

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**MORFOANATOMIA E DESENVOLVIMENTO DE ÓRGÃOS  
VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE  
MICOHETEROTRÓFICA *Thismia panamensis* (STANL.)  
JONKER (THISMIACEAE)**

**Autora: Maryana Oliveira Azevedo  
Orientador: Diego Ismael Rocha**

**Rio Verde – GO  
maio – 2019**

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**MORFOANATOMIA E DESENVOLVIMENTO DE ÓRGÃOS  
VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE  
MICOHETEROTRÓFICA *Thismia panamensis* (STANDL.)  
JONKER (THISMIACEAE)**

Autora: Maryana Oliveira Azevedo  
Orientador: Diego Ismael Rocha

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em Biodiversidade e Conservação, no Programa de Pós – Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – Área de concentração Conservação dos recursos naturais.

**Rio Verde – GO  
maio – 2019**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

A994m Azevedo, Maryana Oliveira  
Morfoanatomia e desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos de *Thismia panamensis* (STANDL.) JONKER (THISMIACEAE) / Maryana Oliveira Azevedo; orientador Diego Ismael Rocha; co-orientadora Valdnea Casagrande Dalvi. -- Rio Verde, 2019.  
55 p.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

1. Morfologia. 2. Anatomia. 3. Thismiaceae. 4. Biologia reprodutiva. I. Rocha, Diego Ismael, orient. II. Dalvi, Valdnea Casagrande, co-orient. III. Título.



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese  | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação                      | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização                 | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação                             | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ |   |

Nome Completo do Autor: Maryana Oliveira Azevedo

Matrícula: 2017102310840067

Título do Trabalho: ~~Morfogenética~~ e desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos de ~~Zizania gracilis~~: Uma espécie ~~micobacteriônica~~

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 23/07/2019

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obtive autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- qualquer obrigação exigida por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, Goiás  
Local

08/07/2019.  
Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Cliente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO

MORFOANATOMIA E DESENVOLVIMENTO DE ÓRGÃOS  
VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE  
MICOHETEROTRÓFICA *Thismia panamensis* (STANDL.)  
JONKER (THISMIACEAE)

Autora: Maryana Oliveira Azevedo  
Orientador: Diego Ismael Rocha

*TITULAÇÃO*: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de  
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 23 de maio de 2019.



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzia Francisca de Souza  
*Avaliador interno*  
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos  
Filho  
*Avaliador interno*  
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Diego Ismael Rocha  
*Presidente da Banca*  
UFJ

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, aquele que está comigo em toda e qualquer situação, me ajudando a trilhar os caminhos dessa vida superando as aflições e tendo bom animo, mesmo quando tudo parece impossível. Obrigada Deus pela oportunidade de estudar e adquirir conhecimentos sobre os aspectos em que me dediquei neste trabalho.

A minha família, a base de tudo na minha vida, a minha razão para persistir e lutar na busca de alcançar a realização de muitos sonhos.

A minha avó Dalvinha, companheira de estrada, amiga, incentivadora, ajudadora, a qual serei eternamente grata por todo apoio tanto na fase da graduação, quanto na pós graduação.

Ao meu orientador, Diego Ismael Rocha, este profissional excelente que tanto me ajudou nessa caminhada. Por estar sempre disposto e acessível, por buscar esclarecer minhas dúvidas e por me ensinar muito acerca do mundo científico. Sou grata por tudo que fez por mim, por tudo que me ensinou e pela amizade que construímos ao longo destes dois anos.

Aos meus coorientadores Valdnéa Casagrande Dalvi e Christiano Peres Coelho, por todas as sugestões e dicas durante o processo de desenvolvimento do meu trabalho.

As equipes dos Laboratórios de Anatomia Vegetal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, e da Universidade Federal de Jatai por todo apoio a mim prestado. Em especial agradeço a Roberta Silva Teixeira, pelas diversas vezes que me auxiliou em técnicas de laboratório, bem como Reiner Silva Oliveira, pelo auxílio nas análises de campo e contribuição no processamento de material.

A professora Ana Paula Caetano, bem como a Juliana Mayer, pela disponibilidade em auxiliar com correções da parte de Anatomia descritiva dos processos de microesporogênese e microgametogênese, megaesporogênese e megagametogênese.

Aos professores vinculados ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação, por toda contribuição nesse processo de minha formação como mestre. Sou grata por todos os ensinamentos.

A Rannayane Teixeira minha amiga desde o ensino fundamental, a qual foi minha carona por muitos meses nas idas e vindas do IF-Goiano.

Aos meus colegas de turma pela convivência agradável e pela amizade construída nesse período.

Agradeço a todos meus amigos de Jatai-GO que sempre estiveram dispostos a me receberem em suas casas, nas inúmeras vezes que precisei me deslocar para a cidade. Obrigada pelo apoio e carinho.

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Goiana, nascida no interior do estado, na cidade de Rio Verde. Filha de Wagner Alves Azevedo e Kenia Oliveira Silva Azevedo.

Graduada em Ciências Biológicas – modalidade licenciatura, pela Universidade Federal de Goiás – Campus Jatai.

No período da graduação atuou como Bolsista em iniciação à docência em duas escolas estaduais, Serafim de Carvalho e CEPI- José Feliciano, em Jatai - GO. Desenvolveu projetos de permacultura e horta nessas escolas, trabalhando temas voltados a educação ambiental, e além disso desenvolveu projetos de pesquisa na área educacional, focalizando na utilização do lúdico para se ensinar Biologia.

Enquanto estudante de Mestrado em Biodiversidade e Conservação, no Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, desenvolveu um projeto de pesquisa com ênfase em Anatomia descritiva, a fim de relacionar dados anatômicos com morfologia, ecologia e fisiologia, possibilitando a ampliação de conhecimentos acerca de uma espécie micoheterotrófica recém descoberta no cerrado brasileiro, *Thismia panamensis*.

## ÍNDICE GERAL

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
1. Micoheterotrofia .....	3
2. Thismiaceae – Caracterização e Distribuição .....	4
3. Thismiaceae no Brasil.....	6
4. Evolução, filogenia, sistemática e taxonomia para Thismiaceae.....	7
5. Morfoanatomia de <i>Thismia</i> .....	8
6. Conservação da biodiversidade Thismiaceae .....	10
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	11
OBJETIVOS .....	17
Objetivo Geral: .....	17
Objetivos específicos: .....	17
1.1 INTRODUÇÃO .....	20
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
1.3 RESULTADOS .....	22
Fenologia .....	22
Caracterização morfoanatômica dos órgãos subterrâneos de <i>T. panamensis</i> .....	24

Caracterização morfoanatômica dos órgãos reprodutivos de <i>T. panamensis</i> .....	25
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
2.1 INTRODUÇÃO .....	39
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
Coleta e microscopia de luz .....	41
MEV- Microscopia eletrônica de varredura .....	41
2.3 RESULTADOS .....	42
Microsporogênese e microgametogênese .....	42
Megaesporogênese e megagametogênese .....	42
2.4 DISCUSSÃO .....	46
2.5 AGRADECIMENTOS .....	49
2.6 FINANCIAMENTO .....	49
CONCLUSÃO GERAL .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Referencial Teórico</b>	
Figura 1 Distribuição de espécies <i>Thismia</i> nos estados brasileiros .....	7
<b>Capítulo 1</b>	
Figura 1 Desenvolvimento reprodutivo de <i>Thismia panamensis</i> .....	23
Figura 2 Morfoanatomia do sistema subterrâneo de <i>Thismia panamensis</i> .....	25
Figura 3 Morfoanatomia das tépalas de <i>Thismia panamensis</i> .....	26
Figura 4 Morfoanatomia da estrutura do botão floral de <i>Thismia panamensis</i>	28
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 1 Microesporogênese e microgametogênese de <i>Thismia panamensis</i> ..	43
Figura 2 Megaesporogênese e megagametogênese de <i>Thismia panamensis</i> ....	45
Figura 3 Desenvolvimento embrionário de <i>Thismia panamensis</i> .....	46

## RESUMO

AZEVEDO, MARYANA OLIVEIRA Instituto Federal Goiano Câmpus Rio Verde – GO, maio de 2019. **Morfoanatomia e desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos da espécie *Thismia panamensis* (Standl.) Jonker Thismiaceae**  
Orientador: Diego Ismael Rocha Coorientadores(as): Valdnéa Casagrande Dalvi e Christiano Peres Coelho

*Thismia panamensis* (Standl.) Jonker, é uma espécie caracterizada como micoheterotrófica, por depender de relação com fungos para garantir sua sobrevivência. Atualmente a espécie é inserida no gênero *Thismia* o qual é o maior gênero da família Thismiaceae, sendo representado por mais de 70 espécies. *T. panamensis* foi descrita para uma fitofisionomia florestada do Cerrado brasileiro a pouco tempo, sendo este o primeiro registro da família para o Cerrado e da espécie para o Brasil. Espécies de *Thismia* apresentam uma ampla variabilidade floral e os estudos existentes sobre as mesmas focam em descrever essas diferenças morfológicas, bem como se dedicam a estudar aspectos ecológicos como polinização e dispersão. Contudo, a fim de ampliar os estudos para a família Thismiaceae, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os diferentes estádios de desenvolvimento de *T. panamensis* e descrever a anatomia dos órgãos vegetativos, e reprodutivos da espécie. O desenvolvimento reprodutivo de indivíduos de *T. panamensis* foi acompanhado em campo. Algumas amostras foram coletadas e submetidas a técnicas usuais de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia. Diferentes estádios de desenvolvimento foram definidos a partir do acompanhamento da espécie. Os dados anatômicos obtidos através deste estudo evidenciaram características estruturais de *T. panamensis* de modo que foram descritos, o tecido de revestimento, o qual apresentou epiderme uniestratificada, o tecido

fundamental, composto por parênquima de reserva no sistema subterrâneo e parênquima de preenchimento nos demais órgãos, e o tecido vascular com xilema e floema dispostos. Além disso, os processos de desenvolvimento de esporos e gametas masculinos (microesporogênese e microgametogênese) e femininos (megaesporogênese e megagametogênese) foram descritos pela primeira vez para a espécie. Acreditamos que os resultados obtidos no presente estudo auxiliarão na compreensão da biologia de *Thismia panamensis*, bem como, de todo gênero.

**PALAVRAS – CHAVES:** Morfologia, Anatomia, Thismiaceae, biologia reprodutiva.

## ABSTRACT

*Thismia panamensis* (Standl.) Jonker, is a species characterized as mycoheterotrophic, because it depends on relation with fungi to guarantee its survival. Currently the species is inserted in the genus *Thismia* which is the largest genus of the family Thismiaceae, being represented by more than 70 species. *T. panamensis* was described for a forested phytophysiology of the Brazilian Cerrado in a short time, being this the first record of the family for the Cerrado and the species for Brazil. *Thismia* species exhibit a broad floral variability and the existing studies on them focus on describing these morphological differences as well as studying ecological aspects such as pollination and dispersal. However, in order to expand the studies for the family Thismiaceae, the present work aimed to characterize the different stages of development of *T. panamensis* and to describe the anatomy of the vegetative and reproductive organs of the species. The reproductive development of *T. panamensis* individuals was monitored in the field. Some samples were collected and submitted to usual techniques of light microscopy, scanning electron microscopy and microtomography. Different stages of development were defined from the monitoring of the species. The anatomical data obtained through this study evidenced structural characteristics of *T. panamensis* so that the lining tissue was described, which presented unstratified epidermis, the fundamental tissue, composed of reserve parenchyma in the underground system and parenchyma of filling in the other organs, and vascular tissue with xylem and phloem arranged. In addition, the processes of development of male spores and gametes (microsporogenesis and microgametogenesis) and female (megaesporogenesis and megagametogenesis) were described for the first time for the species. We believe that the results obtained in the present study will aid in the understanding of the biology of *Thismia panamensis*, as well as, of all genus.

**KEY-WORDS:** Morphology, Anatomy, Thismiaceae, Reproductive Biology.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Thismia* Griff. é um gênero de plantas pouco conhecido representado por cerca de 70 espécies herbáceas que, em geral, apresentam estruturas vegetativas e reprodutivas reduzidas e são aclorofiladas. Essas espécies são denominadas micoheterotróficas por dependerem de relações com fungos micorrízicos para obtenção de carbono e outros nutrientes essenciais à sua sobrevivência (DANČÁK, 2013; SHING MAR e SAUNDERS, 2015).

A micoheterotrofia é uma estratégia trófica que está presente em estimadas 20.000 espécies vegetais (MERCCKX, 2013) e, apesar dos avanços na compreensão desse fenômeno pouco se sabe a respeito das características envolvidas no estabelecimento da interação entre os fungos micorrízicos e as espécies vegetais aclorofiladas. As associações micorrízicas são, em geral, relações mutualísticas. Porém, é intrigante o motivo pelo qual fungos fazem parte de uma interação micoheterotrófica, uma vez que, não está claro se os fungos adquirem benefícios ou se são simplesmente parasitados pela planta aclorofilada (LEAKE, 1993; GOMES et al., 2016).

O gênero *Thismia* possui distribuição Pantropical e se desenvolve entre a serrapilheira de florestas úmidas permanecendo em estágio vegetativo sob o solo durante a maior parte do ano. No período de chuvas, os indivíduos emergem do solo e entram na fase reprodutiva completando seu ciclo de vida (SHING MAR e SAUNDERS, 2015). Doze espécies de *Thismia* foram identificadas na América do Sul, sendo sete restritas à Mata Atlântica, bioma caracterizado por grande variação climática e alto índice pluviométrico (MAAS et al., 1986; MAAS e MAAS 2010).

Recentemente, uma espécie encontrada no Cerrado brasileiro foi identificada como *Thismia panamensis* (GUILHERME et al., 2016) a qual possui cerca de 6 cm de altura, sem folhas aparentes, sistema subterrâneo tuberoso e uma complexa e exótica

estrutura floral. Possuem tépalas fundidas que formam um tubo com um anel no ápice do perianto. No caso de *T. panamensis* é possível notar projeções alongadas e livres entre si acima do anel (CADDICK et al., 2000).

Embora o significado funcional das tépalas morfologicamente complexas, bem como, das projeções observadas no perianto não seja conhecido, essas estruturas provavelmente desempenham um papel na atração de polinizadores. A identidade das estruturas subterrâneas observadas em algumas espécies de *Thismia*, não está bem definida, embora sejam, comumente, denominadas de tubérculos (CADDICK et al., 2000). No caso de *T. panamensis* essa é descrita como tubérculo (IMHOF, 2013), porém não existem registros da anatomia dessa estrutura para a espécie, conseqüentemente não há conhecimento sobre a forma de colonização fúngica existente nessa estrutura subterrânea. As sementes possuem forma elíptica a fusiforme e raramente o tamanho é superior a 1 mm (LEAKE, 1993). Estudos prévios relataram espécies apomíticas no gênero (RUDALL e MORLEY, 1992).

A utilização de análises microscópicas de órgãos vegetativos e/ou reprodutivos tem contribuído significativamente para elucidação da funcionalidade dos mesmos, bem como, para o conhecimento dos aspectos ecológicos, fisiológicos e filogenéticos das espécies (METCALFE e CHALK, 1979; BENZING, 2000; DICKISON, 2000). Contudo, poucos estudos têm abordado a anatomia de espécies micoheterotróficas e de espécies *Thismia* (IMHOF, 1997; IMHOF, 1999).

Diante da complexidade morfológica observada em espécies *Thismia*, a falta de informações a respeito do desenvolvimento e composição de estruturas dessas espécies, bem como, o registro inédito da ocorrência de *T. panamensis* no Cerrado brasileiro, estudos estruturais e morfofuncionais tornam-se relevantes e necessários para a melhor compreensão e entendimento acerca da biologia dessas espécies e, conseqüentemente, da biodiversidade para o Cerrado.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. Micoheterotrofia

Interações micorrízicas são extremamente abundantes no reino das plantas, portanto são mais comuns do que se imagina e estão presentes em mais de 90% das espécies de plantas (CAVALCANTE et al., 2013; HYNSON e BRUNS, 2010; MERCKX, 2013). Essas associações são variadas e classificadas de acordo com sua estrutura e função, sendo que os dois principais grupos de micorrizas são: ectomicorrizas e endomicorrizas, mas existem ainda outras classificações como micorriza arbuscular, micorriza orquidóide, micorriza arbutóides, monotropoides e ericóides (DE SOUZA et al., 2006; VAN DER HEIJDEN et al., 2014),

A micoheterotrofia é descrita como a capacidade de uma planta obter carbono via associação com fungos (MERCKX, 2013). As plantas micoheterotróficas foram caracterizadas como plantas que ‘fraudam ou enganam’ o mutualismo micorrízico (HYNSON e BRUNS, 2010). Historicamente, assumiu-se que essas plantas obtinham nutrição diretamente da matéria orgânica do solo e estas foram descritas erroneamente como “saprófitas” e, apesar deste termo ser considerado incorreto, ele ainda é muito utilizado para descrever a relação entre plantas e fungos denominada atualmente de micoheterotrofia (LEAKE, 2005).

As espécies micoheterotróficas são consideradas também como epiparasitas por alguns autores, pois de forma indireta, elas obtêm nutrientes fotoassimilados das plantas autotróficas ou fotossintéticas, por intermédio dos fungos que também se relacionam com estas, ou seja, essa relação foi descrita como tripartite e trapaceira, devido à incerteza sobre retribuição ao fungo por parte da planta micoheterotrófica (BIDARTONDO, 2005).

Além das micoheterotróficas totais, existem plantas que dependem de fungos apenas na fase inicial do desenvolvimento, sendo denominadas micoheterotróficas iniciais, e outras que conciliam a relação com fungos mais o processo fotossintético, sendo classificadas como micoheterotróficas parciais ou mixotróficas (MERCKX et al., 2010; JIA et al., 2017).

Estudos sugerem que o mecanismo de nutrição micoheterotrófico, surgiu diversas vezes em grupos taxonômicos não relacionados. Acredita-se que a micoheterotrofia evoluiu a partir de linhagens fotossintetizantes que conseguiram sobreviver sem a fotossíntese, resultando então na perda da clorofila, o que é uma

característica marcante das plantas micoheterotróficas totais, as quais dependem completamente de fungos para metabólitos de carbono (BIDARTONDO, 2005; MERCKX et al., 2010). A perda da capacidade fotossintética e dependência de fungos tem sido explicados como fenômenos que fornecem um escape a exclusão competitiva nas condições habitacionais das plantas micoheterotróficas (BIDARTONDO et al., 2004).

As angiospermas constituem o grupo com o maior número de espécies micoheterotróficas, distribuídas em famílias como, Polygalaceae, Ericaceae, Gentianaceae e Orchidaceae, na qual predomina-se o maior número de espécies (IMHOF, 1999; MERCKX e FREUDENSTEIN, 2010). Além destas, existem registros para Triuridaceae, Thismiaceae, Corsiaceae e Burmaniaceae. Contudo, a micoheterotrofia não é restrita a plantas com flores, sendo observada, também, em grupos basais como musgos, hepáticas, monilófitas e gimnospermas (WINTHER e FRIEDMAN, 2009; MERCKX e FREUDENSTEIN, 2010; MERCKX et al., 2012; RENNY et al., 2017).

## **2. Thismiaceae – Caracterização e Distribuição**

Thismiaceae é uma família composta por espécies distribuídas em cinco gêneros, sendo seus representantes caracterizados como espécies micoheterotólicas totais por dependerem de fungos na obtenção de nutrientes essenciais a sua sobrevivência, e pelo fato da relação com os fungos perdurar por todo seu ciclo de vida (GOMES et al., 2016).

As espécies da família possuem características morfológicas marcantes como, por exemplo, a aclorofilia; a forma distinta de suas flores; sementes minúsculas e as variadas formas de sistema radicular, sendo que os órgãos subterrâneos destas plantas apresentam diferentes adaptações morfoanatômicas (IMHOF et al., 2013; APG V, 2018). Na maioria das espécies da família, os estames são encurvados e formam um cone invertido no centro da flor, o ovário é ínfero, as células da testa das sementes geralmente possuem formato espiralado e as células tégmicas são comprimidas (APG V, 2018).

As espécies de Thismiaceae estão restritas aos trópicos sendo comuns nas regiões neotropicais e paleotropicais, distribuindo-se geograficamente pela América do Norte e do Sul, África, Austrália e Nova Zelândia, devido ao clima e ao habitat florestal sombreado que compõem essas áreas (LEAKE, 1994; SAINGE et al., 2017). A distribuição destas espécies é influenciada pela distribuição dos fungos com os quais se associam, por isso sugere-se que a raridade e a distribuição dispersiva de espécies micoheterotróficas esteja associada a uma especificidade para com determinados parceiros fúngicos, os quais são restritos a determinadas áreas (MERCKX et al., 2017).

Essas redes bióticas totalmente funcionais são consideradas um fator importante para a ocorrência e sobrevivência de *Thismiaceae* (SOCHOR et al., 2018). Além disso, mudanças na disponibilidade de recursos do solo também podem influenciar diretamente a distribuição dessas espécies (SAINGE et al., 2017; SHELDRAKE et al., 2017).

Os cinco gêneros que compõem a família são: *Afrothismia* (Engl.) Schltr, *Haplothismia* Airy Shaw, *Oxygyne* Schltr., *Thismia* Griff. e *Tiputinia* P.E. Berry & C. L. Woodw.

*Afrothismia* é um pequeno gênero da família e foi descrito pela primeira vez por um botânico alemão por volta de 1906. O gênero é considerado endêmico da África tropical, apresentando cerca de 15 espécies descritas para a região de Camarões. As demais espécies foram registradas na Uganda, Nigéria, Kenya, Tanzânia e Gabon (GBIF 2019). Nos últimos anos devido o avanço de estudos sobre a distribuição destas, várias espécies novas foram encontradas (SAINGE ET AL., 2017). As espécies *Afrothismia* apresentam perigônio compartimentado sendo que os compartimentos superior e inferior são separados por um anel, as anteras são adnadas ao gineceu e os grupos subterrâneos são bulbilhos, de modo que cada bulbo apresenta uma raiz terminal (CHEEK, 2003).

*Haplothismia* é um gênero monoespecífico conhecido de algumas coleções no Ghats Ocidental (Índia). Este gênero foi considerado extinto até Outubro de 2000, quando uma segunda coleta de *Haplothismia exannulata* foi realizada exatamente 48 anos após desaparecimento da espécie (MERCKX et al., 2006).

O gênero *Oxygyne* apresenta seis espécies conhecidas, três ocorrendo no Japão e outras três ocorrendo na África (SAINGE et al., 2013; CHEEK et al., 2018). *Haplothismia* e *Oxygyne* apresentam estames basalmente largos (WOODWARD et al., 2007). *Oxygyne* difere dos outros gêneros da família *Thismiaceae* devido a presença de três estames. Sendo que as espécies dos demais gêneros apresentam seis.

*Thismia* Griff. é o maior gênero da família. Atualmente são conhecidas cerca de 72 espécies e são popularmente conhecidas como lanternas de fada. As espécies desse gênero se distribuem pela América tropical, Ásia temperada e tropical quente, Leste e sudeste da Austrália, Nova Zelândia, América do Sul e América do Norte (KUMAR et al., 2017), sendo a Mata Atlântica na América do Sul e o Sudeste Asiático os principais centros de diversidade do gênero (JONKER, 1948; HUNT et al., 2014; LIM et al., 2016; SOCHOR et al., 2018). Acredita-se que a distribuição disjunta do gênero é devida a antiguidade deste grupo de plantas, sendo datado de 90 -105 milhões de anos atrás, antes do rompimento do Gondwana ocidental (MERCKX et al., 2008).

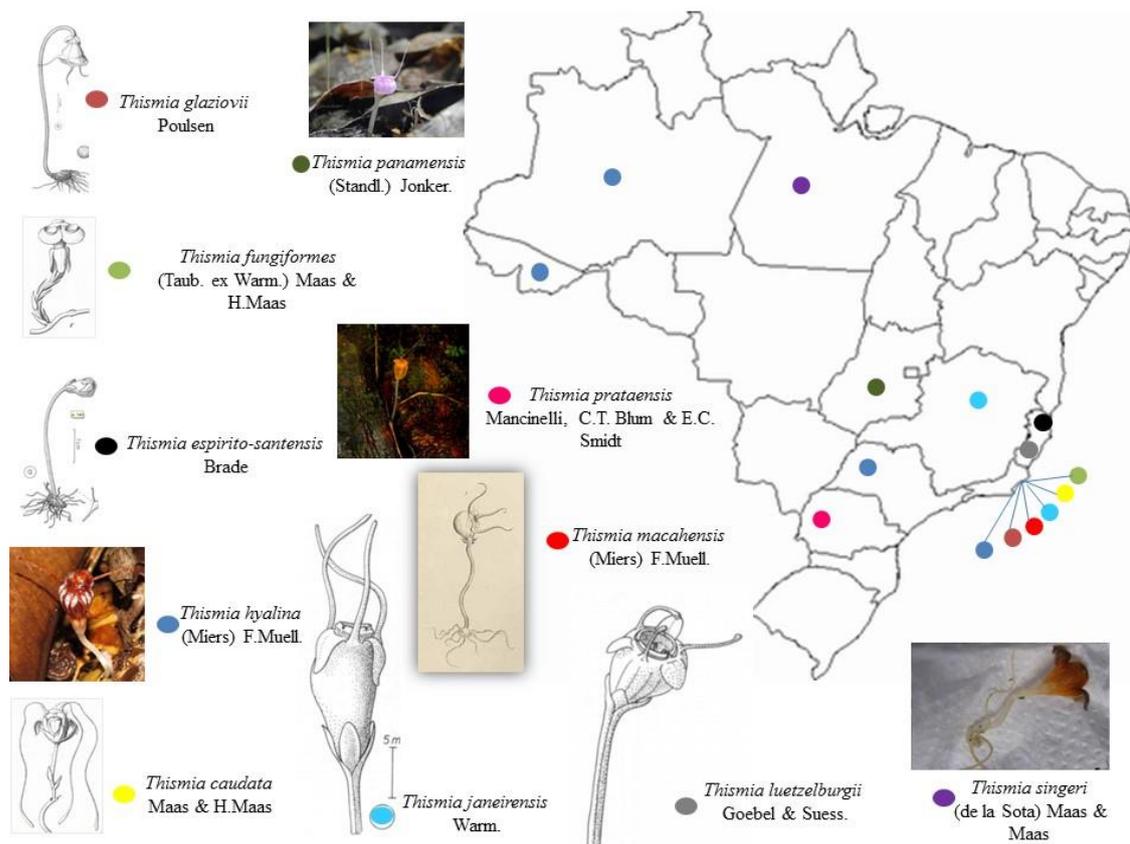
*Tiputinia* é representado por uma única espécie, *Tiputinia foetida* P.E.Berry e C. L. Woodw., a qual foi encontrada no ano de 2005 durante um curso de campo na Estação de Biodiversidade Tiputuni na Amazônia Equador. O gênero foi assim denominado justamente devido ao local em que a espécie foi encontrada, e já o epíteto específico faz jus a um forte odor de carne podre produzido pela flor, relacionado ao sistema de polinização desta (WOODWARD et al., 2007).

### 3. **Thismiaceae no Brasil**

De acordo com a lista de espécies da flora brasileira, os registros da família Thismiaceae para o Brasil se restringem ao gênero *Thismia* Griff., de modo que dez espécies já foram documentadas, as quais ocorrem nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica e Amazônia, distribuindo-se geograficamente na região norte (Acre, Amazonas e Pará), sudeste (Espírito-Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e sul (Paraná).

As espécies já descritas são: *Thismia janeirensis* (WARM)., *Thismia espirito-santensis* (BRADE)., *Thismia macahensis* (Miers) F.Muell., *Thismia prataensis* Mancinelli, C.T. Blum Ee. C. Smidt., *Thismia singeri* (de la Sota) Maas e Maas., *Thismia fungiformis* (Taub. ex Warm.) Maas & H.Maas., *Thismia glaziovii* Poulsen., *Thismia hyalina* (Miers) F. Muel., *Thismia caudata* Maas & H.Maas, e *Thismia luetzelburgii* Goebel e Suess (FORZZA ET AL., 2010).

No ano de 2015 foi relatada a ocorrência de mais uma espécie para o Brasil, a qual representa a descoberta mais recente da família em terras brasileiras. A espécie foi identificada como *Thismia panamensis* (Standl.) Jonker. Esse foi o primeiro registro da família para o Cerrado, e da espécie para o Brasil. A identificação foi feita no município de Jataí – Goiás, região Centro-Oeste brasileira (GUILHERME et al., 2016).



**Figura.1:** Distribuição de espécies *Thismia* nos estados brasileiros. Fonte das imagens:

[http://plantillustrations.org/illustration.php?id\\_illustration=37411&SID=0&mobile=0&code\\_category\\_taxon=1&size=1;](http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=37411&SID=0&mobile=0&code_category_taxon=1&size=1;)  
[https://www.delta-intkey.com/angio/images/triscy01.gif;](https://www.delta-intkey.com/angio/images/triscy01.gif)  
[https://www.inaturalist.org/taxa/429676-Thismia-hyalina;](https://www.inaturalist.org/taxa/429676-Thismia-hyalina)  
<http://botanicaufpr.blogspot.com.br/2013/02/thismia-prataensis-uma-nova-especie-no.html>

#### 4. Evolução, filogenia, sistemática e taxonomia para *Thismiaceae*

Devido à redução ou perda de caracteres morfológicos e a redução de genomas plastidiais, as afinidades taxonômicas de muitos grupos de plantas micoheterotróficas com flores, permanecem incompreendidas (MERCKX et al., 2008; MERCKX et al., 2009). As espécies de *Thismiaceae* são conhecidas por poucas coleções, isso se deve ao fato das populações serem de difícil localização e efêmeras, permanecendo no subsolo durante a maior parte do ano e emergindo apenas durante a floração e frutificação que ocorre no auge do período chuvoso. Além disso, para indivíduos micoheterotróficos o material fóssil é escasso, com isso existe uma dificuldade ainda maior para reconstruir a história evolutiva para estas espécies, ocasionando em lacunas acerca de aspectos evolutivos, reprodutivos, ecológicos e filogenéticos (MERCKX et al., 2010; LAM et al., 2016; SOCHOR et al., 2018).

Prova de todas essas dificuldades relatadas é a inconstância de dados provenientes de estudos filogenéticos feitos, os quais trataram *Thismiaceae* primeiramente como uma tribo de *Burmaniaceae*, posteriormente a partir de estudos evolutivos e filogenéticos a tribo foi elevada a família, considerando algumas distinções (APG, 1998). Anos mais tarde estudos moleculares propuseram, que ambas consistiam em uma só família, mas recentemente estudos envolvendo dados nucleares mostraram que de fato esses grupos devem ser divididos, ou seja, deve-se considerar ambas as famílias, inclusive no (APG, 2018) a separação destes grupos foi explicada (JONKER, 1938; MERCKX et al., 2006, 2009; LAM et al., 2018).

Além dos dados moleculares, dados morfológicos também são usados para diferenciar *Thismiaceae* de *Burmaniaceae*. Dentre as características destaca-se a quantidade de estames, uma vez que, as espécies dessas famílias apresentam seis e três respectivamente, com uma exceção para o gênero *Oxygyne* em *Thismiaceae*. Além disso, a forma da disposição floral também é distinta já que em *Burmaniaceae* a flor apresenta-se cilíndrica e em *Thismiaceae* esta tem formato campanulado.

As descobertas frequentes de várias espécies para o grupo, o avanço das técnicas moleculares, e estudos morfoanatômicos devem auxiliar nas definições taxonômicas posteriores, de modo que estas incongruências sejam resolvidas (CHASE et al., 2016; LAM et al., 2018).

### **5. Morfoanatomia de *Thismia***

As espécies de *Thismia* apresentam morfologia específica e complexa (HRONEŠ, et al., 2015). Essas são plantas que apresentam flores muito pequenas, com morfologias singulares. As raízes podem ser do tipo coróides, vermiformes ou tuberosas. Estômatos nunca foram relatados para essas espécies, quando apresentam folhas estas são reduzidas a escamas (localizadas logo abaixo da flor), e geralmente na flor há um anel no topo do perigônio, podendo apresentar apêndices filiformes no topo ou não.

Espécies do gênero se caracterizam também por apresentarem ovário inferior, óvulos numerosos, estilete curto, sementes semelhantes a poeira e flores actinomorfas ou zigomorfas com cores fortes (KUMAR et al., 2017). Populações de *Thismia* podem apresentar morfotipos externos distintos, como por exemplo, a cor, a forma dos apêndices e o tamanho da flor e ainda assim compartilham da mesma morfologia interna, o que dificulta a delimitação de novas espécies (SOCHOR et al., 2018).

Os estudos sobre essas espécies se restringem a morfologia e a taxonomia, tanto que alguns trabalhos trazem chaves para identificação, a descrição, e a suposta filogenia das mesmas (JONKER, 1938; HUNT et al., 2014 e NURALIEV et al., 2014).

Os caracteres diagnósticos que têm sido considerados para delimitação de espécies são: morfologia das anteras, presença de mitra e morfologia dos apêndices e lobos do perianto (KUMAR et al., 2017).

Um dos trabalhos descritivos aborda com base em microscopia eletrônica de varredura, o desenvolvimento floral de *Thismia* destacando a formação e posicionamento de estames e estigma, e detalhando a aparência floral e a presença de tricomas glandulares para a superfície externa da flor de *Thismia aseroe* Becc., bem como a ausência de nectários para a mesma (CADDICK et al., 2000).

*Thismia acuminata* Hroneš, Dančák & Sochor, possui raízes coraliformes, flores actinomorfas com um tubo urceolado com uma superfície exterior variando do acinzentado ao acastanhado (SOCHOR et al., 2018). *Thismia arachnites* Ridl. possui um perianto actinomórfico com 6 tépalas fundidas de coloração esbranquiçada com listras avermelhadas (CHANTANAORAPINT, 2018). Estas e outras descrições evidenciam a enorme variação morfológica para espécies deste gênero.

*Thismia panamensis*, a espécie em foco no presente estudo, apresenta um sistema subterrâneo tuberoso, com raízes filiformes, um pedúnculo floral simples e delgado, tubo floral zigomórfico com uma coloração que vai do branco ao púrpura, flores bissexuais, únicas e pouco vistosas, as quais apresentam tépalas que terminam em apêndices filiformes (HAMMEL et al. 2003). A flor apresenta seis estames, anteras rimosas, gineceu gamocarpelar, ovário ínfero, tricarpelar, unilocular, placentação central livre, pluriovulado, estilete único, estigma trífidio, ereto, cilíndrico e seu fruto é em forma de cápsula o qual se assemelha a uma taça tendo as sementes expostas (GUILHERME et al., 2016).

A anatomia das espécies *Thismiaceae* ainda é pouco estudada, mas existem alguns dados provenientes de estudos anatômicos desenvolvidos, os quais revelam a estrutura micromorfológica de algumas dessas espécies, como por exemplo, *Thismia americana* e *Thismia luetzelburgii* (PFEIFFER, 1914; GOEBEL E SUSSENGUTH, 1924;). A anatomia foi utilizada principalmente afim de entender estruturalmente a associação micorrízica dessas espécies (IMHOF e SAINGE, 2008; IMHOF, 2013; CHEEK et al., 2018), além disso os estudos revelaram a disposição do tecido vascular dessas plantas, o qual apresenta-se reduzido, o tipo de tecido fundamental que é

constituído por parênquima, seja ele fundamental ou de preenchimento e além disso, a formação, o tipo de saco embrionário e a disposição do mesmo é descrita, bem como a organização de gineceu e androceu (RUDALL e MORLEY, 1992).

Com base na descrição morfológica para *T. panamensis*, surgiu a curiosidade sobre a anatomia da espécie, e sobre como descrições anatômicas poderiam auxiliar em questões ainda não esclarecidas nos estudos da mesma, como por exemplo, o tipo de relação micorrízica estabelecida entre esta espécie e fungos, além disso a anatomia dos apêndices filiformes acima do perigônio e se estes teriam alguma associação com atração de polinizadores, e a morfoanatomia vegetal e reprodutiva da espécie, a qual até então não tinha sido descrita.

## **6. Conservação da biodiversidade Thismiaceae**

Devido efemeridade e a pouca visibilidade dessas espécies aclorofiladas e micoheterotróficas, medidas conservacionistas são dificultadas, porém são necessárias, já que a maioria das plantas micoheterotróficas crescem em habitats florestais ameaçados (MERCKX et al., 2009).

Um exemplo para a família é a espécie *T. nigricoronata* Kumar, a qual sofre pressões intensas de desmatamento para a agricultura. Atualmente medidas conservacionistas não são possíveis, por isso ações imediatas devem ser tomadas para o estudo dessas espécies (KUMAR et al., 2017).

Para Thismiaceae, o estado de conservação e distribuição geográfica ainda são pouco conhecidos. Em geral, essas espécies são fortemente endêmicas, o que as tornam propensas à distúrbios, como por exemplo, perda de população e extinção. Estas também são mais sensíveis a mudanças climáticas devido a sua fenologia que é restrita, dependendo de um fator ambiental importante que é umidade (BOROKINI, 2014; SAINGE et al., 2017).

Existem registros de espécies da família que foram avaliadas de acordo com critérios da IUCN 2012, e consideradas criticamente ameaçadas e de outras que foram perdidas em decorrência de degradações. Portanto, algumas espécies dessa família são consideradas extintas (MERCKX et al., 2009; SAINGE et al., 2013; SAINGE et al., 2017; CHEEK et al., 2018).

Para o gênero *Oxygyne*, duas de suas seis espécies conhecidas (*O. triandra* Schltr e *O. hyodoi* C.Abe e Akasawa), estão extintas e as outras quatro são consideradas criticamente ameaçadas (CHEEK et al., 2018). Considerando que para essas espécies a

única opção viável é a proteção destas na natureza, haja visto que poucos indivíduos aclorofilados foram cultivados *ex situ* com sucesso, são necessários trabalhos voltados ao estudo de conservação das mesmas para que não se percam mais espécies (SUJANAPAL et al., 2017; CHEEK et al., 2018).

Dančák et al., (2018), propuseram a utilização dessas espécies como espécies chaves afim de atingir um objetivo de conservação, já que essas têm uma aparência estranha e uma estratégia de vida peculiar e fortes ligações com as florestas primárias, esta pode ser uma opção na conservação das mesmas.

Portanto o presente trabalho traz também esse apelo a conservação, destacando a importância de se estabelecer projetos conservacionistas para o Cerrado, sendo que ainda há muito o que ser descoberto e contando que muitas espécies já foram perdidas.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BIDARTONDO, M.I., B DE BURGHARDT, GEBAUER, G, BRUNS TD, LEIA DJ: Alterando parceiros no escuro: evidência isotópica e molecular de ligações ectomicorrízicas entre orquídeas da floresta e árvores. *Proc R Soc B.*, 271: 1799-1806. 10.1098 / rspb.2004.2807, 2004.

BIDARTONDO, M.I. A ecologia evolutiva da micoheterotrofia. *New Phytologist* , 167 (2), p.335-352., 2005.

BOROKINI, TI Uma compilação sistemática da flora endêmica na Nigéria para o manejo de conservação. *Jornal de Taxa Ameaçada* , v. 6, n. 11, p. 6406-6426, 2014.

CADDICK, L. R.; RUDALL, P. J.; WILKIN, P. Floral morphology and development in Dioscoreales. *Feddes Repertorium*, 111. Jg., n. 3-4, S. 189-230, 2000.

CAVALVANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.;MAIA, L.C. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. *Anais da academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 5, p. 180-208, 2013.Disponível em:<<http://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/179/162>> Acesso em: Nov. 2017.

CHANTANAORRAPINT, S. Lectotypification de *Thismia arachnites* (Thismiaceae), uma espécie misteriosa recentemente relatada para a Tailândia. *Kew Bulletin*, v. 73, n. 3, p. 43, 2018.

CHASE, Mark W., et al. Uma atualização da classificação do Angiosperm Phylogeny Group para as ordens e famílias de plantas com flores: APG IV. *Revista Botânica da Sociedade Lineana*, 181. Jg., Nr. 1, S. 1-20, 2016.

CHEEK, M. A new species of *Afrothismia* (Burmanniaceae) from Kenya. *Kew Bulletin*, 951-955, 2003.

CHEEK, M.; TSUKAYA, H.; RUDALL, P. J.; SUETSUGU, K. Taxonomic monograph of *Oxygyne* (Thismiaceae), rare achlorophyllous mycoheterotrophs with strongly disjunct distribution. *PeerJ*, 6: e4828 v.2018, n.5, 2018. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/4828/>> Acesso em: AGO 2018.

DANČÁK, M., HRONEŠ, M., SOCHOR, M., & SOCHOROVÁ, Z. *Thismia kelabitiana* (Thismiaceae), a new unique Fairy Lantern from Borneo potentially threatened by commercial logging. *PloS one*, 13(10), e0203443, 2018.

DE SOUZA, V. C., DA SILVA, R. A., CARDOSO, G. D., & BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, 10(3), 612-618, 2006.

GOEBEL, K., SUSSENGUTH, K. Beitrage zur Kenntnis der sudamerikanischen-Burmanniaceen. *Flora*, 117, pp. 55-90, 1924.

GOMES, F. I. S.; GUTIÉRREZ.A.J.; BIDARTONDO, I. M.; MERCKS, T.F.S.V. Arbuscular mycorrhizal interactions of mycoheterotrophic *Thismia* are more specialized than in autotrophic plants *New Phytologist* 213: 1418–1427, 2016.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Disponível em: <https://www.gbif.org/occurrence/search?q=Afrothismia> Acesso em: Jan. 2019.

GUILHERME, G.A.F.; COELHO, P.C.; SMIDT, C.E.; GOMES, C.D.; SOUZA, F.L. *Thismia panamensis*: first record of Thismiaceae for the Brazilian Cerrado in Goiás state **Check List** 12-1877, 2016.

HYNSON, N. A., e BRUNS, T. D. Fungal hosts for mycoheterotrophic plants: a nonexclusive, but highly selective club. *New Phytologist*, 185(3), p.598-601, 2010.

HUNT, C. A., STEENBEEKE, G., & MERCKX, V. *Thismia megalongensis* (Thismiaceae), a new species of *Thismia* from New South Wales. *Telopea*, 16, 165-174, 2014.

IMHOF, S. Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.) Pers.(Gentianaceae). *Mycorrhiza*, 9(1), 33-39, 1999.

IMHOF, S., e SAINGE, M. N. Ontogeny of the mycoheterotrophic species *Afrothismia hydra* (Burmanniaceae). *Botanical journal of the Linnean Society*, 157(1), 31-36, 2008.

IMHOF, Stephan et al. Morfologia Subterrânea e Estruturas Micorrizas. Em: **Mycoheterotrophy** . *Springer*, Nova Iorque, NY. p. 157-214, 2013.

JIA, SHUZHENG et al. Comunidades fúngicas associadas a raiz em três espécies de Pyroleae e sua partilha de micobiontes com árvores circundantes em florestas de coníferas subalpinas no Monte Fuji, Japão. *Mycorrhiza* , v. 27, n. 8, p. 733-745, 2017.

JONKER, F.P. Burmanniaceae. In: Van Steenis CGGJ (ed), Flora Malesiana I, 4: 12–26. Noordhoff, Leiden, 1948.

KUMAR, P.; GALE, S.W.; LI, J.H.; BOUAMANIVONG, S. E.; FISCHER, G. A. *Thismia nigricoronata*, uma nova espécie de Burmanniaceae (Thismieae, Dioscoreales) de Vang Vieng, província de Vientiane, Laos, e uma chave para a classificação subgenérica. *Phytotaxa* , v. 319 (3), p. 225-240, 2017.

LAM, K.Y.V; MERCKX, V.S.F.T.; GRAHAM, S.W.; A few-gene plastid phylogenetic framework for mycoheterotrophic monocots. *American Journal of Botany* v.103, p.692-708, 2016.

LAM, K.Y. V. et al. Phylogenomic inference in extremis: A case study with mycoheterotroph plastomes. *American Journal of Botany*, v. 105, n. 3, p. 480-494, 2018.

LAMBERS, H., TESTE, F.P. Interações entre plantas micorrizas arbusculares e não-micorrizas: espécies não-micorrízicas em ambos os extremos de disponibilidade de nutrientes jogam o mesmo jogo ?. *Plant, Cell & Environment* , 36 (11), p.1911-1915, 2013.

LEAKE, J. R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127(2), p. 171-216, 1994.

LEAKE, J. R. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist*, v. 19, n. 3, p. 113-122, 2005.

LIM, G.S.; BARRETT, C.F.; PANG, C.C; DAVIS, J. I. . Drastic reduction of plastome size in the mycoheterotrophic *Thismia tentaculata* relative to that of its autotrophic relative *Tacca chantrieri*. *American Journal of Botany* v.103, p. 1129-1137, 2016.

MERCKX, V. S. F. T.; SCHOLS, P.; MAAS-VAN DER KAMER, H.; MAAS, P. Phylogeny and evolution of Burmanniaceae (Dioscoreales) based on nuclear and mitochondrial data. *American Journal of Botany* v. 93, p. 1684-1998, 2006.

MERCKX, V., CHATROU, L. W., LEMAIRE, B., SAINGE, M. N., HUYSMANS, S., & SMETS, E. F. Diversification of myco-heterotrophic angiosperms: evidence from Burmanniaceae. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 178, 2008.

MERCKX, V.; BIDARTONDO, M. I.; HYNSON, N. A. Mico-heterotrofia: quando fungos hospedam plantas. *Annals of Botany* , v. 104 (7), p. 1255-1261, 2009.

MERCKX, V. S.F. T.; BAKKER, T. F.; HUYSMANS, S.; SMETS, E. Bias and conflict in phylogenetic inference of myco-heterotrophic plants: a case study in Thismiaceae. *Cladistics* v. 25 p. 64-77, 2009.

MERCKX, V.; FREUDENSTEIN, J. V. Evolution of mycoheterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. *New Phytologist*, 185(3), 605-609. 2010

MERCKX, V. S.F.T, et al. As interações mico-heterotróficas não se limitam a uma faixa filogenética estreita de fungos micorrízicos arbusculares. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 6, p. 1524-1532, 2012.

V.S.F.T. MERCKX (ed.), Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi, 1 DOI 10.1007/978-1-4614-5209-6\_1, © Springer Science+Business Media New York 2013.

PFEIFFER, N. E. Morphology of *Thismia americana*. Botanical gazette, 57(2), p. 122-135, 1914.

NURALIEV, M. S.; BEER, A. S.; KUZNETSOV, A. N.; KUZNETSOVA, S.P. *Thismia mucronata* (Thismiaceae), a new species from southern Vietnam. *Phytotaxa* v. 167, n.3, p. 245-255, 2014. doi: 10.11646/phytotaxa.167.3.3.

RENNY, M. et al. Genetic diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the mycoheterotroph *Arachnitis uniflora* Phil.(Corsiaceae). *Annals of Botany*, v. 119, n. 8, p. 1279-1294, 2017.

RUDALL, P., MORLEY, S. Embryo sac and early post-fertilisation development in *Thismia* (Burmanniaceae). *Kew Bulletin*, p. 625-632, 1992.

SAINGE, M. N. ; KENFACK, D.; CHUYONG, G. B. Two new species of *Afrothismia* (Thismiaceae) from southern Cameroon. *Kew Bulletin*, v. 68, n. 4, p. 591-597, 2013.

SAINGE, M. N.; CHUYONG, G. B.; PETERSON, A. T. Endemism and geographic distribution of African Thismiaceae. *Plant Ecology and Evolution*, v. 150, n. 3, p. 304-312, 2017.

SOCHOR, M.; HRONEŠ, M.; DANČÁK, M. New insights into variation, evolution and taxonomy of fairy lanterns (*Thismia*, Thismiaceae) with four new species from Borneo. *Plant Systematics and evolution*, v. 304(5), p. 699-721, 2018.

SUJANAPAL, P.; ROBI, A. J.; DANTAS, KJ, SUMOD, M.; E MERCKX, V.S.F.T. *Thismia* (Thismiaceae): o primeiro registro do gênero mycoheterotrophic à Flora de Índia com uma nova espécie que revela o significado phytogeographical de Ghats Ocidentais. *Blumea-Biodiversidade, Evolução e Biogeografia de Plantas*, v.62(2). p. 97-102, 2017.

VAN DER HEIJDEN, M. G., MARTIN, F. M., SELOSSE, M. A., & SANDERS, I. R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), p.1406-1423, 2015.

WINTHER, J.L., FRIEDMAN, W.E. Phylogenetic affinity of arbuscular mycorrhizal symbionts in *Psilotum nudum*. *Journal of Plant Research*, 122, p.485–496, 2009.

WOODWARD, C. L. BERRY, E.P.; KAMER, M. H.; SWING, K. *Tiputinia foetida*, a new mycoheterotrophic genus of Thismiaceae from Amazonian Ecuador, and a likely case of deceit pollination. *Taxon*, v. 56, n. 1, p. 157-162, 2007.

## OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar a morfoanatomia e o desenvolvimento das estruturas vegetativas e reprodutivas de *Thismia panamensis*.

### **Objetivos específicos:**

Caracterizar aspectos da fenologia de *Thismia panamensis*, descrevendo os diferentes estádios de desenvolvimento da fenofase reprodutiva da espécie.

Apresentar a anatomia da associação micorrízica obrigatória de *T. panamensis*.

Descrever a morfoanatomia do tubérculo e dos verticilos florais de *T. panamensis*

Determinar os processos de formação de esporos e gametas masculinos e femininos (microesporogênese, microgametogênese, megaesporogênese e megagametogênese).

## CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Brazilian Journal of Botany)

### **Aspectos fenológicos e morfoanatômicos de *Thismia panamensis* (STANDL.)**

**JONKER**

#### **RESUMO**

*Thismia panamensis* é uma espécie micoheterotrófica recentemente reportada no Cerrado. Essa espécie apresenta complexa estrutura vegetativa e reprodutiva, sendo que a identidade e funcionalidade desses órgãos ainda não são bem definidas. O presente estudo caracterizou a fenologia e a morfoanatomia de órgãos vegetativos e reprodutivos de *T. panamensis*. Observações em campo de indivíduos previamente demarcados foram realizadas durante o período reprodutivo da espécie. Amostras do sistema subterrâneo e de órgãos reprodutivos foram coletadas e submetidas à técnicas usuais de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia. Alterações na simetria e na coloração do botão floral foram observadas ao longo do período de pré-antese. Este período durou cerca de 20 a 24 dias. A flor permaneceu aberta por 15 dias até a queda do perianto e maturação do fruto com a exposição das sementes. Os resultados anatômicos evidenciaram uma estrutura subterrânea característica de raiz, com hifas fúngicas distribuídas por toda a extensão cortical, o que é característico em plantas micoheterotróficas. O pedúnculo também apresentou um córtex parenquimatoso e a vascularização era reduzida. Na estrutura floral foram evidenciados tricomas tectores na região interna das tépalas, o gineceu apresentou um estilete curto e uma região estigmática

repleta de papilas, o androceu apresentou seis estames tetraesporangíados. O apêndice floral, com base em análises microscópicas, não apresentou estruturas secretoras, negando o que fora sugerido anteriormente para espécies *Thismia*.

Palavras chave: Anatomia floral, Biologia Floral, Fenologia, Lanterna de fada, Micoheterotrofia

## ABSTRACT

*Thismia panamensis* is a mycoheterotrophic species recently reported in the Cerrado. This species presents a complex vegetative and reproductive structure, and the identity and functionality of these organs are still not well defined. The present study characterized phenology and morphoanatomy of vegetative and reproductive organs of *T. panamensis*. Field observations of previously demarcated individuals were performed during the reproductive period of the species. Samples of the underground system and reproductive organs were collected and submitted to the usual techniques of light microscopy, scanning electron microscopy and microtomography. Changes in symmetry and floral bud color were observed throughout the pre-anthesis period. This period lasted about 20 to 24 days. The flower remained open for 15 days until the fall of the perianth and maturation of the fruit with the exposure of the seeds. The anatomical results evidenced a subterranean structure characteristic of root, with fungal hyphae distributed throughout the cortical extension, which is characteristic in mycoheterotrophic plants. The peduncle also presented a parenchymal cortex and the vascularization was reduced. In the floral structure, tectric trichomes were evident in the internal region of the tepalas, the gynoecium showed a short stylet and a stigmatic region full of papillae, the androecium presented six tetraesporangid stamens. The floral appendix, based on microscopic analysis, did not present secretory structures, denying what had previously been suggested for *Thismia* species.

KEY-WORDS: Floral anatomy, Floral biology, Phenology, Fairy lantern, Mycoheterotrophy

## 1.1 INTRODUÇÃO

O grande número de novas espécies reportadas nos últimos anos tem chamado à atenção de botânicos em todo mundo para o gênero *Thismia* Griff (Thismiaceae), até então, pouco conhecido. Esse gênero compreende cerca de 80 espécies, popularmente denominadas como lanternas de fada (SOCHOR et al. 2018). Essas espécies estão distribuídas principalmente no sudeste da Ásia, Austrália e América do Sul e Central e apresentam estruturas vegetativas e reprodutivas reduzidas, e aclorofiladas (DANČÁK, 2013; HRONEŠ, 2016; COOPER, 2017; KUMAR et al., 2017; SOCHOR et al., 2017; SUJANAPAL et al., 2017; SUETSUGU et al., 2017; TSUKAYA et al., 2017; CHANTANAORRAPINT e SUDDEE 2018; SUETSUGU et al., 2018; SOCHOR et al., 2018). Além disso, são denominadas micoheterotróficas por dependerem de relações com fungos micorrízicos para obtenção de carbono e outros nutrientes essenciais à sua sobrevivência (SHING MAR e SAUNDERS, 2015; KUMAR et al., 2017).

As espécies de *Thismia* se desenvolvem entre a serrapilheira de florestas úmidas, permanecendo em estágio vegetativo sob o solo durante a maior parte do ano. Após o período de chuvas os órgãos reprodutivos emergem e, então, tem-se o pedúnculo sustentando a estrutura reprodutiva. Este pedúnculo pode ou não apresentar folhas. Quando presentes, as folhas são bastante reduzidas e se assemelham a escamas (SHING MAR e SAUNDERS, 2015; TSUKAYA, 2018).

As flores de *Thismia* são exemplos de complexidade e diversidade entre as angiospermas, exibindo características peculiares em sua morfologia floral (CADDICK et al., 2000). Na maioria das espécies do gênero, as tépalas são congenitamente fundidas formando um tubo de perianto com lóbulos apicalmente livres. Esses lóbulos são elaborados e, na maioria das espécies formam uma mitra ou cúpula adornado com apêndices alongados que são livres ou unidos. Embora o significado funcional destas tépalas morfológicamente complexas ainda não seja compreendido, acredita-se que elas desempenham um papel de atração de polinizadores (CADDICK et al., 2000).

A utilização de análises microscópicas de órgãos vegetativos e/ou reprodutivos tem contribuído significativamente para elucidação da funcionalidade dos mesmos, bem como, para o conhecimento dos aspectos ecológicos, fisiológicos e filogenéticos das espécies (METCALFE e CHALK, 1979; BENZING, 2000; DICKISON, 2000). Contudo, poucos estudos têm abordado a anatomia de espécies micoheterotróficas (IMHOF, 1997; IMHOF, 1999). Estudos estruturais pioneiros tratam sobre alguns aspectos de *Thismia*, como o estudo de Pfeiffer, (1914) e o de Goebel e Sussenguth, (1924), os quais

descreveram acerca de estrutura floral e desenvolvimento de óvulos e grãos de pólen. Outros estudos realizados com espécies filogeneticamente relacionadas evidenciaram a interação micorrízica a qual essas espécies estão expostas (IMHOF e SAINGE, 2008; IMHOF, 2013; CHEEK et al., 2018). Contudo, para *Thismia*, o conhecimento acerca de sua morfologia interna ainda é incipiente.

Doze espécies de *Thismia* foram identificadas na América do Sul em biomas caracterizados por grande variação climática e alto índice pluviométrico (MAAS et al., 1986; MAAS e MAAS 2010). Contudo, recentemente, a ocorrência de *Thismia panamensis* foi descrita em fragmento florestal localizado no Cerrado Brasileiro. Esse foi o primeiro registro do gênero *Thismia* em biomas savânicos e abriu novas perspectivas para estudos da biodiversidade e biogeografia de plantas do Cerrado, uma vez que, a ocorrência de espécies micoheterotróficas é incomum nesse Bioma.

Diante da complexidade morfológica observada em espécies *Thismia*, a falta de informações a respeito do desenvolvimento e identidade de estruturas dessas espécies, bem como, o registro inédito da ocorrência de *T. panamensis* no Cerrado brasileiro, estudos estruturais e morfofuncionais tornam-se relevantes e necessários para a melhor compreensão e entendimento acerca da biologia dessas espécies e, conseqüentemente, da biodiversidade para o Cerrado brasileiro. Assim, o presente estudo tem como objetivo geral caracterizar a morfoanatomia e o desenvolvimento das estruturas vegetativas e reprodutivas de *T. panamensis*.

## 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O acompanhamento fenológico de *T. panamensis* foi realizado na Mata do Açude (17°51'40.19"S; 51°43'48.12" O), fragmento florestal localizado no município de Jataí, GO, Brasil. Onze áreas (60 x 60 cm) foram demarcadas em diferentes localidades da mata. As áreas foram acompanhadas por três meses ininterruptos, com três visitas semanais. Ao total, 58 botões florais foram identificados e monitorados, permitindo acompanhar as mudanças morfológicas ocorridas ao longo do período reprodutivo.

Amostras florais foram submetidas ao teste com vermelho neutro 0,1% (KIRK, 1970).

Para caracterização estrutural, botões florais, flores e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados e fixados em solução composta por formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% (FAA) por, pelo menos, 48 h. Posteriormente, as amostras fixadas foram desidratadas em série etílica crescente (Sass,

1951) e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica), de acordo com metodologia sugerida pelo fabricante. Após a confecção dos blocos o material foi seccionado nos planos transversal e longitudinal (5µm de espessura) em micrótomo rotativo semiautomático (Leica RM 2235) com utilização de navalhas de aço descartáveis de baixo perfil. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully 1981) e as lâminas montadas em Permount®.

Algumas secções foram submetidas a testes histoquímicos. Para detecção de lignina foi realizado o teste com floroglucinol (JOHANSEN, 1940), além deste o teste com lugol foi feito para investigação de presença de amido no sistema subterrâneo (JOHANSEN, 1940). Para detecção de proteínas totais o teste com Xilidine Ponceau também foi realizado (O' BRIEN E MCCULLY, 1981).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus CX 41 e as imagens foram registradas pela câmera SC30 Olympus acoplada ao sistema óptico no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAV) da Universidade Federal de Goiás. O software de captura de imagens utilizado foi o AnalySys 1.5.

Para caracterização micromorfológica, as amostras fixadas foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona, secas ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha), dissecadas sob lupa binocular, montadas em suporte metálico com fita dupla-face e metalizadas com ouro coloidal (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435-VP, Cambridge, Inglaterra) com câmera digital. Parte das amostras de botão floral, flores e frutos secos ao ponto crítico foram examinados em microtomografo (Skyscan 1275, Bruker), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, SP, Brasil.

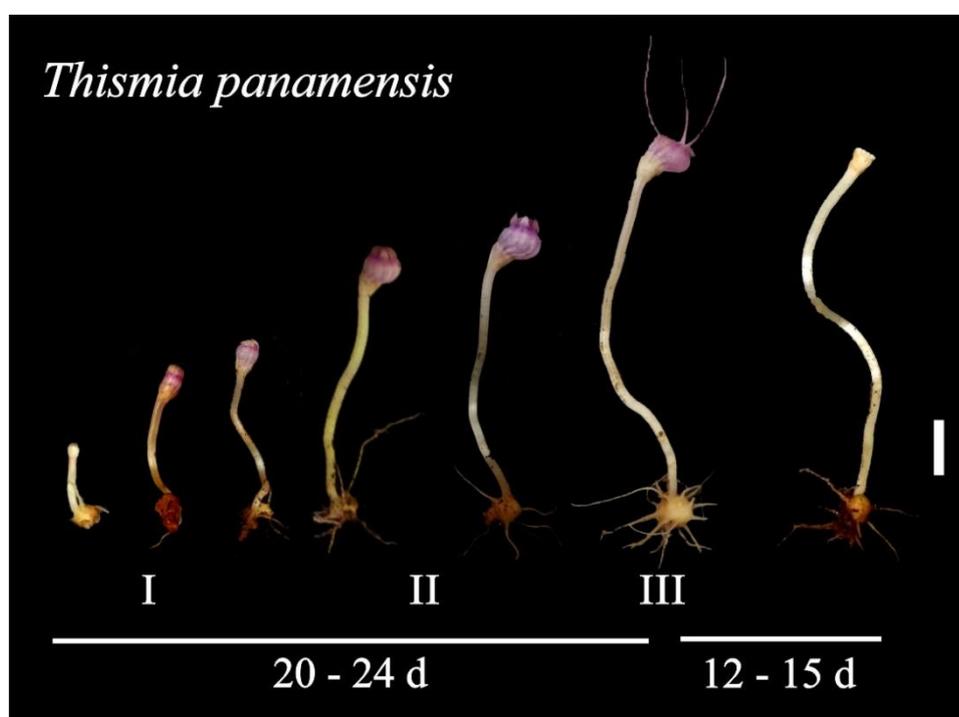
### **1.3 RESULTADOS**

#### **Fenologia**

*Thimia panamensis* foi encontrada na serapilheira do fragmento florestal sendo observada em período reprodutivo somente na época de chuvas da região que, ocorre no trimestre de Janeiro a Março.

As flores de *T. panamensis* são, solitárias, zigomorfas, de coloração púrpura, e apresentam seis tépalas, sendo que três destas terminam em lacínios filiformes. O período de pré-antese durou cerca de 20 a 24 dias (Fig. 1) e durante este, diferentes estádios de desenvolvimento foram definidos com base em algumas diferenças morfológicas marcantes que foram observadas, e descritas. *Estádio I*- Botões florais actinomorfos -

Botões florais apresentavam simetria radial e coloração esbranquiçada; *Estádio II*- Aquisição de zigomorfia – Aumento de volume lateral do perianto adquirindo simetria bilateral e coloração púrpura; *Estádio III*- Formação da estrutura campanulada do perianto e exposição dos apêndices filiformes (Figura 1). O período de duração de cada um dos estádios foi variado. O período para que o botão após emergência adquirisse coloração púrpura foi em torno de cinco dias. Para aquisição de zigomorfia levou um período de quatro a cinco dias e para que os apêndices fossem expostos e a flor entrasse em antese foram necessários mais seis dias, aproximadamente. Os estádios descritos não apresentaram correlação aparente com o tamanho dos pedúnculos florais que apresentou grande variação em todos os estádios descritos (dados não mostrados).



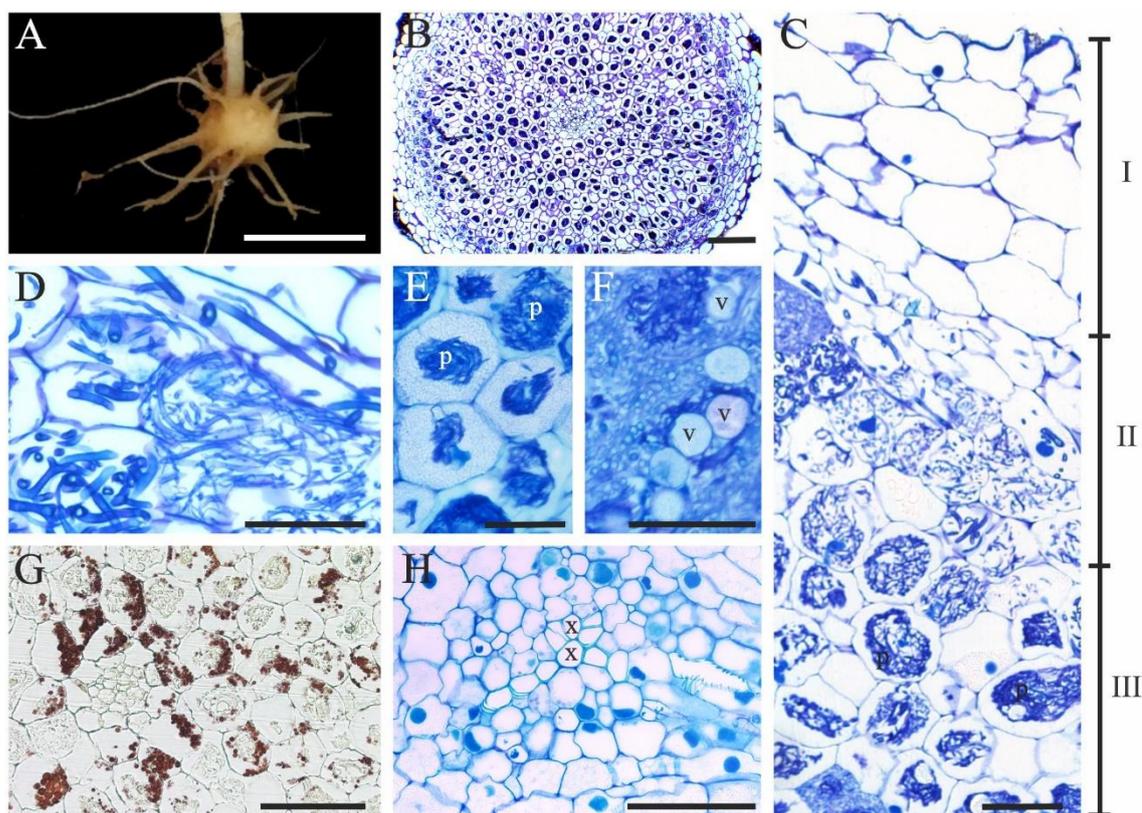
**Figura 1:** Desenvolvimento reprodutivo de *T. panamensis*. (I) - Botão floral actinomorfo (II) - Aquisição de zigomorfia, (III) - Antese Barra: 0,5 mm

Após a antese, as flores permaneceram abertas por cerca de quinze dias, havendo posteriormente a queda do perigônio. Posteriormente, ocorreu o processo de maturação do fruto, com a exposição das sementes. A forma do fruto maduro se assemelhava a uma taça (Figura 1) contendo numerosas sementes.

### **Caracterização morfoanatômica dos órgãos subterrâneos de *T. panamensis***

O sistema subterrâneo de *T. panamensis* consistiu de duas porções. Uma porção tuberosa proeminente e inúmeras raízes laterais filiformes de comprimento variado, constituindo a maior parte do sistema subterrâneo (Figura 2 A). A porção tuberosa era revestida por uma epiderme uniestratificada, cuja as células apresentaram paredes delgadas (Figura 2 B). O córtex era composto de 18 a 20 camadas de células parenquimáticas volumosas e vacuolizadas. Hifas fúngicas foram observadas no interior da maioria das células corticais (Figura 2 B). Contudo, as hifas apresentaram um padrão diferenciado de distribuição. Nas camadas subepidérmicas da porção tuberosa do sistema subterrâneo de *T. panamensis* a colonização de fungos micorrízicos foi menor (Figura 2 C). Na região mediana, hifas intactas e individualizadas foram nitidamente observadas (Figura 2 C, D). Na região interna do córtex, estruturas fúngicas enoveladas, denominadas aqui, de pelotons foram observadas ocupando grande parte do volume celular (Figura 2 C, E). Essas estruturas apresentaram aspecto uniforme não sendo possível distinguir as hifas. Em algumas regiões do córtex, os pelotons adjacentes se mostraram conectados por uma rede de hifas fúngicas (Figura 2 E). Além disso, estruturas vesiculares também foram observadas no interior das células nessa região do tubérculo (Figura 2 F).

Por meio de teste histoquímico com lugol foi possível observar que algumas das células corticais apresentaram-se repletas de amido. Interessantemente, pelotons foram observados, predominantemente, nas células que apresentavam amido (Figura 2G). Testes com floroglucinol e Xilidine Ponceau também foram realizados. Contudo, nenhuma estrutura apresentou reação positiva indicando ausência de lignina, a exceção do xilema, e proteínas, respectivamente, no sistema subterrâneo de *T. panamensis*. A vascularização foi evidente na região central da porção tuberosa do sistema radicular, sendo observado a diferenciação precoce de pólos de protoxilema exarco, confirmando a natureza radicular da estrutura (Figura 2H).

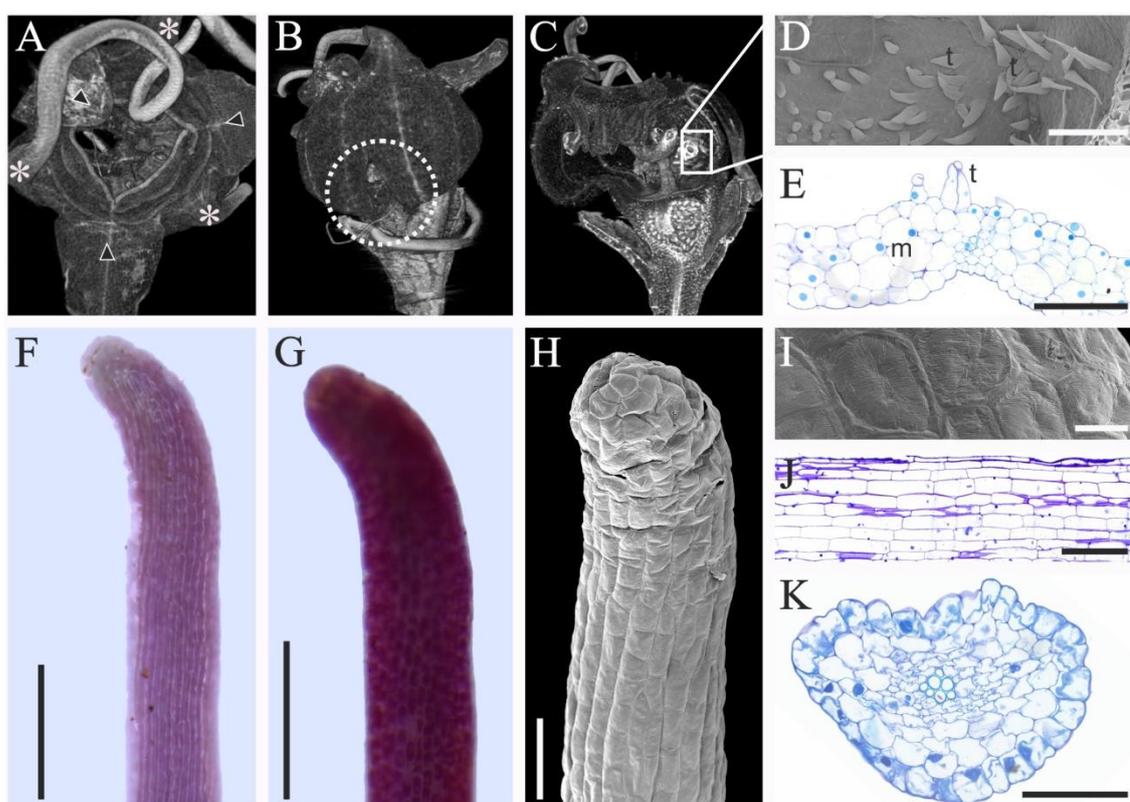


**Figura 2.** Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Thismia panamensis*. **A** Morfologia evidenciando a região tuberosa e raízes filiformes. **B** Secção transversal evidenciando a estrutura anatomicamente. **C** Secção demonstrando padrões de distribuição de hifas I. Região subepidérmica com pouca colonização micorrízica II. Região mediana apresentando hifas fúngicas intactas III. Região interna do córtex com estruturas fúngicas enoveladas também denominadas pélotons (p). **D- F** Estruturas fúngicas apresentadas. Hifas intactas em destaque (D) Pelotons de hifas (E) e vesículas (F). **G** Grãos de amido evidentes em células que apresentam hifas degradadas. **H** Vascularização demonstrando diferenciação xilemática, xilema (x). Barras = A 1 cm; B, G, H 200  $\mu$ m; C,D, E, F 50  $\mu$ m.

### Caracterização morfoanatômica dos órgãos reprodutivos de *T. panamensis*

*Tubo floral* – O tubo floral de *T. panamensis* exibiu 6 tépalas sendo 3 menores, com formato triangular e três maiores apresentando apêndices longos e filiformes (Figura 3 A). Em vista frontal, na face gibosa da flor, observou-se a presença de fenda (Figura 3 B). Em secção longitudinal, tricomas foram observados na face dorsal do tubo floral (Figura 3 C-D). Os tricomas eram do tipo tector e unisseriados (Figura 3 E). As tépalas apresentaram epiderme abaxial e adaxial uniestratificada. O mesofilo é constituído por 3 - 4 camadas de parênquima homogêneo, composto por células irregulares, sem espaços intercelulares. A vascularização é reduzida apresentando feixes de pequeno calibre ao longo de todo mesofilo (Figura 3 E).

Os apêndices filiformes não apresentaram nenhuma estrutura micromorfológica diferenciada (Figura 3F-K). Eram compostos por células epidérmicas, retangulares e não sendo notada nenhuma estrutura glandular (Figura 3H, I). Mas, por meio do teste histoquímico (vermelho neutro), foi possível notar a coloração avermelhada de toda estrutura floral (Figura 3G). Histologicamente, possuíam epiderme uniestratificada, com uma cutícula espessa, 6 - 7 camadas de tecido parenquimatoso e uma vascularização central constituída basicamente por vasos xilemáticos agrupados (Figura 3J, K). Imagens de microscopia de luz evidenciaram células epidérmicas com um conteúdo denso, demonstrando uma possível reserva nessas células (Figura 3K).

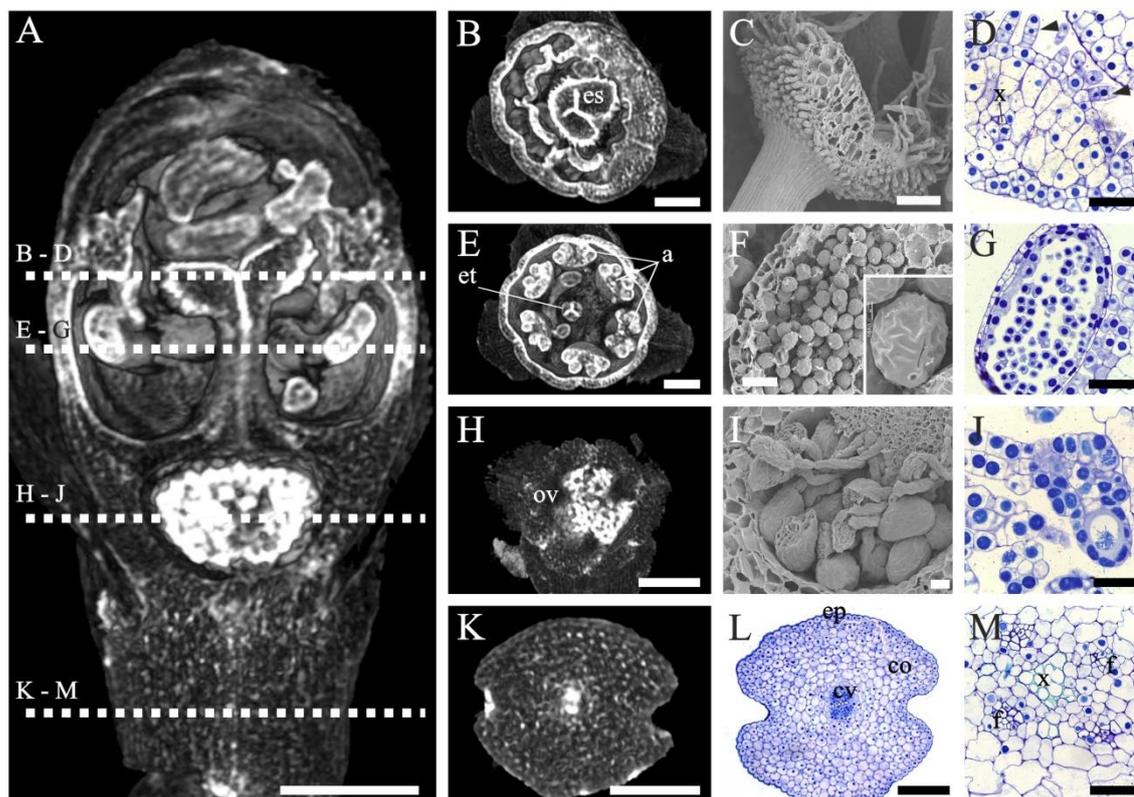


**Figura 3.** Morfoanatomia das tépalas de *Thismia panamensis*. **A** Tépalas menores com formato triangular (pontas de seta) e tépalas maiores com apêndices longos e filiformes (\*). **B** Fenda no tubo floral. **C-E** Tricomas tectores (t) dispostos no interior da flor. Mesofilo (m). **F** Visão geral da morfologia do apêndice. **G** Coloração positiva com vermelho neutro 0,1 %. **H-I** Micromorfologia. Visão geral (H), Detalhe das células epidérmicas do apêndice (I). **J-K** Microscopia de luz. Secção longitudinal (J) e secção transversal (K). Barras = D 500  $\mu\text{m}$ ; E 250  $\mu\text{m}$ ; F, G, J, K 100  $\mu\text{m}$ ; H 50  $\mu\text{m}$ ; I 20  $\mu\text{m}$ .

*Estigma* – Secções longitudinais do botão floral evidenciaram que o estigma se encontra em nível acima das anteras (Figura 4 A). O estigma era curto, globoso, trilobado e ocupava posição central no botão floral (Figura 4 A, B). Os lobos eram constituídos por papilas unisseriadas e multicelulares (Figura 4 C, D), células parenquimáticas volumosas e tecido vascular reduzido (Figura 4 D).

*Androceu* - O androceu era composto por seis estames (Figura 4E). A análise anatômica revelou que anteras jovens em botões florais mostraram-se tetraesporangiadas e apresentaram duas tecas (Figura 4F, G). A epiderme das anteras era unisseriada e o mesofilo composto por células parenquimáticas. Aparentemente eram três estratos parietais caracterizando uma antera do tipo reduzido a qual é constituída pela epiderme, endotécio e tapete (Figura 4G). Os grãos de pólen eram numerosos e apresentaram um poro sendo classificados como monoporados. Além disso, estes apresentaram exina com uma ornamentação do tipo estriada (Figura 4F).

*Gineceu* - O gineceu era tricapelar a apresentava inúmeros óvulos anátropos (Figura 4H - J). O ovário é do tipo ínfero, ovóide composto por 5 - 6 camadas de células (Figura 4H, J). Tanto as células da epiderme quanto do mesofilo apresentaram paredes finas, não sendo observado espessamento diferencial ao longo do desenvolvimento dos frutos.



**Figura 4.** Morfoanatomia da estrutura do botão floral de *Thismia panamensis*. **A-D** Estrutura geral evidenciando na parte superior a região estigmática, transversalmente (B), em microscopia eletrônica de varredura (C), e em microscopia de luz demonstrando as papilas estigmáticas (pontas de seta) e vascularização xilema (x) (D). **E-G** Na região mediana o androceu foi demonstrado, em secção transversal, com seis estames tetraesporangiados ao redor da região estigmática. Estigma (et), androceu (a) (E). Inúmeros grãos de pólen (F). Grãos de pólen em desenvolvimento (G). **H-J** Região inferior do botão floral, demonstrando ovário e óvulos em desenvolvimento **K-M** Pedúnculo floral. Visão transversal. Epiderme (ep). Córtex (co). cilindro vascular (cv) (K-L). Sistema vascular com vasos xilemáticos centralizados (x) e células de floema em torno (f). (M). Barras = A 1 mm; B, E, H, K, L 500  $\mu\text{m}$ ; C 200  $\mu\text{m}$ ; D, G, I, M 100  $\mu\text{m}$ ; F, J 50  $\mu\text{m}$ .

*Pedúnculo Floral* - *Thismia panamensis* apresentou pedúnculo floral ereto, simples, não ramificado esbranquiçado e delgado com aproximadamente 3 centímetros de altura. Em secção transversal, o pedúnculo floral apresentou formato cilíndrico com duas reentrâncias laterais (Figura 4K, L). A epiderme era uniestratificada, composta por células pequenas, isodiamétricas e apresentavam núcleo evidente. A cutícula era espessa (Figura 4L). A região cortical apresentava de 9 a 10 camadas de tecido parenquimático. As células parenquimáticas eram volumosas e apresentaram formatos variados. Pequenos espaços intercelulares também podem ser observados. Não exibiu nenhum tipo de

conteúdo intracelular, sendo o tecido caracterizado como um parênquima de preenchimento (Figura 4K, L). O sistema vascular era único e central, sendo composto por xilema na região interna e quatro pólos de floema em torno do xilema (Figura 4M).

#### 1.4 DISCUSSÃO

Embora avanços tenham sido obtidos quanto à compreensão da distribuição e posicionamento taxonômico e filogenético de espécies de *Thismia*, pouco se conhece acerca da identidade estrutural e funcional dessas espécies. Para *T. panamensis* aspectos fenológicos e morfoanatômicos ainda não tinham sido detalhados da forma como foi neste estudo. Os estudos anteriores se restringiram ao tratamento taxonômico (JONKER, 1938; MAAS, 1986), sendo realizadas algumas suposições sobre a forma de dispersão da espécie alegando que os frutos fossem dispersos por pássaros e as sementes por insetos (CROAT, 1978). O presente trabalho utilizou recursos que permitiram a análise minuciosa de cada órgão, descrevendo os tecidos constituintes e os detalhes de cada parte da planta em diferentes fases do desenvolvimento. Além disso as observações feitas em campo das alterações ocorridas à medida que a espécie foi crescendo foi importante, pois permitiu o registro dessas mudanças que ainda não tinham sido detalhadas anteriormente.

Espécies da família Thismiaceae têm o seu período reprodutivo associado de forma direta a épocas chuvosas (SUJANAPAL et al., 2017; THOROGOOD, 2019), ou seja, o florescimento e frutificação só ocorrem no período de chuvas intensas nos locais onde ocorrem esses táxons. Isso é algo comum em espécies micoheterotróficas e aclorofiladas (NAGY et al., 2018) e pode estar diretamente associado ao seu modo dispersivo, sendo que estudos afirmam que espécies *Thismia* são ombrohidrocóricas, ou seja, têm as sementes dispersas via gotas de chuvas (MAR E SAUNDERS, 2015). Portanto, o controle do processo de floração e frutificação destas espécies está associado a questões ambientais, nesse caso a precipitação. Os fatores que de fato determinam esse processo e essa resposta ao meio, ainda não são compreendidos e mais estudos devem ser feitos afim de entender essa relação.

A descrição da parte subterrânea para o gênero *Thismia* de regiões neotropicais foi feita, e essa foi denominada como um tubérculo globoso e ovóide o qual apresenta raízes exógenas. Maas (1986), também afirmou que para algumas espécies *Thismia* é possível observar raízes cilíndricas, no entanto os órgãos subterrâneos para espécies do gênero podem ser dos mais variados possíveis, já que foram descritas raízes coralóides, rizomas curtos e também bulbos (IMHOF, 2013).

Imhof, (2013) denominou a porção tuberosa de *T. panamensis* como tubérculo, porém não mostrou em seu estudo a estrutura anatômica do sistema subterrâneo da espécie. Tubérculos podem apresentar origem caulinar ou radicular (APEZZATO, 2015), e a partir dos dados anatômicos aqui obtidos, foi possível evidenciar que trata-se de uma estrutura radicular, devido à disposição dos tecidos vasculares que ocupavam a porção central do órgão, característico de raiz. Portanto assumimos que trata - se de um tubérculo radicular.

Na região do córtex interno, onde se formam os pélotons de hifas, foi possível notar a presença de grãos de amido, já nas células epidérmicas estes não foram observados. O amido é tido como o principal carboidrato de armazenamento de plantas heterotróficas, nas orquídeas por exemplo, há o registro de grandes quantidades de amido no sistema subterrâneo (LEAKE, 1994). Estudos abordam que o amido pode ser usado como fonte de energia para simbiose de micorrizas arbusculares (GUTJAHR et al., 2011).

Portanto, a hipótese aqui apresentada é que a presença de amido na região cortical do sistema subterrâneo em *T. panamensis*, pode estar associada à absorção de carboidratos pelo fungo micorrízico. Em um estudo sobre uma orquídea micoheterotrófica, notaram que nas células do parênquima cortical onde a colonização fúngica era numerosa, os grãos de amido eram esparsos (DOMÍNGUEZ e SÉRSIC, 2004). Para *Thismia panamensis* aparentemente em células que não há a colonização fúngica há uma maior quantidade de amido, já nas células colonizadas nota-se uma redução na quantidade destes grãos, portanto pode sim haver uma correlação entre a quantidade de amido e a colonização fúngica.

Para orquídeas micoheterotróficas, por meio de estudos moleculares, foi comprovado que existe de fato uma simbiose na relação micorrízica, ao contrário do que se pensava anteriormente, sendo que tanto o fungo quanto a planta se beneficiam na relação (YEH et al., 2019).

Esses novos estudos sobre a relação micorrízica dessas espécies micoheterotróficas totais trazem novas abordagens, discordando então das hipóteses anteriores de que essas plantas não forneciam nenhum tipo de nutriente a seus parceiros. No entanto, outros estudos são necessários a fim de esclarecer se de fato o amido encontrado no sistema subterrâneo de micoheterotróficas é absorvido pelas hifas, funcionando como uma espécie de recompensa ao fungo pelos benefícios tragos por meio destes para essas plantas.

Quanto à interação micorrízica, Leake, (1994) defendeu que a interação característica do gênero *Thismia* era do tipo micorriza vesicular arbuscular. Imhof et al., (2013) traz que estruturalmente as micorrizas de *Thismia spp.* têm características típicas de micorrizas arbusculares do tipo *Paris*, e os resultados obtidos através deste estudo com *T. panamensis*, corroboram com estes dados, pois demonstraram uma relação micorrizica em que as hifas fúngicas enovelam-se no interior das células. Essas hifas enoveladas encontradas assemelham-se muito a pelotons encontrados no interior das células de protocormios de orquídeas, por isso essas estruturas foram aqui denominadas, pelotons. Além disso, foi possível notar estruturas arredondadas no interior de algumas células na região parenquimatosa do tubérculo, as quais foram denominadas vesículas.

A abundância de micélio de fungo na região subterrânea é algo que as espécies micoheterotróficas têm em comum, já que as mesmas dependem destes para sobreviverem (GOEBEL, 1924; IMHOF, 2009; SISTI, 2018). As hifas de fungos podem apresentarem-se degradadas e não degradadas. A colonização fúngica de *Thismia spp.* tem sido investigada em grande detalhe e distintas morfologias fúngicas são observadas em compartimentos diferentes de tecido (IMHOF et al., 2013). No caso da espécie em questão, por exemplo, nas regiões periféricas do tubérculo foram notadas hifas intactas, já nas regiões mais centrais foi possível observar pelotons de hifas degradadas.

Quanto à forma como ocorre a transferência de nutrientes do solo para a planta ainda não existe nada comprovado sobre, mas acredita-se que os nutrientes acumulados nas hifas podem ser liberados na célula hospedeira após lise (Peterson et al., 2004).

Alguns trabalhos utilizaram técnicas moleculares para identificar quais fungos interagem com espécies do gênero *Thismia*, inclusive uma alta especificidade para com estes parceiros fúngicos tem sido identificada como resultado destes estudos (IMHOF et al., 2013; GOMES et al., 2016).

A vascularização descrita para outras espécies do gênero, como *Thismia clandestina* F. Muell. e *Thismia versteegi* J.J.Sm. (PFEIFER, 1914), é reduzida, de modo que poucos elementos de vaso (xilema) são observados nos cortes. Essa característica foi evidente nas secções feitas de toda a planta, ou seja, nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *T. panamensis*, e isso é reflexo das condições habitacionais da mesma, já que a planta é encontrada em ambientes úmidos.

Em *Thismia americana*, uma das poucas espécies estudadas anatomicamente, foi encontrada uma massa de células com paredes espessas além das células xilemáticas na haste ou pedúnculo floral, estas foram descritas como células de condução similar as

células do floema (PFEIFFER, 1914). Nessa espécie e em outras espécies *Thismia*, quando se compara o xilema em relação ao floema, este último é consideravelmente reduzido.

Quanto a anatomia floral, semelhanças anatômicas foram observadas em relação às descrições feitas para outras espécies do gênero. Em *T. americana*, Maas, (1986) descreveu a região do gineceu abordando que o estilete dessas espécies é curto e que a região estigmática na parte superior é repleta de pelos pluricelulares longos. Para *Thismia luetzelburgii* essas longas papilas estigmáticas também foram descritas (GOEBEL e SUSSENGUTH, 1924). Nas descrições anatômicas de *T. panamensis* feitas no presente estudo isso também foi evidente. Um diferencial encontrado para *T. panamensis* foi a descrição de tricomas na parte interna do perianto o que não foi descrito para outras espécies estudadas do gênero *Thismia*. Estes tricomas podem estar associados de forma direta ao sistema de polinização, servindo para captura de polinizadores a fim de dificultar a saída destes do tubo floral e conseqüentemente efetivar o processo de polinização.

A captura de insetos a fim de garantir a polinização é um dos mecanismos mais elaborados da interação inseto-planta e já foi registrado em outras espécies (OELSCHLÄGEL et al., 2009). A fim de confirmar se estes tricomas estão envolvidos com captura, são necessários mais estudos que visem a observação deste processo. Os apêndices filiformes, como são descritos atualmente (GUILHERME et al., 2016), também são denominados como tépalas internas por alguns autores (MAAS et al., 1986; SHING MAR e SAUNDERS, 2015). O presente trabalho tratou a estrutura como lacínio, sendo este um segmento estreito ou filiforme da tépala. Fora sugerido que essas estruturas descritas para o gênero poderiam ter influência na atração de polinizadores, devido à presença de alguma estrutura glandular, como por exemplo, osmóforos (VOGEL, 1962).

Para algumas espécies *Thismia*, houve o registro da presença de estruturas glandulares, como por exemplo nectários na base do perianto (MAAS et al., 1986). Para *T. panamensis* a partir dos dados anatômicos obtidos notou-se nos lacínios, células epidérmicas com um conteúdo celular denso, além disso, o teste com vermelho neutro foi positivo, destacando a possível presença de células com atividade secretora. Porém esses dados não são suficientes para afirmar que de fato existem estruturas secretoras em flores de *T. panamensis*. Estudos ainda são necessários para evidenciar se estes lacínios estão, de fato, envolvidos com a atração de polinizadores, como sugerido na literatura.

A partir de dados anatômicos foi possível elucidar a identidade e inferir quanto a funcionalidade dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Thismia panamensis*.

Acreditamos que os resultados aqui obtidos contribuirão para a melhor compreensão da biologia floral de *Thismia panamensis*.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEZZATO, B.G. Morfologia de sistemas subterrâneos de plantas. Belo Horizonte: 3 i Editora, 2015.p. 70.

CADDICK, L. R.; RUDALL, P. J.; WILKIN, P. (2000). Floral morphology and development in Dioscoreales. *Feddes Repertorium*, V.111. Jg., n. 3-4, S. pp.189-230.

CHANTANAORRAPINT, S., SUDDEE, S. (2018) *Thismia thaithongiana* (Dioscoreaceae: Thismieae), a new species of mycoheterotroph from an unusual habitat. *Phytotaxa* 333:287–292. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.333.2.14>

COOPER, W.E. (2017) *Thismia hawkesii* W.E.Cooper and *T. lanternatus* W.E.Cooper (Thismiaceae), two new fairy lantern species from the Wet Tropics Bioregion, Queensland, Australia. *Austrobaileya* 10:130–138

CROAT, T.B. (1978). Flora of Barro Colorado Island. Stanford, CA: Stanford University Press. pp.943.

DANČÁK, M. M.; HRONEŠ, M.; SOCHOR, L.; KOBRLOVÁ, R.; HÉDL, Z.; HRÁZSKÝ, A.VILDOMCOVÁ, et al., (2013). A new species of *Thismia* (Thismiaceae) from Brunei Darussalam, Borneo. *Phytotaxa* 125: pp. 33–39.

DANČÁK, M., HRONEŠ, M., SOCHOR, M., & SOCHOROVÁ, Z. (2018). *Thismia kelabitiana* (Thismiaceae), a new unique Fairy Lantern from Borneo potentially threatened by commercial logging. *PloS one*, 13(10), e0203443.

EVERT, F. R. (2007). Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the plant body – Their Structure, Function, and Development. 3 rd ed. United States of America: Wiley interscience.

GOEBEL, K., SUSSENGUTH, K. (1924). Beitrage zur Kenntnis der sudamerikanischen-Burmanniaceen. *Flora*, 117, pp. 55-90.

GUILHERME, G.A.F.; COELHO, P.C.; SMIDT, C.E.; GOMES, C.D.; SOUZA, F.L. (2016). *Thismia panamensis*: first record of Thismiaceae for the Brazilian Cerrado in Goias state *Check List* 12-1877.

GUTJAHR, C., NOVERO, M., WELHAM, T., WANG, T., & BONFANTE, P. (2011). Root starch accumulation in response to arbuscular mycorrhizal colonization differs among *Lotus japonicus* starch mutants. *Planta*, 234(3), 639.

HRONEŠ M (2016) Genus *Thismia* Griff. (Thismiaceae) in Asia and Australasia with focus on the Malesian floristic region. Palacky University, Olomouc

HUNT, C. A., STEENBEEKE, G., & MERCKX, V. (2014) *Thismia megalongensis* (Thismiaceae), a new species of *Thismia* from New South Wales. *Telopea*, 16, 165-174.

IMHOF, S., e SAINGE, M. N. (2008). Ontogeny of the mycoheterotrophic species *Afrothismia hydra* (Burmanniaceae). *Botanical journal of the Linnean Society*, 157(1), 31-36.

IMHOF, S. (2009). Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas—three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification?. *Mycorrhiza*, 19(6), 357-363.

IMHOF, Stephan et al. (2013) Morfologia Subterrânea e Estruturas Micorrizas. Em: Mycoheterotrophy . Springer, Nova Iorque, NY. p. 157-214.

JIA, SHUZHENG et al. (2017). Comunidades fúngicas associadas a raiz em três espécies de Pyroleae e sua partilha de micobiontes com árvores circundantes em florestas de coníferas subalpinas no Monte Fuji, Japão. *Mycorrhiza* , v. 27, n. 8, p. 733-745.

JONKER, F.P.(1938). *A monograph of the Burmanniaceae*. Mededenlingen Botanisch Museum en Herbarium. Rijks University. Utrecht 51: 1–279.

KUMAR, P.; GALE, S.W.; LI, J.H.; BOUAMANIVONG, S. E.; FISCHER, G. A. (2017). *Thismia nigricoronata*, uma nova espécie de Burmanniaceae (Thismieae, Dioscoreales) de Vang Vieng, província de Vientiane, Laos, e uma chave para a classificação subgenérica. *Phytotaxa* , v. 319, n.3, pp. 225-240.

LEAKE, J. R. (1994). The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, v. 127, n. 2, pp. 171-216.

MERCKX, V.; FREUDENSTEIN, J. V. (2010). Evolution of mycoheterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. *New Phytologist*, 185(3), 605-609.

MERCKX V.S.F.T. (2012). *Mycoheterotrophy. The biology of plants living on fungi*. New York, NY, USA: Springer.

NERI-LUNA, C., VILLARREAL-RUIZ, L. Simbiosis micorrícica: un análisis de su relevante función ecosistémica y en la provisión de servicios ambientales. (2012). In book: *Interacciones Ecológicas*, Edition: 1st, Chapter: 3, Publisher: Universidad de Guadalajara, Editors: Huerta Martínez FM and LP Castro Félix (Compiladores, pp.37-61

NURALIEV, M. S.; BEER, A. S.; KUZNETSOV, A. N.; KUZNETSOVA, S.P. (2014). *Thismia mucronata* (Thismiaceae), a new species from southern Vietnam. *Phytotaxa* v. 167, n.3, p. 245-255. doi: 10.11646/phytotaxa.167.3.3.

PFEIFFER, N. E. (1914). Morphology of *Thismia americana*. *Botanical gazette*, 57(2), 122-135.

SHING MAR S E SAUNDERS M.K. (2015). *Thismia hongkongensis* (Thismiaceae): a new mycoheterotrophic species from Hong Kong, China, with observations on floral visitors and seed dispersal. *PhytoKeys* 46:21–33.

SISTI, S. L. (2018). Caracterização de fungos endofíticos, germinação e desenvolvimento do protocormo de *Pogoniopsis schenckii* Cogn. (Orchidaceae: Vanilloideae). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) apresentada a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

SOCHOR, M., SUKRI, R.S., METALI, F., DANČÁK, M. (2017) *Thismia inconspicua* (Thismiaceae), a new mycoheterotrophic species from Borneo. *Phytotaxa* 295:263–270. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.295.3.7>

STONE, B. C. (1980). Rediscovery of *Thismia clavigera* (Becc.) F. v. M.(Burmanniaceae). *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, v.26 n. 2, pp.419-425.

SUETSUGU, K., TSUKAYA, H., TAGANE, S., SUDDEE, S., RUEANGRUEA, S., YAHARA, T. (2017) *Thismia brunneomitroides* (Thismiaceae), a new mycoheterotrophic species from southern Thailand. *Phytotaxa* 314:103–109. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.314.1.9>

SUETSUGU, K., TSUKAYA, H., TAGANE, S. et al (2018) Flora of Bokor National Park VII: *Thismia bokorensis* (Burmanniaceae), a new species representing a new generic record. *Phytotaxa* 334:65–69. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.334.1.10>

SUJANAPAL, P., ROBI, A.J., DANTAS, K.J., SUMOD, M., MERCKX, V.S.F.T. (2017) *Thismia* (Thismiaceae): the first record of the mycoheterotrophic genus to the Flora of India with a new species revealing the phytogeographical significance of Western Ghats. *Blumea* 62:97–102. <https://doi.org/10.3767/blumea.2017.62.2.04>

TOBE, H., TAKAHASHI, H. (2009). Embryology of Petrosavia (Petrosaviaceae, Petrosaviales): evidence for the distinctness of the family from other monocots. *Journal of plant research*, v.122, n. 6, pp. 597.

TSUKAYA, H., SUETSUGU, K., SULEIMAN, M. (2017) *Thismia bryndonii* (Thismiaceae), a new species from Maliau Basin, Sabah, Borneo. *Phytotaxa* 312:135–138. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.312.1.13>

TSUKAYA, H. (2018). How leaves of mycoheterotrophic plants evolved—from the view point of a developmental biologist. *New Phytologist*, v.217 n.(4), pp.1401-1406.

YEH, C.M., CHUNG, K., LIANG, C.K., e TSAI, W.C. (2019). Novos insights sobre a relação simbiótica entre orquídeas e fungos. *Ciências Aplicadas* , 9 (3), 585.

## CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a revista Flora – Journal - Elsevier)

### **Aspectos embriológicos da espécie *Thismia panamensis* (STANDL.) Jonker, uma lanterna de fada descrita para o Cerrado brasileiro**

#### **RESUMO**

Tratamentos taxonômicos e filogenéticos tem sido aplicados a espécies de *Thismia* a fim de estabelecer as possíveis relações inter- e intrataxa. Porém, pouco se conhece acerca da biologia reprodutiva e embriologia dessas espécies. O presente estudo objetivou caracterizar os processos embriológicos como a micro e megasporogênese e micro e megagametogênese e o desenvolvimento embrionário de *Thismia panamensis*. Botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento, flores e frutos foram coletados e submetidos às técnicas usuais de microscopia. As diferentes fases do desenvolvimento esporofítico e gametofítico foram registradas, tanto para o androceu, quanto para gineceu, de modo que algumas etapas das divisões celulares foram relatadas resultando na formação dos esporos e gametas. O processo de desenvolvimento embrionário foi evidenciado de modo que foi possível acompanhar o embrião desde estágios iniciais com a degradação de células parietais do saco embrionário até a formação da semente propriamente dita com a lignificação dos tegumentos. O embrião de *T. panamensis* apresentou-se indiferenciado com pouquíssimas células e o endosperma apresentou células aparentemente cheias de conteúdo. Acreditamos que os resultados aqui obtidos contribuirão para um melhor entendimento sobre a Biologia reprodutiva em *Thismiaceae*.

Palavras chave: Embriogênese, Megaesporogênese, Megagametogênese, Microesporogênese, Microgametogênese

## ABSTRACT

Taxonomic and phylogenetic treatments have been applied to species of *Thismia* in order to establish possible inter- and intrataxa relations. However, little is known about the reproductive biology and embryology of these species. The present study aimed to characterize the embryological processes such as micro and megaesporogenesis and micro and megagametogenesis and the embryonic development of *Thismia panamensis*. Floral buds at different stages of development, flowers and fruits were collected and submitted to the usual techniques of microscopy. The different phases of sporophytic and gametophytic development were recorded for both the androceutical and gyneum so that some stages of the cell divisions were reported resulting in the formation of spores and gametes. The process of embryonic development was evidenced so that it was possible to follow the embryo from the initial stages with the degradation of parietal cells of the embryo sac until the formation of the seed itself with the lignification of the integuments. The *T. panamensis* embryo was undifferentiated with very few cells and the endosperm presented cells apparently full of contents. We believe that the results obtained here will contribute to a better understanding of reproductive biology in Thismiaceae.

KEY- WORDS: Embryogenesis, Megaesporogenesis, Megagametogenesis, Microsporogenesis, Microgametogenesis.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Thismiaceae compreende cerca de 70 espécies distribuídas em cinco gêneros, sendo eles; *Afrothismia* (Engl.) Schltr, *Haplothismia* Airy Shaw, *Oxygyne* Schltr., *Tiputinia* e *Thismia* Griff. P.E. Berry & C. L. Woodw. O último é considerado o maior gênero contendo o maior número de espécies da família (KUMAR et al., 2017).

As espécies de Thismiaceae são micoheterotróficas por dependerem de fungos micorrízicos para sobreviverem (GOMES et al., 2016). Além disso, essas espécies estão localizadas na serapilheira e apresentam crescimento vegetativo reduzido se comparado a maioria das angiospermas (SOCHOR et al., 2018).

Algumas espécies de *Thismia* foram reportadas no passado. Porém, na última década, grande número de novas espécies do gênero tem sido catalogadas, ou mesmo, redescobertas (CHANTANAORRAPINT, 2012; MANCINELLI et al., 2012; TSUKAYA e OKADA, 2012; VOLOSCHEN et al., 2013; NURALIEV et al., 2014; MAR e SAUNDERS, 2015; GUILHERME et al., 2016; CHANTANAORRAPINT e SUDDEE, 2018; HRONEŠ et al., 2018). Assim, tratamentos taxonômicos e filogenéticos tem sido aplicados a esse grupo de plantas a fim de estabelecer as possíveis relações inter - e intrataxa. Porém, pouco se conhece acerca da biologia reprodutiva e embriologia dessas espécies.

Estudos estruturais prévios evidenciaram aspectos do desenvolvimento de óvulos de *Thismia americana* caracterizando-os como anátropos e bitegmentados (PFEIFFER, 1914). Posteriormente, Maas et al. (1986) descreveu características do desenvolvimento do saco embrionário de algumas espécies *Thismia* caracterizando os embriões como pequenos e indiferenciados. O estudo de Rudall e Morley (1992) reportou os processos da megasporogênese e megagametogênese de três espécies asiáticas: *Thismia alba* Holttum ex Jonker, *Thismia episcopalis* F. Muell. e *Thismia javanica* J.J. Sm. caracterizando os sacos embrionários dessas espécies como tenuinucelados, do tipo polygonum, apresentando embriões reduzidos com um suspensor curto e um desenvolvimento de endosperma do tipo helobial. Ainda assim, pode-se afirmar que as informações sobre as características embriológicas de *Thismiaceae* são limitadas, pois se restringem a poucas espécies levando em consideração a quantidade de espécies já descritas para o gênero.

Araújo (2015) defende que além de caracteres morfológicos, a embriologia das espécies pode diferir entre os grupos vegetais, podendo assim auxiliar no posicionamento sistemático de alguns grupos. Com isso aspectos do desenvolvimento de estruturas reprodutivas são utilizados com frequência para entender as relações taxonômicas entre grupos superiores (TOBE e TAKAHASHI, 2009).

*Thismia panamensis*, é uma espécie que foi recentemente descrita para a região do Cerrado brasileiro, sendo este o primeiro registro da espécie para o Brasil e da família para o Cerrado (GUILHERME et al., 2016). Os estudos estruturais existentes que abordam características de *T. panamensis*, trazem poucas informações de sua biologia reprodutiva (MAAS et al., 1986). Além disso, existem suposições de ocorrência de poliembrião na espécie, mas o desenvolvimento embriológico da mesma não foi acompanhado (MEDEIROS et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo descrever os processos de micro e megasporogênese e gametogênese de *T. panamensis*. Acreditamos que os resultados obtidos poderão contribuir para o maior entendimento da biologia reprodutiva da espécie e de todo gênero *Thismia*.

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta e microscopia de luz**

As amostras de *T. panamensis* foram coletadas em fragmento florestal localizado no município de Jataí, GO, Brasil, conhecido como Mata do Açude (17°51'40.19"S; 51°43'48.12" O). Foram coletados botões florais em estágio inicial de desenvolvimento, que ainda apresentavam simetria radial e coloração esbranquiçada (BI); botões florais tardios que já apresentavam simetria bilateral e coloração púrpura (BII), além de flores em antese e frutos.

O material foi fixado em campo em solução de formaldeído, ácido acético e álcool etílico (FAA) por pelo menos 48h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em resina do tipo metacrilato (Historesin, Leica), de acordo com a metodologia sugerida pelo fabricante. O material foi seccionado em micrótomo rotativo semiautomático (Leica RM 2235) com utilização de navalhas de aço descartáveis de baixo perfil, obtendo cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura.

As lâminas foram coradas com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully 1981) e montadas em Permount®. Após montadas, as lâminas foram observadas no microscópio óptico Olympus CX 41 e as imagens foram registradas pela câmera SC30 Olympus acoplada ao sistema óptico. O software de captura de imagens utilizado foi o AnalySys 1.5.

### **MEV- Microscopia eletrônica de varredura**

Para caracterização micromorfológica, as amostras fixadas foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona, secas ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha), dissecadas sob lupa binocular, montadas em suporte metálico com fita dupla-face e metalizadas com ouro coloidal (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital (LEO 435-VP, Cambridge, Inglaterra).

## 2.3 RESULTADOS

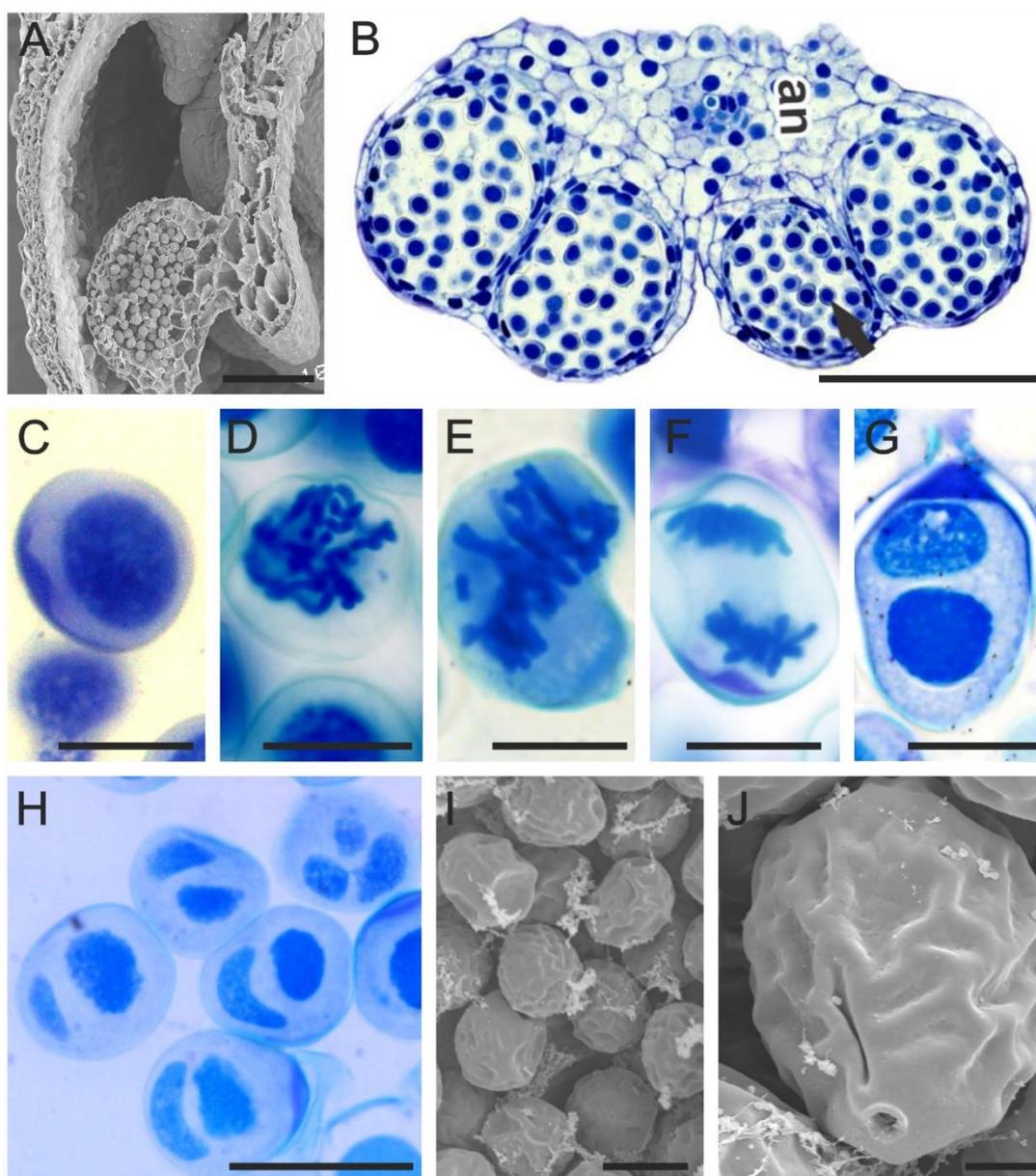
### Microsporogênese e microgametogênese

Nos estágios iniciais de desenvolvimento (BI e BII) as anteras (Figura 1A) eram constituídas por quatro microsporângios, sendo estes envoltos por três camadas, caracterizando uma formação parietal do tipo reduzida, contendo apenas epiderme, endotécio e tapete (Figura 1B). Abaixo das células do tapete uma massa de células de citoplasma denso e com grandes núcleos foi observada, essas foram denominadas como células mãe de micrósporos (Figura 1B e C). As células mãe de micrósporos passaram por etapas de divisão celular, sendo que neste estudo foram evidentes apenas as divisões de Meiose 1 (Fig.1D-G), sendo elas: prófase (Figura 1D), metáfase (Figura 1E), anáfase (Figura 1F), e telófase (Figura 1G), caracterizando uma das etapas da microesporogênese. O grão de pólen maduro apresentou uma célula germinativa e outra vegetativa. (Figura 1H). Em botões prestes a se abrirem observou-se espessamento parietal tanto no endotécio, quanto na epiderme (dados não mostrados).

Na antese, apenas a epiderme e o endotécio foram observados revestindo as anteras. Por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível caracterizar um grão de pólen monoporado e com uma exina ornamentada do tipo estriada (Figura 1I e J).

### Megaesporogênese e megagametogênese

O ovário de *T. panamensis* foi caracterizado como ínfero, sendo este tricarpelar, possuindo um estilete curto e uma região estigmática repleta de tricomas. Além disso, este apresentou inúmeros óvulos (Figura 2).



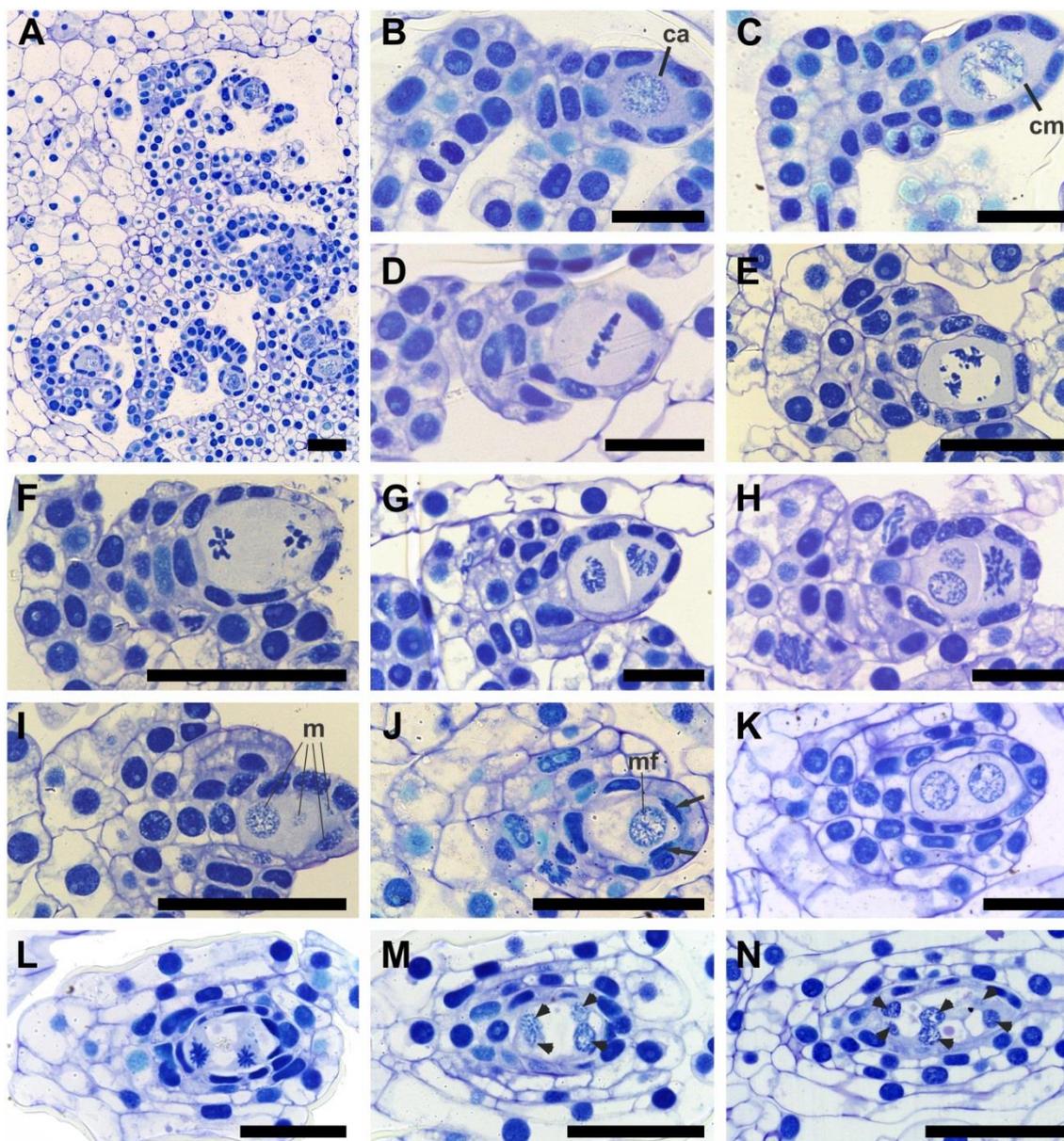
**Figura 1.** Microesporogênese e microgametogênese de *Thismia panamensis*. **A** Imagem de microscopia eletrônica de varredura evidenciando parte da antera com grãos de pólen. **B** Microscopia de luz mostrando a estrutura da antera tetraesporangiada, antera (an) seta: indicando células mãe de micrósporos **C** célula mãe de micrósporos. **D-G** Meiose I. Prófase (D), Metáfase (E), anáfase (F), Telófase (G). **H** Microscopia de luz do grão de pólen maduro. **I** Grãos de pólen em microscopia eletrônica de varredura. **J** Grão de pólen com exina estriada e um poro evidentes. Barras = A 200  $\mu\text{m}$  ;B 250  $\mu\text{m}$ ; C -H 50  $\mu\text{m}$ ; I- 20  $\mu\text{m}$  J-50  $\mu\text{m}$

Nas fases iniciais do desenvolvimento dos óvulos foi possível observar a diferenciação dos tegumentos. Os óvulos de *T. panamensis* eram bitegmentados e cada tegumento era composto por duas camadas celulares, sendo que, o tegumento externo cresceu mais do que o tegumento interno (Figura 2 D-N). Os óvulos foram definidos como anátropos e tenuinucelados.

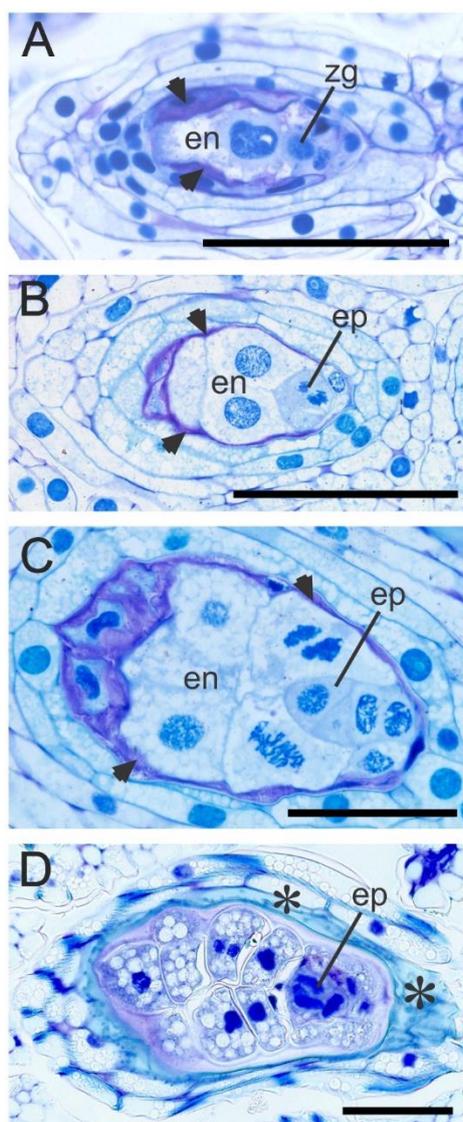
Nos botões de menor tamanho, denominados neste trabalho como BI e BII, foi possível observar na região do ovário células apresentando um citoplasma denso, envoltas por uma epiderme nucelar. Essas células se diferenciaram das demais pelo seu tamanho e por seu conteúdo denso, sendo essa denominada, célula arquesporial, a qual se diferencia em célula mãe de megásporos (Figura 2 A e B). Em um estágio posterior, foi possível observar uma díade, ou seja, dois núcleos, resultantes de uma primeira divisão celular (Figura 2 G) e a segunda divisão resultando numa tétrade, de modo que foram observados quatro núcleos (Figura 2 I).

Na fase de pré-antese, divisões mitóticas sucessivas (Figura 2 K-M) resultaram na formação de um saco embrionário já maduro do tipo Polygonum, constituído por 3 antípodas, uma célula média binucleada na qual ocorre a fusão dos núcleos, uma oosfera, e duas sinérgides (Figura 2N).

Em secções transversais da região do ovário da espécie foi possível notar a presença de tubos polínicos germinando. Portanto, após a formação do saco embrionário maduro, o embrião de *T. panamenis*, começou seu processo de desenvolvimento marcado por divisões celulares, este apresentou poucas células com conteúdo citoplasmático denso e núcleos evidentes. A célula média teve seus núcleos fundidos e a degeneração das células parietais do saco embrionário foi evidente. (Figura 3 A-C). Durante o processo de formação da semente foi possível notar o tegumento externo diferenciando-se em testa e o tegumento interno diferenciando-se em tégmen, sendo ambos lignificados (Figura 3 D).



**Figura 2.** Megasporogênese e megagametogênese de *Thismia panamensis*. **A** Visão geral do ovário. **B** Célula arquesporial (ca). **C** célula mãe de megásporos (cm). **D-F** Meiose I. Metáfase (**D**), anáfase (**E**) e telófase (**F**). **G-I** Meiose II. Note a presença da tétrede de megásporos (m) (**I**). **J** Megásporo funcional (mf) e megásporos degenerados (setas). **K** Primeira divisão mitótica do megásporo funcional. **L-M** Segunda divisão mitótica – Formação do saco embrionário tetranucleado (cabeça de seta). **N** Saco embrionário maduro. Barras = A 100 $\mu$ m; B-N 50  $\mu$ m.



**Figura 3.** Desenvolvimento embrionário em *Thismia panamensis*. **A** Visão geral do saco embrionário demonstrando o zigoto (zg), e o início do processo de desenvolvimento do endosperma (en) com a fusão dos núcleos centrais. **B** Endosperma (en) constituído de duas células e embrião propriamente dito (ep) com uma divisão celular evidente. **C** Embrião propriamente dito (ep) e endosperma (en) com mais células, indicando um estágio mais avançado de desenvolvimento. **D** Embrião propriamente dito (ep) em um estágio tardio apresentando uma lignificação dos tegumentos (\*). Setas indicam a degradação das células parietais do saco embrionário. BARRAS = A-D 200  $\mu$ m.

## 2.4 DISCUSSÃO

A determinação dos eventos embriológicos pode auxiliar na compreensão da biologia reprodutiva das espécies, bem como fornecer caracteres taxonomicamente úteis para o entendimento da sistemática e filogenia das espécies vegetais. No presente

reportamos, em detalhe, os aspectos estruturais da micro- e megaesporogênese e micro- e megagametoênese de *T. panamensis*.

São poucos os estudos que abordam sobre aspectos embriológicos em *Thismiaceae* (PFEIFFER 1914; MAAS 1986; e RUDALL 1992), apesar da quantidade de espécies que têm sido descritas para a família nos últimos anos.

Para *Thismiaceae* a microesporogênese é caracterizada como sendo do tipo sucessiva (RUBSAMEN, 1986). Porém, diversos tipos de grãos de pólen tem sido descritos para esse grupo de plantas como; monoporados (CADDICK et al. 1998), inaperturados (CRANWELL, 1953), ulcerados (RUBSAMEN, 1986), e diporados (KAMER, 1998), evidenciando a diversidade de tipos de grãos de pólen na família. Os grãos de pólen de *T. panamensis* foram descritos anteriormente apresentando uma exina do tipo lisa, contendo apenas um poro (monoporado), e tendo formato ovoide ou plano convexo, sendo este binucleado (RUBSAMEN, 1986). Porém, o presente estudo mostrou que a exina do grão de pólen da espécie apresentou reticulações ou estrias. Essas características mostraram-se semelhantes às descritas para *Thismia americana*, que também apresentaram grãos de pólen com estrutura oval, monoporadado e com exina estriada (PFEIFER, 1914; MAAS et al., 1986).

*Thismia americana* também apresentou óvulos tenuinucelados, bitegmentados e anátropos, como descrito aqui, para *T. panamensis*. Porém, divergências estruturais na formação de megásporos são reportadas para o gênero. Em *T. episcopalis*, por exemplo, foram observadas tríades em que a célula micropilar não se dividiu, e tétrades de megásporos em forma de T (MAAS et al., 1986; RUDALL, 1992). Em *T. panamensis* foram observadas poucas tétrades e as que foram observadas eram dispostas em forma de T.

De acordo com Rudall (1992, apud BERNARD e ERNEST, 1909), para o gênero *Thismia* existem registros de apomixia, especificamente para a espécie *Thismia javanica*, e este é o único registro de apomixia para o gênero até agora. No presente estudo não descartamos a hipótese de que haja apomixia, já que eventos meióticos foram observados em um baixo número de amostras. Portanto, futuros estudos são necessários para comprovar a ocorrência de apomixia em *T. panamensis*.

Por mais que ocorra apomixia isso não isenta a espécie de apresentar reprodução sexuada, já que em estudos feitos recentemente, bem como nas observações em campo para realização deste trabalho, foram observadas moscas visitando flores de *Thismia panamensis*. Além disso, experimentos mostraram que a polinização pode ocorrer via

gotas de chuva (MEDEIROS, 2019). No presente estudo também reportamos a presença de tubos polínicos germinados no ovário. Isso demonstra uma gama de possibilidades de propagação da espécie. Contudo, mais estudos são necessários a fim de compreender se é comum em espécies do gênero *Thismia* essas várias alternativas reprodutivas, e entender quais são os fatores que favorecem a ocorrência de cada uma dessas formas de reprodução.

Os pequenos embriões de plantas micoheterotróficas não são diferenciados em epicótilo, hipocótilo e regiões cotiledonares, sendo portanto reduzidos a pouquíssimas células (LEAKE, 1994). Em *Thismia*, os embriões descritos até hoje são caracterizados por apresentarem-se indiferenciados, multicelulares, porém contendo poucas células devido ao seu tamanho reduzido. Em *Thismieae*, antes considerada uma tribo de *Burmanniaceae*, o desenvolvimento do endosperma helobial foi descrito como bicelular (MAAS, 1986).

O desenvolvimento embrionário de *T. panamensis* descrito no presente estudo se assemelha ao de outras espécies micoheterotróficas, como por exemplo, espécies de orquídeas, as quais foram mais estudadas a esse respeito, de modo que, as células se dividem resultando em um embrião reduzido e um endosperma também constituído de pouquíssimas células, sendo que para algumas espécies o endosperma nem se desenvolveu. (LI et al., 2016; MAYER et al., 2011).

As sementes de *T. panamensis* têm suas características morfológicas e anatômicas semelhantes à de outras micoheterotróficas (LEAKE, 1994), como por exemplo, o tamanho reduzido, e a quantidade significativa produzida por fruto. Para outras espécies foi relatada a presença mínima de reservas como proteína, gordura e amido (MAAS, 1986). Análises histoquímicas futuras devem ser realizadas a fim de reconhecer a natureza química observada no conteúdo celular das células embrionárias de *Thismia panamensis*. Leake (1994), defendeu que essas características estão relacionadas de forma direta a otimização do sucesso reprodutivo dessas espécies.

Em resumo, no presente estudo caracterizou-se os processos de formação de grãos de pólen, saco embrionário e da semente de *T. panamensis*. Considerando a escassez de informações acerca da biologia do gênero, acreditamos que os resultados obtidos aqui poderão contribuir para a maior compreensão da biologia reprodutiva do gênero, bem como, auxiliar em estudos taxonômicos de *Thismiaceae*.

## 2.5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos as professoras Juliana Mayer e Ana Paula, bem como suas respectivas instituições por toda contribuição com o desenvolvimento deste.

## 2.6 FINANCIAMENTO

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de fomento no setor público, comercial ou setores sem fins lucrativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, N. A. V. Embriologia , apomixia e poliembrionia em *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae – Mimosoideae). (2015). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal apresentada a Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia .

CADDICK, L. R., FURNESS, C. A., STOBART, K. L., e RUDALL, P. J. (1998). Microsporogenesis and pollen morphology in Dioscoreales and allied taxa. *Grana*, 37(6), p. 321-336.

CAETANO, A. P. D. S. Contribuição da embriologia na sistemática e na elucidação da apomixia em Melastomataceae Juss. (2014). Tese (Doutorado em Biologia Vegetal apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2014.

CHANTANAORRAPINT, S. (2012). *Thismia filiformis*, uma nova espécie de Thismiaceae (anteriormente Burmanniaceae) da Tailândia. *Kew Boletim* , 67 (1), 69-73.

CHANTANAORRAPINT, S., & SUDDEE, S. (2018). *Thismia thaithongiana* (Dioscoreaceae: Thismieae), uma nova espécie de mycoheterotroph de um habitat incomum. *Phytotaxa* , 333(2), 287-292.

CRANWELL, L. M. (1953) New Zealand pollen studies. The monocotyledons. A comparative account. *Bull. Auckland Inst.Mus.*3: 1- 91.

De KAMER, H. M. 1998. Burmanniaceae. Flowering Plants · Monocotyledons, p. 154–164. doi:10.1007/978-3-662-03533-7\_21.

GUILHERME, F., GOMES, D., COELHO, C., SMIDT, E., & SOUZA, L. (2016). *Thismia panamensis*: first record of Thismiaceae for the Brazilian Cerrado in Goiás state. *Check List*, 12, 1.

HRONEŠ, M., REJŽEK, M., SOCHOR, M., SVÁTEK, M., KVASNICA, J., EGERTOVÁ, Z., ... & DANČÁK, M. (2018). Two new species of *Thismia* subsect. *Odoardo* (Thismiaceae) from Borneo. *Plant ecology and evolution*, 151(1), 110-118.

HUNT, C. A., STEENBEEKE, G., & MERCKX, V. (2014). *Thismia megalongensis* (Thismiaceae), a new species of *Thismia* from New South Wales. *Telopea*, 16, 165-174.  
JONKER, F.P. 1948. Burmanniaceae. In: Van Steenis CGGJ (ed), Flora Malesiana I, 4: 12–26. Noordhoff, Leiden.

KUMAR, P.; GALE, S.W.; LI, J.H.; BOUAMANIVONG, S. E.; FISCHER, G. A. (2017). *Thismia nigricoronata*, uma nova espécie de Burmanniaceae (Thismieae, Dioscoreales) de Vang Vieng, província de Vientiane, Laos, e uma chave para a classificação subgenérica. *Phytotaxa*, v. 319 (3), p. 225-240.

LI, Y. Y., CHEN, X. M., GUO, S. X., & LEE, Y. I. (2016). Embryology of two mycoheterotrophic orchid species, *Gastrodia elata* and *Gastrodia nantoensis*: ovule and embryo development. *Botanical studies*, 57(1), 18.

MAAS, P. J., MAAS-VAN DE KAMER, H., VAN BENTHEM, J., SNELDERS, H. C. M., e RÜBSAMEN, T. (1986). Burmanniaceae [Monograph 42]. Flora Neotropica, p.1-189.

MANCINELLI, W.S., BLUM, C.T. E SMIDT, E.D.C. (2012). *Thismia prataensis* (Thismiaceae), uma nova espécie da Mata Atlântica Brasileira. *Systematic Botany*, 37 (4), 879-882.

MAR, S. S., & SAUNDERS, R. M. (2015). *Thismia hongkongensis* (Thismiaceae): a new mycoheterotrophic species from Hong Kong, China, with observations on floral visitors and seed dispersal. *PhytoKeys*, (46), 21.

MAYER, J. L. S., CARMELLO-GUERREIRO, S. M., & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. (2011). Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (ORCHIDACEAE). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(6), 601-609.

MEDEIROS, B. O.; MARCONDES, F. A. COELHO, C.P. (2015) Caracterização morfoanatômica da semente de *Thismia panamensis* (STANDL.) JONK. (Thismiaceae). Resumo apresentado no 66º Congresso Nacional de Botânica. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Lucas\\_Brandao3/publication/308148920](https://www.researchgate.net/profile/Lucas_Brandao3/publication/308148920)

MEDEIROS, B. O. (2019) Lanternas de fada (*Thismia* Griff) no cerrado do Brasil central: Biologia reprodutiva sistema de polinização e dispersão de sementes em *Thismia panamensis* (STANDL.) JONKER (Thismiaceae). Dissertação de mestrado UFG Programa de pós graduação em biodiversidade vegetal Disponível em: [https://sigaa.sistemas.ufg.br/sigaa/public/programa/defesas.jsf?lc=pt\\_BR&id=3228](https://sigaa.sistemas.ufg.br/sigaa/public/programa/defesas.jsf?lc=pt_BR&id=3228)

NURALIEV, M. S.; BEER, A. S.; KUZNETSOV, A. N.; KUZNETSOVA, S.P. (2014). *Thismia mucronata* (Thismiaceae), a new species from southern Vietnam. *Phytotaxa* v. 167, n.3, p. 245-255. doi: 10.11646/phytotaxa.167.3.3.

PFEIFFER, N. E. (1914). Morphology of *Thismia americana*. *Botanical gazette*, 57(2), p. 122-135.

RUBSAMEN, T. (1986a). Morphologische, embryologische und systematische Untersuchungen an Burmanniaceae und Corsiaceae (Mit Ausblick auf die Orchidaceae-Apostasioideae). Diss. Bot. 92. Cramer, Berlin. (1986b). Embryology. p. 24-27 in *Flora Neotropica Monograph N. 42. Burmanniaceae*, by P. MAAS, H. MAAS-VAN DE KAMER, J. VAN BENTHAM, H. C. M. SNELDERS & T. RIIBSAMEN. New York *Botanical Garden*.

RUDALL, P., MORLEY, S. (1992). Embryo sac and early post-fertilisation development in *Thismia* (Burmanniaceae). *Kew Bulletin*, p. 625-632.

SOCHOR, M.; HRONEŠ, M.; DANČÁK, M. (2018). New insights into variation, evolution and taxonomy of fairy lanterns (*Thismia*, Thismiaceae) with four new species from Borneo. *Plant Systematics and evolution*, v. 304(5), p. 699-721.

TOBE, H.,; TAKAHASHI, H. (2009). Embryology of *Petrosavia* (Petrosaviaceae, Petrosaviales): evidence for the distinctness of the family from other monocots. *Journal of plant research*, 122(6), 597.

TRAUB, H. P. (1975). Class Liliida of superclass Monocotyidra. *Taxon*, p. 453-460.

TSUKAYA, H., & OKADA, H. (2012). Uma nova espécie de *Thismia* (Thismiaceae) de West Kalimantan, Bornéu. *Botânica Sistemática* , 37 (1), 53-57.

VOLOSCHEN, T.D., ENGELS., M.E., ASSUNÇÃO, PACLE E DE CAMARGO SMIDT, E. (2013). *Thismia vocali* (Thismiaceae), uma descrição aumentada e primeiro registro para o Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* , 36 (4), 309-312.

## CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo descreveu-se de forma detalhada os caracteres anatômicos de órgãos vegetativos e reprodutivos de *Thismia panamensis*, bem como, os processos de micro- e megaespororênese e megagametogênese dessa espécie. Esses resultados constituem informações importantes para a caracterização e entendimento da biologia dessa espécie até pouco tempo desconhecida no Cerrado brasileiro. Além disso, abre novas perspectivas para estudos que visem à compreensão das estruturas aqui descritas.