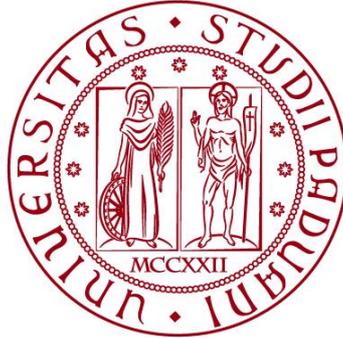


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Biologia riproduttiva del "pino brasiliano" (*Araucaria angustifolia*-Araucariaceae): la crescita del tubetto pollinico e lo sviluppo dello strobilo femminile**

**Tutor: Prof.ssa Barbara Baldan  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Silvia Moschin  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Aurora Baldin**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

## ABSTRACT

Le gimnosperme sono un gruppo di spermatofite che, a differenza delle angiosperme, sono caratterizzate dalla produzione di semi nudi, ovvero non protetti dal carpello. I semi si sviluppano sulle scaglie ovulifere che compongono lo strobilo femminile. Le gimnosperme si suddividono in quattro grandi gruppi: Cicadofite, Conifere, Ginkgofite e Gnetofite. *Araucaria angustifolia*, detta anche “pino brasiliano”, appartiene al gruppo delle conifere. Di questa specie verrà discusso lo sviluppo dell’ovulo all’interno dello strobilo femminile, dalla primavera alla primavera dell’anno successivo, e la crescita del tubetto pollinico per quanto riguarda la controparte maschile. Questo studio utilizza tecniche di microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione, di microtomografia a raggi X e tecniche istochimiche. Sono descritti con particolare attenzione i processi di megasporogenesi e megagametogenesi. Infatti, seppur lo studio delle Araucariaceae sia progredito nel corso degli ultimi anni, mancano ancora molte informazioni circa modalità e tempistiche dei processi di formazione e sviluppo dei gametofiti femminile e maschile, e molte domande sono ancora senza una risposta. Pertanto un’analisi di questi processi può essere utile a comprendere meglio l’affermazione di diversi pattern di sviluppo riproduttivo nelle piante a seme.

## INDICE

1. INTRODUZIONE .....	3
1.1 Morfologia ed ecologia di <i>Araucaria angustifolia</i> .....	3
1.2 Le gimnosperme .....	5
1.3 Lo sviluppo dell'ovulo e la formazione del seme nelle conifere .....	6
2. SCOPO DI QUESTO ELABORATO .....	8
3. MATERIALI E METODI .....	9
3.1 Campionamento del materiale .....	9
3.2 Microscopia ottica.....	9
3.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM) .....	10
3.4 Tomografia micro-computerizzata a raggi X ( $\mu$ CT).....	10
4. RISULTATI .....	12
4.1 Morfologia dello strobilo femminile.....	12
4.2 Lo sviluppo dell'ovulo.....	13
4.3 Lo sviluppo del tubetto pollinico .....	18
5. DISCUSSIONE .....	20
5.1 Lo strobilo femminile .....	20
5.2 Lo sviluppo dell'ovulo.....	20
5.2.1 Megasporogenesi e megagametogenesi .....	22
5.3 La crescita del tubetto pollinico.....	24
6. CONCLUSIONI .....	27
7. BIBLIOGRAFIA .....	28
8. APPENDICE .....	30

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Morfologia ed ecologia di *Araucaria angustifolia*

*Araucaria angustifolia*, conosciuta anche come pino brasiliano, è una conifera sempreverde appartenente alla famiglia delle Araucariaceae.

La sua morfologia è costituita da un tronco rettilineo cilindrico avente un diametro che va da 1 a 2 metri per un'altezza che può arrivare fino ai 50 metri. Quando la pianta è giovane risulta simmetrica, a forma di cono, con i rami che la ricoprono dalla base alla cima con foglie perenni, dure e aghiformi. Avanzando con l'età la chioma si apre andando a formare una sorta di ombrello e sulla maggior parte della lunghezza del fusto dell'albero non si trovano rami, in quanto vengono persi naturalmente (Fig. 1). È una pianta dioica, cioè presenta gli organi riproduttivi maschili e femminili in due piante differenti. Gli amenti maschili sono densi, cilindrici, raggruppati in clusters o solitari e composti da numerosi microsporangi disposti a spirale (Fig. 2). Invece, i coni femminili sono ovoidali, più larghi che lunghi, presentano scaglie legnose strettamente sovrapposte, che cadono quando i semi sono maturi (Fig. 3) (Bittencourt, 2007).



**Figura 1:** Fotografia di esemplari di *Araucaria angustifolia*  
(<https://www.gardenia.net/plant/araucaria-angustifolia>)



**Figura 2:** Un ramo di *Araucaria angustifolia* ricco di coni maschili. Giardino botanico di Mt. Tomah, Australia ([https://www.conifers.org/ar/Araucaria\\_angustifolia.php](https://www.conifers.org/ar/Araucaria_angustifolia.php)).



**Figura 3:** Cono femminile di una giovane pianta di *Araucaria angustifolia* al RHS Garden Wisley, Luglio 2019. Immagine di John Grimshaw (<https://www.treesandshrubsonline.org/articles/araucaria/araucaria-angustifolia/>).

*Araucaria angustifolia* è l'unica gimnosperma nativa della foresta atlantica del Brasile e ha una grande importanza economica, culturale e sociale. Infatti, ha rappresentato la fonte di legname più sfruttata fino agli anni '70, ed è una preziosa sorgente di semi, resina e fibra.

I semi hanno un alto valore nutrizionale e sono consumati sia dall'uomo che dalla fauna selvatica. Il legno degli alberi adulti viene impiegato per la produzione di mobili e in quasi tutti gli altri tipi di applicazioni del legno.

È l'albero dominante della foresta pluviale, dalla subtropicale alla temperata, nel sud-est del Brasile. Si può anche trovare nel nord-est dell'Argentina, nel Paraguay orientale, più precisamente nella provincia di Misiones, e a est dell'Alto Paraná.

Il caratteristico colore verde scuro di *Araucaria angustifolia* gli è valso il soprannome di “bosco nero” e le foreste di araucaria sono spesso indicate come “boschi neri” in contrasto con i “boschi bianchi” o le foreste prive di questa pianta (Bittencourt, 2007).

Originariamente le foreste di *Araucaria angustifolia* ricoprivano un'area pari a 20 milioni di ettari in Brasile; tuttavia, a causa dello sfruttamento umano oggi solo il 2% di tale area permane (Kuhn et al., 2024). Le attuali condizioni della foresta di *Araucaria* in Brasile sono dovute alla mancanza di un piano di gestione che combina fattori ecologici, genetici, sociali ed economici per le foreste native. Infatti, le colture arabili, soprattutto soia e mais, e le piantagioni forestali di specie esotiche sono considerate più redditizie (Bittencourt, 2007).

Questo ha fatto sì che *Araucaria angustifolia* fosse inserita nell'elenco ufficiale delle piante brasiliane a rischio di estinzione, all'interno della categoria CR secondo la IUCN Red List of Threatened Species del 2011.

## 1.2 Le gimnosperme

Le spermatofite sono il gruppo più cospicuo di piante vascolarizzate, caratterizzate dalla presenza dell'ovulo, struttura di grande importanza, dalla quale si sviluppa il seme. Questo gruppo di piante vascolari viene diviso in: gimnosperme e angiosperme. Entrambe sono piante a seme, ma tra loro sono presenti sostanziali differenze sia dal punto di vista vegetativo che riproduttivo.

Quando parliamo di gimnosperme (dal greco *gymnos* che significa “nudo”) ci riferiamo a una serie di spermatofite legnose aventi ovuli (e semi) esposti all'aria, spesso portati da scaglie dette macrosporofilli. Al contrario di queste, le angiosperme hanno l'ovulo racchiuso e protetto da strutture dette carpelli, che vanno a formare l'ovario.

Le gimnosperme sono comparse nel devoniano superiore, cioè circa 360 milioni di anni fa. Oggi le specie attualmente viventi sono poco più di mille e appartengono a circa 83 generi divisi in 12 famiglie che crescono in diverse zone del mondo. Più in

particolare, studi molecolari, suggeriscono che esse rappresentino un gruppo monofiletico che comprende 4 divisioni: cicadee, ginkofite, conifere e gnetofite. (Pasqua et al., 2019).

### **1.3 Lo sviluppo dell'ovulo e la formazione del seme nelle conifere**

Le conifere costituiscono il gruppo più ampio di gimnosperme viventi (Pasqua et al., 2019). Al mondo ne esistono 6 famiglie, 69 generi e circa 620 specie, comprendenti specie legnose perenni, diffuse nelle regioni fredde dell'emisfero boreale, aventi grande importanza ecologica e economica.

I taxa comprendenti tale gruppo detengono strutture riproduttive chiamate coni o strobili. Nella maggior parte delle conifere gli strobili sono unisessuali portati da uno stesso individuo o da individui diversi.

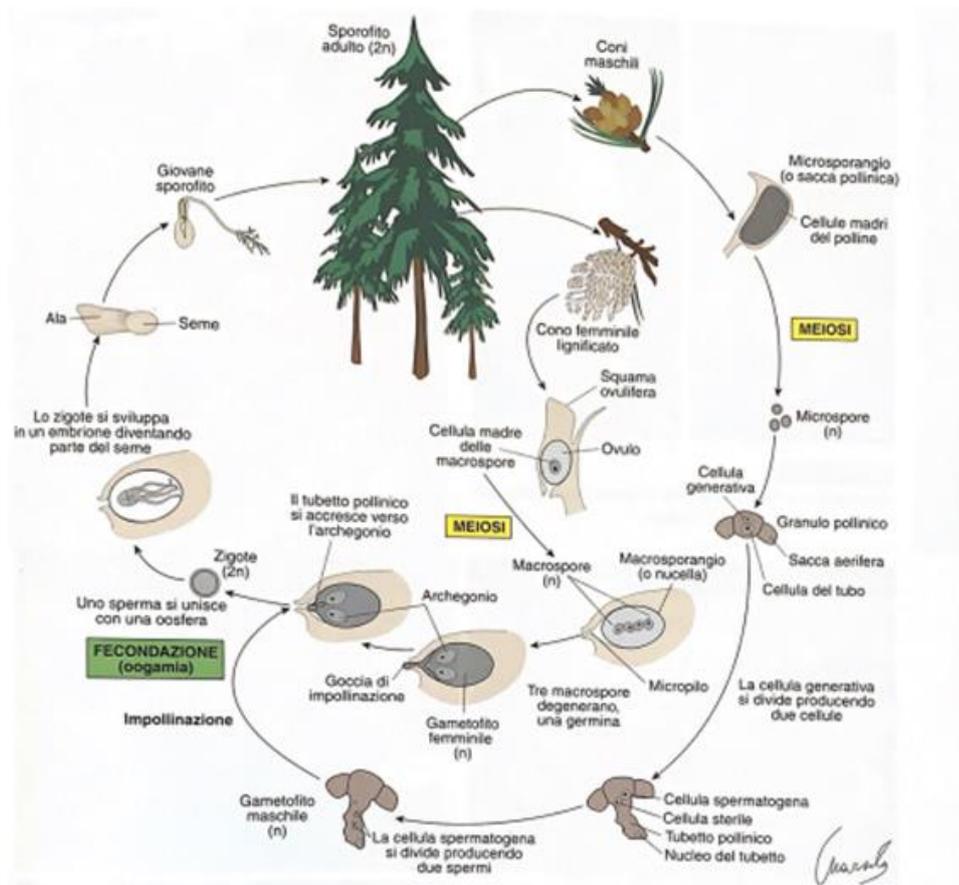
Gli strobili femminili hanno generalmente una forma ovoidale e presentano un asse che porta squame ovulifere, cioè germogli modificati solitamente di tipo legnoso. Al di sotto di ogni squama è presente una brattea copritrice che permette la protezione dell'ovulo. Poiché la forma dello strobilo e delle squame cambia nei diversi taxa di conifere, esso può essere utilizzato come carattere d'identificazione. Gli strobili maschili risultano essere semplici, in posizione ascellare o terminale di rami brevi, costituiti da microsporofilli di forma squamiforme, contenenti i microsporangii (Pasqua et al., 2019).

Queste strutture proteggono ovulo e semi, facilitando l'impollinazione e la dispersione dei semi una volta che questi si sono formati.

Le conifere hanno un ciclo biologico lento in cui l'impollinazione, che avviene prevalentemente per via aerea, e la fecondazione sono due eventi distinti nel tempo. L'impollinazione, che prevede il passaggio dei granuli di polline dalle sacche polliniche agli ovuli, può essere facilitata grazie alla presenza di sacche aerifere che permettono il galleggiamento della goccia di impollinazione, un liquido zuccherino e viscoso rilasciato dal micropilo dell'ovulo nella sua fase ricettiva (Pasqua et al., 2019).

Il polline entra quindi nell'ovulo e generalmente nelle gimnosperme si ha un periodo di coesistenza tra gametofito maschile e femminile. All'interno dell'ovulo, infatti, al momento dell'impollinazione corrisponde la formazione del gametofito femminile. Tale processo avviene dopo che la cellula madre delle megaspore

(MMC) va incontro a meiosi, si vengono a formare quattro megaspore e di queste spesso solo una rimane funzionale (megaspore funzionale). Tale megaspore si va a dividere formando un gametofito femminile cenotitico. Questo gametofito in seguito (il processo può essere molto lungo) cellularizza, e da esso, in prossimità del micropilo, si vengono a sviluppare gli archegoni, contenenti la/e cellula/e uovo. A questo punto si ha il rilascio dei gameti maschili dal tubetto pollinico e la conseguente fecondazione della cellula uovo (Pasqua et al., 2019). Lo zigote diventa embrione, avvolto e protetto dai tegumenti dell'ovulo, costituendo il seme. Dalla fecondazione allo sviluppo completo dell'embrione può trascorrere diverso tempo.



**Figura 4:** Ciclo riproduttivo di una conifera (Pasqua et al., 2019).

## 2. SCOPO DI QUESTO ELABORATO

Sebbene lo studio della biologia riproduttiva delle Araucariaceae sia aumentato significativamente negli ultimi decenni, rimangono ancora molte domande aperte (Kuhn et al., 2024). Lo studio di Burlingame (1914) descrisse il ciclo riproduttivo di *A. angustifolia*; tuttavia, molti aspetti non risultavano chiari, come la struttura del cono femminile, lo sviluppo dell'ovulo e la modalità di crescita del tubetto pollinico nella nucella. Mentre i primi due aspetti furono chiariti nel 2020, studiando l'omologia con il cono femminile di *A. araucana* (Herting & Stutzel, 2020), la modalità di crescita del tubetto pollinico fu descritta nel dettaglio solo in *Agathis* (Owens et al., 1995a) pertanto a causa di mancanza di informazioni a livello di altre specie, la modalità di crescita in *Agathis* fu generalizzata alle Araucariaceae. Per questo è necessario investigare in modo specifico i processi di sviluppo dello strobilo femminile, dell'ontogenesi dell'ovulo e della crescita del tubetto pollinico, focalizzando l'attenzione ai processi di megasporogenesi e megagametogenesi, come affrontato nell'articolo di Kuhn et al. (2024), presentato in questa tesi. Inoltre, questo studio può essere utile al fine di migliorare le tecniche di conservazione di *A. angustifolia*, e la gestione del suo ambiente naturale.

### 3. MATERIALI E METODI

In questa parte dell'elaborato vengono presentati le tecniche e i materiali utilizzati da Kuhn et. al (2024) nel loro studio sulla biologia riproduttiva di *Araucaria angustifolia*.

#### 3.1 Campionamento del materiale

Gli strobili femminili di *A. angustifolia* utilizzati in questo studio sono stati ottenuti da tre differenti piante provenienti da Nova Petropolis City, Rio Grande do Sul, Brasile. La raccolta di questi campioni si è svolta in 18 mesi, da giugno a novembre dell'anno successivo, alle porte dell'inverno.

Dal primo al terzo mese e dal settimo al diciottesimo mese il campionamento è stato fatto mensilmente, mentre dal quarto al sesto mese il campionamento è stato fatto settimanalmente o ogni due settimane.

#### 3.2 Microscopia ottica

La microscopia ottica, detta anche microscopia in campo chiaro, è una tecnica che permette l'osservazione di campioni biologici dotati di colore proprio o proprietà che influenzano la quantità di luce che passa attraverso di essi. Tuttavia, molti campioni mancano di queste caratteristiche e pertanto devono essere preparati e trattati con specifici coloranti (Hardin & Bertoni, 2018).

Nello studio di Kuhn et al. (2024) l'analisi istologica è avvenuta su campioni fissati in una soluzione buffer 0.1 M di sodio fosfato pH 7.2 contenente 1% glutaraldeide e 4% formaldeide, per 72 ore, come descritto da McDowell and Trump (1976). Il materiale è stato quindi lavato con il buffer sodio fosfato 0.1 M e poi disidratato in una serie di soluzioni di etanolo a concentrazione crescente, da 10% etanolo a 100% etanolo. Il materiale è stato poi processato per includerlo nella resina 2 idrossi-metacrilato.

Una volta inclusi, i campioni sono stati tagliati in sezioni aventi uno spessore pari a 2-4  $\mu\text{m}$  utilizzando il microtomo rotativo Zeiss. Le sezioni, poste su dei vetrini, sono state colorate con una soluzione al 0,05 % blu di toluidina O, pH 4,4 (Kuhn et al.,2024). Le microfotografie del materiale sono state acquisite in campo chiaro utilizzando un microscopio Leica DMR e uno stereomicroscopio Leica M165 FC, con AxioCam Fotocamera digitale HRc e AxioVision LE (Carl Zeiss® Meditec AG, Oberkochen, Germania).

Oltre a ciò, utilizzando materiale supplementare, è stata rilevata composizione chimica degli strobili attraverso diversi agenti e test istochimici:

- IKI, per rilevare l'amido;
- Rosso rutenio, per rilevare acidi polisaccaridi e acidi pectici;
- Alcian Blue 8GX, per rilevare mucopolisaccaridi;
- Acido Periodico Schiff-PAS, per rilevare i polisaccaridi totali;
- Calcofluor White per rilevare cellulosa;
- Blu anilina, per rilevare callosio.

### **3.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

Nello studio viene utilizzata poi la microscopia elettronica a scansione, un tipo differente di microscopia elettronica che permette la produzione di immagini da elettroni deviati dalla superficie del campione e non trasmessi attraverso di esso (Hardin & Bertoni, 2018).

Questa tecnica è particolarmente spettacolare per la tridimensionalità che dà alle strutture biologiche, permettendo così lo studio topografico della superficie.

Per questo tipo di microscopia, nello studio di Kuhn et. al (2024) il materiale viene disidratato attraverso una serie di acetoni ed essiccato utilizzando il metodo del punto critico di Gersterberger e Leins (1978) con BALTEC, Attrezzatura CPD 030. I campioni sono stati poi montati su supporti rivestiti in oro, utilizzando un dispositivo di vaporizzazione catodica BAL-TEC SCD 050. L'osservazione e le micrografie elettroniche sono state in seguito eseguite con un microscopio JEOL JSM 6060 sotto 30 Kv.

### **3.4 Tomografia micro-computerizzata a raggi X ( $\mu$ CT)**

La micro-tomografia computerizzata a raggi X (nota anche come micro-tomografia o micro-CT) è una tecnica che produce immagini ad alta risoluzione che possono essere impiegate per generare modelli digitali tridimensionali di campioni.

Questa tecnologia sfrutta i principi della tomografia computerizzata (TC), utilizzata anche dallo scanner TC negli ospedali per esaminare gli organi e le ossa dei pazienti. La differenza è che, servendosi di sorgenti di raggi X finemente focalizzate e ottiche da microscopio, la micro-tomografia ci permette di vedere dettagli

tridimensionali da micron a sub-micron in campioni piccoli come la testa di uno spillo.

Al fine di attuare questa tecnica, per prima cosa Kuhn et. al (2024) hanno fissato il cono femminile in una soluzione buffer 0.1 M di sodio fosfato contenente 1% glutaraldeide e 4% formaldeide, pH 7.2 per 72 ore, come descritto da McDowell and Trump (1976). Il materiale è stato quindi lavato con il buffer sodio fosfato 0,1 M, disidratato in una serie di acetoni ed essiccato utilizzando il metodo del punto critico Gersterberger e Leins (1978) con BAL-TEC, CPD 030.

Per le analisi  $\mu$ CT, il materiale è stato quindi montato in un supporto di plastica e la scansione è stata eseguita con SkyScan 1172 (Bruker-microCT, Kontich, Belgio). Senza applicazione di filtro la tensione della sorgente e l'intensità di corrente erano rispettivamente di 40 kV e 250  $\mu$ A, per un tempo di esposizione di 1700 ms, risultando in 2657fette con dimensione voxel di 2,06  $\mu$ m.

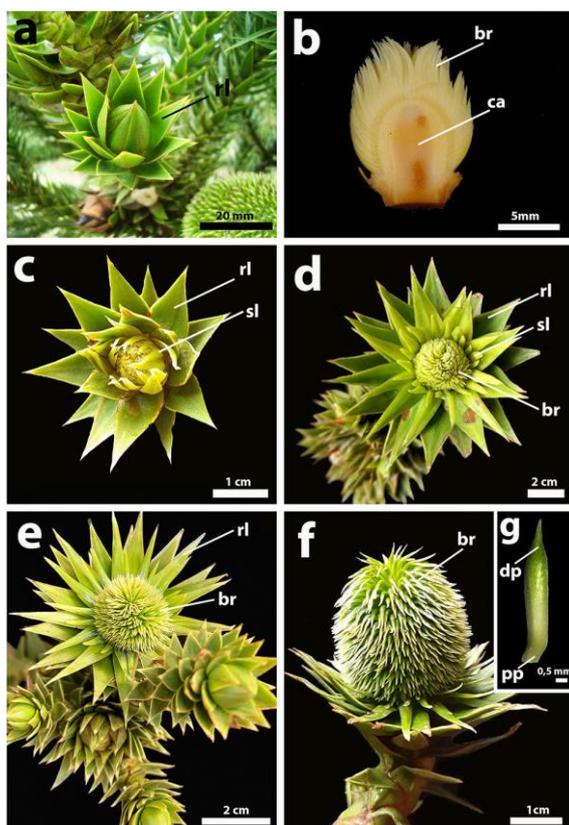
Per eseguire la ricostruzione 3D e il sezionamento virtuale è stato utilizzato FIJI, un software distribuito da ImageJ, dove la segmentazione utilizzata per creare maschere binarie corrisponde a diverse strutture nel cono femminile (Kuhn et al., 2024).

## 4. RISULTATI

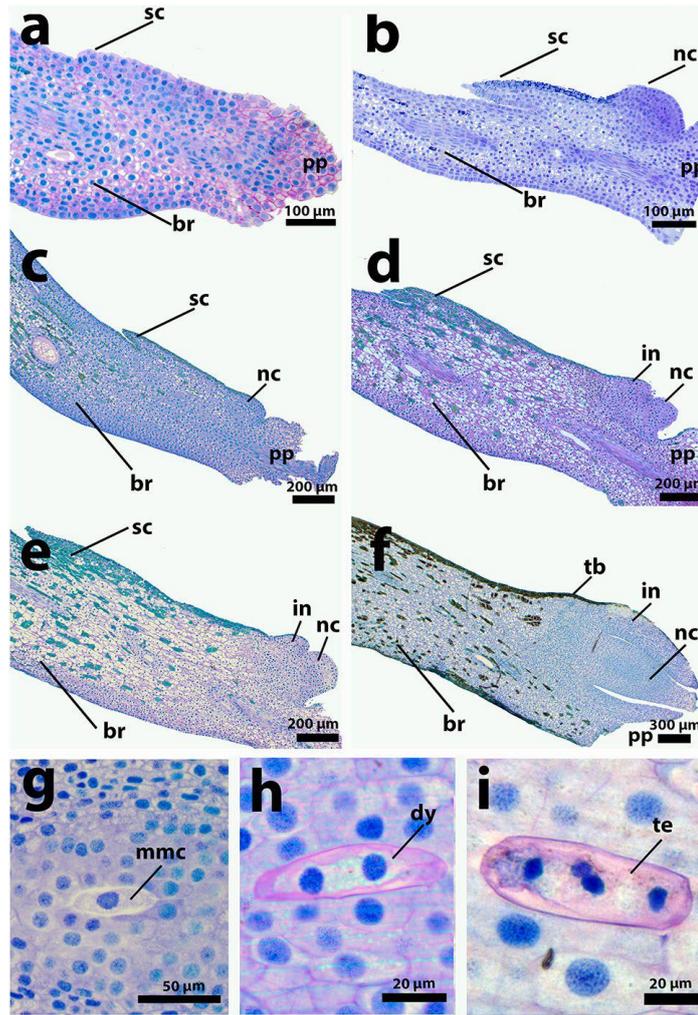
### 4.1 Morfologia dello strobilo femminile

Le analisi morfologiche eseguite da Kuhn et. al (2024) hanno mostrato che lo strobilo femminile si trova nei suoi primi stadi di sviluppo all'inizio dell'inverno, in una posizione plagiotropica rispetto al ramo della pianta (Fig. 5a). Il cono risulta composto dal proprio asse e da brattee disposte elicoidalmente intorno ad esso (Fig. 5b, d). La brattea presenta una "forma a spada" e nessuna porzione di essa risulta essere fotosintetica. In questo momento, il cono risulta essere completamente annidato, coperto da normali foglie.

Alla fine dell'inverno, il cono comincia ad emergere dalle foglie regolari e sottese (Fig. 5c), risultando completamente libero di ricevere i granuli di polline nel periodo di impollinazione, che avviene all'inizio della primavera (Fig. 5d, e). Dalla primavera a quella successiva, il cono continua a crescere e sviluppare la sua struttura, preparandosi per l'evento della fecondazione, che avviene dopo 14 mesi dall'impollinazione (Fig. 5f). Dall'impollinazione in poi, la porzione distale di ciascuna brattea è acuminata e verde, mentre la porzione mediana e la porzione prossimale, dove si sviluppa l'ovulo, rimangono non fotosintetiche (Fig. 5g).



**Figura 5:** Immagine tratta da Kuhn et al., 2024. Stadi di sviluppo del cono femminile di *Araucaria angustifolia*. **a** Le foglie regolari avvolgono il cono nella fase iniziale dello sviluppo. **b** Sezione trasversale del cono nella fase iniziale dello sviluppo, che mostra l'asse del cono e le brattee. **c-e** Fasi dell'esposizione del cono femminile dalle foglie regolari e da quelle sottese. **f** rappresentazione del cono femminile in uno stadio avanzato di sviluppo. **g** visione adassiale della brattea con una porzione distale fotosintetica e una porzione prossimale fertile. **Legenda:** Foglie regolari (rl), asse del cono (ca), brattee (br), foglie sottese (sl), porzione distale del cono femminile (dp), porzione prossimale (pp).



**Figura 6:** Immagine tratta da Kuhn et al., 2024. Sezione longitudinale del cono femminile di *Araucaria angustifolia* e i suoi stadi di sviluppo con microscopia ottica. **a** Formazione della scaglia ovulifera nella porzione prossimale (**pp**) della brattea. **b** Primordio della nucella e **c** allargamento della scaglia ovulifera. **d** Formazione del tegumento. **e, f** Crescita dello strobilo femminile e sviluppo del terzo rigonfiamento (**tb**). **g** Nucella con la cellula madre della megaspore (**mmc**), **h** nucella con la diade, e **i** con tetradi cenocitiche. **Legenda:** brattea (**br**), scaglia ovulifera (**sc**), nucella (**nc**), tegumento (**in**), cellula madre della megaspore (**mmc**), diade (**dy**), porzione prossimale (**pp**), terzo rigonfiamento (**tb**), tetrade (**te**).

#### 4.2 Lo sviluppo dell'ovulo

In questo lavoro è stato osservato che all'inizio della primavera, a livello adassiale e ascellare della brattea dello strobilo femminile, nasce il primordio della scaglia ovulifera (Fig. 6a). In seguito il primordio della nucella emerge nella porzione più prossimale della scaglia, essendo orientata lungo il suo asse longitudinale (Fig. 6b). In questo momento è possibile osservare che la porzione distale della scaglia ovulifera è staccata dalla brattea mentre la sua porzione prossimale è fusa ad essa. Nei giorni successivi la scaglia si sviluppa verso la porzione distale della brattea (Fig. 6c) e il primordio del tegumento si accresce, presentandosi come un leggero

rigonfiamento che evidenzia l'orientamento del micropilo verso l'asse del cono (Fig. 6d). La scaglia ovulifera e l'ovulo continuano così nelle settimane successive a ingrandirsi, aumentando in lunghezza e larghezza (Fig. 6e).

Entro tre settimane dalla formazione del tegumento, la nucella si sviluppa e allunga sporgendo attraverso il micropilo. Appare una terza protuberanza formata da cellule che risultano poste distalmente rispetto al tegumento (Fig. 6f). La MMC si differenzia, presentando una forma allungata e un nucleo centrale (Fig. 6g); si verifica quindi la prima divisione meiotica, che porta alla formazione di una diade con una parete cellulare spessa. Tuttavia, nessuno dei nuclei risulta essere isolato dalla parete cellulare trasversale (Fig. 6h). La diade entra subito nella seconda divisione meiotica producendo una tetrade cenocitica di megaspore, aventi una parete cellulare spessa e pectica, priva di callosio (Fig. 6i). Si ha quindi un ulteriore sviluppo del cono (Fig. 7a), con l'allungamento della nucella, e della megaspore al suo interno, che presenta un citoplasma denso e porta un prominente nucleo vitale (Fig. 7b) e tre nuclei degenerativi, che hanno subito un restringimento nucleare (Fig. 7c). Le cellule della nucella adiacenti alle megaspore appaiono compresse dalla sua crescita. In seguito, la megaspore funzionale inizia a dividersi, presentando inizialmente quattro cospicui nuclei con nucleoli prominenti, due in posizione micropilare e gli altri due in posizione centrale (Fig. 7d e Fig. 7e).

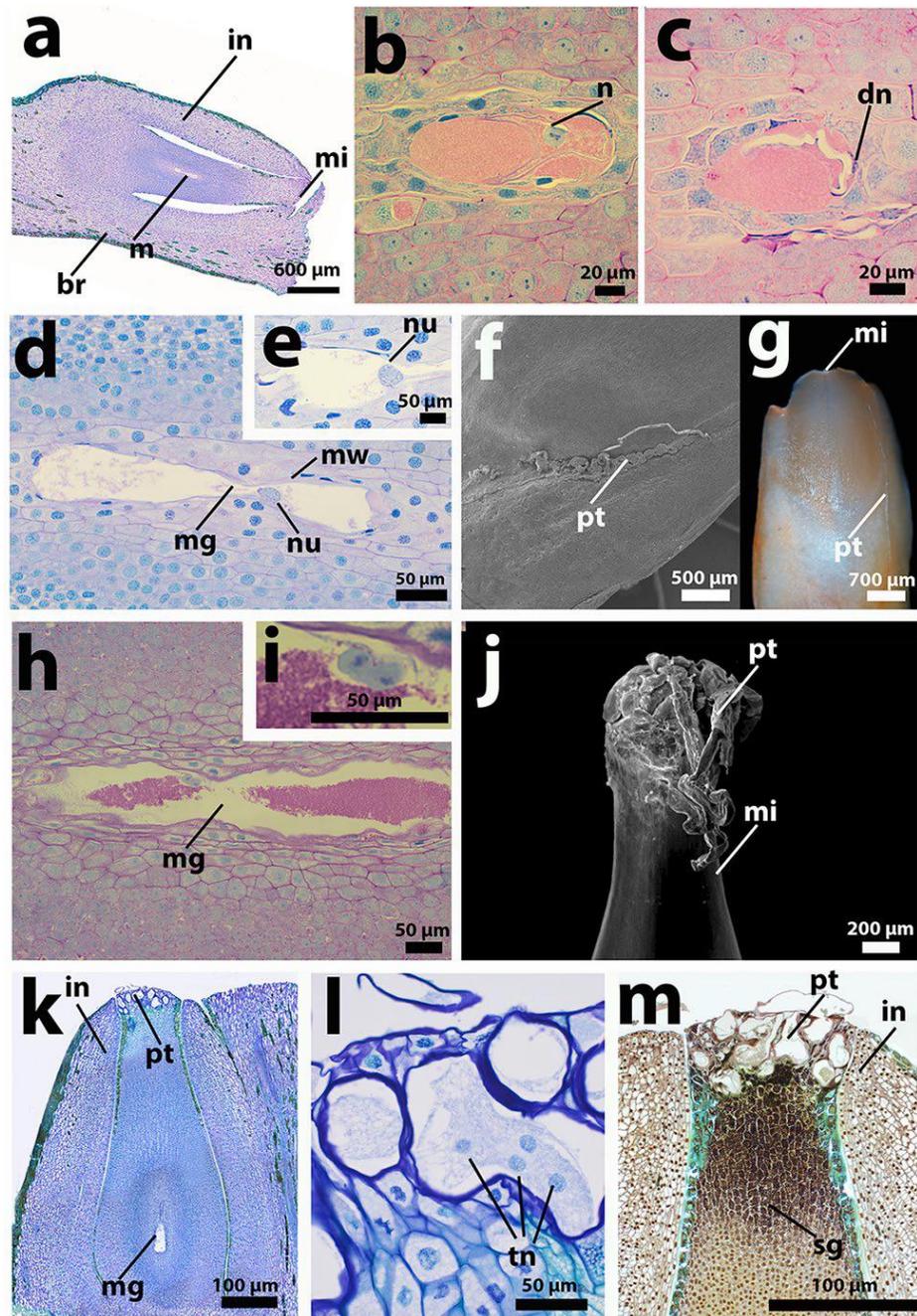
Il gametofito femminile continua il suo sviluppo andando a formare dopo due settimane 16 grandi nuclei liberi (Fig. 7h). Da 16 nuclei liberi, dopo essere cresciuto per tutta l'estate, esso arriva a formare fino a centinaia di nuclei liberi, che presentano un cospicuo nucleolo. Tuttavia, la continua crescita fa sì che le cellule nucellari che lo circondano degenerino, e a permanere intatte sono solo quelle che presentano un citoplasma più denso (Fig. 8c).

Il gametofito raggiunge successivamente la fase cellularizzata, sviluppando poi circa dodici archeconi nel polo micropilare. All'inizio del suo sviluppo l'archegonio presenta un primordio che si differenzia verso l'estremità del micropilo. Le cellule del gametofito femminile adiacenti all'inizio archeconico si differenziano come "jacket cells" (Fig. 8i). Successivamente, una divisione periclinale a livello del primordio fa sì che si venga a formare la "central cell" (cellula inferiore) (Fig. 8j) e la "primary neck cell" (cellula superiore) (Fig. 8k).

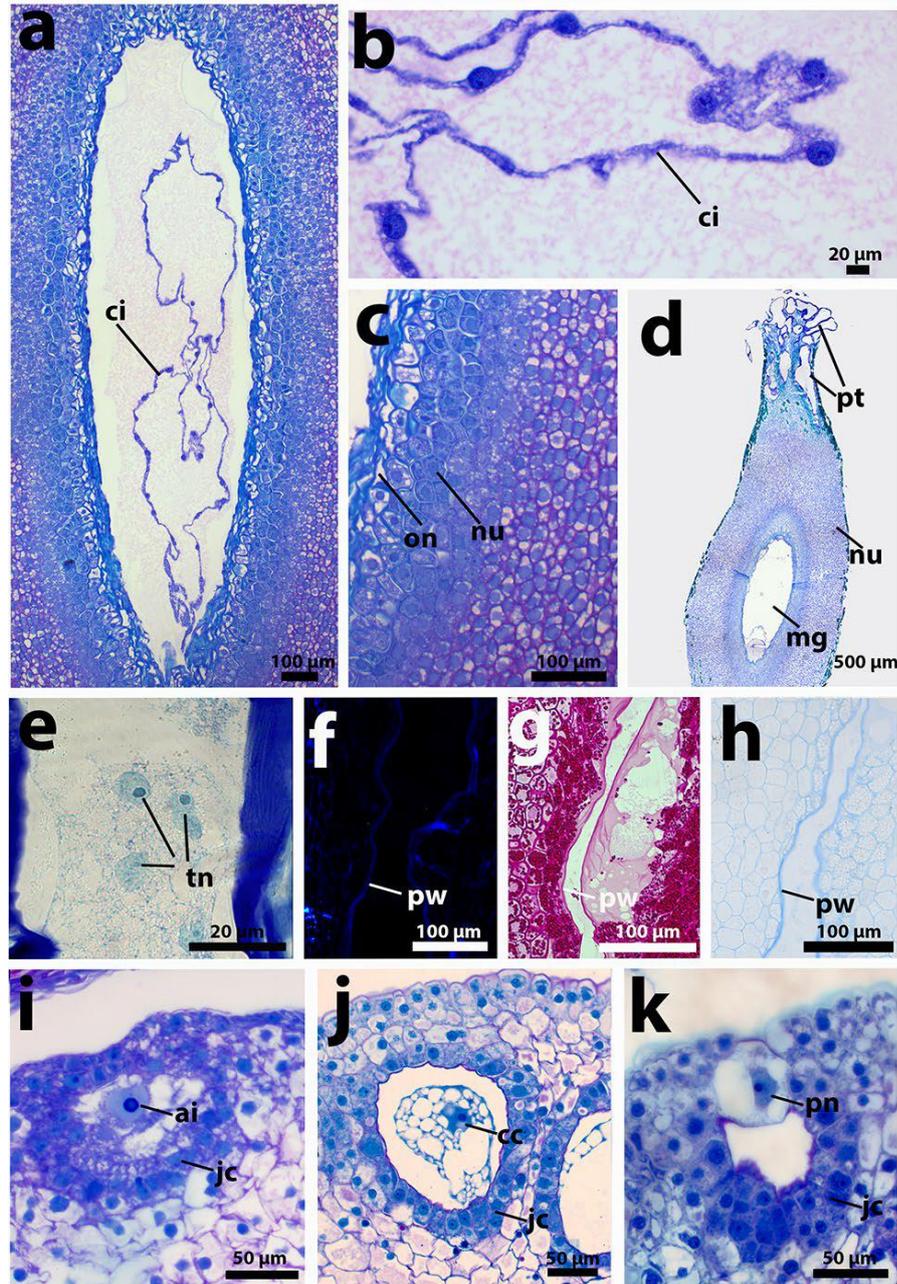
Quando il gametofito femminile raggiunge la maturità (Fig. 9a-c), divisioni anticlinali nella “primary neck cell” portano alla formazione di un canale centrale composto da 13 cellule (Fig. 9d). In questa fase, le “neck cells” e le “jacket cells” contengono grandi quantità di granuli di amido nel loro citoplasma (Fig. 9e) e la cellula uovo si forma a partire dalla cellula centrale (Fig. 9a, c).

Il processo riproduttivo richiede circa 14 mesi dall'impollinazione alla fecondazione. I tubetti pollinici e il gametofito femminile non fecondato rimangono in un periodo di dormienza per circa 4-5 mesi e, successivamente, impiegano 3-4 mesi per completare lo sviluppo (Fig. 10).

Gli autori di questo lavoro hanno prodotto una ricostruzione tridimensionale dell'ovulo, dove è possibile discernere i diversi componenti: i tessuti più esterni, il tegumento e l'interno della nucella (Fig. 10a). Il tegumento e la nucella sono visibili con trasparenza ed è possibile vedere il gametofito femminile con numerosi tubetti pollinici in prossimità (Fig. 10b).



**Figura 7:** Immagine tratta da Kuhn et al., 2024. Lo sviluppo del cono femminile di *Araucaria angustifolia* rappresentazione della sezione longitudinale dell'ovulo utilizzando microscopia ottica e la crescita del tubetto pollinico con microscopia elettronica a scansione. **a** Panoramica generale dell'ovulo nella fase di megasporogenesi. **b** Megaspore cenocitiche che mostrano un nucleo vitale (**n**) e in **c** nuclei degenerativi (**dn**). **d**, **e** megagametofito (**mg**) in fase di sviluppo a quattro nuclei, con parete della megaspore (**mw**), nucleo (**nu**) e in **e** dettaglio del secondo nucleo. **f**. Panoramica della faccia adassiale del seme che mostra la crescita del tubetto pollinico **g** verso il micropilo. **h** Megagametofito cenocitico in fase di 16 nuclei e **i** nuclei in dettaglio. **j**, **k** ovulo con tubetti pollinici al micropilo e **l** dettaglio dei nuclei del tubetto (**tn**). **m** Cellule della punta nucellare con granuli di amido. Legenda: Megaspore (**m**) Brattea (**br**), tegumento (**in**), micropilo (**mi**), tubetto pollinico (**pt**), granuli di amido (**sg**)

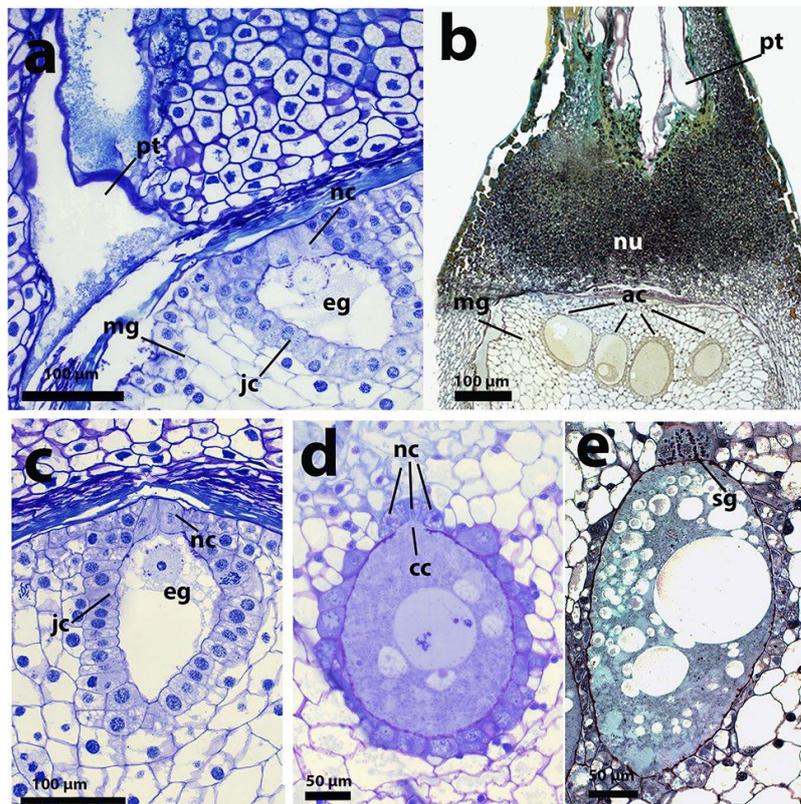


**Figura 8:** Immagine tratta da Kuhn et al., 2024. Sezione longitudinale del megagametofito e del tubetto pollinico di *Araucaria angustifolia* al microscopio ottico. **a** Panoramica del megagametofito cenocitico, con **b** strato citoplasmatico e **c** cellule nucellari **d** Ovulo con tubetti pollinici profondamente inseriti e dettaglio della punta del tubetto pollinico. Le analisi istochimiche sulla parete del tubetto pollinico (**pw**) hanno mostrato **f** cellulosa (Calcofluor White), **g** polisaccaridi (Periodic Acid Schiff- PAS) e **h** mucopolisaccaridi (Alcian Blue 8GX). **i-k** Diverse fasi dello sviluppo dell'archegonio. **i** I primi stadi di sviluppo mostrano il primordio dell'archegonio. Le sezioni sequenziali dello sviluppo successivo mostrano **j** la cellula centrale (**cc**) e **k** la cellula primaria del collo (**pn**). **Legenda:** Strato citoplasmatico (**ci**), cellule nucellari obliterate (**on**), cellule nucellari (**nu**), megagametofito (**mg**), nuclei del tubetto (**tn**), cellule della giacca (jacket cells) (**jc**).

### 4.3 Lo sviluppo del tubetto pollinico

Dallo studio di Kuhn et. al (2024) è emerso che nello stesso periodo in cui il gametofito femminile si sviluppa, sono visibili i tubetti pollinici che germinano e si allungano, a livello del micropilo (Fig. 7f, g).

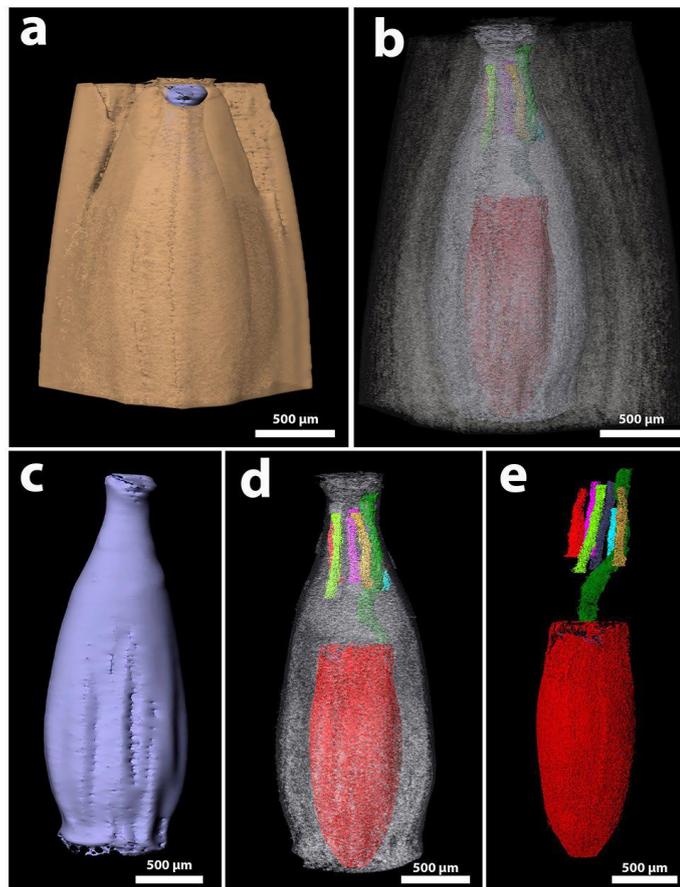
Durante l'estate il tubetto pollinico penetra in profondità verso il gametofito femminile (Fig. 8d). I test istochimici hanno indicato che la parete del tubetto pollinico è composta da cellulosa, polisaccaridi e mucopolisaccaridi (Fig. 8 f–h), mentre non si colora per callosio e pectine acide. Dopo che il gametofito ha raggiunto la maturità e sviluppato gli archegoni entro cui la cellula uovo si differenzia, il tubetto pollinico giunge al gametofito femminile, in preparazione alla fecondazione (Fig. 9a).



**Figura 9:** Immagine tratta da Kuhn et al., 2024. Sezione longitudinale dell'ovulo e dettagli dell'archegonio di *Araucaria angustifolia* attraverso microscopia ottica. **a** Tubetto pollinico che si avvicina al megagametofito con archegoni maturi. **b** Granuli di amido nelle cellule nucellari accanto al megagametofito e all'archegonio. **c** Archegonio maturo con cellule del collo, cellule del mantello e cellula uovo. **d** visione obliqua delle cellule del collo e del canale centrale dell'archegonio. **e** Individuazione dei granuli di amido nelle cellule del collo dell'archegonio con Lugol. **Legenda:** Tubetto pollinico (**pt**), megagametofito (**mg**), cellule del collo (neck cells) (**nc**), cellule della giacca (jacket cells) (**jc**), cellula uovo (**eg**), cellule nucellari (**nu**), archegonio (**ac**), canale centrale (**cc**), granuli di amido (**sg**).

L'impollinazione avviene all'inizio della primavera, quando i granuli pollinici giungono sul micropilo dell'ovulo. Il tubetto pollinico rimane quindi in uno stadio di dormienza per 4-5 mesi dentro all'ovulo.

In questo lavoro gli autori hanno effettuato una ricostruzione  $\mu$ CT, una tecnica che attraverso la produzione di immagini ad alta risoluzione porta a generare modelli digitali tridimensionali che permettono di vedere dettagli tridimensionali da micron a sub-micron in campioni piccoli. Questa ricostruzione mostra come siano presenti molti tubetti pollinici che crescono attraverso il tessuto nucellare. Questi confinano l'uno con l'altro, ma ciascuno presenta un solo asse che si estende rettilineo verso il gametofito femminile (Fig. 10e).



**Figura 10:** Immagine tratta da Kuhn et al., 2024. Ricostruzione  $\mu$ CT 3D dell'ovulo di *Araucaria angustifolia*. **a** Vista laterale dell'ovulo con il tegumento e la nucella. **b** Vista frontale dell'ovulo con la trasparenza del tegumento. Si noti la nucella, il megagametofito (in rosso) e i tubetti pollinici micropilari (giallo, arancione, verde, viola e rosa). **c** visione frontale della nucella **d** Visione frontale della nucella con trasparenza. Si notino il gametofito femminile e i tubetti pollinici nel micropilo **e** visione frontale del megagametofito e i tubetti pollinici. **Legenda:** tegumento (rosa pallido), nucella (viola chiaro), megagametofito (rosso), tubetti pollinici (giallo, arancione, verde, viola, rosa e azzurro).

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 Lo strobilo femminile

La discussione sull'omologia degli strobili femminili nelle gimnosperme è ancora aperta. Il cono di conifera comprende numerosi complessi brattea/scaglia ovulifera e, sebbene i coni femminili presentino una struttura simile, i reperti fossili hanno dimostrato una morfologia molto diversificata tra le diverse conifere (Kuhn et al., 2024).

Analisi filogenetiche e morfologiche hanno definito *Agathis*, *Wollemia* e *Araucaria* come gruppo monofiletico. Ciò nonostante, la morfologia del cono di *Agathis* risulta piuttosto differente rispetto a quello di *Araucaria angustifolia*, la cui morfologia è stata studiata nell'articolo presentato in questa tesi (Kuhn et al., 2024). Lo strobilo di *Agathis*, infatti, è formato da numerose squame ovali appiattite, con minuscole protuberanze apicali e senza la presenza di brattee, mentre lo strobilo in *A. angustifolia* è caratterizzato da sottili scaglie ovulifere e da brattee disposte elicoidalmente intorno a esso (Kuhn et al., 2024). Per quanto riguarda la morfologia di *Wollemia nobilis*, la brattea e la scaglia ovulifera sono congenitamente fuse l'una all'altra, in modo da formare un solo tipo di squama conica (Dörken & Rudall, 2019). Inoltre in *Araucaria* e *Wollemia* le scaglie ovulifere presentano una lunga appendice distale spinosa che risulta essere assente in *Agathis*. Tuttavia, un'importante differenza tra *Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia* è che negli ultimi due i semi sono alati. Pertanto, gli ovuli e le scaglie del cono sono ontogeneticamente liberi. I semi possono essere quindi dispersi indipendentemente dalle scaglie del cono quando il cono ha raggiunto la maturità (Dörken & Rudall, 2019).

### 5.2 Lo sviluppo dell'ovulo

Secondo il modello di Florin (1931) la scaglia ovulifera delle conifere fossili e delle conifere attualmente esistenti comprende un ovulo pedunculato, prolungamenti sterili e un rudimentale asse, che può essere fuso a diversi gradi. Questo modello interpreta la scaglia come un rudimentale germoglio laterale che porta molteplici prolungamenti e si sviluppa all'ascella della brattea, risultando così omologa ad una foglia (Florin, 1931).

Attualmente è presente un altro modello basato su studi più recenti di ontogenetica, paleobotanica e filogenesi, confrontando *Araucaria araucana* e altre conifere

(Herting & Stützel, 2020). Questo modello offre un'interpretazione secondo cui la scaglia ovulifera non risulta omologa a una foglia, per tre motivi principali:

- Non tiene conto dell'ontogenesi del cono delle conifere esistenti;
- Non spiega la morfologia del cono femminile di tutte le conifere esistenti;
- Esclude, in origine, specie di Taxaceae.

Secondo quanto emerge da questo studio, la scaglia ovulifera è da intendersi infatti come un funicolo modificato dell'ovulo (Herting & Stützel, 2020).

Nello studio di Kuhn et.al (2024) su *A. angustifolia* è stato messo in luce che la brattea nasce mesi prima dello sviluppo dell'ovulo. Subito dopo che la scaglia ovulifera emerge avviene il differenziamento della nucella. In sequenza, queste due strutture continuano a svilupparsi e a crescere contemporaneamente.

Lo sviluppo della scaglia e della nucella di *A. angustifolia* ripete il modello descritto da *A. araucana* (Herting & Stützel, 2020). Infatti attraverso studi morfologici tramite SEM è stata avvalorata l'idea che entrambe le strutture derivino dallo stesso primordio.

In *Aghatis australis* e *Wollemia nobilis*, altre due Araucariaceae, l'ovulo presenta un solo punto di connessione alla brattea, e la scaglia non risulta essere evidente (Owens et al., 1995a). Tuttavia, non è chiaro se la brattea e la scaglia siano completamente congenitamente fuse.

Nelle Podocarpaceae il cono femminile porta una o più brattee che sottendono un *epimatium* ascellare che sostiene un singolo ovulo in posizione adassiale (Tomlinson, 1992). Dati ontogenetici indicano che l'*epimatium* delle Podocarpaceae e la scaglia delle Araucariaceae presentano lo stesso modello di sviluppo. Entrambe le strutture sorgono nella porzione ascellare della brattea e, subito dopo l'inizio del loro sviluppo, emergono la nucella e il tegumento dell'ovulo. Pertanto il modello di sviluppo di questa struttura suggerisce che la scaglia e l'*epimatium* siano due strutture omologhe (Herting & Stützel, 2020).

### 5.2.1 Megasporogenesi e megagametogenesi

La nucella delle piante a seme corrisponde al megasporangio, in cui si differenzia la cellula madre delle megaspore (MMC). Essa dopo aver effettuato la meiosi, genera le megaspore aploidi. Generalmente solo una di esse prosegue il suo sviluppo e differenzia in megaspore funzionale, dando origine al megagametofito. Nelle conifere il processo generale della megagametogenesi può avvenire in diversi modi descrivendo la formazione di tetradi, che possono essere lineari, a forma di T, tetraedriche e isobilaterali, o di triadi, nel caso non avvenga la meiosi II.

Dallo studio di Kuhn et al. (2024) è emerso come in *A. angustifolia* la MMC subisca meiosi I, formando una diade cenocitica che diventa poi una tetrade cenocitica in meiosi II. Dopo la meiosi, tre nuclei degenerano attraverso un processo di morte cellulare programmata e solo uno funge da megaspore funzionale per dare origine a un gametofito femminile. Subito dopo il completamento della meiosi II, tre nuclei mostrano un restringimento; al contrario, il nucleo vitale presentava due nucleoli che indicavano attività nucleare, come descritto per i nuclei funzionali (Kuhn et al., 2024). Gli stadi meiotici non sono stati osservati in nessun'altra specie di Araucariaceae, e nella famiglia delle Podocarpaceae non è stata trovata alcuna evidenza di tetradi cenocitiche. Tuttavia, è stata rilevata formazione di una tetrade lineare di megaspore in quattro specie di *Podocarpus* (Wilson & Owens, 1999) e la formazione di una tetrade cenocitica solo in *Cupressus sempervirens*, dove, però, il gametofito femminile risulta essere tetrasporico (El Maâtaoui & Pichot, 1999). Per quanto riguarda altre specie di gimnosperme, possiamo osservare la presenza di un gametofito femminile tetrasporico in due generi di Gnetales: *Welwitschia* e *Gnetum* (Carmichael & Friedman, 1996). In *Welwitschia* l'osservazione di una tetrade cenocitica ha indotto a concludere l'origine tetrasporica del gametofito femminile. Ciò nonostante, non è avvenuta una descrizione dettagliata di megaspore degenerative o meno (Kuhn et al., 2024). Pertanto, sebbene questi due generi condividano molti aspetti della riproduzione sessuale di altre gimnosperme, il processo di megasporogenesi e megagametogenesi nelle piante a seme è probabilmente molto più variabile di quanto si pensi.

In questo studio su *A. angustifolia*, nella MMC è stata evidenziata la presenza una parete cellulare spessa con composti pectici ma non callosio, schema osservato fino alla fine della meiosi sulla tetrade di megaspore.

Allo stesso modo, l'analisi dell'ultrastruttura delle megaspore di *Ginkgo biloba* ha mostrato una parete cellulare spessa e complessa con una considerevole lamella centrale (Stewart & Gifford, 1967). L'ispessimento della parete cellulare della megaspore è un carattere generale delle gimnosperme, che consente al citoplasma di isolarsi per realizzare la meiosi. Tuttavia, la composizione della parete cellulare può differire. Nella MMC delle specie con depositi di callosio, questo materiale permane per un breve periodo, poiché scompare rapidamente dopo la meiosi. Il callosio isola le megaspore vitali da quelle degenerative, rendendo così evidenziabile l'avvio dello sviluppo del gametofito femminile (Kuhn et al., 2024). Dal momento che *A. angustifolia* non presenta pareti cellulari che isolano le megaspore all'interno della tetrade, l'analisi dello sviluppo di queste ultime potrebbe fornire il meccanismo di selezione della megaspore funzionale.

In questo lavoro è stato osservato che in *A. angustifolia* le prime divisioni mitotiche dello sviluppo del gametofito femminile hanno prodotto nuclei organizzati in modo dispersivo. Alcune settimane dopo, si sono formati centinaia di nuclei con cromatina compattata. Questo modello di sviluppo è stato descritto anche per molte altre gimnosperme, il cui megagametofito è costituito da un grande vacuolo centrale che mantiene il citoplasma alla sua periferia (Kuhn et al., 2024).

Escludendo le angiosperme, *Gnetum* e *Welwitschia*, tutti i gametofiti femminili formano degli archeconi, che comunemente possiedono una forma a "T".

Organo multicellulare e tridimensionale, l'archegonio presenta uno sviluppo finemente regolato in ogni gruppo vegetale. Studi dettagliati sull'ontogenesi di quest'organo aiutano a comprendere le analogie tra archegonio e sacco embrionale, risolvendo così molte domande sull'evoluzione delle piante terrestri.

Le parti principali dell'archegonio sono il ventre e il collo. Il ventre ospita la cellula uovo e la "ventral canal cell" (cellula del canale del ventre), che derivano dalla "ventral cell" (cellula del ventre), mentre il collo racchiude una serie di "neck canal cells" (cellule del canale del collo).

Nello studio di Kuhn et. al (2024), la tipica forma a "T" è stata riscontrata in *A. angustifolia* quando la prima divisione del primordio dell'archegonio è orizzontale e la "primary neck cell" (cellula superiore) si divide. Al contrario, la ventral canal cell non è stata osservata. Allo stesso modo, Burlingame (1914) non ha notato questa cellula in *Aghatis*, anch'essa appartenente alle Araucariaceae, pertanto è stata

descritta come una cellula effimera. Tuttavia, Owens et al. (1995a) hanno identificato un nucleo della “ventral canal cell” persistente in *Aghatis australis*. La presenza di “ventral canal cells” può essere ritrovata anche in altre conifere come le Podocarpaceae, in specie di *Pinus* e *Abies*, mentre la regolare formazione della “ventral canal cell” in *Taxus canadensis* è ancora in questione (Sokoloff & Remizowa, 2021).

Pertanto, è probabile che in molte conifere, la “ventral canal cell”, invece di essere assente, presenti un comportamento effimero, e che probabilmente non sia stato possibile identificarla in questo lavoro.

Il numero e la disposizione delle “neck cells” dell’archegonio delle gimnosperme variano tra i vari gruppi di spermatofite. Nelle conifere e in *Ephedra*, le “neck cells” dell’archegonio sembrano assumere delle configurazioni plastiche quando svolgono un ruolo nella ricezione del tubetto pollinico (Sokoloff & Remizowa, 2021).

### **5.3 La crescita del tubetto pollinico**

Nella maggior parte delle conifere, i granuli di polline germinano all’interno dell’ovulo (Owens et al., 1995a), dove l’esina scoppia quando il polline viene idratato, consentendo l’estrusione dell’intina, che darà vita al tubetto pollinico (Kuhn et al., 2024). Nelle Araucariaceae, così come in molte specie di *Tsuga* e *Saxegothaea*, il granulo di polline germina in modo extra ovulare. In questo lavoro è stato osservato che il polline di *A. angustifolia* raggiunge il micropilo dell’ovulo, attraversando la struttura del cono femminile e le scaglie ovulifere. Durante questo percorso, il polline germina in un tubetto lineare.

In Cycadales e Ginkgoales il tubetto pollinico è una struttura vegetativa. Il ruolo vegetativo di quest’ultimo è infatti collegato alla sua crescita ramificata austoriale, sviluppandosi attraverso le cellule della nucella (Offer et al., 2023). Anche nelle Pinaceae i tubetti pollinici si ramificano, tuttavia solo le ramificazioni multiple sembrano svolgere un ruolo austoriale, mentre il ramo principale, che contiene i nuclei generativi, è sifonogamico (Hiratsuka & Terasaka, 2011). Per quanto riguarda le ramificazioni del tubetto pollinico delle Araucariaceae, esse sono state descritte attraverso studi su *Aghatis* da parte di Owens et al. (1995a, b).

In generale nelle conifere e nelle Gnetales i tubetti pollinici presentano un ruolo sifonogamico (Fernando et al., 2005), pertanto la germinazione ramificata del tubetto pollinico e il suo ruolo esclusivamente vegetativo sembrano essere pressoché esclusivi di Ginkgoales e Cycadales.

Nello studio di Kuhn et. al (2024) le analisi delle sezioni istologiche del tubetto pollinico hanno portato inizialmente ad un fraintendimento sull'interpretazione della struttura, poiché molti tubetti confinavano tra loro nel tessuto nucellare ed istologicamente si potevano descrivere come ramificazioni di un singolo tubetto pollinico. Tuttavia, attraverso la ricostruzione tridimensionale, è stato rivalutato l'accrescimento del tubetto, dimostrando la sua traiettoria rettilinea verso il gametofito femminile ed evidenziando che esso non ramifica a livello del tessuto nucellare. In *A. angustifolia* il tubetto ha dunque un ruolo principalmente sifonogamico, idea rafforzata dal comportamento di quest'ultimo. Nonostante ciò, poiché le cellule spermatiche non si formano fino a 12 mesi dopo la germinazione del polline, il tubetto pollinico svolge ancora un ruolo austoriale. Di conseguenza, la crescita del tubetto pollinico di *A. angustifolia* sembra differire da quella di *Agathis*, in quanto dal lavoro di Owens et al. (1995a, b) è emerso che in *Agathis* il tubetto pollinico si ramifica. Kuhn e colleghi (2024) evidenziano dunque in questo lavoro un potenziale nuovo modello di crescita del tubetto nelle Araucariaceae.

La composizione della parete del tubetto pollinico delle gimnosperme è relativamente omogenea rispetto a quella delle angiosperme e questa caratteristica sembra essere correlata alla crescita lenta del tubetto pollinico (Kuhn et al., 2024). In particolare, specifici modelli di composizione chimica in diverse specie di piante a seme possono avere un valore tassonomico (Yatomi et al., 2002). Il tubetto pollinico in *A. angustifolia* presenta la stessa composizione chimica della parete più interna dei granuli di polline maturi, con una distribuzione omogenea di cellulosa, mentre lievi differenze sono state osservate per altre gimnosperme.

In modo diverso, *Picea wilsonii* e *Pinus sylvestris* mostrano una minore densità di microfibre di cellulosa sull'appendice del tubetto. Da uno studio condotto su 12 specie di conifere il tubetto è stato colorato con il rosso rutenio (Yatomi et al., 2002). Ne risulta che il contenuto di pectina sembra essere molto raro nelle specie di conifere analizzate in questo studio. Ad ogni modo, questi dati differiscono da quelli di *A. angustifolia* che non si colora con il rosso rutenio. Un'altra variazione

che si ritrova tra le conifere è la presenza o meno di callosio, che viene evidenziato tramite il blu di anilina. L'assenza di quest'ultimo è stata evidenziata nella maggior parte delle conifere studiate, ma Derksen (1999) l'ha riscontrato nelle parti giovani del tubetto pollinico di *Pinus silvestris*.

Un aspetto molto interessante ha fornito l'analisi istochimica effettuata durante lo sviluppo delle strutture riproduttive in *A. angustifolia* ha evidenziato che la sintesi di sostanze immagazzinate nelle cellule della nocella è associata alla crescita del tubetto pollinico. Ciò è in accordo con quanto riportano Hiratsuka e colleghi (2002), che osservano che la sintesi dell'amido nella nucella è stimolata dall'impollinazione, in *Pinus densiflora*.

## 6. CONCLUSIONI

La variabilità nel meccanismo di impollinazione tra le diverse conifere determina i tratti morfologici del polline, dello strobilo femminile e della struttura dell'ovulo.

Attraverso tecniche di bio-imaging, in questo studio sono stati descritti la crescita e lo sviluppo dello strobilo femminile in *A. angustifolia*. Sono stati poi aggiornati i dati sulla biologia riproduttiva di questa conifera dalla formazione dell'ovulo fino alla fecondazione. Kuhn et. al (2024) dimostrano che la scaglia del seme nasce nello stesso primordio dell'ovulo, concordando sul fatto che questa struttura fa parte dell'ovulo stesso e deve essere interpretata come funicolo modificato dell'ovulo.

Per quanto riguarda la megagametogenesi, viene descritta la formazione di una tetradecina cenocitica e la formazione del gametofito femminile con origine monosporica. Il processo evidenzia un modello di origine del gametofito femminile che non è mai stato descritto nelle conifere.

Inoltre, la ricostruzione tridimensionale dell'ovulo attraverso microtomografia a raggi X ha rivelato la presenza di più tubetti pollinici, adiacenti l'uno con l'altro, ma aventi un solo asse che si estende direttamente verso il gametofito femminile e un ruolo principalmente sifonogamico. In aggiunta viene sottolineata la differenza tra tubetto pollinico di *A. angustifolia* e di *Agathis*, mettendo in evidenza un nuovo modello di crescita nelle Araucariaceae.

## 7.BIBLIOGRAFIA

- Bittencourt, J. V. M. (2007). *Araucaria angustifolia its geography and ecology*. University of Reading.
- Burlingame, L.L. (1914). *The morphology of Araucaria brasiliensis. II. The ovulate cone and female gametophyte*. Bot Gaz 57:490–508. <https://doi.org/10.1086/331344>.
- Carmichael, J.S., Friedman, W.E. (1996). *Double fertilization in Gnetum gnemon (Gnetaceae): its bearing on the evolution of sexual reproduction within the Gnetales and the anthophyte clade*. Am J Bot 83:767–780. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12766.x>
- Derksen, J., Li, Y., Knuiman, B., Geurts, H. (1999). *The wall of Pinus sylvestris L. pollen tubes*. Protoplasma 208:26–36. <https://doi.org/10.1007/BF01279072>
- Dörken, V.M., & Rudall, P.J. (2019). *Structure and abnormalities in cones of the Wollemi pine (Wollemia nobilis)*. Kew Bulletin, 74.
- El Maâtaoui, M., Pichot, C. (1999). *Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, Cupressus sempervirens L.* Planta 208:345–351. <https://doi.org/10.1007/s004250050568>
- Fernando, D.D, Lazzaro, M.D., Owens, J.N. (2005). *Growth and development of conifer pollen tubes*. Sex Plant Reprod 18:149–162. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0008-y>
- Florin, R. (1931). *Untersuchungen zur stammesgeschichte der coniferales und cordaitales*, 1st edn. Almquist & Wiksells Boktryckeri, Stockholm
- Gersterberger, P., Leins, P. (1978). *Rasterelektronenmikroskopische untersuchungen an blütenknospen von physalis philadelphica (Solanaceae) anwendung einer neuen präparationsmethode*. Ber Dtsch Bot Ges 91:381–387
- Hardin, J., Bertoni, G.P. (2018). *Becker Il mondo della cellula*. Nona edizione. Pearson
- Herting, J., Stützel, T. (2020). *Morphogenesis of the seed cone of Araucaria araucana (Molina) K. Koch and the evolution of the coniferous seed scale*. Flora 273:151719. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151719>
- Hiratsuka, R., Yamada, Y., Terasaka, O. (2002). *Programmed cell death of Pinus nucellus in response to pollen tube penetration*. J Plant Res 115:141–148. <https://doi.org/10.1007/s102650200019>
- Kuhn, S.A., Nogueira, F.M., Schürer, T. et al. (2024). *Reproductive biology of the “Brazilian pine” (Araucaria angustifolia-Araucariaceae): the pollen*

*tube growth and the seed cone development.* Plant Reprod 37, 1–13  
<https://doi.org/10.1007/s00497-023-00473-8>

- McDowell, E.M., Trump, B.F. (1976). *Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy.* Arch Pathol Lab Med 100:405–414
- Offer, E., Moschin, S., Nigris, S. & Baldan, B. (2023). *Reproductive Mechanisms in Ginkgo and Cycas: Sisters but not Twins, Critical Reviews in Plant Sciences*, 42:5, 283-299, DOI: 10.1080/07352689.2023.2235173
- Owens, J.N., Catalano, G.L., Morris, S.J, Aitken-Christie, J. (1995b). *The reproductive biology of kauri (Agathis australis). II. Male gametes, fertilization, and cytoplasmic inheritance.* Int J Plant Sci 156:404–416. <https://doi.org/10.1086/297262>
- Owens, J.N., Catalano, G.L., Morris, S.J., Aitken-Christie, J. (1995a). *The reproductive biology of kauri (Agathis australis). I. Pollination and prefertilization development.* Int J Plant Sci 156:257–269. <https://doi.org/10.1086/297248>.
- Pasqua, G., Abbate, G., Forni, C. (2019). In AA.VV. *Botanica generale e diversità vegetale*.ed IV. Italia. Piccin.
- Sokoloff, D.D., Remizowa, M.V. (2021). *Diversity, development and evolution of archegonia in land plants.* Bot J Linn Soc 195:380–419. <https://doi.org/10.1093/botli/mnab077>
- Stewart, K.D., Gifford, E.M. (1967). *Ultrastructure of the developing megaspore mother cell of Ginkgo biloba.* Am J Bot 54:375–383. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1967.tb06932.x>.
- Tomlinson, P.B. (1992). *Aspects of cone morphology and development in Podocarpaceae (Coniferales).* Int J Plant Sci 153:572–588. <https://doi.org/10.1086/297081>
- Wilson, V.R., Owens, J.N. (1999). *The reproductive biology of totara (Podocarpus totara) (Podocarpaceae).* Ann Bot 83:401–411. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0836>
- Yatomi, R., Nakamura, S., Nakamura, N. (2002). *Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of gymnosperms.* Grana, 41:21–28. <https://doi.org/10.1080/00173130260045468>

## **8.APPENDICE**



# Reproductive biology of the “Brazilian pine” (*Araucaria angustifolia*-Araucariaceae): the pollen tube growth and the seed cone development

Sofia A. Kuhn<sup>1</sup> · Fernanda M. Nogueira<sup>2</sup> · Tainá Schürer<sup>1</sup> · Jorge E. A. Mariath<sup>1</sup>

Received: 31 March 2023 / Accepted: 19 June 2023 / Published online: 14 July 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

## Abstract

**Key message** In *Araucaria angustifolia*, the seed scale is part of the ovule, the female gametophyte presents a monosporic origin and arises from a coenocytic tetrad, and the pollen tube presents a single axis.

**Abstract** The seed cone of conifers has many informative features, and its ontogenetic data may help interpret relationships among function, development patterns, and homology among seed plants. We reported the seed cone development, from pollination to pre-fertilization, including seed scale, ovule ontogeny, and pollen tube growth in *Araucaria angustifolia*. The study was performed using light microscopy, scanning electron microscopy, and X-ray microcomputed tomography ( $\mu$ CT). During the pollination period, the ovule arises right after the seed scale has emerged. From that event to the pre-fertilization period takes about 14 months. Megasporogenesis occurs three weeks after ovule formation, producing a coenocytic tetrad. At the same time as the female gametophyte's first nuclear division begins, the pollen tube grows through the seed scale adaxial face. Until maturity, the megagametophyte goes through the free nuclei stage, cellularization stage, and cellular growth stage. Along its development, many pollen tubes develop in the nucellar tissue extending straight toward the female gametophyte. Our observations show that the seed scale came out of the same primordia of the ovule, agreeing with past studies that this structure is part of the ovule itself. The formation of a female gametophyte with a monosporic origin that arises from a coenocytic tetrad was described for the first time in conifers, and the three-dimensional reconstruction of the ovule revealed the presence of pollen tubes with only one axis and no branches, highlighting a new pattern of pollen tube growth in Araucariaceae.

**Keywords** Gymnosperm · Megasporogenesis · Megagametogenesis · Ontogeny · Ovule · Seed scale

## Introduction

The gymnosperms are a group of distantly related seed plants with a fossil record extending back to the mid-Devonian (Gerrienne et al. 2004). They differ from angiosperms

because their ovule is entirely or partially exposed during the pollination stage, forming naked seeds. The main gymnosperm lineages include cycads, *Ginkgo*, conifers, and Gnetales (Ran et al. 2018) and present a wide variety of reproductive systems (Breygina et al. 2021), showing different ovule morphology, pollen structure, and pollen tube behavior (Biswas and Johri 1997).

The largest group of gymnosperms are the conifers which present two kinds of reproductive structures: pollen cones and seed cones (Farjon 2017). While pollen cones produce and disperse the pollen grains, the seed cones play a great variety of roles, such as producing the ovule, housing the fertilization process, and protecting and dispersing the seeds (Leslie 2011). According to Miller (1999), the seed cone structure has many informative features that allow extant families to be distinguished.

✉ Sofia A. Kuhn  
sofia.kuhn@ufrgs.br

<sup>1</sup> Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg), Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) – Universidade de São Paulo—USP, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto 14040-901, Brazil

*Araucaria* is a conifer genus identified in the fossil record since the Jurassic (Panti et al. 2012), and all 19 species are recognized as living fossils. This genus presents two endemic species from South America, *Araucaria araucana* (Molina) K.Koch and *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Dettmann and Clifford 2005) that have likely changed very little since the Jurassic (Farjon 2017). *Araucaria* belongs to Araucariaceae, a family primarily representing Southern Hemisphere distribution and comprising two other genera, *Agathis* and *Wollemia* (Farjon 2010). The most recent combined morphological and molecular phylogenetic analyses retrieved *Agathis* and *Wollemia* as a monophyletic group (i.e., agathoid clade), sister to *Araucaria* (Escapa and Catalano 2013).

The *Araucaria* seed cone is the largest of the conifers (Gleiser et al. 2019), and only the two South American species and one from Australia, together with several species of *Pinus*, produce seeds for human consumption (Farjon 2017).

The cones of *Araucaria* are known to bear a single and inverted ovule which is produced in bract/seed scale complexes. The comprehensive study of Burlingame (1913, 1914, 1915) analyzed several aspects of the reproductive cycle of *A. angustifolia*. Still, many aspects were not completely described, such as the seed scale, ovule development, and megasporogenesis process.

Therefore, many aspects of the embryonic ontogenesis of *A. angustifolia* were updated by Goeten et al. (2020), and Herting and Stützel (2020) described the *A. araucana* seed scale ontogeny discussing the homology of this structure. The overall pollination mechanism of *Araucaria* was analyzed, which includes wind pollination, the presence of non-saccate pollen, the absence of pollination drops, and extra-ovular pollen germination (e.g., Burlingame 1915; Haines et al. 1984; Owens et al. 1998), in which pollen grains laid on the seed scale, germinate and grow toward the seed cone axis straight to the micropyle.

Pollen tube growth in the nucellus has only been precisely detailed in *Agathis* (Owens et al. 1995a), which indicated that pollen tubes meander and branch within the nucellar tissue, suggesting that besides the siphonogamic role, the pollen tube possesses a secondary haustorial function. Because of the lack of information about pollen tube growth in other species, this developmental pattern was generalized to Araucariaceae.

Although the study of reproductive biology of Araucariaceae has been increasing significantly in the last few decades, many questions remain. Thus, reinvestigating specific developmental processes, such as seed scale and ovule ontogeny, megasporogenesis and megagametogenesis, and pollen tube growth, is still necessary. Nevertheless, those

ontogenetic data may aid in interpreting homologies among seed plants and help understand the relationships among function, developmental patterns, and the evolution of reproductive morphology.

*Araucaria angustifolia*, known as Brazilian Pine or Monkey Puzzles, is a Critically Endangered conifer (IBAMA 1992; Baillie et al. 2004), having lost 97% of its range in the last century due to human activities (Mantovani et al. 2004). *A. angustifolia* also plays an important role in the Atlantic Forest ecology, hosting many plant species in its canopy and providing shelter and nutritional resources to the wild fauna through its seed (Koch and Corrêa 2002).

In this article, we report the seed scale ontogeny, ovule formation, and development, including the megasporogenesis and megagametogenesis processes and pollen tube growth. Furthermore, given the difficulty of visualizing how the pollen tube grows inside the seed cone using traditional serial sections, a non-invasive approach using X-ray micro-computed tomography ( $\mu$ CT) was also performed to generate a high-resolution 3D model of the pollinated ovule. This data can be useful in enhancing breeding techniques and pollination success with fertilized cones and seed production and increases chances for successful management of the natural environment of this tree. Lastly, understanding the morphology of the reproductive structure in *Araucaria* is important to comprehend how reproductive strategies evolved in Araucariaceae.

## Materials and methods

### Plant material

The seed cones of *A. angustifolia* were obtained from three different plants of Nova Petrópolis City, Rio Grande do Sul, Brazil. The collections were performed over 18 months (from June to November of the next year), starting at the beginning of the winter. From the first to the third month and from the seventh to the eighteenth months, the collections were made monthly, except that the fourth to sixth-month samples were taken weekly or every two weeks. The voucher specimens were deposited in the Federal University of Rio Grande do Sul's ICN herbarium under numbers 171957 and 171958.

### Light microscopy (LM)

To prepare histological sections, the material was fixed in 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 (McDowell and Trump 1976). Then it was washed in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2)

Gabriel (1982), dehydrated in an ethanol series (10–100%), and embedded in 2-hydroxyethyl – methacrylate (Gerrits and Smid 1983). Sections were cut 2–4  $\mu\text{m}$  thick, using a Zeiss rotatory microtome, and stained with Toluidine Blue O 0.05%, pH 4.4 (O’Brien and McCully 1981). Photomicrographs were acquired under a bright field using a Leica DMR microscope and a Leica M165 FC stereomicroscope, with an AxioCam HRc digital camera and AxioVision LE (Carl Zeiss® Meditec AG, Oberkochen, Germany) software.

Chemical composition was detected using different histochemical tests (Supplementary material 1): IKI (Lugol’s solution) (Johansen 1940) to detect starch; Ruthenium Red (Johansen 1940) for polysaccharide acids and pectic acids; Alcian Blue 8GX (Lillie 1965) for mucopolysaccharides; Periodic Acid Schiff-PAS (Sass 1951) for total polysaccharides and Calcofluor White (Hughes and McCully 1975) for cellulose; Aniline Blue (Martin 1959) for callose.

### Scanning electron microscopy (SEM)

For scanning electron microscopy (SEM), the samples were dehydrated in an acetone series and dried using the critical-point method (Gersterberger and Leins 1978) with BAL-TEC, CPD 030 equipment. The samples were then mounted onto stubs and coated with gold using a BAL-TEC SCD 050 sputtering device. Observations and electron micrographs were performed with a JEOL JSM 6060 microscope under 30 kV.

### X-ray microcomputed tomography ( $\mu\text{CT}$ )

The seed cone in the early stage of development was collected and fixed in 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 over 72 h (McDowell and Trump 1976), and washed in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. After washing, the sample was dehydrated in an acetone series and dried using the critical-point method (Gersterberger and Leins 1978) with BAL-TEC, CPD 030 equipment.

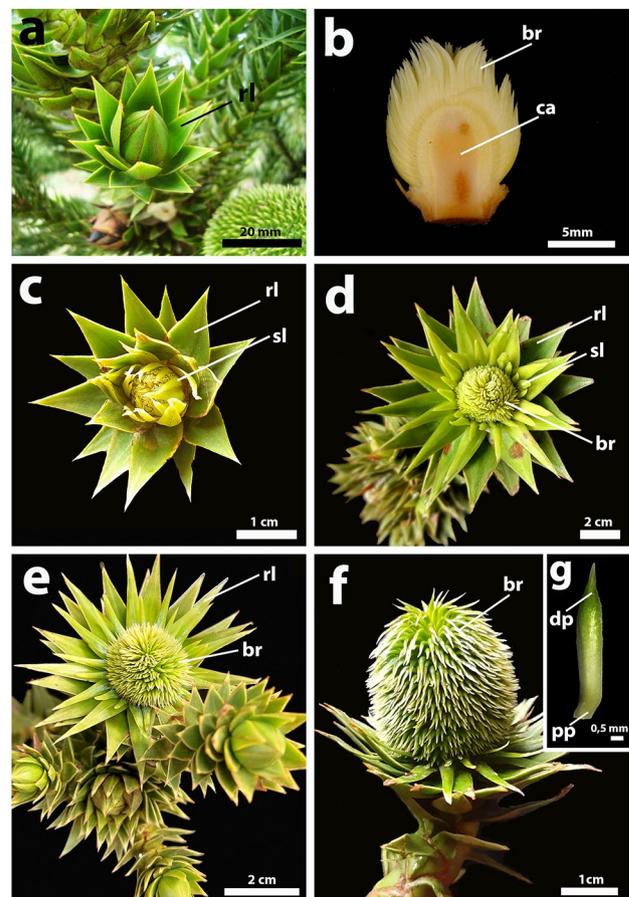
For the  $\mu\text{CT}$  analyses, the material was mounted in a plastic sample holder, and the scanning was performed in SkyScan 1172 (Bruker-microCT, Kontich, Belgium). Source voltage and current were 40 kV and 250  $\mu\text{A}$ , respectively, and no filter was applied. Exposure time was 1700 ms, resulting in 2657 slices with 2.06  $\mu\text{m}$  voxel size. To perform the 3D reconstruction and virtual sectioning, the open-source FIJI, a distribution of ImageJ (Schindelin et al. 2012), was used. The Segmentation plug-in was used to create binary masks corresponding to different structures in the seed cone (Schindelin et al. 2012). A detailed description of the image treatment and the three-dimensional reconstructions is given by (Nogueira et al. 2017, 2019; Palombini et al. 2020).

## Results

### Morphology of the Seed Cone development

At the beginning of the winter, the seed cone was in the early stage of development and presented a plagiotropic position in the tree branch (Fig. 1a). The seed cone is composed of the cone axis and bracts that are helically arranged (Fig. 1b, d). The bract presents an ensiform shape in outline and does not have any photosynthetic portion. At this moment, the seed cone was nested and completely covered by the regular leaves.

At the end of the winter, the seed cone started to emerge from the regular leaves and subtending leaves (Fig. 1c), and in the early spring, the seed cone was completely free to



**Fig. 1** Stages of development of *Araucaria angustifolia* seed cone. **a** Regular leaves involve seed cone in the early stage of development. **b** Transversal section of seed cone in the early stage of development showing the cone axis and bracts. **c–e** Stages of seed cone exposure by the regular leaves and subtending leaves. **f** Seed cone in an advanced stage of development. **g** Detail of adaxial view of the bract with a photosynthetic distal portion and a fertile proximal portion. Legend: Regular leaves (rl), cone axis (ca), bracts (br), subtending leaves (sl), distal portion (dp), proximal portion (pp)

receive the pollen grains in the pollination period (Fig. 1d, e).

From the spring to the following spring, the seed cone keeps growing and developing its seed cone structures, preparing for the fertilization event, which occurs 14 months after the pollination period (Fig. 1f). From the pollination onwards, the distal portion of each bract is acuminate and green, and the median and the proximal portion, where the ovule develops, remains non-photosynthetic (Fig. 1g).

Supplementary material 2 indicates the sample dates and the sample size related to the reproductive stages of *A. angustifolia*.

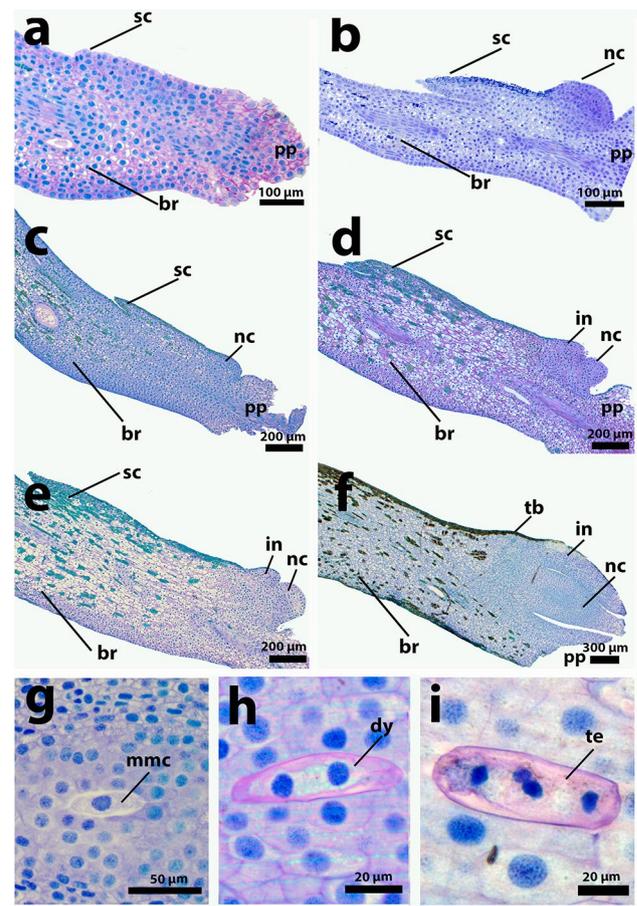
### Ovule and pollen tube anatomy development

In the early spring, the seed scale primordium arose in the adaxial and axillary portion of the bract (Fig. 2a). Right after the seed scale formation, the nucellus primordium emerged in the most proximal portion of the seed scale being oriented along its longitudinal axis (Fig. 2b). At this moment, it was possible to observe that the distal portion of the seed scale is detached from the bract, and its proximal portion is fused to it. Some days later, the seed scale elongated toward the distal portion of the bract (Fig. 2c). Subsequently, the integument primordium arose as a slight bulge evidencing the micropyle orientation toward the cone axis (Fig. 2d). The seed scale and the ovule kept developing in the following weeks and increased in length and width (Fig. 2e).

Within three weeks from the integument formation, the nucellus elongated and protruded through the micropyle towards the cone axis. A third bulge of cells appeared distally to the integument (Fig. 2f). At this moment, the megaspore mother cell (MMC) differentiated within the nucellus, presenting an elongated shape and a central nucleus (Fig. 2g). The first meiotic division occurs, forming the dyad with a thick cell wall, however, no cell cross-wall isolates its nuclei (Fig. 2h). The dyad immediately enters in the second meiotic division producing a coenocytic tetrad of megaspores with a thick and pectic megaspore cell wall and no internal cross-wall isolating these nuclei (Fig. 2i). No callose compound was found in the megaspore wall during megasporogenesis.

Subsequently, the seed cone unit develops even more (Fig. 3a). The nucellus elongates, the same as the megaspore in its interior, and the nucellar cells adjacent to the megaspore appear compressed by its growth. The megaspore presented a dense cytoplasm and bore one prominent and viable nucleus (Fig. 3b) and three degenerative nuclei, which underwent nuclear shrinkage (Fig. 3c).

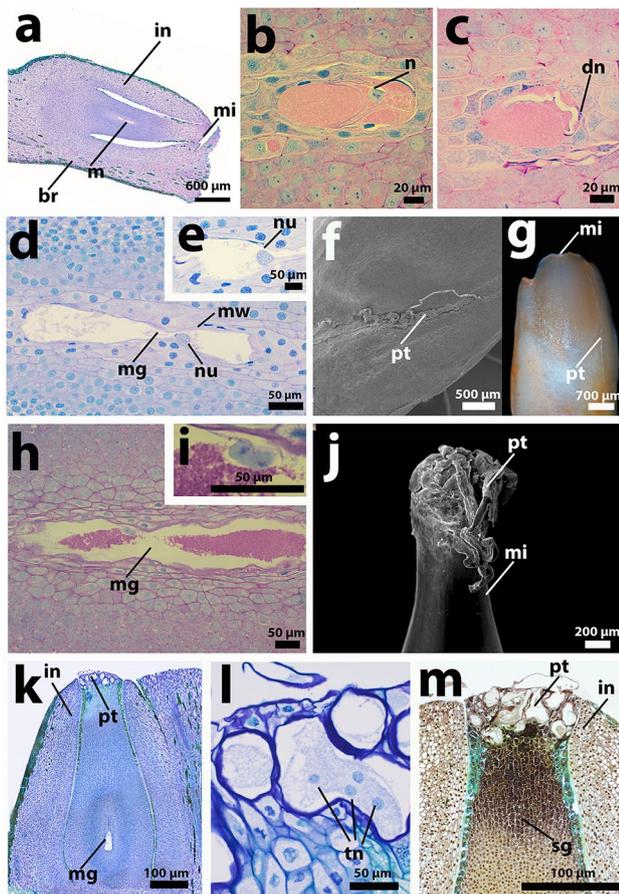
Some days later, the female gametophyte expands and undergoes megagametogenesis presenting four conspicuous nuclei with prominent nucleoli, two at the micropylar position and the other two in the central position. Figure 3d and



**Fig. 2** Longitudinal section of the seed cone unit of *Araucaria angustifolia* and its stages of development in light microscopy. **a** Formation of the seed scale in the proximal portion (pp) of the bract. **b** Nucellus initiation and **c** enlargement of seed scale. **d** Integument formation and **e, f** seed cone unit growth and development of the third bulge (tb). **g** Nucellus with megaspore mother cell (mmc), **h** nucellus with the dyad, and **i** with coenocytic tetrads. Legend: Bract (br), seed scale (sc), nucellus (nc), integument (in), megaspore mother cell (mmc), the dyad (dy), tetrad (te)

e show two of the four nuclei. The female gametophyte wall is thin and stained purple with Toluidine Blue O. During the same period, the pollen tube was visible in the seed cone unit's adaxial face elongating toward the cone axis, straight to the micropyle (Fig. 3f, g). The female gametophyte kept in development, and after two weeks, it bore more than 16 free large nuclei. However, no mitotic divisions were observed. Figure 3h and i show two of the 16 nuclei. At the end of the spring, many pollen tubes penetrated the micropyle (Fig. 3j, k), and each pollen tube contained many nuclei (Fig. 3l). In this stage, the lugol reaction also evidenced the presence of starch grains in the nucellar tip (Fig. 3m).

Throughout the summer, the female gametophyte kept growing and forming hundreds of free nuclei. The nuclei present a conspicuous nucleolus and are inserted in a thin layer of cytoplasm, which reverts the inner wall of the

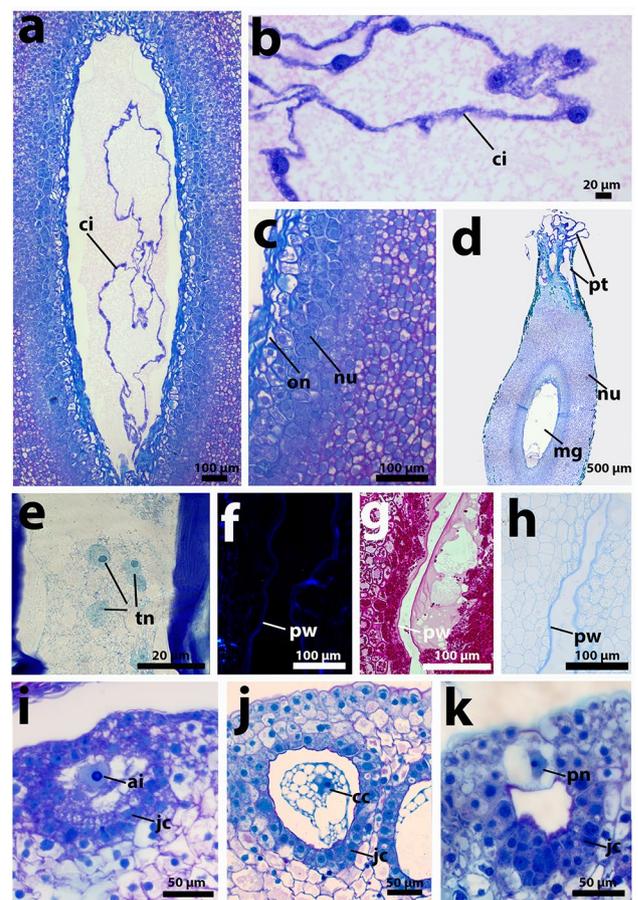


**Fig. 3** Seed cone development of *Araucaria angustifolia* shows the ovule's longitudinal section in light microscopy and pollen tube growth in scanning electron microscopy. **a** Ovule general overview in the megasporogenesis phase. **b** Coenocytic megaspore showing viable nucleus (n) and in **(c)** degenerative nuclei (dn). **d, e** Four-nucleus phase of the megagametophyte (mg), with megaspore wall (mw), nucleus (nu) and in **(e)** second nucleus detail. **(f)** Overview of seed scale adaxial face showing pollen tube growth **(g)** toward micropyle. **h** Coenocytic megagametophyte in 16 nuclei phase and **i** nuclei detail. **j, k** ovule with pollen tubes at the micropyle and **l** pollen tube nuclei (tn) detail. **m** Nucellar tip cells with starch grains. Legend: Megaspore (m), Bract (br), integument (in), micropyle (mi), pollen tube (pt), starch grains (sg)

coenocytic female gametophyte (Fig. 4a, b). The growth of the female gametophyte obliterates the nucellar cells surrounding it. However, the surrounding cells that remain intact present a denser cytoplasm when compared to the other nucellar cells (Fig. 4c).

The pollen tube penetrates deeply toward the female gametophyte (Fig. 4d), and near its tip, there are many nuclei (Fig. 4e). Histochemical tests indicated that the pollen tube wall is compounded by cellulose, polysaccharide, and mucopolysaccharide (Fig. 4 f–h). The pollen tube wall did not stain for callose, acidic polysaccharide, and acidic pectin.

The female gametophyte and the pollen tubes undergo a few changes from the middle of summer to the middle of



**Fig. 4** Longitudinal section of the megagametophyte and pollen tube of *Araucaria angustifolia* in light microscopy. **a** Coenocytic megagametophyte overview, with **b** cytoplasmic layer, and **c** nucellar cells detail. **d** Ovule with deeply inserted pollen tubes and **e** pollen tube tip detail. Histochemical tests in the pollen tube wall (pw) indicated **f** cellulose (Calcofluor White), **g** polysaccharide (Periodic Acid Schiff-PAS), and **h** mucopolysaccharide (Alcian Blue 8GX). **i–k** Different archegonium development phases. **i** Early development shows the archegonial initial cell. The sequential sections of subsequent development indicate **j** the central cell (cc) and **k** the primary neck cell (pn). Legend: Cytoplasmic layer (ci), obliterate nucellar cells (on), nucellar cells (nu), megagametophyte (mg), tube nuclei (tn), jacket cells (jc)

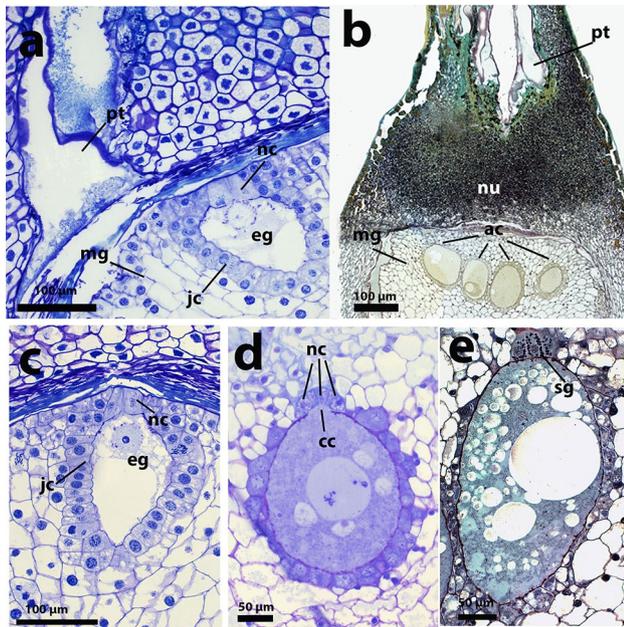
winter of the next year. After this period, the female gametophyte restarts its development and reaches the cellularized phase.

The female gametophyte in the micropylar pole develops about twelve archegonia. At the beginning of the development, the archegonium presents the archegonial initial differentiated at the micropylar end. The female gametophyte cells adjacent to the archegonial initial are differentiated as jacket cells with darkly stained cytoplasm (Fig. 4i). Subsequently, a periclinal division of the archegonial initial forms the central cell (lower cell) (Fig. 4j) and primary neck cell

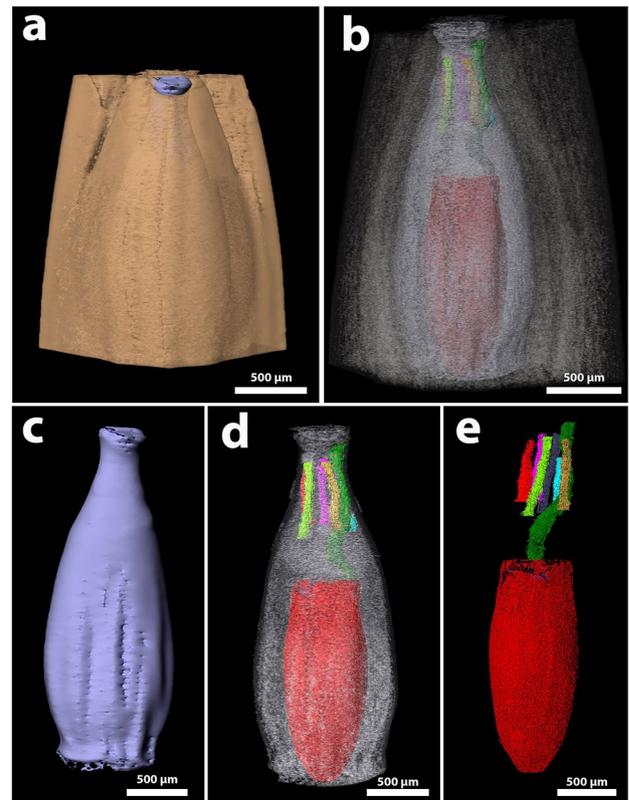
(upper cell) (Fig. 4k). Figure 4j and k represent sequential sections of the archegonium.

In the female gametophyte at maturity (Fig. 5a–c), anticlinal divisions in the primary neck cell form a tier composed of 13 neck cells which form a central channel (Fig. 5d). In this phase, the neck cells and the jacket cells contain large amounts of starch grains in their cytoplasm (Fig. 5e) and the egg cell have already been formed from the central cell (Fig. 5a, c). At this moment, the pollen tube arrives at the female gametophyte, preparing for fertilization (Fig. 5a).

The three-dimensional reconstruction of the ovule shows the elements that were segmented in a way to discern its components: the most external tissue, the integuments, and inside the nucellus (Fig. 6a). The integuments and the nucellus are shown with transparency and are possible see the female gametophyte with several pollen tubes nearby (Fig. 6b). Figure 6c shows the 3D reconstruction of the nucellus, and by the transparency of the nucellus, Fig. 6d shows the perspective of the female gametophyte and the pollen tubes.  $\mu$ CT reconstruction shows that many pollen tubes grow through the nucellar tissue. They border each other, but each presents only one axis that extends straight toward the female gametophyte (Fig. 6e).



**Fig. 5** Longitudinal section of the ovule and archegonia detail of *Araucaria angustifolia* in light microscopy. **a** Pollen tube approach into megagametophyte with mature archegonium. **b** Starch grains detection in nucellar cells next to megagametophyte and archegonium. **c** Mature archegonia showing neck cells, jacket cells, and egg cell. **d** Archegonia with an oblique view of neck cells and central channel. **e** Starch grains detection in the neck cells of archegonium with Lugol. Legend: Pollen tube (pt), megagametophyte (mg), neck cells (nc), jacket cells (jc), egg cell (eg), nucellar cells (nu), archegonium (ac), central channel (cc), starch grains (sg)



**Fig. 6**  $\mu$ CT 3D reconstruction of the ovule of *Araucaria angustifolia*. **a** Lateral view of the ovule with the integument and nucellus. **b** Frontal view of the ovule using integument transparency. Note the nucellus, the megagametophyte (in red), and the micropylar pollen tubes (yellow, orange, green, purple, and pink). **c** Frontal view of the nucellus. **d** Frontal view of the nucellus with transparency. Note the megagametophyte and micropylar pollen tubes. **e** Frontal view of the megagametophyte and the pollen tubes. Legend: integument (pale pink), nucellus (pale purple), megagametophyte (red), pollen tubes (yellow, orange, green, purple, pink, and light blue)

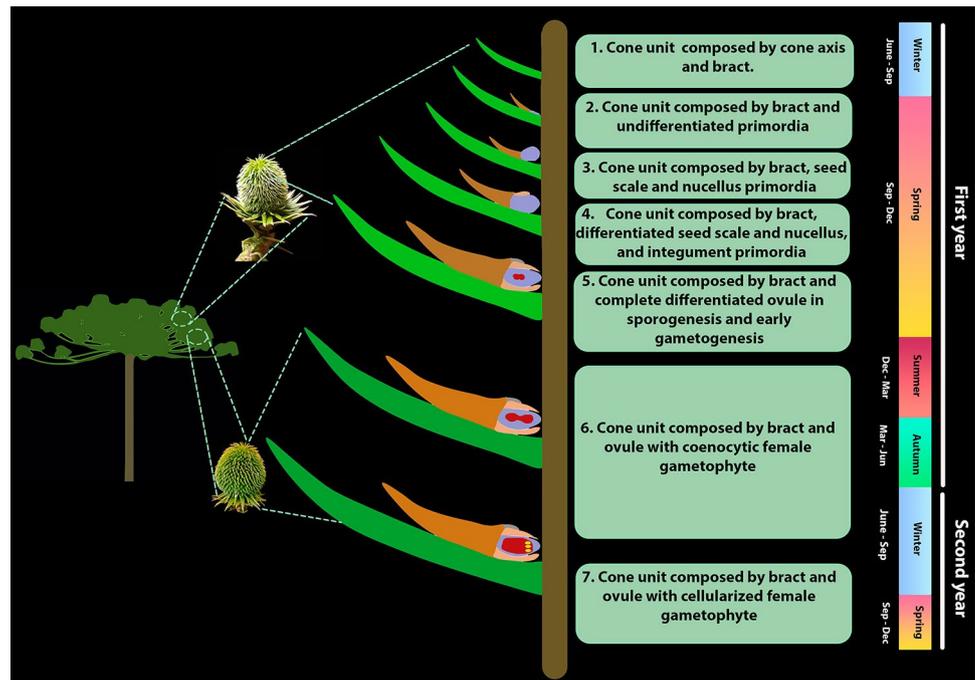
The process from pollination to pre-fertilization takes about fourteen months. In the first and second months, the pollen grains arrive in the seed cone, and the pollen tube germinates. The pollen tubes and unfertilized female gametophyte remain for about 4–5 months in a dormancy period, and after that, it takes about 3–4 months to complete their development (Fig. 7).

## Discussion

### Ovule development

The identification of seed cone structure homology has caused divergence for decades. The conifer seed cone comprises several bract/seed scale complexes (Florin 1954). Although the seed cones of modern conifers present a

**Fig. 7** Seed cone unit development of *Araucaria angustifolia*. The cone unit from 1 to 5 develops in the first year of the reproductive cycle. The cone unit represented from 6 to 7 develop in the second year of the reproductive cycle. Brown: cone axis; Green: bract; Light Brown: seed scale (funiculus); Purple: nucellus; Beige: integument; Grey: third bulge; Red: Female Gametophyte; Yellow: Archegonia



consistent Bauplan (Tomlinson 2012), the fossil records demonstrated a very diverse morphology (Taylor et al. 2009). According to the Florin Model (1931) of the conifer evolution, the seed scale of fossil and extant conifers comprises a stalked ovule, sterile appendages, and a rudimentary axis, which may be fused to different degrees.

Currently, there is a different interpretation of the seed scale homology. The traditional view still rests on the pivotal argument of the Florin Model, interpreting the seed scale as a rudimentary lateral shoot that bears multiples appendages and develops at the axil of the bract, homolog to a leaf (Clement-Westerhof 1989; Rothwell et al. 2011). In recent studies based on ontogenetic, paleobotany, and phylogenetic data, a new model of seed scale evolution was proposed (Herting and Stützel 2020, 2022). This new interpretation points out that the seed scale would not be interpreted as a homolog to a leaf for three main reasons: it does not take into account the seed cone ontogeny of extant conifers, it does not explain the seed cone morphology of all extant conifers and because excluded, originally, species from Taxaceae. Therefore, based on ontogenetic studies with *Araucaria araucana* and comparative development with other conifers, the seed scale should be interpreted as a modified funiculus of the ovule (Herting and Stützel 2020).

Our study demonstrated that in *A. angustifolia*, the bract arises months earlier in the ovule development. In the early spring, the ovule starts its morphogenesis as an axillary structure of the bract in which a group of meristematic cells differentiates firstly the free portion of the seed scale (interpreted as the funicular region of the ovule). Immediately after the seed scale emergence, the nucellus differentiates. In

sequence, these two zones keep growing and differentiating simultaneously.

The seed scale and nucellus development of *A. angustifolia*, identified by the sequential histological section, repeat the pattern described by *A. araucana* (Herting and Stützel 2020) by scanning electron microscopy and endorse the idea that both structures arise from the same primordium being the seed scale a component of the ovule once the whole axillary structure is undifferentiated before the nucellus and integument emerges. The formation of the third bulge of cell observed in *A. angustifolia* during the ovule ontogeny was first described in *A. araucana*, and its enlargement was linked to a change in ovule orientation from the cone apex to the cone axis (Herting and Stützel 2020).

In *Aghatis australis* and *Wollemia nobilis*, the other two genera of Araucariaceae, the ovule presents only one point of attachment to the bract, and the seed scale is not evident (Owens et al. 1995a; Dörken and Rudall 2019). However, it is unclear if the bract and seed scale are completely congenitally fused in those species or if any ontogenetic step has been missed from the seed cone development. In the Podocarpaceae family, also included in Araucariales (Leslie et al. 2018), the ovulate cone bears one or more bracts subtending an axillary epimatium supporting a single adaxial ovule (Tomlinson 1992). According to (Tomlinson 1992), the role of the epimatium is to change the ovule orientation, turning it into an inverted ovule, as in *Araucaria* (Herting and Stützel 2020). Furthermore, regarding the ovule homology in these two families, ontogenetic data infer that the epimatium of Podocarpaceae and the seed scale of Araucariaceae present the same development pattern. Both structures

arise at the axillary portion of the bract, and quickly after its initiation, the nucellus, and the integument emerge. The pattern of development of this structure suggests that seed scale and epimatium are homologous structures (Herting and Stützel 2020; Khan and Hill 2021).

### Megasporogenesis/Megagametogenesis

The nucellus of seed plants corresponds to the megasporangium, in which the megaspore mother cell undergoes meiosis to form megaspores (Williams 2009). In conifers, the nucellus could present one or several archesporial cells, which develop subdermally and divide periclinally to form many parietal cells that overlie the sporogenous cells. The sporogenous cells could divide once or more or develop directly as a megaspore mother cell (Biswas and Johri 1997). The general process of megasporogenesis in conifers describes the formation of tetrads or triads. In the latter case, the upper dyad cell does not undergo meiosis II (Pennell 1989; Biswas and Johri 1997). Different tetrad shapes occurred, such as linear, T-shape, tetrahedral, and isobilateral (Fiordi 1987; Pennell 1989), and in all cases, the functional megaspore is the chalazal one. In *A. angustifolia*, we described a distinct process in which the megaspore mother cells undergo meiosis I and form a coenocytic dyad, and subsequently, meiosis II forms a coenocytic tetrad. After meiosis, three nuclei degenerate, and only one acts as a megaspore to originate a female gametophyte with monosporic origin. The nuclear degeneration process in the megasporogenesis of plants is conducted by programmed cell death, which plays a significant role in forming the female gametophyte (Doronina et al. 2020). In *Zea mays*, the deaths of three megaspores are accompanied by aggregation of heterochromatin at the nucleus periphery and discharge of the plasmalemma from the cell wall (Russel 1979; Doronina et al. 2020). The causes that determine the fate of these cells have been poorly studied. In *Arabidopsis*, mutant plants with inactivated ICK/KRPs (interactor/inhibitor of cyclin-dependent kinase (CDK)/Kip-related proteins) genes that are CDK inhibitors, and cell cycle regulators, more than one megaspore mother cell and functional megaspore were developed. Besides, the authors show that a positional signal and more than one ICK protein may occur, selecting the functional megaspore (Cao et al. 2018). In *A. angustifolia*, right after meiosis II was completed, three pycnotic nuclei showed shrinking, compacting cell nuclei and peripheric position on the tetrad. Conversely, the viable nuclei presented two nucleoli indicating nuclear activity, as described for functional nuclei (Shaw and Brown 2012).

The meiotic stages have not been observed in any other Araucariaceae species, and in the closed-related family Podocarpaceae, no evidence of coenocytic tetrads was described. Instead, the authors showed the formation of a

linear tetrad of megaspores in four species of *Podocarpus* (Del Fueyo 1999; Wilson and Owens 1999). In conifers, the formation of a coenocytic tetrad was only found in *Cupressus sempervirens*. However, in this species, the female gametophyte is tetrasporic, given that the four nuclei contribute to female gametophyte formation (El Maâtaoui et al. 1998; El Maâtaoui and Pichot 1999). Regarding other gymnosperms, the classic literature only describes the occurrence of a tetrasporic female gametophyte in two genera of Gnetales, *Welwitschia* (Biswas and Johri 1997; Friedman 2015) and *Gnetum* (Carmichael and Friedman 1996). In *Welwitschia*, the observation of a coenocytic tetrad led the authors to conclude the tetrasporic origin of the female gametophyte, and no degenerative megaspores were described (Friedman 2015). Hence, although these two genera share many sexual reproduction aspects that differ from *Ephedra* and other gymnosperms, the megasporogenesis process in seed plants is likely much more variable than has been thought.

Our study also identified a thick cell wall with pectic compounds and no signal of callose compound in the megaspore mother cell. This same pattern of the cell wall was observed until the end of the meiosis on the megaspore tetrad. In the same way, the ultrastructure analysis of the megaspore of *Ginkgo biloba* demonstrated a thick and complex cell wall that presents a conspicuous middle lamella, a primary wall similar to the other ordinary cells, and an inner cell layer resembling the structure of the middle lamella (Stewart and Gifford 1967). The thickening cell wall of the megaspore is a general character of gymnosperms, which allows the cytoplasm to isolate itself to accomplish meiosis. Although the thick structure is constant between species, the cell wall composition may differ. In species that present callose wall deposits, the megaspore mother cells show this material for a short moment, however, this compound disappears quickly after meiosis (Fiordi 1987). Callose isolates the viable megaspore from the degenerative ones, providing its vital activity to initiate female gametophyte development. Since *A. angustifolia* doesn't present cell walls isolating each megaspore within the tetrad, the ultrastructure analysis of megaspore development could provide the mechanism for functional megaspore selection.

A key event in the seed's evolution was the formation of the megaspores inside the ovule (Williams 2009). In the reproductive development of seed plants, the functional megaspore gives rise to a female gametophyte inside the ovule through multiple mitotic cycles. The conifer female gametophyte must move through several well-defined stages before it reaches maturity: free nuclear stage, cellularization stage, and cellular growth stage (Maheshwari and Singh 1967). Our study described the first steps of the free nucleus and cellular growth stages, including archegonium formation. In *A. angustifolia*, the first mitotic divisions of the female gametophyte development produced conspicuous

nuclei organized dispersedly. Some weeks later, hundreds of nuclei were formed, presenting compacted chromatin and organizing in a thin layer of cytoplasm that reverts the inner wall of the coenocytic female gametophyte. This development pattern was also described for many gymnosperms, which showed a large central vacuole that maintains the scanty cytoplasm at the female gametophyte periphery (Konar and Moitra 1980). After the coenocytic phase, the cellularization phase takes place. This phase is marked by alveolar growth in gymnosperms, except in *Gnetum* and *Welwitschia* (Maheshwari and Singh 1967). Because the alveoli present a specific development pattern, it is regarded as a fossil fingerprint (Rudall and Bateman 2019).

Except for angiosperms, *Gnetum*, and *Welwitschia*, all female gametophytes form archegonia, and according to Sokoloff and Remizowa (2021), this sexual organ presents a commonly developed motif called the “t-shape” pattern. Our data show that the archegonium of *A. angustifolia* presents the t-shape pattern once the first division of the archegonial initial is horizontal and the primary neck cell (upper cell) divides (vertically). The archegonium is a multicellular and three-dimensional organ that presents a precisely regulated cellular division in each plant group. Detailed studies on the ontogeny of this organ may help to understand the homologies of archegonium and embryo sac and may solve many questions about land plant evolution.

In the archegonium development of *A. angustifolia* described here, the ventral canal cell was not observed. In the same way, Burlingame (1914) didn't notice this cell in *A. angustifolia*, and the ventral canal cell of *Aghatis*, which also belongs to Araucariaceae, was described as an ephemeral cell (Eames 1913). However, Owens et al. (1995a) identified a persistent ventral canal nucleus in *A. australis* (Owens et al. 1995a). The occurrence of ventral canal cells in other conifers, such as Podocarpaceae, is usually observed (Maheshwari and Singh 1967), as well as in *Pinus* and *Abies* (Sokoloff and Remizowa 2021). Still, Biswas and Johri (1997) point out questions about the regular formation of this cell in *Taxus canadensis*. Therefore, it is likely that for many conifers, the ventral canal cell presents an ephemeral behavior instead its complete absence, and probably the division of the central cell was missed in our study.

The number and arrangement of the neck cells of gymnosperms vary between plant lineages. In siphonogamous groups, such as conifers and *Ephedra*, the neck cells' configurations seem even more plastic once these sets of cells play a role in pollen tube reception (Sokoloff and Remizowa 2021). The necks cells of *A. angustifolia* are organized in one tier of 13 cells, which present a significant amount of starch grains at maturity. *A. australis*, even though jack cells and the egg cell present starch, this substance wasn't found in the neck cells' cytoplasm (Owens et al. 1995b). In angiosperms, the pistil offers support and controls pollen tube

growth. Therefore, the presence of starch in the neck cells of *Araucaria* agrees with the idea that the female gametophyte neck of conifers and *Ephedra* operates like angiosperm pollen-tube transmitting tissue (Sokoloff and Remizowa 2021).

### Pollen tube growth in nucellar tissue

In gymnosperms, the usual pollination mechanism occurs when the pollen is carried through the micropyle and then to the nucellus by the pollination drops (Rudall and Bateman 2007). In most of the conifers, the pollen grains germinate inside the ovule (Owens et al. 1995a), where it is hydrated, making the exine burst, allowing the projection of the intine, which will establish the pollen tube (Singh 1978; Owens et al. 1998; Fernando et al. 2010). Differently, in Araucariaceae as well as many *Tsuga* (Pinaceae) and *Saxegothaea* (Podocarpaceae) species, the pollen grain germinates extra-ovulatory (Singh 1978; Owens et al. 1998; Owens and Bruns 2000; Fernando et al. 2005). In *A. angustifolia*, pollen grains laid on the ovuliferous scales germinate and grow toward the seed cone axis to reach the micropyle. Over this pathway, the pollen tube doesn't branch as Konar and Oberoi (1969) suggested for *Araucaria* and *Agathis*.

Owens et al. (1995b) showed that the pollen grain of *A. australis* has a delay of about one to two months between the landing of the pollen on the scales until its germination, and this time is like our results. The delay in the pollen tube emission through the scale probably occurs due to the hydration of the pollen grains on the scale of the seed cone instead on the nucellus. This pollination mechanism highlights the close relationship between favorable climatic conditions to successful germination.

In Cycadales and Ginkgoales, the pollen tube is exclusively a vegetative structure and does not conduct the sperm cells to the egg cell (Rudall and Bateman 2007). The vegetative role of the pollen tube in these plants is linked with its haustorial behavior, which shows many branches in their pollen tubes while it is developing through the nucellus cells (Johri 1992). In conifers and Gnetales, pollen tubes display a siphonogamic role (Fernando et al. 2005). However, Pinaceae pollen tubes have been shown to branch (Dawkins and Owens 1993; Hiratsuka and Terasaka 2011). In those cases, the multiple branches observed in the pollen tube play a haustorial role, while the main branch, which holds the reproductive cells lineage, is siphonogamic (Hiratsuka and Terasaka 2011). Within Araucariaceae, pollen tube branches have also been described in *Aghatis* (Owens et al. 1995a, b) and *Araucaria* (Burlingame 1913, 1915). Indeed, in our study, the pollen tube histologic serial section analyses lead to a misunderstanding of this structure once many tubes border each other in nucellar tissue. Through the three-dimensional reconstruction, we reevaluate the pollen tube growth of *A. angustifolia*, demonstrating that it doesn't

branch at nucellar tissue and evidences its straight trajectory toward the female gametophyte. The pollen tube behavior of *A. angustifolia* strengthens the idea that this structure has a primarily siphonogamic role. However, because the sperm cells do not form until 12 months after pollen germination, the pollen tube still performs a haustorial role. Therefore, the pollen tube growth in *A. angustifolia* differs from *Agathis*, highlighting a new pattern of growth in Araucariaceae. The analysis of pollen tube growth in other conifer species, especially Araucariaceae, may help to understand how this structure evolved in this family and conifers.

The pollen tube wall chemical composition in gymnosperms markedly differs from angiosperms, and specific pollen tube chemical composition patterns presented in different seed plant lineages may have taxonomic value (Yatomi et al. 2002). The pollen tube of *A. angustifolia* shows the same chemical composition as the intine of mature pollen grains, as Kuhn et al. (2014) described, and slight differences were observed regards other gymnosperms. In *A. angustifolia*, the pollen tube wall has a homogeneous distribution of cellulose in all its extensions, as observed in *Picea abies* (Lazzaro et al. 2003). In a different way, calcofluor labeling in *Picea wilsonii* (Sheng et al. 2006) and *Pinus sylvestris* pollen tubes showed a lower density of cellulose microfibers at the tube apex (Derksen et al. 1999). The pollen tube of *Cycas revoluta*, *Ginkgo biloba*, and 12 conifers species (representing four families) was stained with ruthenium red (Yatomi et al. 2002). Although the authors indicate that pectin content seems very rare in conifers species analyzed in this study, these data differ from *A. angustifolia* that do not stain with ruthenium red. The occurrence of callose, stained by aniline blue, in tube wall also varies between conifers. The absence of callose was highlighted in our data and most conifers studied by (Yatomi et al. 2002). Derksen et al. (1999) described the presence of callose in young parts of the pollen tube in *Pinus sylvestris*, and (Chichiricò et al. 2009) detected this substance in the side of the pollen tube continuous to the intine.

Along its extension, the pollen tube wall composition of Gymnosperms is relatively homogeneous compared to Angiosperms, and this feature seems to be related to the slow growth of its pollen tube (Wallace and Williams 2017). On the other hand, the specific distribution pattern of callose and pectins in the pollen tube wall of Angiosperms is an essential trait to the fast growth of its pollen tube (Chebli et al. 2012).

The Angiosperms pollen tube presents a primary pectocellulosic layer and a secondary callosic wall (Heslop-Harrison 1987). The callose wall is distributed on the pollen tube shank conferring resistance to tensile and compression stress (Parre and Geitmann 2005a). In contrast, the pectins present a gradient of apical esterified to distal de-esterified pectins, which provide, from the tip to the

shank, an increase in the degree of cell wall rigidity and a decrease of visco-elasticity (Parre and Geitmann 2005b). The fast-growing pollen tube of Angiosperms, which greatly accelerate the fertilization process, is an important innovation in seed plants associated with the origin of the flowering plants (Wallace and Williams 2017).

The histochemical analysis made during the development of the reproductive structures in *A. angustifolia* demonstrated that synthesizing stored substances in nucellar cells is associated with pollen tube growth. Many studies have already revealed the presence of starch grains in the nucellar cells of gymnosperms. The mechanism of pollen tube intrusion was also associated with pollen tube in stelar transmitting tissue of angiosperm (e.g., Jensen and Fisher 1968). According to (Hiratsuka et al. 2002), the starch synthesis in the nucellus is spurred by pollination in *Pinus densiflora*; however, the pollen tubes gradually consume the starch grains by means of programmed cell death (PCD).

Conifers present a high diversity regards their pollination mechanism, and such range reflects in different traits of pollen morphology, seed cone morphology, and ovule structure (Owens et al. 1998). In some lineages, the pollen germination occurs right after its arrival in the ovule, while in others, the germination is postponed for weeks or months (Williams 2009). The period between pollen germination and fertilization also presents variation, which could extend for weeks or even months (Williams 2009). In *A. angustifolia*, fertilization occurred 14 months after pollination, emphasizing the long-time reproductive cycle of this species.

Using several bioimaging techniques, we presented ontogenetic events of seed cone development in *A. angustifolia*. We reported updates for the reproductive biology knowledge of this species from the ovule formation until pre-fertilization. Our observations show that the seed scale is born in the same primordium of the ovule, agreeing that this structure is part of the ovule itself and should be interpreted as the modified funiculus of the ovule. Along the ovule ontogeny, the formation of a coenocytic tetrad and the formation of the female gametophyte with monosporic origin was demonstrated. This process highlights a distinct pattern of female gametophyte origin that was never noticed in conifers. Besides, the three-dimensional reconstruction of the ovule revealed the presence of many pollen tubes growing in the nucellus. They border each other but have only one axis that extends straight toward the female gametophyte, performing a primarily siphonogamic role. The pollen tube growth in *A. angustifolia* differs from *Agathis*, highlighting a new growth pattern in Araucariaceae.

**Author contribution statement** SAK designed the study. SAK and FMN wrote the manuscript. SAK and TS acquired the light microscopy images. SAK acquired the scanning

electron microscopy images. FMN performed the microcomputed tomography analysis. TS and JEAM contributed to the writing and revision of the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## Glossary

Archegonium	The reproductive structure of the multicellular female gametophyte that produces the egg cell.
Seed cone	The compound reproductive structure of conifers in which each unit produces one or more ovules.
Seed cone unit	Composed of a bract and all axillary structures (Herting and Stutzel 2022).
Seed Scale	A single or multiple structures axillary to a bract and all axillary structures (Herting and Stutzel 2022).
Siphonogamy	Oriented growth of the pollen tube to the female gametophyte. Sperm cells are not motile in lineages with this type of growth.
Coenocyte	Cell with several nuclei without division of the cytoplasm.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00497-023-00473-8>.

**Acknowledgements** The authors are grateful to the Laboratório de Anatomia Vegetal at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LAVeg, UFRGS) and the Laboratório de Física Nuclear Aplicada at Universidade Estadual de Londrina (UEL) for technical support. The authors thank the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), which sponsored grants to FMN (Number 151156/2022-0), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 001. The authors also thank the anonymous reviewers for contributing to the improvement of this work.

**Funding** The authors thank the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), which sponsored grants to FMN (Number 151156/2022-0), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 001.

**Data availability** All data generated and analyzed during this study are included in this article.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest within this article.

**Ethical approval** Not applicable.

**Consent to participate** All authors have seen and agreed with the content of this article. All authors agree with the publication of this manuscript.

## References

- Adelar Mantovani L, Morellato PC, dos Reis MS (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Rev Bras Bot*. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000400017>
- Baillie J, Hilton-Taylor C, Stuart S (2004) A global species assessment IUCN. IUCN Publications Services, Cambridge
- Biswas C, Johri BM (1997) The gymnosperms. Springer, Berlin Heidelberg
- Breygina M, Klimenko E, Schekaleva O (2021) Pollen germination and pollen tube growth in gymnosperms. *Plants* 10:1301. <https://doi.org/10.3390/plants10071301>
- Burlingame LL (1913) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. I. The staminate cone and male gametophyte. *Bot Gaz* 55:97–114. <https://doi.org/10.1086/331002>
- Burlingame LL (1914) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. II. The ovulate cone and female gametophyte. *Bot Gaz* 57:490–508. <https://doi.org/10.1086/331344>
- Burlingame LL (1915) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Fertilization, the embryo, and the seed. *Bot Gaz* 59:1–39. <https://doi.org/10.1086/331466>
- Cao L, Wang S, Venglat P et al (2018) *Arabidopsis* ICK/KRP cyclin-dependent kinase inhibitors function to ensure the formation of one megaspore mother cell and one functional megaspore per ovule. *PLOS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007230>
- Carmichael JS, Friedman WE (1996) Double fertilization in *Gnetum gnemon* (Gnetaceae): its bearing on the evolution of sexual reproduction within the Gnetales and the anthophyte clade. *Am J Bot* 83:767–780. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12766.x>
- Chebli Y, Kaneda M, Zerkour R, Geitmann A (2012) The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube—spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides. *Plant Physiol* 160:1940–1955. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199729>
- Chichiriccò G, Spanò L, Torraca G, Tartarini A (2009) Hydration, sporoderm breaking and germination of *Cupressus arizonica* pollen. *Plant Biol* 11:359–368. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00134.x>
- Clement-Westerhof J (1989) Morphology and phylogeny of Paleozoic conifers. Columbia University Press, New York
- Dawkins MD, Owens JN (1993) In vitro and in vivo pollen hydration, germination, and pollen-tube growth in white spruce, *Picea glauca* (Moench) voss. *Int J Plant Sci* 154:506–521. <https://doi.org/10.1086/297134>
- Del Fueyo GM (1999) Cone and ovule development in the *Podocarpus* species from Argentina. *Phytomorphology* 49:49–60
- Derksen J, Li Y, Knuiman B, Geurts H (1999) The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes. *Protoplasma* 208:26–36. <https://doi.org/10.1007/BF01279072>
- Dettmann ME, Clifford HT (2005) Biogeography of araucariaceae. Australia and New Zealand forest histories: Araucarian forests. Australian forest history society Inc. *Occas Publ* 2:1–9
- Dörken VM, Rudall PJ (2019) Structure and abnormalities in cones of the *Wollemi* pine (*Wollemia nobilis*). *Kew Bull* 74:3. <https://doi.org/10.1007/s12225-018-9789-7>
- Doronina TV, Sheval EV, Lazareva EM (2020) Programmed cell death during formation of the embryo sac and seed. *Russ J Dev Biol* 51:135–147. <https://doi.org/10.1134/S1062360420030029>
- Eames AJ (1913) The morphology of *Agathis australis*. *Ann Bot* 27:1–38
- El Maâtaoui M, Pichot C (1999) Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L. *Planta* 208:345–351. <https://doi.org/10.1007/s004250050568>

- El Maâtaoui M, Pichot C, Alzubi H, Grimaud N (1998) Cytological basis for a tetraspory in *Cupressus sempervirens* L. megagametogenesis and its implications in genetic studies. *Theor Appl Genet* 96:776–779. <https://doi.org/10.1007/s001220050801>
- Escapa IH, Catalano SA (2013) Phylogenetic analysis of Araucariaceae: integrating molecules, morphology, and fossils. *Int J Plant Sci* 174:1153–1170. <https://doi.org/10.1086/672369>
- Farjon A (2010) A handbook of the world's conifers (vol 1). Brill. <https://doi.org/10.1163/9789047430629>
- Farjon A (2017) A handbook of the world's conifers (2 vols.). Brill. <https://doi.org/10.1163/9789004324510>
- Fernando DD, Lazzaro MD, Owens JN (2005) Growth and development of conifer pollen tubes. *Sex Plant Reprod* 18:149–162. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0008-y>
- Fernando DD, Quinn CR, Brenner ED, Owens JN (2010) Male gametophyte development and evolution in extant gymnosperms. *Int J Plant Dev Biol* 4:47–63
- Fiordi AC (1987) Megasporogenesis in gymnosperms: aspects of the cytoplasm and the cell walls. *Atti Della Società Toscana Di Scienze Naturali, Memorie, Serie B* 94:163–179
- Florin R (1931) Untersuchungen zur stammesgeschichte der coniferales und cordaitales, 1st edn. Almqvist & Wiksells Boktryckeri, Stockholm
- Florin R (1954) The Female reproductive organs of conifers and taxads. *Biol Rev* 29:367–389. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1954.tb01515.x>
- Friedman WE (2015) Development and evolution of the female gametophyte and fertilization process in *Welwitschia mirabilis* (Welwitschiaceae). *Am J Bot* 102:312–324. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400472>
- Gabriel BL (1982) Biological electron microscopy. Wiley, Hoboken
- Gerrienne P, Meyer-Berthaud B, Fairon-Demaret M et al (2004) Run-caria, a middle devonian seed plant precursor. *Science* 306:856–858. <https://doi.org/10.1126/science.1102491>
- Gerrits PO, Smid L (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J Microsc* 132:81–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04711.x>
- Gersterberger P, Leins P (1978) Rasterelektronenmikroskopische untersuchungen an blütenknospen von physalis philadelphica (*Solanaceae*) anwendung einer neuen präparationsmethode. *Ber Dtsch Bot Ges* 91:381–387
- Gleiser G, Speziale KL, Lambertucci SA et al (2019) Uncoupled evolution of male and female cone sizes in an ancient conifer lineage. *Int J Plant Sci* 180:72–80. <https://doi.org/10.1086/700580>
- Goeten D, Rogge-Renner GD, Schmidt ÉC et al (2020) Updating embryonic ontogenesis in *Araucaria angustifolia*: from Burlingame (1915) to the present. *Protoplasma* 257:931–948. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01481-5>
- Haines R, Prakash N, Nikles D (1984) Pollination in *Araucaria* Juss. *Aust J Bot* 32:583. <https://doi.org/10.1071/BT9840583>
- Herting J, Stützel T (2020) Morphogenesis of the seed cone of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and the evolution of the coniferous seed scale. *Flora* 273:151719. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151719>
- Herting J, Stützel T (2022) Evolution of the coniferous seed scale. *Ann Bot* 129:753–760. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab154>
- Heslop-Harrison J (1987) Pollen germination and pollen tube growth. In: Bourne GH, Jeon KW, Friedlander M (eds) International review of cytology, vol 107. Elsevier, Netherlands, pp 1–78
- Hiratsuka R, Terasaka O (2011) Pollen tube reuses intracellular components of nucellar cells undergoing programmed cell death in *Pinus densiflora*. *Protoplasma* 248:339–351. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0176-y>
- Hiratsuka R, Yamada Y, Terasaka O (2002) Programmed cell death of *Pinus nucellus* in response to pollen tube penetration. *J Plant Res* 115:141–148. <https://doi.org/10.1007/s102650200019>
- Hughes J, McCully ME (1975) The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technol* 50:319–329. <https://doi.org/10.3109/10520297509117082>
- IBAMA (1992) Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção: Portaria nº, 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)
- Jensen WA, Fisher DB (1968) Cotton embryogenesis: the tissues of the stigma and style and their relation to the pollen tube. *Planta* 84:97–121. <https://doi.org/10.1007/BF00398389>
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, London
- Johri BM (1992) Haustorial role of pollen tubes. *Ann Bot* 70:471–475. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088504>
- Khan R, Hill RS (2021) Morpho-anatomical affinities and evolutionary relationships of three paleoendemic podocarp genera based on seed cone traits. *Ann Bot* 128:887–902. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab113>
- Koch Z, Corrêa MC (2002) Araucária: a floresta do Brasil meridional. Olhar Brasileiro, Curitiba
- Konar RN, Moitra A (1980) Ultrastructure, cyto- and histochemistry of female gametophyte of gymnosperms. *Gamete Res* 3:67–97. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120030108>
- Konar RN, Oberoi YP (1969) Recent work on reproductive structures of living conifers and taxads—a review. *Bot Rev* 35:89–116. <https://doi.org/10.1007/BF02858911>
- Kuhn SA, de Mariath JE, A, (2014) Reproductive biology of the “Brazilian pine” (*Araucaria angustifolia*—Araucariaceae): development of microspores and microgametophytes. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 209:290–298. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.02.009>
- Lazzaro MD, Donohue JM, Soodavar FM (2003) Disruption of cellulose synthesis by isoxaben causes tip swelling and disorganizes cortical microtubules in elongating conifer pollen tubes. *Protoplasma* 220:201–207. <https://doi.org/10.1007/s00709-002-0042-7>
- Leslie AB (2011) Shifting functional roles and the evolution of conifer pollen-producing and seed-producing cones. *Paleobiology* 37:587–602. <https://doi.org/10.1666/10049.1>
- Leslie AB, Beaulieu J, Holman G et al (2018) An overview of extant conifer evolution from the perspective of the fossil record. *Am J Bot* 105:1531–1544. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1143>
- Lillie RD (1965) Histopathologic technic and practical histochemistry. McGraw-Hill Book Company, New York
- Maheshwari P, Singh H (1967) The female gametophyte of gymnosperms. *Biol Rev* 42:88–129. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1967.tb01341.x>
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34:125–128. <https://doi.org/10.3109/10520295909114663>
- McDowell EM, Trump BF (1976) Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 100:405–414
- Miller CN (1999) Implications of fossil conifers for the phylogenetic relationships of living families. *Bot Rev* 65:239–277. <https://doi.org/10.1007/BF02857631>
- Nogueira FM, Kuhn SA, Palombini FL et al (2017) Tank-inflorescence in *Nidularium innocentii* (Bromeliaceae): three-dimensional model and development. *Bot J Linn Soc* 185:413–424. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box059>
- Nogueira FM, Palombini FL, Kuhn SA et al (2019) Heat transfer in the tank-inflorescence of *Nidularium innocentii* (Bromeliaceae): experimental and finite element analysis based on X-ray

- microtomography. *Micron* 124:102714. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102714>
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods
- Owens JN, Bruns D (2000) Western white pine (*Pinus monticola* Dougl.) reproduction: I Gametophyte development. *Sex Plant Reprod* 13:61–74. <https://doi.org/10.1007/s004970000042>
- Owens JN, Catalano GL, Morris SJ, Aitken-Christie J (1995a) The reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). I. Pollination and prefertilization development. *Int J Plant Sci* 156:257–269. <https://doi.org/10.1086/297248>
- Owens JN, Catalano GL, Morris SJ, Aitken-Christie J (1995b) The reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). II. Male gametes, fertilization, and cytoplasmic inheritance. *Int J Plant Sci* 156:404–416. <https://doi.org/10.1086/297262>
- Owens JN, Takaso T, Runions CJ (1998) Pollination in conifers. *Trends Plant Sci* 3:479–485. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01337-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01337-5)
- Palombini FL, Nogueira FM, Kindlein W et al (2020) Biomimetic systems and design in the 3D characterization of the complex vascular system of bamboo node based on X-ray microtomography and finite element analysis. *J Mater Res* 35:842–854. <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.117>
- Panti C, Pujana RR, Zamaloa MC, Romero EJ (2012) Araucariaceae macrofossil record from South America and Antarctica. *Alcheringa Australas J Palaeontol* 36:1–22. <https://doi.org/10.1080/03115518.2011.564562>
- Parre E, Geitmann A (2005a) More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol* 137:274–286. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050773>
- Parre E, Geitmann A (2005b) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta* 220:582–592. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1368-5>
- Pennell RI (1989) Sporogenesis in conifers. In: Callow JA (ed) *Advances in botanical research*. Academic Press, Cambridge, pp 179–196
- Ran J-H, Shen T-T, Wang M-M, Wang X-Q (2018) Phylogenomics resolves the deep phylogeny of seed plants and indicates partial convergent or homoplastic evolution between Gnetales and angiosperms. *Proc R Soc B Biol Sci* 285:20181012. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1012>
- Rothwell GW, Stockey RA, Mapes G, Hilton J (2011) Structure and relationships of the Jurassic conifer seed cone *Hughmillerites judicii* gen. et comb. nov.: implications for the origin and evolution of Cupressaceae. *Rev Palaeobot Palynol* 164:45–59. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2010.11.004>
- Rudall PJ, Bateman RM (2007) Developmental bases for key innovations in the seed-plant microgametophyte. *Trends Plant Sci* 12:317–326. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.004>
- Rudall PJ, Bateman RM (2019) Coenocytic growth phases in land plant development: a paleo-evo-devo perspective. *Int J Plant Sci* 180:607–622. <https://doi.org/10.1086/702758>
- Russel SD (1979) Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Can J Bot* 57:1093–1110
- Sass J (1951) Botanical microtechnique. The Iowa State College, Iowa
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shaw P, Brown J (2012) Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol* 158:44–51. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188052>
- Sheng X, Hu Z, Lü H et al (2006) Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components. *Plant Physiol* 141:1578–1590. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081703>
- Singh H (1978) Embryology of gymnosperms: Gebrüder Borntraeger
- Sokoloff DD, Remizowa MV (2021) Diversity, development and evolution of archegonia in land plants. *Bot J Linn Soc* 195:380–419. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa077>
- Stewart KD, Gifford EM (1967) Ultrastructure of the developing megaspore mother cell of *Ginkgo biloba*. *Am J Bot* 54:375–383. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1967.tb06932.x>
- Taylor EL, Taylor TN, Krings M (2009) *Paleobotany: the biology and evolution of fossil plants*. Academic Press, Cambridge
- Tomlinson PB (1992) Aspects of cone morphology and development in *Podocarpaceae* (Coniferales). *Int J Plant Sci* 153:572–588. <https://doi.org/10.1086/297081>
- Tomlinson PB (2012) Rescuing Robert Brown—the origins of angiosperm ovules in seed cones of conifers. *Bot Rev* 78:310–334. <https://doi.org/10.1007/s12229-012-9104-5>
- Wallace S, Williams JH (2017) Evolutionary origins of pectin methyl-esterase genes associated with novel aspects of angiosperm pollen tube walls. *Biochem Biophys Res Commun* 487:509–516. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.027>
- Williams CG (2009) *Conifer reproductive biology*. Springer, Netherlands, Dordrecht
- Wilson VR, Owens JN (1999) The reproductive biology of totara (*Podocarpus totara*) (*Podocarpaceae*). *Ann Bot* 83:401–411. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0836>
- Yatomi R, Nakamura S, Nakamura N (2002) Immunochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of gymnosperms. *Grana* 41:21–28. <https://doi.org/10.1080/00173130260045468>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.