; Kirpes *et al.*, 1996). Outra hipótese, formulada por Håkansson (1954), é a de que os núcleos degenerativos se posicionam longe das células do tapete, na região estreita da pseudomônade, e degeneram por consequência da falta de nutrição e de espaço. No entanto, nossos resultados não são condizentes com nenhuma das duas hipóteses, uma vez que os núcleos degenerativos estão posicionados na região basal da pseudomônade perto do tapete e na região larga da célula.

Estudos ultraestruturais no grupo *Eleocharis palustris* mostraram que o desenvolvimento de uma placa celular entre os quatro núcleos só ocorre quando estes estão posicionados na região apical da pseudomônade (Dunbar, 1973; Strandhede, 1973). Desta maneira, uma citocinese assimétrica poderiam originar um micrósporo maior, funcional e outros três menores não funcionais (Ranganath e Nagashree, 2000), como também visto em *R. pubera*. Outros autores sugerem que a formação da pseudomônade acontece devido à ausência de citocinese e, assim, os três núcleos podem migrar para a porção apical antes da degeneração (Kirpes *et al.*, 1996; Furness e Rudall, 1999). Os resultados do presente trabalho mostram claramente a existência de uma citocinese assimétrica isolando a célula funcional das outras três não funcionais. Assim, nós sugerimos que o isolamento das três células permite que a sinalização para eliminação dos núcleos degenerativos não influencie no desenvolvimento do núcleo funcional, justamente pela independência citoplasmática. As paredes internas da pseudomônade de *R. pubera* são constituídas de pectina esterificadas, as

quais foram marcadas positivamente pelo anticorpo JIM7, como também reportado Knox *et al.* (1990), contudo essa região não foi marcadas pelo anticorpo JIM5 (dados não apresentados). Pectinas não esterificadas são encontradas mais frequentemente em regiões de lamela média (Knox, 1997), ao contrário das esterificadas, que estão presentes na parede celular da epiderme em intenso crescimento, como reportado em epiderme de raiz de cenoura (VandenBosch *et al.*, 1989). As AGPs, encontradas na membrana plasmática, parede celular e livres no citoplasma, ainda não são bem compreendidas, mas mostraram importância na embriogênese de células somáticas de cenoura (Kreuger e Van Holst, 1993), no controle da expansão de células epidermais de *Arabidopsis thaliana* e no crescimento do tubo polínico de *Lilium longiflorum*. Os múltiplos papéis e localizações das AGPs são um indicativo de que estas proteínas sejam importantes sinalizadoras na interação célula-célula. Além disso, existem evidências do envolvimento de AGPs na sinalização de morte celular programada (MCP) em células vegetais (Mitler *et al.*, 1997). A presença destas proteínas nas paredes internas que isolam os núcleos degenerativos do funcional de *R. pubera* indica uma possível sinalização de MCP neste processo.

Dados ultraestruturais em células vegetais mostraram que a condensação da cromatina, encolhimento e vacuolização do citoplasma são excelentes marcadores morfológicos de MCP (Coimbra *et al.*, 2004). A degradação da cromatina durante o processo de MCP é coordenado pela ativação de endonucleases específicas que clivam o DNA em fragmentos de cerca de 180 pb, para isto o material genético é submetido a um alto grau de compactação (Mitler *et al.*, 1997; Dominguez *et al.*, 2001). Nas células animais, a condensação da cromatina ocorre na região periférica do núcleo, no entanto, em células vegetais esta condensação ocorre em todo o núcleo, como foi descrito em tabaco (Mitler *et al.*, 1997). Este padrão de compactação da cromatina foi encontrado nos núcleos degenerativos da pseudomônade de *R. pubera*. As regiões do DNA que contém as sequências organizadoras de nucléolo tendem a ser clivadas no final do processo de MCP (Varnier *et al.*,

2005), por isso nucléolos foram encontrados nos núcleos degenerativos de *R. pubera*, mesmo em estágios avançados de MCP. Outro indicativo de MCP encontrado em nosso trabalho foi a presença de organelas como mitocôndrias e plastídios nos fragmentos de citoplasma isolados com os núcleos degenerativos. Estas organelas desempenham importantes papéis de sinalização para MCP tanto em células animais (Lam *et al.*, 2001) quanto em células vegetais (Hanson e Bentolila, 2004). As características ultraestruturais encontradas na pseudomônade de *R. pubera* são um indicativo de que os micrósporos não funcionais são

eliminados por MCP. O núcleo funcional por sua vez, mostrou-se menos eletrondenso, com grande volume, sugerindo elevada atividade transcricional.

Nossos resultados sugerem que há uma relação entre a morte programada das células do tapete e o desenvolvimento do pólen maduro em *R. pubera*, porém, há questões que ainda não estão esclarecidas como: 1) Qual é a real dependência da morte das células do tapete frente à degeneração dos micrósporos não funcionais? 2) É possível que a morte das células do tapete aconteça precocemente em função da formação precoce do grão de pólen? 3) O mecanismo de MCP é o mesmo nos diferentes tipos celulares? 4) Qual o motivo biológico da eliminação de três dos quatro núcleos formados após a meiose? Este estudo abre novas perspectivas para investigações sobre MCP em plantas, envolvendo modificações nas membranas, bem como sobre a expressão gênica associada ao processo de degradação dos núcleos?

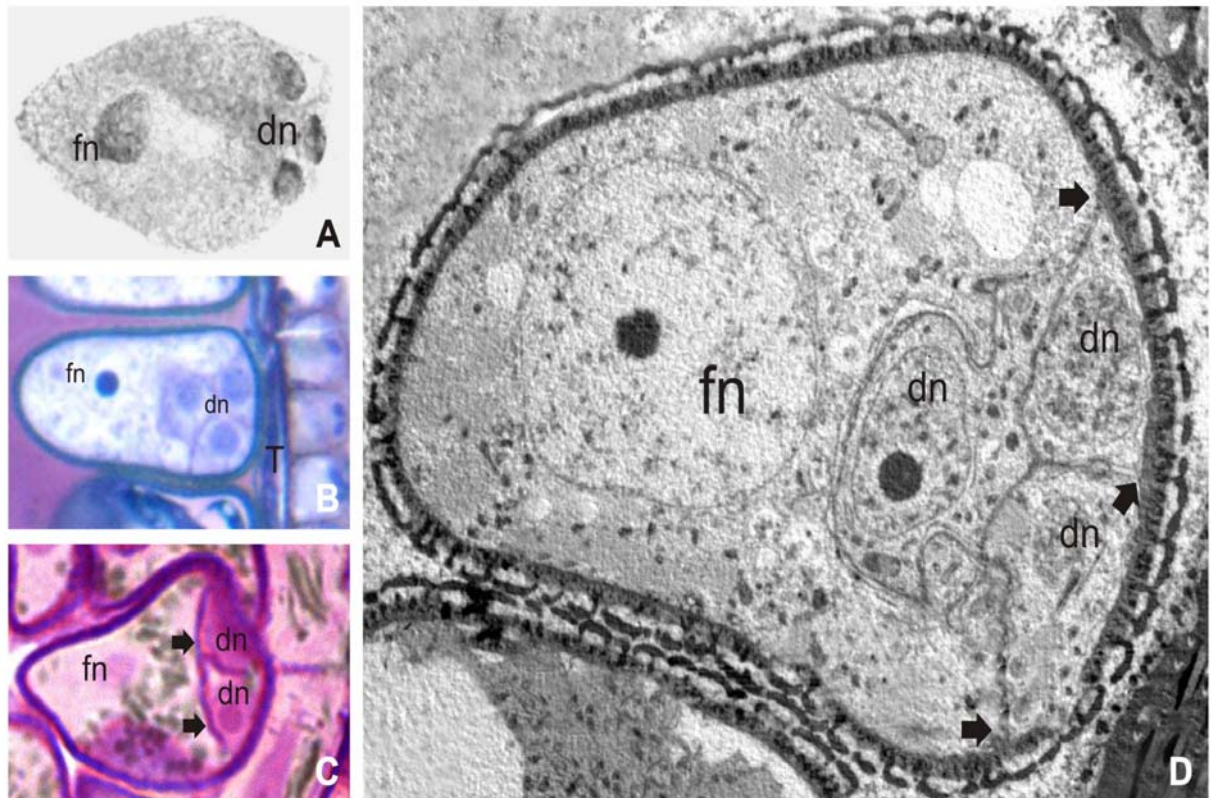


Figura 1 Diferentes colorações para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão da pseudomônade *R. pubera*. **(A)** A pseudomônade apresenta um formato de pêra com três núcleos degenerativos (dn) na região larga da célula e um núcleo funcional (fn) maior na região mais estreita. Corado com hematoxilina acética. Aumento 1.000X. **(B)** Cortes semifinos longitudinais à antera corados com azul de tolúidina, os núcleos degenerativos (dn) se encontram na região basal que estabelece contato com o tapete (T) e o núcleo funcional (fn) está na região apical. Aumento 1.000X. **(C)** Técnica do PAS mostrando marcação positiva na parede celular interna (setas), núcleo funcional (fn) e núcleos degenerativos (dn). Aumento 1.000X. **(D)** eletromicrografia da pseudomônade mostrando os três núcleos degenerativos (dn) isolados na região basal por uma fina parede interna que estabelece contato (setas) com a parede da pseudomonade. Aumento 2.850X.

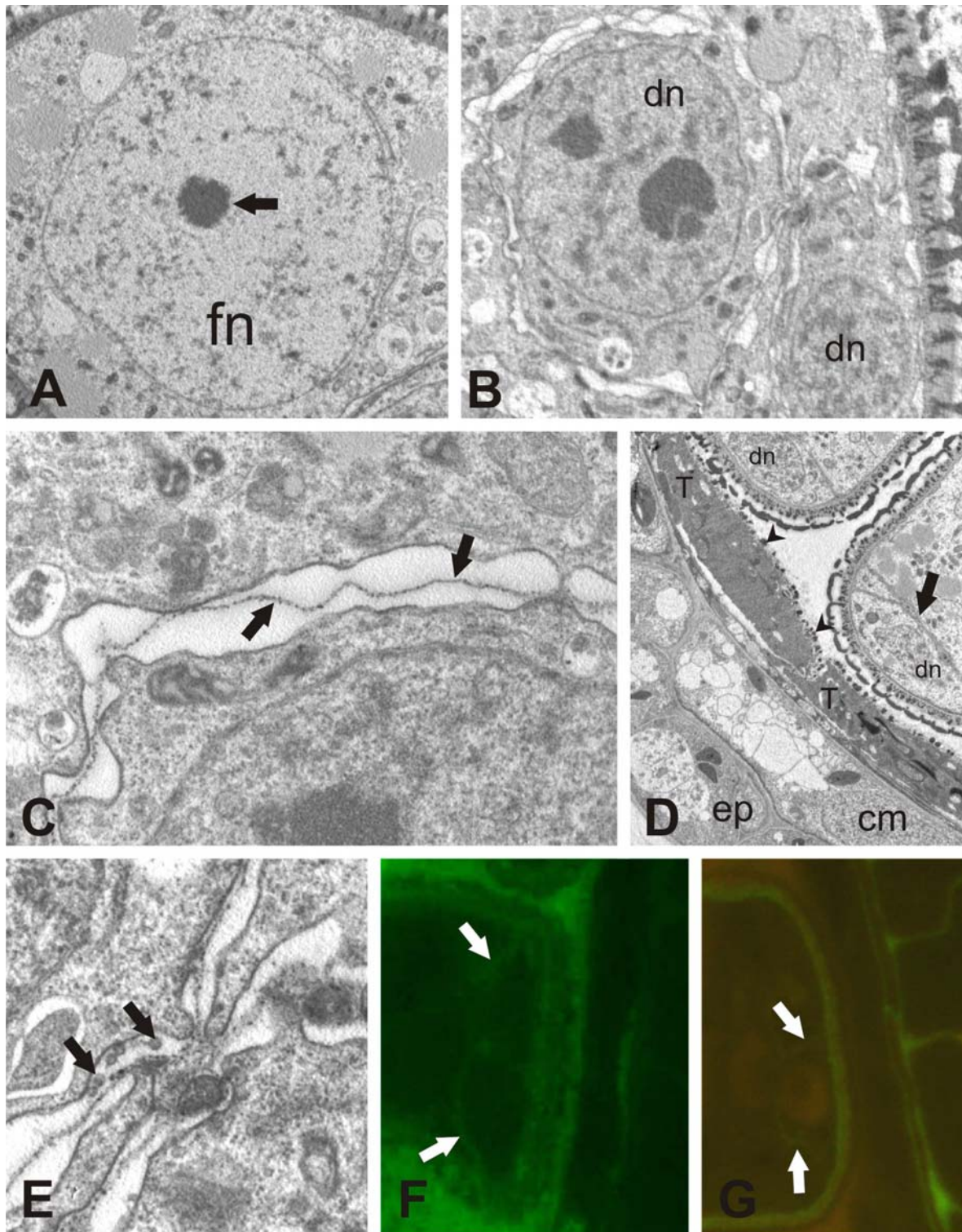


Figura 2 – (A) Núcleo funcional (fn) grande e com a cromatina bastante descompactada nucléolo (seta) evidente. Aumento 5.800X. (B) Detalhe do núcleo degenerativo (dn) com a cromatina compactada em relação ao núcleo funcional, isolado do citoplasma da pseudomônade pelas cisternas do provindas do Complexo de Golgi e na porção citoplasmática isolada com o núcleo degenerativo mostrando sinais de contração e com presença de organelas. Aumento 5.800X. (C) Detalhe da figura (2B) mostrando a presença de material eletrondenso (seta) dentro das cisternas do Golgi. Aumento 26.500X. (D) Células do tapete (T) mostrando claros sinais de morte celular, com a presença de corpúsculos de Ubisch (cabeça de seta). A

pseudomônade apresenta a parede interna (seta) isolando os núcleos degenerativos (dn). Epiderme (E) e camada média (cm). Aumento 2.850X. **(E)** Detalhe da figura (2B) mostrando a fusão das cisternas do Golgi que formam a parede interna, dentro das cisternas são vistas pequenas vesículas (setas) que parecem originar um cordão de material eletrondenso dentro das cisternas. Aumento 18.500X. **(F)** Corte semifino da antera mostrando a marcação positiva (setas) do anticorpo JIM 13 contra a proteína arabinogalactana. Aumento 1.000X. **(G)** Corte semifino da antera mostrando a marcação positiva (setas) do anticorpo JIM 7 contra resíduos metil-esterificados da pectina. Aumento 1.000X.

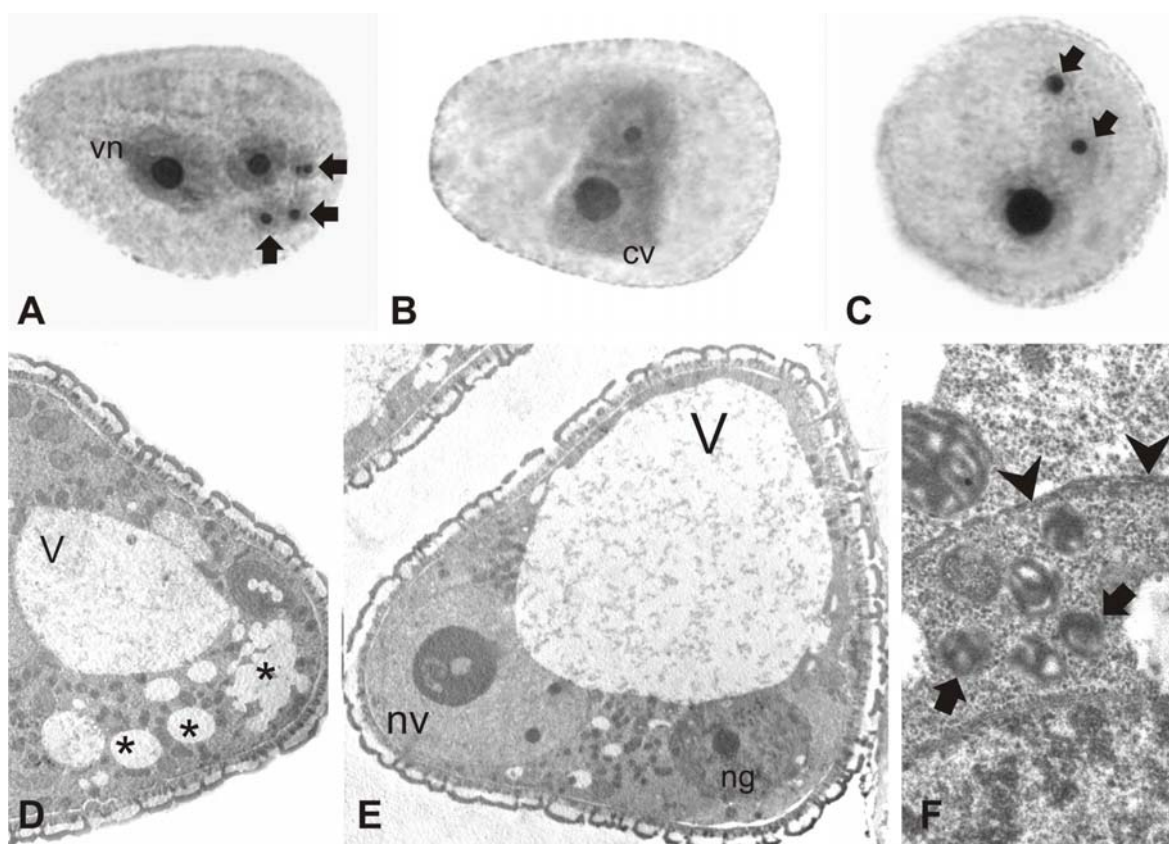


Figura 3 – **(A – C)** Diferentes fases do desenvolvimento do androgametófito impregnado por nitrato de prata. **(A)** Pseudomônade com a presença dos núcleos degenerativos (setas), núcleo generativo e núcleo vegetativo (vn). **(B)** Androgametófito com as células vegetativa (cv) e generativa. **(C)** Grão de pólen maduro com os núcleos gaméticos (setas) e a célula vegetativa. **(A – C)** aumento 1000X. **(D)** Eletromicrografia de transmissão de uma fase intermediária ao do desenvolvimento do androgametófito mostrando pequenos vacúolos (*) se fundindo e formando um grande vacúolo central (v). Aumento 2.850X. **(E)** Androgametófito maduro com o núcleo da célula vegetativa (nv) com a cromatina descompactada e o núcleo da célula generativa (ng) com a cromatina compactada. Vacúolo (V). Aumento 2.850X. **(F)** Maior aumento da célula generativa mostrando a presença de plastídios (seta) no interior do seu citoplasma e uma membrana (cabeça de seta) a isolando da célula vegetativa. Aumento 18.500X.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribui para o entendimento da androsporogênese da família Cyperaceae. Com a caracterização ultraestrutural do tecido esporogênico da antera de *Rhynchospora pubera*.

- A polarização da pseudomônade é marcada pelo deslocamento do núcleo da célula mãe de andrósporo para região basal.
- O sentido da polarização da pseudomônade do gênero *Rhynchospora* é diferente dos demais gêneros da família.
- Após a meiose os três núcleos degenerativos são isolados por uma citocinese assimétrica, configurando a pseudomônade com três andrósporos pequenos não funcionais e um grande funcional.
- Esta parede além de conter resíduos de pectina apresenta AGPs. Estas proteínas podem estar relacionadas ao processo de morte celular programada.
- Desta forma, esta parede não permite que os fatores de morte celular programada, responsáveis pela eliminação dos andrósporos não funcionais, influenciem no desenvolvimento do andrósporo funcional.
- Os andrósporos não funcionais apresentam características ultraestruturais de morte celular programada, como: contração do citoplasma, compactação da cromatina, nucléolo presente e mitocôndrias.
- Antes da eliminação dos núcleos degenerativos o núcleo funcional se divide por mitose originando a célula vegetativa e célula generativa.
- A célula generativa é isolada da célula vegetativa por membranas.
- Após a eliminação dos núcleos degenerativos a célula generativa se divide por mitose formando os dois núcleos gaméticos com o grão de pólen ainda dentro da antera.

A partir deste trabalho torna-se evidente a necessidade de novos estudos com o intuito de se esclarecer importantes questionamentos abertos sobre a androsporogênese da família Cyperaceae como:

- Qual a vantagem evolutiva da eliminação de três dos quatro núcleos formados após a meiose?
- Por que a pseudomônade se polariza de maneira diferente nos diferentes gêneros da família?

- Qual o mecanismo envolvido na escolha de um único núcleo? Ou este é um fato aleatório?
- Que fator coordena a citocinese assimétrica que acontece na pseudomônade?
- Quais os mecanismos moleculares envolvidos na eliminação dos andrósporos não funcionais? E se estes mecanismos são os mesmos nos diferentes gêneros da família?

REFERÊNCIAS

- ALLIMOVA, G. K. 2002. POLLEN GRAIN..In: Batigina, T.B (Org.). EMBRYOLOGY OF FLOWERING PLANTS. Enfield (USA): Science publishers (1): 57-58.
- ARRUDA, R. C. O.; NEVES, L, J. 2005. Anatomia foliar de *Trilepis Lhotzkiana* Nees e *Trillepis ciliatifolia* T. Koyama (Cyperaceae) Juss. *Acta Botânica Brasiliis* (19): 889-897.
- BEDINGER, P. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* (4): 879-887.
- BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. 1992. Pollen Development In Orchids: 4.0 Cytoskeleton And Ultrastructure Of The Unequal Pollen Mitosis In *Phalaenopsis*. *Protoplasma* (167): 183-192.
- BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. 2000. The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda* (Cyperaceae). *American Journal of Botany* (87.1): 1-11.
- COCUCCI, A. E.; MARIATH, J. E.A. 1995. Sexualidade das plantas. *Ciência Hoje* (106): 19-30
- COIMBRA, S.; TORRÃO, L.; ABREU, I. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actidia deliciosa* female flowers. *Plant physiology and biochemistry* (42): 537-541.
- DELMER, D. P. 1987. Cellulose biosynthesis. *Annual Review Plant Physiology* (38): 259-290.
- DOMÍNGUEZ, F.; MORENO, J.; CEJUDO, F. J. 2001. The nucellus degenerates by process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta* (213): 352-360.
- DOPCHIZ, L. P.; POGGIO, L.; GUAGLIANONE, E. R. 2000. Estudos cromossômicos em espécies de *Rhynchospora* y *Pleurostacys* (Cyperaceae). *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, (34): 325-330,
- DUNBAR, A. 1973. Pollen development in the *Eleocharis palustris* group (Cyperaceae). I. Ultrastructure and ontogeny. *Botaniska Notiser* (126): 197-254.
- EDLUND, A. F.; SWANSON, R.; PREUSS, D. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant cell* (16): S84-S97.
- ENNS, L. C.; KANAOKA, M. M.; TORII, K. U.; COMAI, L.; OKADA, K.; CLELAND, R. E. 2005. Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Molecular Biology* (58): 333-349.

FLACH, M. 1966. Diffuse centromeres in a dicotyledonous plant. *Nature* (209):1369-1370. FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Annals of Botany* (84): 475-499.

GARCIA, M. A. 2001. A new western Mediterranean species of *Cuscuta* (Convolvulaceae) confirms the presence of holocentric chromosomes in subgenus *Cuscuta*. *Botanical Journal of Linnaeus Society* (135): 169-178.

GUERRA, M.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; ARANA, P.; PUERTAS, M. J. 2006. Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* (126): 1-9.

HÅKANSSON, A. 1954. Meiosis and pollen mitosis in X-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. *Hereditas* (40): 325-345.

HANSON, M. R.; BENTOLILA, S. 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant cell* (16): 154-169.

HESLLOP-HARRISON, J. 1964. Cell walls, cell membranes, and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. In pollen physiology and fertilization. LINSKENS, H. F. Ed (Amsterdam: North Holland): 39-47.

HESLLOP-HARRISON, J. 1966. Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. *Annals of Botany* (30):221-230.

HOSHINO, T. 1993. Cytological studies of chinese Cyperaceae chromosome counts of nine species collected from Jilin, Liaoning and Hebei provinces. *Journal Japanese of Botany* (68):65-69

KIRPES, C. C.; CLARK, L. G.; LERSTEN, N. R. 1996. Systematic significance of pollen arrangement in microsporangia of Poaceae and Cyperaceae: review and observations on representative taxa. *American Journal of Botany* (83): 1609-1622.

KNOX, J. P.; LINSTEAD, P. J.; KING, J.; COOPER, C.; ROBERTS, K. 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell wall and between developing tissues of root apices. *Planta* (181): 512-521.

KNOX, J.P. 1997. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell wall. *International Review Cytology* (171): 79-120.

KREUGER, M.; VAN HOLST, G. J. 1995. Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* (197): 135-141.

LAM, E.; NAOHIRO, K.; LAWTON, M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and plant hypersensitive response. *Nature* (411): 848-853.

- LI, F. L.; DICKISON H.G.1987. The structure and function of nuclear invaginations characteristic of microsporogenesis in *Pinus banksiana*. *Annals of Botany* (60): 321-330.
- LUCEÑO, M.; GUERRA, M. 1996. Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* (49): 301-309.
- LUCEÑO, M.; VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. 1998 Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Canadian Journal of Botany* (76):440-449.
- MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR, N. S. 2003. Flor. In: Beatriz Appezzato-da-Glória; Sandra Maria Carmello-Guerreiro. (Org.). ANATOMIA VEGETAL. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 329-373.
- MALHEIROS, N.; DE CASTRO, D.; CÂMARA, A. 1947. Cromossomas sem centrômero localizado. *Agronômica Lusitana* (9): 57-74.
- MAMUN, E. A.; CANTRILL, L. C.; OVERALL, R. L.; SUTTON, B. G. 2005. Cellular organization and differentiation of organelles in rice anthers. *Cell Biology International* (29):792-802.
- MASCARENHAS, J. P. 1989. The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* (1): 657-664.
- McCORMICK, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* (5): 1265-1275.
- McCORMICK, S. 2004. Control of male gametophyte development. *Plant Cell* (16): S142-S153.
- MOAR, N. T.; WILMSHURST, A. 2003. A key to the New Zealand Cyperaceae. *New Zealand Journal of Botany* (41):325-334.
- MITLER, R.; SIMON, L.; LAM, E. 1997. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Journal of Cell Science* (110): 1333-1344.
- PAPINI, A.; MOSTI, S.; BRIGHGNA, L. 1999. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma* (207): 213-221.
- PENNELL, R. I.; LAMB, C. 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* (9): 1157-1168.
- POLOWICK, P. L.; SAWHNEY, V. K. 1992. Ultrastructural changes in the cell wall, nucleus and cytoplasm of pollen mother cells during meiotic prophase I in *Lycopersicon esculentum* (Mill.). *Protoplasma* (169):139-147.

- RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. 2000. Selective cell elimination during microsporogenesis in sedges. *Sexual Plant Reproduction* (13): 53-60
- REINSCH, S.; GÖNCZY, P. 1998. Mechanisms of nuclear positioning. *Journal of Cell Science* (111): 2283-95
- ROMANOV, I. D. 1959. The embryo sac and pollen morphology in *Tulipa*. In: *Proceedings of the IX International Botanical Congress, Montreal. Vol. II, abstracts*. Montreal: University of Toronto Press: 331-332.
- SAN MARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T. J.; VANZELA, A. L. L. 2009. Early meiosis in *Rhynchospora pubera* L. (Cyperaceae) is marked by uncommon ultrastructural features. *Cell Biology International* (33): 1118-1122
- SCOTT, R. J.; SPIELMAN, M. H.; DICKINSON, G. 2004. Stamen structure and function. *Plant Cell* (16): S46-S60.
- SILVA, C. R. M. da; GONZÁLES-ELIZONDO, M. S.; VANZELA, A. L. L. 2005. Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Botany Journal Linneum Society*. (149):457-464.
- SILVA, C. R. M. da; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M.; VANZELA, A. L. L. 2008. Chromosome Reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenetic and Genome Research* (122): 175-180.
- SIMPSON, D. A.; FURNESS, C. A.; HODKINSON, T. R.; MUASYA, A. M.; CHASE, M. W. 2003. Phylogenetic relationships in Cyperaceae subfamily Mapanioideae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany* (90): 1071-1086.
- SINGH, S.; LAZZARO, M. D.; WALLEES, B. 1998. The nuclear reticulum in placental cells of *Lilium regale* is a part of endomembrane system. *Protoplasma* (203): 144-152.
- SHI, L.; MOGENSEN, L.; ZHU, T. 1991. Dynamics of nuclear pore density and distribution patterns within developing pollen: implications for a functional relationship between the vegetative nucleus and the generative cell. *Journal of Cell Science* (99): 115-120.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. 2000. Development of pollen grain in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). *Genetics Molecular Biology* (23): 469-473.
- SUMNER, A.T. 2003. Chromosomes: Organization and function. Blackwell Publishing, Malden, Oxford, Melborn, Berlin.
- STRAATMAN, K. R.; NIJSSE, J.; KIEFT, H. 2000. Nuclear pore dynamics during pollen development and androgenesis in *Brassica napus*. *Sexual Plant Reproduction* (13): 43-51.

STRANDEHEDE, S. O. 1965. Chromosome studies in *Eleocharis* subser. *Palustris* I. Meiosis in some forms with 15 chromosomes. *Hereditas* (53): 47-62.

STRANDEHEDE, S. O. 1973. Pollen development in the *Eleocharis palustris* group (Cyperaceae) II. Cytokinesis and microspore degeneration. *Botaniska Notiser* (126): 255-265.

TANAKA, N. 1949. Chromosome studies in Cyperaceae, XII. Pollen development in genera with special reference to *Rhynchospora*. *Botanical Magazine* (55): 55-65. TANAKA, I; ITO, M. 1981. Control of division patterns in explanted microspores of *Tulipa gesneriana*. *Protoplasma* (108): 329-340.

TANAKA, I. 1997. Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. *Sexual Plant Reproduction* (10): 1-7.

VANDENBOSCH, K. A.; BRANDLEY, D. J.; KNOX, J. P.; PEROTTO, S.; BUTCHER, G.W.; BREWIN, N. J. 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space indentified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO Journal* (8): 335-342.

VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M.; LUCEÑO, M. 1996. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios* (88): 219-228.

VANZELA, A. L. L.; LUCEÑO, M.; GUERRA, Marcelo S. 2000. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* (134): 557-566.

VANZELA, A. L. L.; COLAÇO, W. 2002. Mitotic and meiotic behavior of g irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Acta Scientifica* (24):611-614.

VARNIER, A. L.; GOURBEYRE, F. M.; SANGWAN, R. S.; CLÉMENT, C. 2005. Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of Structural Biology* (152): 118-128.

WAHL, H. A. 1940. Chromosome numbers and meiosis in the genus *Carex*. *American Journal of Botany* (27): 459-470.

WU, H.; CHEUNG, A. Y. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* (44): 267-281

XIE, C. T.; YANG Y. H.; QIU Y. L.; ZHU, X. Y.;TIAN, H. Q. 2005. Cytochemical investigation of genic male-sterility in Chinese cabbage. *Sexual Plant Reproduction* (18):74-80.