



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



**Anatomia comparada da antera de espécies de
Passiflora L. (Passifloraceae)
do Rio Grande do Sul**

Dissertação de Mestrado

Greta Aline Dettke

Porto Alegre

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



**Anatomia comparada da antera de espécies de
Passiflora L. (Passifloraceae)
do Rio Grande do Sul**

Greta Aline Dettke

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos

Porto Alegre

2009

"... basta ser sincero e desejar profundo..."

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por todas as bênçãos neste período de trabalho.

Aos meus pais, irmãos e avô, que mesmo à distância, sempre apoiaram e confiaram nas minhas decisões. Ao meu irmão, Renan Theodor, pela confecção dos esquemas dos grãos de pólen.

Nestes dois anos em Porto Alegre conheci muitas pessoas, cada qual deixou um pouco de si e com certeza auxiliaram muito no meu crescimento pessoal, profissional e na elaboração deste trabalho, algumas das quais não se poderia deixar sem registro:

Ao Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos pela orientação, confiança e disponibilidade em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath e à Prof. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti, pelos conhecimentos compartilhados, pela excelente recepção no LAVeg e por serem exemplos de profissionais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, seus coordenadores e professores, por me proporcionarem a oportunidade de sempre aprender mais e ampliar meus horizontes.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dra. Maria Luisa Lorscheitter, Prof. Dr. Alfredo Elio Coccuci e Prof. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti, escolhidos pela enorme admiração que tenho, agradeço a disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos meus queridos amigos e companheiros do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg), Natividade Ferreira Fagundes, Aline Tonin, Juliana Troiles, Carla de Pelegrin, Fernanda dos Santos Silva, Anelise Hertzog, Érica Giani, Raquel Magalhães, Marc Emerim, Denise Klein, Daniele Munareto Rodrigues, Adriana Braum, Denise Dell'Aglio, Jaqueline Sartori, Adriano Silvério e Érica Duarte, por me proporcionarem uma segunda casa, pelas discussões, pelo companheirismo, amizade e apoio em todos os momentos, meu MUITO OBRIGADA!

Aos amigos de campo, Priscila Porto Alegre Ferreira, Luís Fernando Paiva Lima, Verônica Thode, Ana Claudia Fernandes, Natividade Ferreira Fagundes, Juliana Troiles, Jaqueline Durigon, Prof. Rodrigo Singer, Prof. Rosana Farias Singer, Prof. Rosa Mara Silveira, Prof. Mara Ritter, Prof. Luís Rios Baptista; na certeza de que muitas outras virão. E aos demais amigos da pós pelos bons momentos.

Ao querido amigo Luís Fernando Paiva Lima, agradeço a disposição, desde o início deste trabalho, em sempre me ajudar nas atividades de campo, na localização e coletas das passifloras, pelas viagens e boas conversas e risadas.

Ao grande Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher, pela disponibilidade em ceder sua propriedade em Guaíba para a coleta de várias espécies de *Passiflora* utilizadas neste trabalho (*P. caerulea*, *P. elegans*, *P. suberosa* e *P. misera*) e por referências sobre o grupo.

Ao Prof. Dr. Gilson Moreira, do Departamento de Zoologia, pelo apoio no estudo das passifloras.

À Profa. Dra. Solange Kerpel, pelo envio de material de *Passiflora morifolia*.

À amiga Andréia Pacheco Evaldt, técnica do Laboratório de Palinologia da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA, Canoas), pelas discussões e auxílio na tradução de referências.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Bernacci, do Instituto Agronômico de Campinas, pelas informações sobre *Passiflora* e pelo envio de material bibliográfico.

À Dra. Aline Lorenz-Lemke, do Laboratório de Evolução Molecular (LEM/UFRGS), pelas informações da localização das espécies de *Passiflora* no Rio Grande do Sul.

Por último, porém não menos importante, ao pessoal de casa: Ana Claudia Fernandes, Andrei Carlos Fernandes e Fernando Rogério Carvalho, por todo o suporte, pela convivência pacífica, amizade e apoio sempre, agradeço!

APOIO:



SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Resumo	viii
Apresentação	01
Capítulo I	02
1. Introdução geral	03
1.1. Apresentação do gênero e distribuição	03
1.2. Sistemática filogenética de <i>Passiflora</i> L.	07
1.3. Precedentes de estudos anatômicos em <i>Passiflora</i> L.	10
1.4. Estudos palinológicos em Passifloraceae	11
1.5. Caracterização geral dos subgêneros e espécies estudadas	18
2. Objetivos	23
3. Referências bibliográficas	24
Capítulo II	31
Artigo 1. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil	32
Introdução	34
Materiais e métodos	35
Resultados	37
Discussão	42
Referências Bibliográficas	55
Tabelas	64
Figuras	66
Apêndice I	81
Artigo 2. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de <i>Passiflora</i> L. (Passifloraceae)	88
Resumo	90
Abstract	90
Introdução	91
Materiais e métodos	92
Resultados e Discussão	94
Agradecimentos	100
Referências Bibliográficas	101
Tabela	104
Figuras	105
Considerações finais	109

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Botânica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

Anatomia comparada da antera de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul

Autora: Greta Aline Dettke

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos

Local e data de defesa: Porto Alegre, 27 de fevereiro de 2009

Passiflora L. é o maior dos gêneros de Passifloraceae, com cerca de 530 espécies, e ocorre predominantemente no continente americano. Compreende trepadeiras herbáceas ou lenhosas com gavinhas, raramente ervas, arbustos ou pequenas árvores. A sistemática de *Passiflora*, assim como de Passifloraceae, não está ainda bem resolvida, pois são frágeis os limites de circunscrição de vários subgêneros, seções e séries e a última revisão sistemática dos gêneros americanos data do século passado. Esta classificação estabelece 23 subgêneros e é inteiramente baseada em caracteres morfológicos, principalmente da estrutura floral. Estudos recentes, morfológicos e moleculares, indicam a redução destes subgêneros à apenas quatro: *Passiflora*, *Decaloba*, *Astrophea* e *Deidamioides*. Porém, a relação entre estes subgêneros é incerta, sendo de fundamental importância a realização de estudos morfológicos para a sustentação e esclarecimento das relações entre os grupos deste gênero. Este estudo tem por objetivo descrever a morfologia externa, vascularização e estrutura histológica da antera deiscente, a estrutura e histoquímica da esporoderme dos grãos de pólen, bem como a caracterização das aberturas do pólen de treze espécies de *Passiflora* L. (subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*) que ocorrem no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sob microscopia óptica e eletrônica de varredura, fornecendo dados anatômicos que auxiliem na distinção entre estas espécies e na delimitação dos grandes subgrupos do gênero, bem como no entendimento de suas relações e que possam ser utilizados em análises filogenéticas. As espécies de *Passiflora* possuem antera tetraesporangiadas com deiscência rimosa, ampla variação de tamanhos e, como os demais verticilos florais, apresentam movimentação durante a abertura da flor. Anatomicamente, apresentam epiderme persistente, com cutícula lisa à estriada e células estomiais alongadas na maioria das espécies, endotécio com espessamentos distintos e lignificados, camadas médias colapsadas, membrana tapetal evidente e orbículos pequenos. Os grãos de pólen, com variáveis padrões morfológicos, apresentam grandes quantidades de substâncias lipofílicas sobre a esporoderme. Podem apresentar ou não pequenos grãos de amido e citoplasma PAS-positivo. A esporoderme apresenta intina triestratificada (estrato péctico, péctico e protéico, péctico celulósico) e exina diferenciada em ectexina e endexina. Três padrões estruturais foram encontrados: tipo 1, grãos de pólen com intina espessa, ectexina de aspecto internamente verrucado, ausência de camada basal compacta, nexina 1 como uma mistura de ectexina e endexina, onde são visíveis as columelas imersas (subgênero *Passiflora*); tipo 2, grãos de pólen com intina fina, endexina internamente lisa, com camada basal compacta, formada somente pela ectexina (subgêneros *Astrophea* e *Decaloba*); tipo 3: grãos de pólen com intina fina, endexina internamente lisa, ausência de camada basal, nexina 1 granulosa, como uma mistura de ectexina e endexina (*P. suberosa* - *Decaloba*). Em relação aos tipos de aberturas, a espécie do subgênero *Astrophea* apresenta pólen 6-colporado, com três endoaberturas alongadas; as espécies do subgênero *Passiflora* apresentam pólen 6-12-sincolpado, com colpos fundidos aos pares, delimitando o pseudopérculo; as espécies do subgênero *Decaloba* apresentam pólen 6-colporados operculados e *P. capsularis* apresenta pólen 12-colporado. Algumas características encontradas neste estudo merecem especial atenção pelo seu potencial uso na filogenia do grupo, com necessidade de estudos mais amplos. Entre eles, o tamanho das anteras, presença de células estomiais, tipos de espessamentos do endotécio, padrões de vascularização, características do retículo na exina (amplitude e presença de báculas), estrutura da exina e tipos de aberturas.

Palavras-chave: *Passiflora*, antera, pólen, anatomia vegetal.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se dividida em duas partes: o primeiro capítulo fornece uma introdução geral sobre as diferentes abordagens e conceitos que permeiam a discussão dos resultados; e o segundo capítulo apresenta os resultados propriamente ditos.

Os resultados foram organizados em duas partes, que correspondem a dois manuscritos: o primeiro abordando a morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen das espécies estudadas; e o segundo aborda a caracterização dos tipos de aberturas dos grãos de pólen destas espécies.

De modo a facilitar a publicação dos resultados, os manuscritos encontram-se formatados de acordo com as normas dos periódicos aos quais serão submetidos, com exceção das margens e espaçamentos do texto. O primeiro será um capítulo integrante do livro em edição “Passifloraceae no Rio Grande do Sul” (Eds. Moreira, G.R.P. & Santos, R.P.) que será publicado neste ano de 2009, e o segundo será submetido ao periódico *Acta Botanica Brasilica*.

Após os manuscritos, são apresentadas as considerações finais e perspectivas de abordagens futuras.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Apresentação do gênero e distribuição

Passifloraceae possui 17 gêneros, entre 700 e 750 espécies distribuídas nos paleotrópicos, com poucas espécies ocorrendo em regiões temperadas da América do Sul e do Norte, sul da China e Nova Zelândia, sendo encontradas desde lianas, ervas, arbustos a pequenas árvores (Feuillet & MacDougal, 2007). Tradicionalmente, foi tratada em Violales por Cronquist (1981) e Passiflorales por Takhtajan (1997) e, atualmente, encontra-se posicionada em Malpighiales, com a adição de dados moleculares aos estudos filogenéticos (APGII, 2003).

Korotkova *et al.* (*in press*), utilizando como marcadores genes plastidiais de regiões não-codificantes e espaçadores (regiões *petB–petD*), verificaram a formação de um clado fortemente sustentado envolvendo sete famílias de Malpighiales, denominado pelos autores de clado “*violids*”: Achariaceae, Violaceae, Malesherbiaceae, Passifloraceae, Turneraceae, Lacistemataceae e Salicaceae. Neste clado, Passifloraceae mostra-se como clado-irmão de Turneraceae; e Malesherbiaceae, como clado-irmão destas duas famílias, discordando da relação anteriormente encontrada por Chase *et al.* (2002), na qual Passifloraceae possui relação de clado-irmão com o clado formado pelas famílias Malesherbiaceae e Turneraceae.

APGII (2003) propõem, como opção, a sinonimização destas três famílias em Passifloraceae *sensu lato*, pois todas possuem como características compostos secundários glicosídeos cianogênicos ciclopentenóides e o hipanto como estrutura individualizada dos estames. Turneraceae e Passifloraceae possuem em comum glândulas (ou nectários extraflorais) e transmissão biparental ou paterna de plastídios (Shore *et al.*, 1994), enquanto que Passifloraceae e Malesherbiaceae apresentam a coroa como principal caráter comum.

Passifloraceae é formada por duas tribos, *Paropsieae* e *Passifloreae*, de acordo com Escobar (1988). *Paropsieae* é composta por arbustos ou árvores sem gavinhas, apresenta seis gêneros e aproximadamente 27 espécies, distribuídas especialmente no oeste da África, e é considerada por Judd *et al.* (1999) como um complexo basal parafilético em Passifloraceae. *Passifloreae*, ao contrário, é considerada monofilética, composta por 11 gêneros e cerca de 700 espécies. Apresenta como claras sinapomorfias o hábito escandente, gavinhas axilares e flores altamente especializadas (Judd *et al.*, 1999).

Dos gêneros atualmente reconhecidos em Passifloraceae, apenas quatro ocorrem no continente americano (Feuillet & MacDougal, 2007): *Ancistrothyrsus* (duas espécies), *Dilkea* (seis espécies), *Mitostemma* (três espécies) e *Passiflora* (ca. 500 espécies).

Passiflora L. é o maior dos gêneros de Passifloraceae, com cerca de 530 espécies. Ocorre predominantemente no continente americano. Cerca de 30 espécies (todas pertencentes ao subgênero *Decaloba*) ocorrem na Índia, sul da China, Austrália e Samoa (Feuillet & MacDougal, 2007). A maior riqueza de espécies do gênero concentra-se no Brasil e na Colômbia, sendo encontradas desde as regiões costeiras até altitudes de 3800 m nos páramos andinos (Pérez, 2007). No Brasil, Cervi (2006) refere um total de aproximadamente 140 espécies validamente descritas para o gênero.

O gênero *Passiflora* compreende trepadeiras herbáceas (Fig. 1) ou lenhosas com gavinhas, raramente ervas, arbustos ou pequenas árvores. O caule pode ser flexível ou lenhoso, usualmente com crescimento secundário anômalo (Ayensu & Stern, 1964). Caracteriza-se por possuir folhas alternas, pecíolo ou limbo freqüentemente com glândulas ou nectários extraflorais, limbo simples ou composto, lobado ou não, venação pinada ou palmada e estípulas minúsculas a foliáceas (Feuillet & MacDougal, 2007). As flores são solitárias ou em pares, raramente formando inflorescências cimosas, normalmente com brácteas, cinco sépalas (eventualmente com glândulas), cinco pétalas (por vezes ausentes), e uma ou mais séries de filamentos, formando a corona (Feuillet & MacDougal, 2007). Do centro da flor emerge o androginóforo que eleva o androceu e o gineceu em relação ao anel ou disco nectarífero, na sua base (Deginani, 2001). O androceu é composto por 5 (-8) estames livres e o gineceu por 3 carpelos (Killip, 1938; Cervi, 1997; Feuillet & MacDougal, 2007). Os frutos são carnosos do tipo baga, indeiscentes, globosos a fusiformes, ou raramente do tipo cápsula, deiscentes. As sementes são comprimidas, com arilo carnosos colorido e testa reticulada, pontuada ou alveolada (Fig. 2).

De um modo geral, as espécies de *Passiflora* possuem grande plasticidade fenotípica, especialmente em relação aos órgãos vegetativos, tal como as folhas, sendo que um mesmo indivíduo pode assumir formatos e dimensões do limbo totalmente distintos (Killip, 1938; Cervi, 1997; Deginani, 2001; Milward-de-Azevedo & Baumgratz, 2004; Araújo & Alves, 2007; Feuillet & MacDougal, 2007). Tal variabilidade, associado às grandes variações florais, contribuem para a discordância, de vários

autores, quanto à identidade de várias espécies do gênero, bem como dificultam uma clara classificação hierárquica do grupo em níveis infragenéricos.



Figura 1. Hábito típico de espécies herbáceas de *Passiflora* L. (*P. morifolia* Mast.; adaptado de *Flora Brasiliensis* (Masters, 1872)).

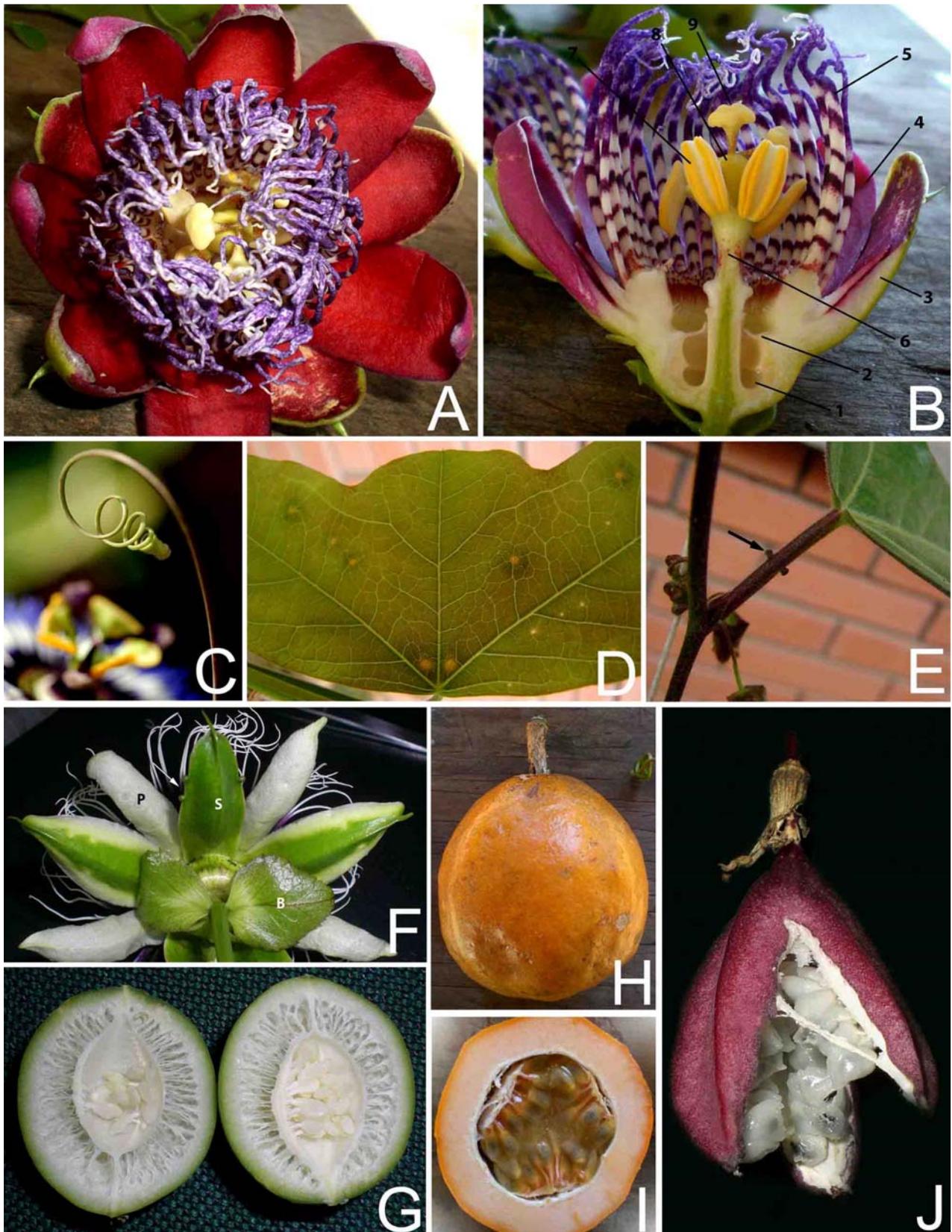


Figura 2. Características gerais de espécies de *Passiflora* L. **A-B.** *P. alata* – flor em antese (A: vista frontal; B: seção longitudinal – 1. nectário, 2. opérculo, 3. sépala, 4. pétala, 5. corona filamentosa, 6. androginóforo, 7. antera, 8. ovário, 9. estigma). **C.** *P. caerulea* – gavinha. **D.** *P. misera* – nectários extraflorais das folhas. **E.** *P. suberosa* – nectários extraflorais do pecíolo (seta). **F.** *P. edulis* – nectários das sépala (seta) (B: bráctea, P: pétala, S: sépala). **G.** *P. tenuifila* – seção longitudinal do fruto imaturo. **H-I.** *P. alata* – fruto maduro (H: vista lateral; I: seção transversal). **J.** *P. capsularis* – fruto maduro deiscente.

1.2. Sistemática filogenética de *Passiflora* L.

A sistemática de *Passiflora*, assim como de Passifloraceae, ainda não está bem resolvida, pois são bastante frágeis e controversos os limites de circunscrição de vários subgêneros, seções e séries (Feuillet & MacDougal, 2003) e a última revisão sistemática dos gêneros americanos data do século passado (Killip, 1938).

De acordo com a proposta de Killip (1938), para as espécies de *Passiflora*, o gênero é composto por 22 subgêneros. A este sistema de classificação, Escobar (1989) adiciona um novo subgênero, totalizando 23. Esta classificação é inteiramente baseada em caracteres morfológicos, principalmente da estrutura floral.

Recentemente, a delimitação dos subgêneros (Killip, 1938; Escobar, 1989) é questionada num contexto de análises filogenéticas baseadas também em seqüências gênicas.

O primeiro estudo filogenético do gênero *Passiflora* foi realizado por Muschner *et al.* (2003), utilizando como marcadores genes nucleares, cloroplastidiais e mitocondriais, e põem em questão a monofilia do gênero pelo baixo suporte nas análises. Simultaneamente, Feuillet & MacDougal (2003) propõem uma nova classificação infragenérica para *Passiflora*, reduzindo o número de subgêneros para apenas quatro: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L. Esta proposta é baseada principalmente na morfologia externa e características ecológicas da espécies. Muschner *et al.* (2003) e, posteriormente, Muschner (2005), comprovam a monofilia de três dos subgêneros propostos por Feuillet & MacDougal (2003): *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*, mediante análise filogenética molecular, sendo que a posição do subgênero *Deidamioides* permanece indeterminada.

Yockteng & Nadot (2004), utilizando um gene nuclear expresso no cloroplasto (*ncpGS*) como marcador, propõem a manutenção de oito subgêneros em *Passiflora*, considerada pelos autores como monofilética (*Astrophea*, *Deidamioides*, *Dysosmia*, *Granadilla*, *Plectostema*, *Polyanthea*, *Tetrapathea* e *Tryphostemmatoides*), discordando parcialmente dos arranjos anteriormente propostos. Os autores também fazem a correlação entre a posição filogenética das espécies e o número cromossômico dos principais grupos.

Em análise posterior mais abrangente (utilizando 19 dos 23 subgêneros anteriormente propostos), Muschner (2005) não confirma a proposta de Yockteng & Nadot (2004), quanto ao número de subgêneros, e reafirma a proposta de Feuillet & MacDougal (2003), com a adição (incerta) de mais um subgênero

(*Tryphostemmatoides*). Três destes subgêneros são claramente monofiléticos (*Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*) de acordo com Muschner (2005). *Deidamioides* não se apresenta monofilético, enquanto que *Tryphostemmatoides* conta apenas com uma espécie na análise da autora. Neste trabalho, também foi estudada a data provável de surgimento do gênero *Passiflora* e diversificação dos três principais subgêneros. De acordo com Muschner (2005), *Passiflora* deve ter surgido há cerca de 42 milhões de anos atrás, sendo que o subgênero *Decaloba* provavelmente foi o primeiro a se estabelecer (35 Ma), enquanto que *Astrophea* e *Passiflora* se estabeleceram mais recentemente (24 Ma) e tiveram uma radiação bastante rápida em relação à *Decaloba*, cujo principal responsável parece ser a pressão seletiva pelos diferentes agentes polinizadores.

Souza-Chies *et al.* (2005), numa análise restrita às relações entre os três subgêneros considerados monofiléticos, avaliando dois marcadores moleculares nucleares e dois cloroplastidiais, apresentam, na análise combinada, o clado *Astrophea* como irmão de *Decaloba*, porém com baixo suporte (BS59) e a não resolução da relação entre o clado *Passiflora* e os demais.

Hansen *et al.* (2006), utilizando dois marcadores plastidiais e 136 espécies analisadas (17 dos 22 subgêneros de Killip (1938)), corrobora a classificação de Feuillet & MacDougal (2003), com a formação de quatro cladogramas correspondentes aos subgêneros *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*. No entanto, também nesta análise, a relação entre estes subgêneros permanece não resolvida e variável conforme o método e marcador utilizado. Por exemplo, utilizando a seqüência cloroplastidial *trnL/trnT* e análise Bayesiana, os autores encontraram uma árvore com cladogramas bem sustentados, nos quais o clado *Passiflora* aparece como irmão de *Astrophea*, enquanto que o clado *Decaloba* é irmão de *Deidamioides*. No entanto, a relação entre estes dois grandes cladogramas não é resolvida nesta análise. Hansen *et al.* (2006) também fazem a relação dos cladogramas formados com o número cromossômico das espécies: *Decaloba* possui número haplóide $n=6$, *Passiflora* $n=9$, *Astrophea* e *Deidamioides* $n=12$. Os autores defendem o número básico de cromossomos de *Passiflora* como $n=12$ (presente também em outros gêneros de Passifloraceae) e não $n=6$, conforme defendido por De Melo & Guerra (2003) e presente somente em *Decaloba*, podendo ser considerado uma autapomorfia do subgênero em *Passiflora*. Neste trabalho, a monofilia do gênero *Passiflora* não é suportada pelos dados utilizados pelos autores.

O estudo de filogenia molecular de Zamberlan (2007), utilizando 121 espécies de *Passiflora* e genes nucleares e plastidiais, confirma a monofilia dos três principais subgêneros (*Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*), sendo que apenas a monofilia de *Deidamioides* permanece em aberto. Os resultados também confirmam a existência de um quinto subgênero, *Tryphostemmatoides*. Quanto às questões infra-subgenéricas, objetivo principal do trabalho, em geral, as superseções, seções e séries propostas para os subgêneros mostram-se não monofiléticas e a autora aponta para a necessidade da reavaliação dos caracteres morfológicos utilizados tipicamente em suas circunscrições.

Pérez (2007) faz um estudo biogeográfico, morfológico e molecular das espécies de *Passiflora* da Colômbia, levantando diversas questões, especialmente voltadas ao manejo e conservação destas espécies nos ambientes andinos. Na análise morfológica, o autor utiliza 43 descritores quantitativos e 84 qualitativos, sendo apenas 32 dos qualitativos utilizados para análise fenética posterior. O autor encontra, como informativos, o tamanho de caules e folhas, presença de gavinhas, número e distribuição dos nectários extraflorais, dimensão e forma das brácteas, tamanho das flores e frutos e complexidade da corona e, na análise fenética, confirma a formação dos principais clados sugeridos pelas recentes análises moleculares, com a adição do clado *Tacsonia*, composto por espécies andinas de altas altitudes e polinizadas por beija-flores (normalmente reconhecida no clado *Passiflora*). Na análise molecular, utilizando marcadores de DNA cloroplastidial e mitocondrial de 151 espécies, o autor confirma de modo geral a ocorrência de três principais clados: *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*, além de *Tryphostemmatoides* e *Deidamioides*, não muito bem resolvidos, e também põem em dúvida a monofilia de *Passiflora*. As grandes diferenças entre as análises morfológicas e moleculares, Pérez (2007) atribui às pressões seletivas do ambiente, principalmente polinizadores, às diferentes taxas evolutivas dos táxons, aos diferentes modos de transmissão de organelas e à evolução reticulada de *Passiflora*.

Assim, mesmo após intensiva dedicação de vários grupos de pesquisas na resolução dos problemas existentes na delimitação de *Passiflora* e níveis infragenéricos e na relação entre estes grupos, estas questões ainda permanecem em aberto e longe de obter um ponto final, sendo necessária a realização de estudos mais abrangentes, tanto no aumento do número de espécies e de seqüências gênicas utilizadas nos estudos. Igualmente, também são necessários novos estudos abordando os aspectos biológicos do grupo em questão, para que seja possível o estudo da

evolução destes caracteres e para que novos caracteres sejam adicionados ao grupo, auxiliando na elucidação de suas relações filogenéticas.

1.3. Precedentes de estudos anatômicos em *Passiflora* L.

Apesar da grande importância do gênero nos ambientes tropicais, na cultura popular e como fonte de alimento e de importantes fitoterápicos (Cervi, 1997; Dhawan *et al.*, 2004), ainda poucos estudos abordam os aspectos anatômicos das espécies de *Passiflora*.

Quanto aos órgãos vegetativos, destacam-se, além dos clássicos da anatomia vegetal que caracterizam as famílias de Angiospermas (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950), o trabalho de Ayensu & Stern (1964) que descreve a ontogenia e os aspectos do crescimento “anômalo” do caule de espécies de *Passiflora*. A região estudada com maior frequência é a foliar e os aspectos da constituição morfológica e secreção dos nectários presentes nas folhas, assim como a plasticidade fenotípica de algumas espécies (por exemplo, Roth, 1974; Durkee, 1982, 1984; Meruvia *et al.*, 1993a,b; Varassin *et al.*, 2001; Kurtz *et al.*, 2003; Plotze *et al.*, 2004; Barp *et al.*, 2006).

Em relação aos órgãos florais, os trabalhos são ainda mais escassos e abordam, em geral, aspectos da origem dos verticilos e da corona, constituição dos tecidos secretores do disco nectarífero e substâncias secretadas (Bernhard, 1999; Krosnick & Freudenstein, 2005; Krosnick *et al.*, 2006; Amela García *et al.*, 2007), a estrutura, ontogênese e histoquímica da superfície estigmática (Silvério & Mariath, 2005, 2007; Souza *et al.*, 2006), bem como as interações entre pólen e estigma (Braum, 2008).

Do ponto de vista embriológico, destacam-se, entre os mais recentes estudos, a revisão de Johri *et al.* (1992) para as Angiospermas, e os estudos de Amela García *et al.* (2002, 2003), Souza *et al.* (2002a,b), Souza & Pereira (2000), para algumas espécies argentinas e brasileiras de *Passiflora*. Ainda, estudos desta natureza têm sido conduzidos no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, abordando, além da embriologia (Almeida-Tormes, 2007; Silvério *et al.*, 2005, 2009), a transmissão da herança plastidial em espécies dos três principais subgêneros de *Passiflora* (Silvério, 2009).

Quanto à antera, objetivo de estudo da presente dissertação e associado ao grupo de pesquisa supracitado, existem também poucos estudos específicos e para um número restrito de espécies. As anteras de espécies do gênero *Passiflora* são

tetraesporangiadas e deiscentes mediante duas fendas longitudinais. A epiderme da antera é persistente e, em algumas espécies, apresenta cutícula estriada. Próximo à linha de deiscência podem existir células epidérmicas alongadas anticlinalmente, que auxiliam na abertura (Johri *et al.*, 1992; Amela García *et al.*, 2002). De acordo com a revisão de Johri *et al.* (1992), as espécies de Passifloraceae possuem endotécio “fibroso” (com espessamentos da parede celular), duas ou três camadas médias efêmeras e tapete do tipo secretor, multinucleado. Pequenos orbículos (corpúsculos de Übisch) podem ocorrer presos à membrana peritapetal (Amela García *et al.*, 2002).

A célula mãe de micrósporo dá origem a tétrades tetraédricas ou tetragonais, dependendo da espécie (Johri *et al.*, 1992; Amela García *et al.*, 2002), por vezes ocorrendo os dois tipos na mesma espécie, tal como em *Passiflora elegans* (Silvério *et al.*, 2005). Os grãos de pólen maduros são dispersos na forma bicelular e possuem de três a 12 aberturas, na forma de colpos ou colporos (Presting, 1965; Spirlet, 1965; Johri *et al.*, 1992; Amela García *et al.*, 2002).

1.4. Estudos palinológicos em Passifloraceae

Do ponto de vista palinológico, Passifloraceae mostra-se uma família bastante interessante, pois apresenta grande variabilidade de características, algumas ainda fracamente exploradas do ponto de vista sistemático e filogenético.

As primeiras observações sobre a morfologia dos grãos de pólen foram relatadas por Mohl, em 1834, Fritzsche, em 1837, e Fischer, em 1890 (Presting, 1965; Spirlet, 1965).

Posteriormente, Erdtman (1952) descreve, em seu tratado, os grãos de pólen de sete espécies de Passifloraceae, pertencentes aos gêneros *Mitostemma*, *Passiflora* e *Tetraphaea*, possuindo de três a 12 colpos ou colporos e exina reticulada. Neste trabalho, Erdtman (1952) define o termo “pontopérculo”, aplicado para “*aberturas alongadas onde a parte apical do opérculo se funde com a exina que cerca as aberturas*”.

Em 1965, Spirlet (1965) e Presting (1965) publicam dois importantes trabalhos, simultaneamente.

Spirlet (1965) trata da utilização taxonômica dos grãos de pólen de Passifloraceae. A autora analisa, sob microscopia óptica de campo claro, 49 espécies da família, sendo 24 pertencentes à *Passiflora*, com o objetivo de verificar o valor taxonômico das estruturas polínicas, bem como resolver a posição incerta de alguns

gêneros e espécies. O resultado é uma ampla gama de características relevantes para o grupo, desde a estrutura da exina (variação no diâmetro dos lúmens, presença de báculas) até a complexa gradação de vários tipos de aberturas, partindo de pólen tricolpados até formas bastante complexas com 12 ou mais aberturas e diversos tipos de fusões. Neste trabalho, a autora utiliza o conceito de pontopérculo proposto e utilizado por Erdtman (1952).

Spirlet (1965) divide os grãos de pólen em dois grandes grupos, um com grãos de pólen prolatos e outro com oblatos a esferoidais; as subdivisões seguintes se baseiam no número de colpos e na aparência dos pontopérculos. Assim, no arranjo final, a autora estabelece nove tipos polínicos, os quais nomeia de acordo com as espécies representantes (por exemplo, tipo *Adenia acuminata* Blume, tipo *Passiflora edulis* Sims etc.). A autora também chama a atenção para o aumento da complexidade dos grãos de pólen, conforme o avanço nos grupos filogeneticamente mais derivados.

Presting (1965), no mesmo volume da obra anterior, realiza o estudo até então mais abrangente e pormenorizado sobre os grãos de pólen de Passifloraceae. Esta obra contempla 153 espécies da família, sendo distribuídas pelos gêneros *Adenia* (15 espécies analisadas), *Deidamia* (2), *Dilkea* (2), *Hollrungia* (1), *Mitostemma* (2), *Ophiocaulon* (2), *Paropsia* (5), *Paropsiopsis* (2), *Passiflora* (106), *Schlechterina* (1), *Smeathmannia* (1), *Tetrastylis* (1) e *Tryphostemma* (13). O idioma de publicação da obra (alemão) possivelmente restringiu bastante a sua divulgação e, na maioria dos casos, a sua inteira compreensão, motivo pelo qual se optou, na seqüência deste texto, apresentar os pontos principais do pensamento do autor, de modo a tornar mais fácil o entendimento de alguns conceitos utilizados no decorrer desta dissertação.

Presting (1965), desde o início da descrição, reconhece a importância do entendimento da evolução das aberturas dos grãos de pólen de Passifloraceae para a realização das descrições polínicas. Com base em suas análises, o autor desenvolve um esquema bastante didático no qual retrata grande parte dos tipos de aberturas e suas possíveis relações evolutivas (Fig. 3). De acordo com o autor, o desenvolvimento das aberturas em Passifloraceae ocorreu por três vias principais, que têm sua origem comum nos grãos de pólen tricolporados ou parcialmente tetracolporados, com colpos longos e estreitos (Fig. 3.1), membranas dos colpos psiladas e endoabertura circular, características presentes em algumas espécies de *Adenia* analisadas pelo autor, além de espécies de Flacourtiaceae (hoje incluída em Salicaceae), Malesherbiaceae (Kubitzki, 2007) e Turneraceae (Arbo, 2007).

A primeira via de desenvolvimento dos grãos de pólen já aparece nas espécies de *Adenia*. Nesta via, as membranas dos colpos se apresentam finas e granulares e culminam com a formação de um verdadeiro opérculo. A este grupo pertencem, além de *Adenia*, grãos de pólen (com membrana do colpo granular e com 3 ou 4 aberturas) de espécies dos gêneros *Mitostemma*, *Dilkea* e *Ophiocaulon*, e grãos com opérculos dos gêneros *Deidamia*, *Tryphostemma* e *Hollrungia* (Figs. 3.2 e 3.13).

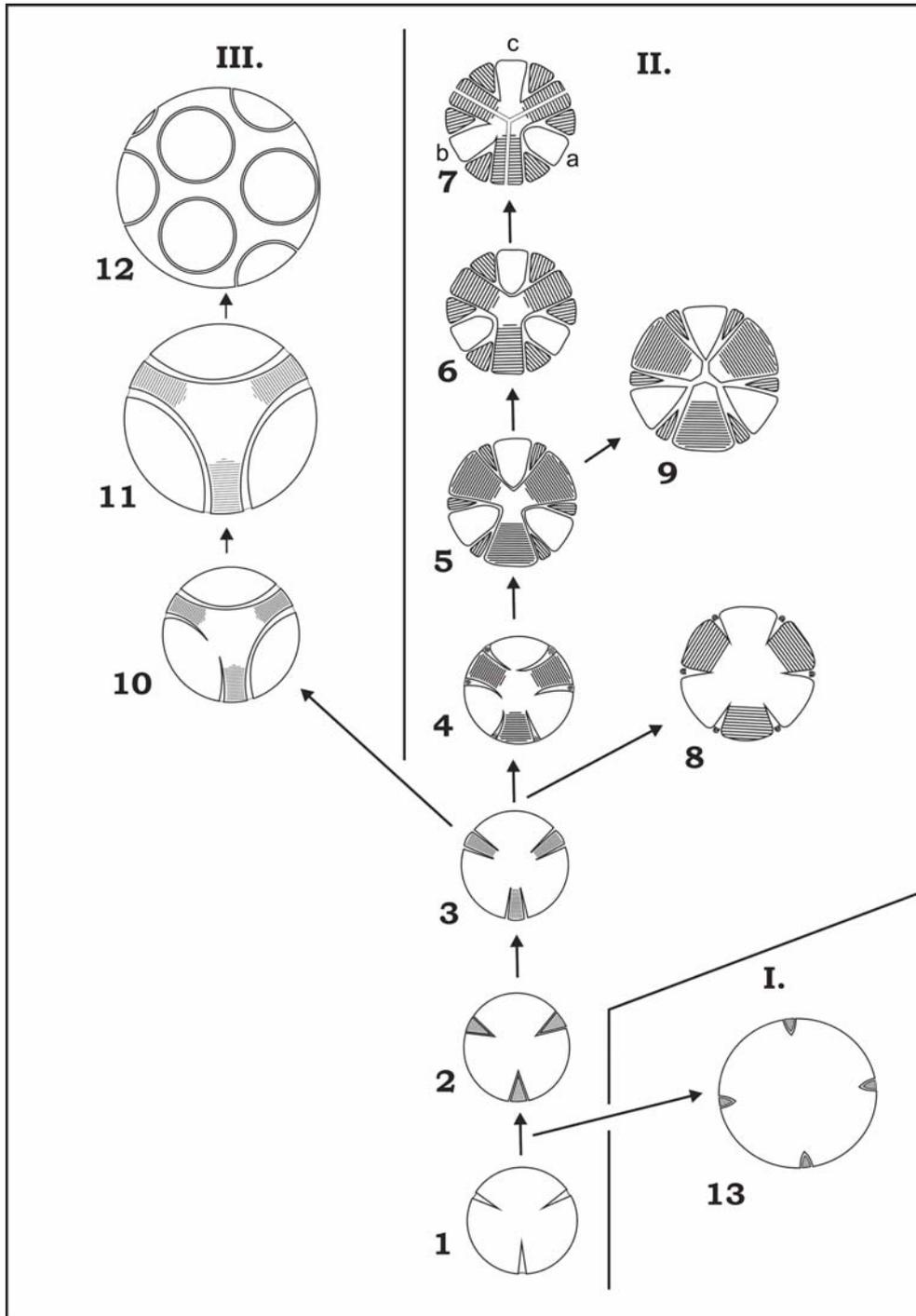


Figura 3. Etapas do desenvolvimento da abertura dos grãos de pólen de Passifloraceae. Números do esquema referidos no texto. (Redesenhado a partir do original de Presting (1965), fig. 1, pg.197). Rachuras paralelas = opérculos primários, rachuras perpendiculares = opérculos secundários.

Em *Hollrungia aurantioides* e algumas espécies de *Passiflora*, além dos opérculos normalmente desenvolvidos, Presting (1965) relata a presença de grãos de pólen nos quais se observa a fusão dos opérculos na região do apocolpo (Fig. 3.3). O autor denomina estes opérculos de “opérculos primários” (na Fig. 3, paralelamente rachurados), que se tornam, após a fusão no apocolpo, parte do mesocolpo. Assim, tem-se nesses grãos de pólen a duplicação do número de aberturas, de 3 para 6. Na Figura 4, encontra-se representada esta duplicação das aberturas, na qual as aberturas, após a individualização das endoaberturas sob os opérculos primários (A) e fusão dos opérculos no apocolpo (B), podem ser reconhecidas como unidades distintas (C) e com tendência a rotação externa e fusão, aos pares, com os colpos vizinhos que, segundo o autor, são as vias seguintes de evolução das aberturas em *Passifloraceae*.

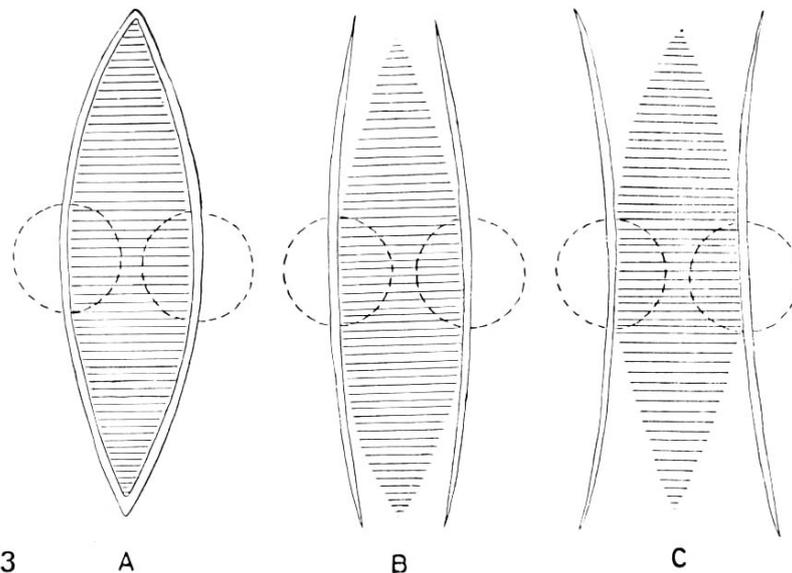


Figura 4. Representação esquemática do desenvolvimento da abertura em *Passiflora ferruginea* (Retirado de Presting (1965), fig.3, pg.199). Rachura = opérculo primário.

Os opérculos primários, conforme nomeados por Presting (1965), correspondem ao que Erdtman (1952) nomeia de pontopérculos e cujo conceito encontra-se definido por Punt *et al.* (2007): “*tipo de opérculo que não está completamente isolado do restante da sexina, mas ligado a ela pelas extremidades das aberturas*”.

Como os opérculos primários originais são mais estreitos que os 3 mesocolpos originais, um mesocolpo estreito (pontopérculo de Erdtman, 1952) e um largo se alternam (Fig. 3.3). Em algumas espécies, as endoaberturas não se individualizam e tem-se 3 endoaberturas alongadas sob os 3 pares de aberturas (como em *P. haematostigma*, ver Artigo 2).

Na etapa seguinte da evolução das aberturas, presente nas espécies de *Passiflora*, *Paropsia*, *Paropsiopsis* e *Smeathmannia*, os 6 colpos apresentam a

tendência de fusão aos pares, onde cada abertura do par se funde com uma abertura do par vizinho, delimitando assim uma larga faixa de mesocolpo (como nas Figs. 3.4, 3.10, 3.11), que se assemelha a um grande opérculo e, frequentemente, se desprende do restante da exina nas preparações palinológicas. Por se tratar originalmente de parte do mesocolpo, mas que funciona como um opérculo, Presting (1965) chama esta região de “pseudopérculo”. Este desenvolvimento de abertura é comum à segunda e terceira vias, mas diferenciam-se pelo fato que na segunda via, sobre cada uma das aberturas, surgem novos opérculos verdadeiros, que o autor denomina de “opérculos secundários” (Fig. 3, perpendicularmente rachurados).

Assim, na segunda via de evolução das aberturas tem-se, além da tendência de fusão dos colpos aos pares, a formação de opérculos sobre as aberturas (Fig. 3.4-9). Inicialmente estreitos, estes opérculos secundários podem tornar-se largos, a ponto de serem de igual espessura com o mesocolpo e o pseudopérculo (Fig. 3.6-7). Também, conforme o autor, a nexina pode tornar-se mais espessa nas bordas dos opérculos e a endoabertura, sob o opérculo, pode formar duas novas endoaberturas pela deposição de finas faixas de endexina (Fig. 5E-G). Deste modo, tem-se 12 endoaberturas e o opérculo secundário deixa de ser funcionalmente um opérculo e não se desprende mais do restante da exina, resultando em grãos com 12 colporos. Estes grãos aparecem em somente quatro espécies de *Passiflora* estudadas por Presting (1965): *P. capsularis*, *P. hahnii*, *P. pohlii* e *P. biflora*.

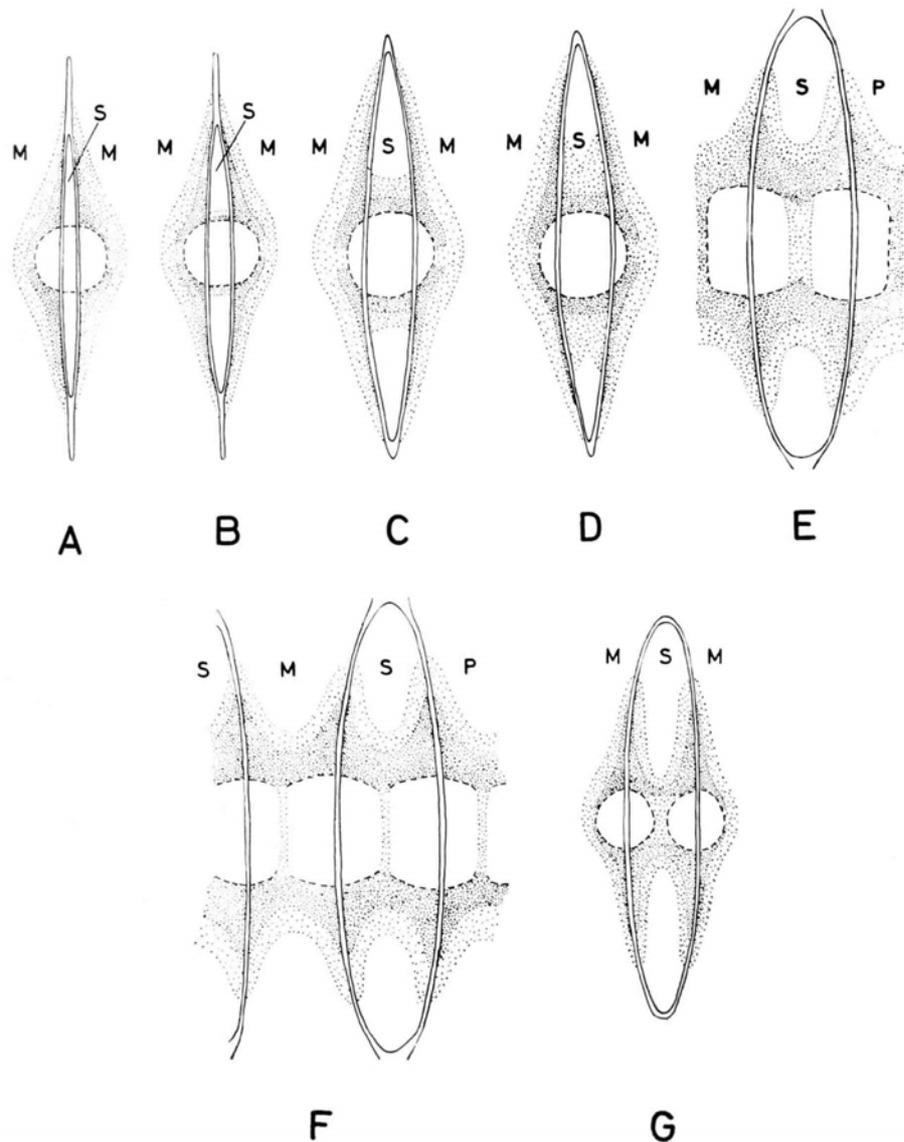


Figura 5. Estados do desenvolvimento da endoabertura em algumas espécies de *Passiflora*. M: mesocolpo, S: opérculo secundário, P: opérculo primário (Retirado de Presting (1965), fig.4, pg.201).

Na terceira via de evolução das aberturas não há formação de opérculos secundários e os colpos encontram-se fundidos aos pares, delimitando o pseudopérculo (Fig. 3.10-12), com tendência de perda das endoaberturas. De forma inexplicável para Presting (1965), o número de pseudopérculos pode chegar a 12 e distribuídos por todo o grão (ou seja, 24 aberturas fundidas aos pares) (Fig. 3.12). Spirlet (1965) explica a formação deste tipo de grão de pólen por meio de fusões longitudinais e também transversais dos colpos.

Presting (1965) ainda define em seu trabalho dois tipos de estrutura do retículo (retículo tipo 1 e tipo 2) e dois tipos de exina (exina tipo 1 e tipo 2).

Após Presting (1965) e Spirlet (1965), poucos estudos foram realizados com grãos de pólen de Passifloraceae. Destacam-se, entre eles, Amela García *et al.* (2002),

no estudo da microesporogênese, microgametogênese e morfologia polínica de seis espécies de *Passiflora* da Argentina (entre elas *P. caerulea*, *P. suberosa* e *P. misera*). Araújo & Santos (2004) estudam 12 espécies de *Passiflora* da Chapada Diamantina, Bahia, e estabelecem três tipos polínicos entre as espécies estudadas. Milward-de-Azevedo *et al.* (2004) fazem a descrição polínica de oito espécies de *Passiflora*, subgênero *Decaloba*, e aplicam as características encontradas na taxonomia das espécies. Barrios *et al.* (2005) caracterizaram 121 espécies de *Passiflora* e 2 espécies de *Dilkea* e discutem a morfologia polínica aplicada à nova classificação infragenérica de *Passiflora* (Feuillet & MacDougal (2003), encontrada em Ulmer & MacDougal, 2004).

Além de Amela García *et al.* (2002), Almeida-Tormes (2007) também estudou a formação dos grãos de pólen em *Passiflora*, porém poucas informações são fornecidas a respeito da ontogenia das aberturas. Huynh (1972) faz um estudo sobre o arranjo dos micrósporos da fase de tétrade pós-meiótica e afirma que a multiplicação das aberturas, dos mesocolpos e fusão dos colpos são os aspectos evolutivos mais importantes do pólen deste grupo.

Em relação à estrutura da esporoderme, Larson (1966) faz um estudo detalhado e extensamente discutido sobre a ultraestrutura desta parede em *P. caerulea*. Posteriormente, Carreira (1977) também descreve a esporoderme de *P. coccinea* Aubl., porém pouco discute as características encontradas e, recentemente, Amela García *et al.* (2002) faz a caracterização da formação da esporoderme durante a formação do pólen de *P. caerulea*.

Em todos estes estudos que abrangem os grãos de pólen de Passifloraceae e do gênero *Passiflora*, percebe-se a utilização de diferentes termos para as diferentes regiões dos grãos de pólen mas que, de certo modo, se complementam e giram em torno de um conceito de evolução similar para as aberturas (como a utilização dos termos pontopérculo, opérculos primários e secundários e pseudopérculos por Erdtman (1952), Spirlet (1965) e Presting (1965)).

Contudo, na literatura recente verifica-se que estes termos não têm sido aplicados sempre de forma correta e algumas vezes são confundidos pelos autores, comprometendo as descrições polínicas. Assim, não há consenso quanto ao tipo e número de aberturas em muitas espécies e, por exemplo, o pólen de *P. suberosa* é descrito como 6-colpado com opérculos sobre os colpos (Araújo & Santos, 2004), 6-colporado com opérculos secundários (Presting, 1965) e 12-colpado (Milward-de-Azevedo *et al.*, 2004). Nestes casos, é necessária a análise mais minuciosa dos tipos aperturais, se possível com vários métodos de abordagem, podendo então ser

indicadas com mais segurança o número e forma das aberturas, bem como a presença ou não de opérculos.

1.5. Caracterização geral dos subgêneros e espécies estudadas

Neste estudo foram consideradas espécies dos três subgêneros atualmente considerados monofiléticos pela maioria dos estudos de filogenia molecular (Muschner *et al.*, 2003; Muschner, 2005; Hansen *et al.*, 2006; Zamberlan, 2007): *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*. Estes subgêneros são os maiores, em número de espécies, representando juntos mais de 97% das espécies de *Passiflora* descritas, segundo Feuillet & MacDougal (2007). Além disso, espécies de *Deidamioides* possuem, como região austral de distribuição, o estado de São Paulo, a exemplo de *P. deidamioides* Harms, espécie tipo do subgênero e que se encontra em estado vulnerável de extinção em São Paulo (Bernacci *et al.*, 2003) e, durante a realização deste estudo, não obtivemos acesso ao material necessário.

O subgênero *Astrophea* é composto por aproximadamente 57 espécies, que diferem bastante do padrão típico do gênero, são espécies arbustivas ou trepadeiras lenhosas, em geral sem gavinhas e com folhas inteiras, hipanto campanulado ou tubular e opérculo membranoso ou tubular (Feuillet & MacDougal, 2007). O centro de diversidade do grupo encontra-se em áreas de baixas altitudes no norte da América do Sul (Ulmer & MacDougal, 2004). Pertencente a este subgênero *P. haematostigma* Mart. ex Mast., que possui como limite sul de distribuição o estado de Santa Catarina. Ocorre tanto em encostas íngremes da Serra Geral (Floresta Atlântica), campos rupestres e áreas de cerrado (Sacco, 1980; Bernarcci *et al.*, 2003; Milward-de-Azevedo, 2007; Cervi & Linsingen, 2008).

Os outros dois subgêneros, *Decaloba* e *Passiflora*, ocorrem no estado do Rio Grande do Sul, amplamente distribuídas, e diferenciam-se morfológicamente por caracteres florais, vegetativos e citológicos (Hansen *et al.*, 2006; Feuillet & MacDougal, 2007).

Decaloba engloba espécies de caule flexível, glândulas laminares ou peciolares, flores pequenas, de coloração opaca, em geral esbranquiçada, hipanto achatado, opérculo plicado, límen carnoso e curto e número haplóide de cromossomos $n=6$. No Rio Grande do Sul, ocorrem seis espécies deste subgênero: *P. capsularis* L.; *P. misera* H.B.K.; *P. morifolia* Mast.; *P. organensis* Gardn.; *P. suberosa* L. e *P. tricuspis* Mast. (Mondin, 2001). Estudos morfológicos e moleculares (Mäder *et al.*, 2006) revelaram que esta última espécie, *P. tricuspis* citada por Mondin (2001), trata-se de *P. urnaefolia*

Rusby, que é a espécie ocorrente no estado, enquanto que *P. tricuspis* ocorre predominantemente na região Centro-Oeste do Brasil. Destas espécies, foram utilizadas no presente estudo *P. capsularis* (Fig. 6B), *P. misera* (Fig. 6C), *P. morifolia* (Fig. 6D) e *P. suberosa* L. (Fig. 6E).

O subgênero *Passiflora* compreende espécies de caule flexível ou lenhoso, com nectários distribuídos no pecíolo, estípulas e margens foliares, as flores são grandes, de coloração vibrante, hipanto tubular ou campanulado, opérculo tubular ou filamentososo, límen membranoso e número haplóide de cromossomos $n=9$, 10 ou 11. No estado do Rio Grande do Sul, este subgênero conta com oito espécies, segundo Mondin (2001): *P. actinia* Hook.; *P. amethystina* Mik.; *P. caerulea* L.; *P. edulis* Sims; *P. eichleriana*; *P. elegans* Mast.; *P. foetida* L. e *P. tenuifila* Kill. Inclui-se, também neste grupo, *P. alata* Curtis, que apesar de ser uma espécie amplamente cultivada no estado, está colonizando ativamente áreas previamente não ocupadas desta região, sendo considerada subespontânea, conforme demonstrado por Koehler-Santos *et al.* (2006a,b). Foram estudadas, deste subgênero as espécies *P. alata* (Fig. 2A-B), *P. actinia* (Fig. 7A), *P. amethystina* (Fig. 7B), *P. caerulea* (Fig. 7C), *P. edulis* (Fig. 7D), *P. elegans* (Fig. 7E) e *P. tenuifila* (Fig. 7F).

Na tabela 1 encontram-se as espécies analisadas no presente estudo e respectivo local de coletas de espécimes representativos das populações estudadas, cujas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN). Adicionalmente às espécies estudadas do Rio Grande do Sul, foram estudadas duas espécies de Santa Catarina: *P. haematostigma* (Fig. 6A) (subgênero *Astropheia*) e *P. truncata* Regel (Fig. 6F) (subgênero *Decaloba*).

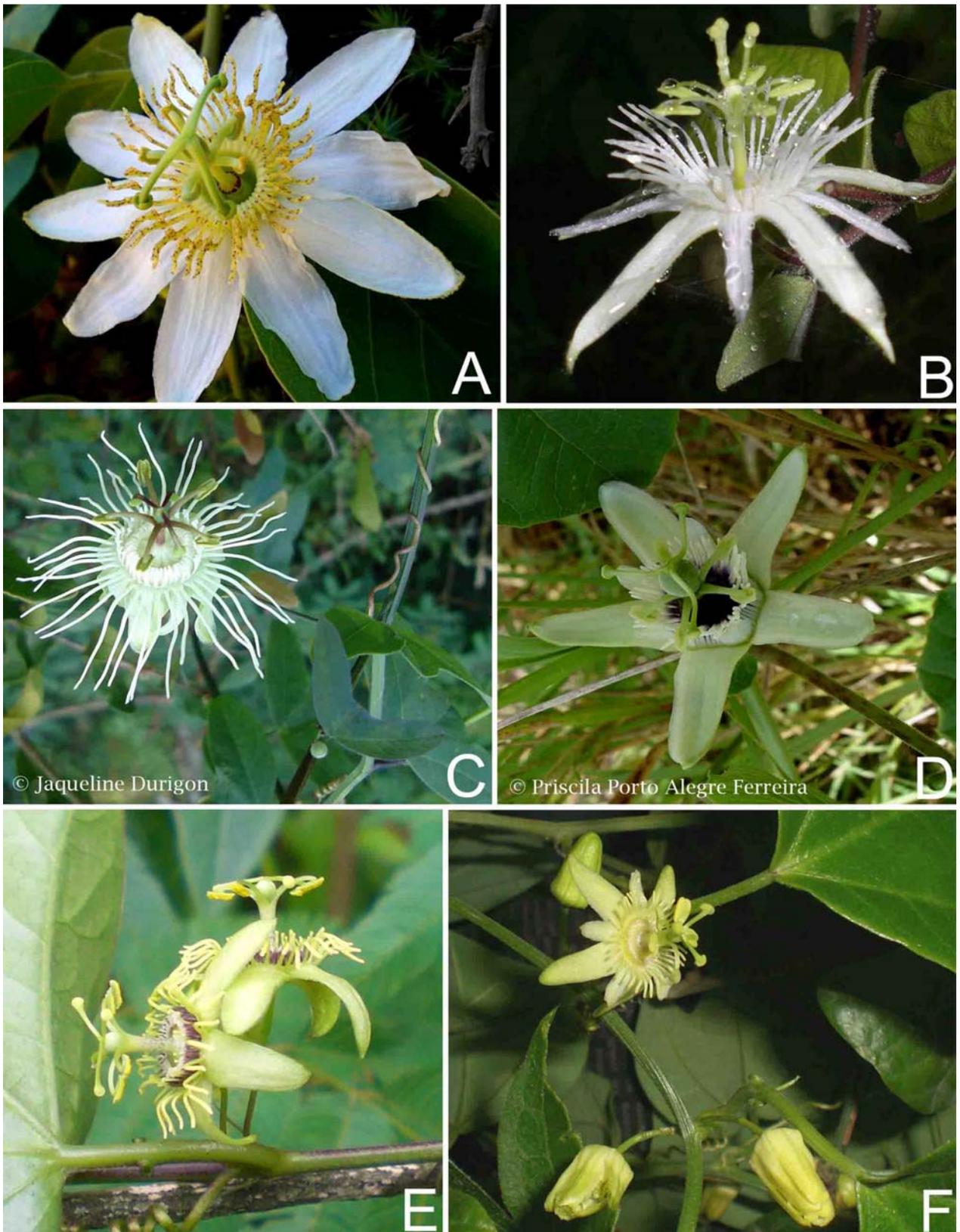


Figura 6. Espécies de *Passiflora*, subgêneros *Astrophea* e *Decaloba*. **A.** *P. haematostigma* Mart. ex Mast. **B.** *P. capsularis* L. **C.** *P. misera* H.B.K. **D.** *P. morifolia* Mast. **E.** *P. suberosa* L. **F.** *P. truncata* Regel.

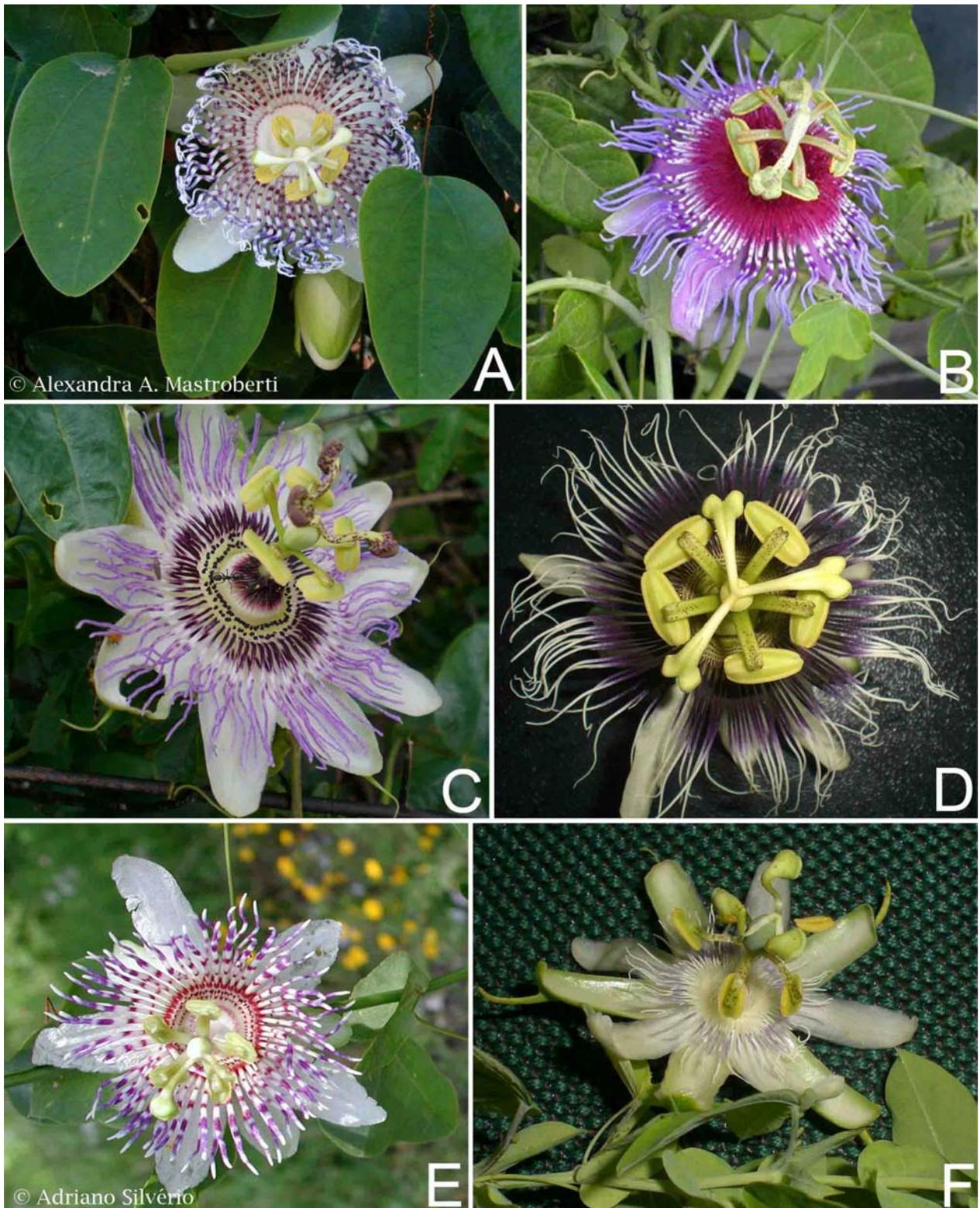


Figura 7. Espécies de *Passiflora*, subgênero *Passiflora*. **A.** *P. actinia* Hook. **B.** *P. amethystina* Mik. **C.** *P. caerulea* L. **D.** *P. edulis* Sims **E.** *P. elegans* Mast. **F.** *P. tenuifila* Kill.

Tabela 1. Espécies de *Passiflora* estudadas, locais de coleta e registro de herbário.

Espécie	Local de Coleta	Exsicata (ICN)
Subgênero <i>Astrophea</i>		
<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	Santa Rosa de Lima (SC)	<i>Dettke, G.A. & Silvério, A. 70 (152173)</i>
	São Martinho (SC)	<i>Lima, L.F. & Dettke, G.A. 512 (152122)</i>
Subgênero <i>Decaloba</i>		
<i>P. capsularis</i> L.	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 65 (152171)</i>
	Sapiranga	<i>Dettke, G.A. 97 (150004)</i>
	Maquiné	<i>Dettke, G.A. 102 (153009)</i>
<i>P. misera</i> H.B.K.	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 64 (152170)</i>
	Guaíba	<i>Dettke, G.A. 81 (152269)</i>
<i>P. morifolia</i> Mast.	Augusto Pestana	<i>Kerpel, S. s.n. (159142)</i>
<i>P. suberosa</i> L.	Guaíba	<i>Dettke, G.A. 60 (152091)</i>
	Guaíba	<i>Dettke, G.A. 84 (152272)</i>
	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 95 (153002)</i>
	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 75 (122178)</i>
	Osório	<i>Dettke, G.A. 73 (152176)</i>
<i>P. truncata</i> Regel	Santa Rosa de Lima (SC)	<i>Lima, L.F. & Dettke, G.A. 520 (152128)</i>
Subgênero <i>Passiflora</i>		
<i>P. actinia</i> Hook.	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 63 (152094)</i>
<i>P. alata</i> Curtis	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 85 (152273)</i>
	Guaíba	<i>Souza, G. 01 (152353)</i>
<i>P. amethystina</i> Mik.	Osório	<i>Dettke, G.A. 74 (152177)</i>
<i>P. caerulea</i> L.	Guaíba	<i>Dettke, G.A. 62 (152093)</i>
	Osório	<i>Dettke, G.A. 72 (152175)</i>
	Lages (SC)	<i>Dettke, G.A. 67 (152172)</i>
<i>P. edulis</i> Sims	Victor Graeff (cultivada)	-
	Torres	<i>Dettke, G.A.215 (159143)</i>
	Porto Alegre (cultivada)	-
	Osório	<i>Dettke, G.A. 76 (152179)</i>
<i>P. elegans</i> Mast.	Guaíba	<i>Dettke, G.A. 59 (152092)</i>
<i>P. tenuifila</i> Kill.	Porto Alegre	<i>Dettke, G.A. 87 (152275)</i>

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos:

- Descrever a morfologia externa, vascularização e estrutura histológica (sobretudo epiderme e endotécio) da antera deiscente de espécies de *Passiflora* L. (subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*) que ocorrem no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no que diz respeito ao número de camadas celulares nos estratos parietais e características citológicas, sob microscopia óptica e eletrônica de varredura.
- Descrever a estrutura e histoquímica da esporoderme dos grãos de pólen nas espécies de *Passiflora*, caracterizando a exina, intina e as aberturas, sob microscopia óptica e eletrônica de varredura.
- Fornecer dados anatômicos que auxiliem na distinção entre estas espécies e na delimitação dos grandes subgrupos do gênero, bem como no entendimento de suas relações e que possam ser utilizados por outros pesquisadores em análises filogenéticas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-TORMES, S.B.F. 2007. Esporogênese e gametogênese de *Passiflora suberosa* L. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- AMELA GARCÍA, M.T.; GALATI, B.G. & HOC, P. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora* 202: 302-315.
- AMELA GARCÍA, M.T.; GALATI, B.G. & ANTON, A.M. 2002. Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 383-394.
- AMELA GARCÍA, M.T.; GALATI, B.G. & ANTON, A.M. 2003. Development and ultrastructure of the megagametophyte in *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 73-81.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- ARAÚJO, D. & ALVES, M. 2007. Variabilidade morfológica de *Passiflora foetida* L.: Quantas variedades existem no estado de Pernambuco? *Revista Brasileira de Biociências* 5(2): 852-854.
- ARAÚJO, R.C.M. & SANTOS, F.A. 2004. Palinologia de espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Stientibus série Ciências Biológicas* 4(1/2): 37-42.
- ARBO, M.M. 2007. Turneraceae. KUBITZKI, K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Vol. 9. Springer Berlin Heidelberg. p. 458-466.
- AYENSU, E.S. & STERN, W.L. 1964. Systematic anatomy and ontogeny of the stem in Passifloraceae. *Contributions from the United States National Herbarium* 34: 45-73.
- BARP, E.A.; SOARES, G.L.G.; GOSMANN, G.; MACHADO, A.M.; VECCHI, C. & MOREIRA, G.R.P. 2006. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): Induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. *Brazilian Journal of Biology* 66(3): 853-862.

- BARRIOS, L.; CAETANO, C.M.; CARDOSO, C.I.; D'EECKENBRUGGE, G.C.; ARROYAVE, J.A. & OLAYA, C.A. 2005. Caracterización del pollen de especies de los géneros *Passiflora* e *Dilkea*. *Acta Agronômica* 54(3): 19-23.
- BERNACCI, L.C., VITTA, F.A. & BAKER, Y.V. 2003. *Passiflora* L. (Passifloraceae). In: M.G.L. WANDERLEY, G.J. SHEPHERD, A.M. GIULIETTI & T.S. MELHEM (eds.) *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. RIMA, FAPESP. São Paulo, vol.3, p. 248-271.
- BERNHARD, A. 1999. Flower structure, development, and systematics in Passifloraceae and in *Abatia* (Flacourtiaceae). *International Journal of Plant Science* 160(1): 135-150.
- BRAUM, A.F. 2008. Morfologia, anatomia e imunocitoquímica da interação entre pólen e estigma em duas espécies de *Passiflora* (Passifloraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CARREIRA, L.M.M. 1977. Aspectos da ultra-estrutura do pólen de *Passiflora coccinea* Aubl. (Passifloraceae). *Acta Amazônica* 7(3): 329-332.
- CERVI, A.C. & LINSINGEN, L. 2008. Sinopse taxonômica das Passifloraceae Juss. no complexo de cerrado (savana) no estado do Paraná – Brasil. *Iheringia série Botânica* 63(1): 145-157.
- CERVI, A.C. 1997. Passifloraceae do Brasil: Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria* 45: 1-92.
- CERVI, A.C. 2006. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae Editionem* 16: 1-5.
- CHASE M.W.; ZMARTZTY S.; LLEDÓ M.D.; WURDACK K.J.; SWENSEN S.M. & FAY M.F. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences. *Kew Bulletin* 57: 141–181.
- CRONQUIST, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- DE MELO, N.F. & GUERRA, M.S. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92: 309-316.
- DEGINANI, N.B. 2001. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana* 39(1-2): 43-129.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S. & SHARMA, A. 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 1-23.

- DURKEE, L.T. 1982. The floral and extrafloral nectaries of *Passiflora*. *American Journal of Botany* 69(9): 1420-1482.
- DURKEE, L.T. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71(4): 596-602.
- ERDTMAN, G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy*. Angiosperms. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.
- ESCOBAR, L.K. 1989. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 877-885.
- FEUILLET, C. & MACDOUGAL, J.M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13: 34-38.
- FEUILLET, C. & MACDOUGAL, J.M. 2007. Passifloraceae. KUBITZKI, K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Vol. 9. Springer Berlin Heidelberg. p. 270-281.
- HANSEN, A.K.; GILBERT, L.E.; SIMPSON, B.B.; DOWNIE, S.R.; CERVI, A.C. & JANSEN, R.K. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany* 31(1): 138-150.
- HUYNH, K. L. 1972. Étude de l'arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de données cytologiques – IV Le genre *Passiflora*. *Pollen et Spores* 14: 51-60.
- JOHRI, B.M.; AMBEGAOKAR, K.B. & SRIVASTAVA, P.S. 1992. *Comparative embryology of angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland. 464 p.
- KILLIP, E. 1938. The American species of Passifloraceae. *Field Museum of Natural History, Botanical Series* 19: 1-613.
- KOEHLER-SANTOS, P.; LORENZ-LEMKE, A.P.; MUSCHNER, V.C.; BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. & FREITAS, L.B. 2006a. Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 611-630.
- KOEHLER-SANTOS, P.; LORENZ-LEMKE, A.P.; SALZANO, F.M. & FREITAS, L.B. 2006b. Ecological-evolutionary relationships in *Passiflora alata* from Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 66(3): 809-816.

- KOROTKOVA, N.; SCHNEIDER, J.V.; QUANDT, D.; WORBERG, A.; ZIZKA, G. & BORSCH, T. (*in press*). Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis 3 of a recalcitrant clade with sequences of the *petD* group II intron. *Plant Systematic and Evolution*.
- KROSNICK, S.E. & FREUDENSTEIN, J.V. 2005. Monophyly and floral character homology of Old World *Passiflora* (subgenus *Decaloba*: supersection *Disemma*): *Systematic Botany* 30(1): 139-151.
- KROSNICK, S.E.; HARRIS, E.M. & FREUDENSTEIN, J.V. 2006. Patterns of anomalous floral development in the Asian *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). *American Journal of Botany* 93(4): 620-636.
- KUBITZKI, K. 2007. Malesherbiaceae. KUBITZKI, K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Vol. 9. Springer Berlin Heidelberg. p. 247-249.
- KURTZ, S.M.T.F.; SANTOS, C.A.M.; DUARTE, M.R. & SATO, M.E.O. 2003. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 22(2): 105-112.
- LARSON, D.A. 1966. On the significance of the detailed structure of *Passiflora caerulea* exines. *Botanical Gazette* 127(1): 40-48.
- MÄDER, G.; LORENZ-LEMKE, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. & FREITAS, L.B. 2006. Ocorrência de *Passiflora urnaefolia* Rusby no RS: marcadores moleculares auxiliando na identificação de espécies. *In*: 57º Congresso Nacional de Botânica, Sociedade Botânica do Brasil. Resumos, Gramado.
- MASTERS, M. T. (1872). Passifloraceae. *In*: MARTIUS, *Flora brasiliensis* 13(1): 527-628, tab. 106-128.
- MERUVIA, M.Y.L.; PALACIOS, V. & CERVI, A.C. 1993a. Anatomia foliar de *Passiflora capsularis* L. (Passifloraceae). *Acta Biológica Paranaense* 22: 31-44.
- MERUVIA, M.Y.L.; PALACIOS, V. & CERVI, A.C. 1993b. Anatomia foliar de *Passiflora campanulata* Masters (Passifloraceae). *Acta Biológica Paranaense* 22: 45-62.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of dicotyledons*. Claredon Press, Oxford, v. 1 e 2. 1499p.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A. & BAUMGRATZ, J.F. 2004. *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia* 55(85): 17-54.

- MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A. 2007. Passifloraceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25(1): 71-79.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. & BAUMGRATZ, J.F. 2004. Palinotaxonomia das espécies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27(4): 655-665.
- MONDIN, C.A. 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. *Pesquisas série Botânica* 51: 147-150.
- MUSCHNER, V.C. 2005. Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M. & FREITAS, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 90(8): 1229-1238.
- PÉREZ, J.O. 2007. Study of the diversity of genus *Passiflora* L. (Passifloraceae) and its distribution in Colombia. Doutorado em ciências agrônômicas, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France.
- PLOTZE, R.O.; FALVO, M.; PÁDUA, J.G.; VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, G.C.X. & BRUNO, O.M. 2004. Análise biométrica de órgãos foliares de *Passiflora*. 49ª *Reunião da RBRAS*. pp. 104-109.
- PRESTING, D. 1965. Zur morphologie der Pollenkörner der Passifloraceen. *Pollen et Spores* 7: 193-247.
- PUNT, W., HOEN, P.P., BLACKMORE, S., NILSSON, S. & Le THOMAS, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology* 143: 1-81.
- ROTH, I. 1964. Morfologia, anatomia y desarrollo de la hoja pinnada y de las glándulas laminales em *Passiflora* (Passifloraceae). *Acta Botanica Venezuelica* 9: 363-380.
- SACCO, J. C. 1980. Passifloráceas. In: R. Reitz (ed.) *Flora Ilustrada Catarinense*. fasc. Pass. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí.

- SHORE, J.S.; MCQUEEN, K.L. & LITTLE, S.L. 1994. Inheritance of plastid DNA in the *Turnera ulmifolia* complex. *American Journal of Botany* 81: 1636–1639.
- SILVÉRIO, A. & MARIATH, J.E.A. 2005. A superfície estigmática e a caracterização anatômica das papilas estigmáticas em *Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae). *In: 56° Congresso Nacional de Botânica, Sociedade Botânica do Brasil. Resumos, Curitiba.*
- SILVÉRIO, A. & MARIATH, J.E.A. 2007. The process of formation of the stigma in *Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae). *In: 21° Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios.*
- SILVÉRIO, A. 2009. Aspectos embriológicos de espécies do gênero *Passiflora*, com ênfase no potencial de transmissão organelar. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SILVÉRIO, A.; ALMEIDA-TORMES, S.B.F. & MARIATH, J.E.A. 2005. A andro e ginosporogênese em *Passiflora elegans* Masters e *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): dados preliminares. *In: 56° Congresso Nacional de Botânica, Sociedade Botânica do Brasil. Resumos, Curitiba.*
- SILVÉRIO, A.; ALMEIDA-TORMES, S.B.F. & MARIATH, J.E.A. 2009. Ginosporogênese e ginogametogênese de *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Biociências.*
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Claredon Press, Oxford, v.1 e 2. 1102p.
- SOUZA, M.M. & PEREIRA, T.N.S. 2000. Development of pollen grain in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* 23(2): 469-473.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; HOFFMANN, M.; MELO, E.J.T. & LOURO, R.P. 2002a. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* 25(4): 471-475.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S. & MARTINS, E.R. 2002b. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência e Agrotecnologia* 26(6): 1209-1217.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; DIAS, A.J.B.; RIBEIRO, B.F. & VIANA, A.P. 2006. Structural, histochemical and cytochemical characteristics of the stigma and stile

- in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(1): 93-98.
- SOUZA-CHIES, T.T.; YOCKTENG, R. & NADOT, S. 2005. Systématique moléculaire comparée en France et au Brésil du genre *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Cahiers Agricultures* 14(2): 209-215.
- SPIRLET, M.L. 1965. Utilisation taxonomique des grains de pollen de Passifloracées. *Pollen et Spores* 7: 249-301.
- TAKHTAJAN A.L. 1997. *Diversity and classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- ULMER, T. & MACDOUGAL, J.M. 2004. *Passiflora – Passionflowers of the world*. Timber Press, Portland-Cambridge. 430p.
- VARASSIN, I.G.; TRIGO, J.R. & SAZIMA, M. 2001. The role of néctar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 139-152.
- YOCKTENG, R. & NADOT, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*ncpGS*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 379-396.
- ZAMBERLAN, P.M. 2007. Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAPÍTULO II

Artigo 1. Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil

Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil

Greta Aline Dettke^{1*}, Rinaldo Pires dos Santos²

1. Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Bloco IV, Prédio 43433, Campus do Vale, Bairro Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: gretadet@yahoo.com.br

2. Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para contato.

INTRODUÇÃO

A antera representa a parte superior do androceu das plantas com flores, que forma e protege o tecido esporogênico. Este tecido dá origem aos esporos da geração esporofítica das angiospermas e posteriormente, após mitose, à geração gametofítica, representada, na antera, pelos grãos de pólen ou gametófitos masculinos imaturos (COCCUCI & MARIATH, 1995). A morfologia (externa e interna) da antera é extremamente variável nos vários grupos vegetais e tem sido fonte de um grande número de características importantes para o entendimento da evolução das angiospermas (STEBBINS, 1974; CRONQUIST, 1981; JUDD *et al.*, 1999). Dentre elas destaca-se o endotécio, estrato parietal do microsporângio, cujos padrões de espessamentos ou ausência deles revelam sobre os mecanismos de deiscência da antera (KEIJZER, 1987), bem como a evolução das espécies em vários níveis taxonômicos (MANNING, 1996), tais como assinalado para as famílias Aceraceae (JACOBS & LERSTEN 1994), Araceae (FRENCH, 1985, 1986), Asteraceae (DORMER, 1962), Begoniaceae (TEBBITT & MACIVER, 1999), Iridaceae (MANNING & GOLDBLATT, 1990), Loranthaceae (VENTURELLI, 1983; BHATNAGAR & GARG, 1984), Orchidaceae (FREUDENSTEIN, 1991), Solanaceae (GARCÍA, 2002) e várias espécies de monocotiledôneas (GERENDAY & FRENCH, 1988).

Outro importante elemento da antera é o grão de pólen, cuja importância na taxonomia das angiospermas tem sido reconhecida em trabalhos clássicos como de WODEHOUSE (1935), ERDTMAN (1952) e WALKER & DOYLE (1975) e, a partir de então, aplicada em inúmeros grupos de vegetais.

Poucos trabalhos tratam da anatomia de órgãos reprodutivos de espécies de Passifloraceae, destacando-se os que abordam a origem dos verticilos e corona e estrutura dos tecidos secretores (BERNHARD, 1999; KROSINICK & FREUDENSTEIN, 2005; KROSINICK *et al.*, 2006; AMELA GARCÍA *et al.*, 2007), estrutura e histoquímica da superfície estigmática (SOUZA *et al.*, 2006), aspectos embriológicos (JOHRI *et al.*, 1992; SOUZA & PEREIRA, 2000; AMELA GARCÍA *et al.*, 2002, 2003; SOUZA *et al.*, 2002a,b), palinologia (PRESTING, 1965; SPIRLET, 1965; ARAÚJO & SANTOS, 2004; MILWARD-DE-AZEVEDO *et al.*, 2004; BARRIOS *et al.*, 2005) e estrutura da esporoderme de algumas espécies (LARSON, 1966; CARREIRA, 1977; AMELA GARCÍA *et al.*, 2002). Assim, num contexto geral, pouco é conhecido sobre o potencial da aplicação de características morfológicas na resolução de conflitos que revelam os atuais estudos de filogenia molecular do grupo (MUSCHNER *et al.*, 2003; YOCKTENG & NADOT, 2004; MUCHNER, 2005; SOUZA-CHIES *et al.*, 2005; HANSEN *et al.*, 2006) e nas novas propostas de classificação (FEUILLET & MACDOUGAL, 2003).

Este estudo tem por objetivos ampliar o conhecimento acerca da morfologia externa e interna da antera de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) ocorrentes nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Brasil), e contribuir com características morfológicas que sejam úteis nas análises taxonômicas e sistemáticas do grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas onze espécies de *Passiflora* nativas do Rio Grande do Sul e duas nativas de Santa Catarina, pertencentes a três dos quatro subgêneros estabelecidos por FEUILLET & MACDOUGAL (2003), sendo o material testemunho das populações estudadas depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN), como segue: subgênero *Astrophea* (DC.) Mast.: *Passiflora haematostigma* Mart. ex Mast. (ICN152173-SC, ICN152122-SC); subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb.: *P. capsularis* L. (ICN152171, ICN150004, ICN153009), *P. misera* Kunth (ICN152190, ICN152269), *P. morifolia* Mast. (ICN159142), *P. suberosa* L. (ICN152091, ICN152272, ICN153002, ICN122178, ICN152176), *P. truncata* Regel (ICN152128-SC); e subgênero *Passiflora* L.: *P. actinia* Hook. (ICN152094), *P. alata* Curtis (ICN152273, ICN152353), *P. amethystina* J.C. Mikan (ICN152177), *P. caerulea* L. (ICN152093, ICN152175, ICN152173-SC), *P. edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg. (ICN152179, ICN159143, cultivada: Victor Graeff e Porto Alegre (RS)), *P. elegans* Mast. (ICN152092) e *P. tenuifila* Killip (ICN152275).

As anteras maduras, de flores em antese ou botões em pré-antese, foram removidas sob microscópio estereoscópico, em laboratório, ou sob lupa manual, em campo. As amostras foram imersas em solução fixadora primária, uma mistura de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (ROLAND & VIAN, 1991), a temperatura ambiente e sob pressão negativa de 600 mmHg, em estufa a vácuo, por 24 horas, ou submetidas à vácuo manual com o auxílio de uma seringa descartável, em campo. O material permaneceu estocado no fixador, a pressão ambiente e a temperatura de 10° C, por no máximo seis meses antes da utilização.

Após lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (três vezes, durante 30 minutos cada), o material foi desidratado em série crescente de etanol (10, 30, 50, 70, 90 e 100%; 30 minutos cada) e série etanol-clorofórmio (nas proporções 1:0, 1:1; 0:1, 1:1 e 1:0; 30 minutos cada), e incluído em resina acrílica a base de hidroxietilmetacrilato (Tecnovith 7100, Kulzer) (GERRITS & SMID, 1983).

Seções semifinas, de 0,5 a 2 µm de espessura, foram feitas em micrótomo de rotação, equipado com navalhas descartáveis de vidro de 6 ou 8 mm. As seções foram suspensas em água morna (aproximadamente 50°C), montadas em lâminas histológicas e secas em placa aquecedora (50-70°C). Para o estudo do espessamento do endotécio, foram realizadas seções de 10-12 µm de espessura, montadas nas mesmas condições.

Como corante básico, foi utilizado o corante metacromático Azul de Toluidina O (C.I. 52040), em concentração de 0,05% e pH 4,4 (O'BRIEN & MCCULLY, 1981). A combinação de Ácido periódico-Reativo de Schiff (PAS) (O'BRIEN & MCCULLY, 1981), Azul de Astra 1% em solução aquosa e Fucsina Básica (C.I. 42500) 0,05% em solução aquosa (KRAUS *et al.*, 1998) foi

utilizada para a confecção de lâminas permanentes, utilizando verniz vitral incolor 500[®] como meio de montagem (PAIVA *et al.*, 2006).

Para a realização dos testes histoquímicos, as seguintes técnicas foram utilizadas: Cloreto Férrico 10%, para substâncias fenólicas (JOHANSEN, 1940); Ácido periódico-Reativo de Schiff (PAS), para polissacarídeos totais (O'BRIEN & MCCULLY, 1981); IKI (solução de Lugol), para amido (JOHANSEN, 1940); Alcian Blue 8GX 1% (C.I. 74240) em solução acética 3%, para ácidos polissacarídicos e ácidos pécticos (JENSEN, 1962); Vermelho de Rutênio, para ácidos polissacarídicos e ácidos pécticos (JOHANSEN, 1940); Calcofluor White, seguido de excitação sob luz ultravioleta (filtro 340-380 nm), para a localização de celulose (O'BRIEN & MCCULLY, 1981); Sudan Black B (C.I. 26150) saturado em solução alcoólica a 95 %, para a localização de lipídios (JENSEN, 1962); Sudan III (C.I. 26100) para a localização de substâncias lipídicas (pollenkit) (BAKER, 1947), utilizando-se pólen fresco ou fixado; Auramina O (C.I. 41000), em concentração 0,01% em tampão Tris HCl (HESLOP-HARRISON, 1977; NEPI & FRANCHI, 2000), seguido de excitação sob luz ultravioleta (filtro 340-380 nm), para a localização de compostos lipídicos (esporopolenina, orbículos e membrana peritapetal); Fucsina Básica (C.I. 42500) 0,05% em solução alcoólica 2,5%, para a identificação da ectexina e endexina (FAEGRI & IVERSEN, 1964; PUNT *et al.*, 2007); Coomassie Blue Brilhante R-250 (C.I. 42660) com concentração de 0,25% em solução acética 7%, para proteínas totais (SOUTHWORTH, 1973). Para a análise da composição hemicelulósica da esporoderme dos grãos de pólen, seções de 2 µm de espessura foram encubados por 40 min com hemicelulases 2%, (GUERRA & SOUZA, 2002) e posteriormente corados com Azul de Astra 1% em solução aquosa.

Para o estudo da vascularização, as anteras foram imersas em solução clarificante (HERR, 1971) e analisadas em microscopia de luz polarizada. Para a análise dos espessamentos das células do endotécio, fragmentos dos arcos e conectivo foram tratados em solução de ácido láctico (MANNING & GOLDBLATT, 1990), montadas em lâminas semi-permanentes com gelatina glicerizada e analisados em microscopia de luz polarizada ou montados em suportes de alumínio e analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leitz DM-HC, equipado com óptica de campo claro, contraste interferencial, polarização e fluorescência.

Para a análise em MEV, as anteras fixadas foram lavadas em tampão fosfato de sódio, desidratadas em série crescente de etanol e transferidas para acetona 100%. A seguir, foram processadas em secador de ponto crítico. As anteras foram montadas em fita adesiva metálica sobre suportes de alumínio. Algumas foram fraturadas para a exposição do endotécio e grãos de pólen.

Para a análise da morfologia polínica e resistência à acetólise (esporopolenina), grãos de pólen foram tratados com solução de acetólise (ERDTMAN, 1960), sendo parte dos grãos montados

em lâminas palinológicas semipermanentes com gelatina glicerinada. Outra parte dos grãos foi destinada à inclusão em resina e montagem de lâminas histológicas, corados com Fucsina Básica. O restante dos grãos acetolizados, após lavagem, foi ressuspenso em água destilada e uma gota da solução foi transferida para a superfície de 1 cm² de filme fotográfico preto e branco sobre o lado da emulsão (CLAUGHER, 1986), previamente exposto à luz, revelado e colado sobre suportes de alumínio. O filme foi seco em estufa aquecida a 60°C. Os grãos de pólen, secos e aderidos sobre o filme fotográfico, foram recobertos com fita adesiva, sendo esta rapidamente removida, em um único movimento, obtendo-se grãos de pólen fraturados.

Todo o material destinado à MEV foi recoberto com 10 a 15 nm de ouro ou platina. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6060, sob 10 kV.

RESULTADOS

ANTERA – Nas flores em botão e durante a abertura da flor, as anteras das espécies de *Passiflora* estudadas estão posicionadas paralelamente em relação ao ovário, estando os esporângios voltados para o ovário (anteras introrsas) (Figs. 1A-D). Logo após a abertura inicial da flor, ocorre um giro de 270° em relação à posição inicial, ficando os estômios dos esporângios voltados para a corona e perpendiculares ao ovário, como um mecanismo que facilita a retirada dos grãos de pólen pelos polinizadores quando estes visitam os nectários na base do androginóforo (Figs. 1E-L). Semelhante comportamento é verificado também nos estiletos, inicialmente eretos (Figs. 1F-H), se curvam em direção à corona (Figs. 1I-L), facilitando a deposição do pólen nos estigmas, e, após a polinização, tornam a ficar eretos. Este processo de abertura da flor até a curvatura completa das anteras e, posteriormente estiletos, dura em torno de 5 horas em *P. caerulea*.

Os aspectos da morfologia externa das espécies de *Passiflora* podem ser visualizados nas figuras 2A-M.

As anteras das espécies do gênero *Passiflora* são dorsifixas basal-medianofixas, versáteis, tetraesporangiadas, deiscentes mediante duas fendas longitudinais. Na região terminal do filete, observa-se uma pequena porção de menor diâmetro e flexível, responsável pela movimentação vertical e horizontal da antera, como pode ser visto em *P. suberosa*, *P. edulis* e *P. tenuifila* (Figs. 2E2, 2K2 e 2M2). A inserção do filete ocorre geralmente na base da porção mediana da antera (Figs. 2A2, 2E2, 2H2, 2K2) ou pouco acima desta região (Figs. 2B2, 2C2, 2D2, 2F2, 2G2, 2I2, 2J2, 2L2, 2M2), nunca exatamente no meio da antera.

A região basal da antera pode ser levemente ou profundamente dividida, com a formação de dois ou quatro lobos, dependendo da espécie. Na região apical pode estar presente uma extensão do

conectivo na forma de um apêndice ou apículo, proeminente em *P. haematostigma* (Figs. 2A1 e 2A2), *P. capsularis* (Figs. 2B1 e 2B2) e *P. tenuifila* (Figs. 2M1 e 2M2). Em algumas espécies, o ápice da antera pode ser dividido em dois lobos, acompanhando as tecas. Em *P. suberosa*, o conectivo termina juntamente com os esporângios (Tab. 1).

As espécies apresentam, quando deiscente, comprimentos da antera variando entre 0,2 cm, em *P. suberosa*, e 1,3 cm, em *P. alata* e *P. edulis* (Tab. 1). As espécies do subgênero *Passiflora* apresentam as maiores anteras, sendo *P. tenuifila* a espécie com anteras menores. Entre os representantes do subgênero *Decaloba*, *P. misera* apresenta a maior antera. *P. haematostigma*, do subgênero *Astrophea*, apresenta anteras grandes, como às do subgênero *Passiflora* (Figs. 3A-M).

Anatomicamente, as anteras maduras de *Passiflora* estudadas apresentam, como estratos parietais, epiderme e endotécio, nas regiões dos arcos e parte do conectivo, e uma a duas camadas de células colapsadas da camada média. Conectivo e feixes vasculares podem ser também ser identificados nas seções transversais das espécies estudadas (Figs. 4A-F, 5A-G). Nas espécies do subgênero *Astrophea* e *Passiflora*, a proporção do conectivo é bem maior em relação ao das espécies de *Decaloba*, fato que se deve ao maior tamanho da antera nestas espécies.

A epiderme apresenta-se coberta por cutícula relativamente fina (Fig. 9G), lisa (Fig. 6A) ou estriada (Figs. 6B-L), dependendo da região da antera analisada. Na região dorsal mediana da antera, a cutícula é lisa e gradativamente torna-se estriada, conforme se aproxima das regiões dos arcos (Fig. 6B). Na região ventral, a cutícula é predominantemente estriada, mais evidente na área do arco próxima às fendas (Figs. 6H-L). Não foram encontradas diferenças significativas na ornamentação da cutícula entre as espécies analisadas.

A epiderme possui células com paredes anticlinalis retas ou levemente sinuosas e estômatos nas áreas que cobrem o conectivo, tanto na região ventral quanto na dorsal (Figs. 6D-E). Nas células epidérmicas do arco ocorrem idioblastos com ráfides, dispersos aleatoriamente (Figs. 8A-B). *P. haematostigma* apresenta longos e esparsos tricomas unicelulares na região dorsal (Figs. 2A2 e 6C) e *P. suberosa* pode apresentar raras papilas epidérmicas, também nesta região. Todas as populações analisadas de *P. edulis* apresentaram inclusões no conteúdo das células epidérmicas que reagiram positivamente ao teste para a detecção de compostos fenólicos (Fig. 9H).

Próximo à linha de deiscência, no arco externo de cada teca, as espécies analisadas apresentam as células epidérmicas alongadas anticlinalmente (células estomiais), com um a três estratos celulares, cujas alturas destas células variam entre as espécies analisadas (Figs. 4A-F, 5A-G, 9A-D). Apenas *P. haematostigma* e *P. suberosa* não apresentam, nesta região, células epidérmicas distintas das demais (Figs. 4A e 4E, respectivamente).

O endotécio está presente na região do arco, onde normalmente é uni ou biestratificado, e nas regiões adjacentes ao conectivo, próximas aos esporângios, onde ocupa de dois a quatro estratos

celulares (Figs. 7A-M). Em *P. haematostigma*, endotécio dos arcos é contínuo com o conectivo, que também apresenta espessamentos secundários, formando uma “continuidade” entre as tecas da antera (Fig. 7A). Os espessamentos secundários do endotécio e conectivo apresentaram reação positiva aos testes para celulose e lignina.

Dois tipos de espessamentos foram identificados no endotécio dos arcos nas espécies estudadas (Figs. 8C-O): as espécies do subgênero *Decaloba* possuem espessamentos predominantemente helicoidais, com quatro a sete voltas, podendo ocorrer anastomoses entre elas (Figs. 8C, H-K). Eventualmente, são encontrados espessamentos em forma de “O” e “U”. *P. suberosa* possui as células do endotécio alongadas periclinalmente (Figs. 8H e 8K), diferente das demais espécies de *Decaloba* onde estas são mais curtas (Figs. 8I-J). *P. haematostigma* e todas as espécies do subgênero *Passiflora* possuem as células do endotécio com espessamentos tipicamente em formato de “U”, raramente em “O”, dois a cinco por célula (predominantemente três), com a região menos espessa voltada para a epiderme (Figs. 8D-G,L-O).

No conectivo as células são de formato aproximadamente isodiamétrico e os espessamentos, em todas as espécies analisadas, ocorrem na forma de faixas em todas as paredes, com anastomoses frequentes (Fig. 8P).

O conectivo, nas espécies estudadas, possui reserva amilífera abundante e na forma de grandes grãos de amido compostos (Figs. 9A-B, E-F), os quais são re-assimilados após a deiscência da antera. Grãos de amido menores são encontrados também nas células estomiais e células do endotécio (Fig. 9B), estando geralmente ausentes na antera deiscente. Também, no conectivo, são encontrados idioblastos com drusas, em maior ou menor quantidade, dependendo da espécie analisada, dispersos aleatoriamente e não associados aos feixes vasculares (Fig. 10A-M).

A membrana peritapetal forma uma camada contínua revestindo a superfície interna da antera de todas as espécies de *Passiflora* estudadas e apresenta mesma reação de coloração da exina dos grãos de pólen (Figs. 9I-K). Sobre esta se encontra a membrana tapetal, formada pelos orbículos, também de natureza química similar à exina (Figs. 9I-K).

Os feixes vasculares que irrigam as anteras são anficrivais (Fig. 9L), representados apenas por traqueídes (Fig. 9M). Foram reconhecidos três padrões de vascularização. *P. haematostigma* apresenta um feixe vascular central, pouco ramificado na região apical e basal da antera (Fig. 10A). Nas espécies de *Decaloba*, o feixe vascular não se ramifica, possuindo apenas dois prolongamentos na região basal (Figs. 10B-F). As espécies do subgênero *Passiflora* apresentam os feixes vasculares bastante ramificados e bem distribuídos em todas as regiões do conectivo (Figs. 10G-M).

GAMETÓFITO IMATURO – O gametófito imaturo ou grãos de pólen apresentam variações de tamanho e formato e, no momento da dispersão, grandes quantidades de substâncias lipofílicas

(pollenkitt) são encontradas sobre a esporoderme (Figs. 11A-C), especialmente entre as columelas livres do retículo (Figs. 14A-B).

Embora em menor frequência, porém importante para algumas espécies, tais como *P. actinia*, *P. caerulea*, *P. edulis* e *P. elegans*, são encontrados grãos de pólen distintos da maioria, de três tipos: grãos de pólen de grandes dimensões, cerca de 50% maiores que os pólenes normais, com esporoderme mais fina, intina extremamente fina e com citoplasma translúcido (Fig. 11D); grãos de pólen de menores dimensões, com citoplasma translúcido, aberturas corretamente formadas, intina não detectável, exina mais espessa que nos normais (Fig. 11E) e grãos de pólen semelhantes aos anteriores, porém com o citoplasma colapsado (Fig. 11F).

Em *Passiflora* os grãos de pólen são dispersos na forma bicelular, estando a célula generativa envolta pelo citoplasma da célula vegetativa (Figs 11G-I). A célula generativa apresenta citoplasma denso, formato alongado fusiforme e está localizada na região central da célula vegetativa, próximo ao núcleo. Somente em *P. misera* foi verificado o envolvimento parcial da célula generativa pelo núcleo da célula vegetativa, formando a unidade germinativa masculina (Fig. 11I). Em uma das populações de *P. caerulea* analisada (ICN152175), a célula vegetativa apresentou grandes acúmulos de polissacarídeos intimamente associados ao núcleo (Fig. 12E).

No citoplasma da célula vegetativa são encontrados grandes acúmulos de amido, na forma de grãos compostos, que podem permanecer ou não após a deiscência da antera, sendo que em uma mesma teca é possível encontrar grãos de pólen com e sem amido (Figs. 12E-F, Apêndice 1-G). Na maioria das espécies, o pólen disperso possui o citoplasma da célula vegetativa PAS positivo, indicando a presença de polissacarídeos insolúveis (Apêndice 1-G).

ESPORODERME – Todas as espécies apresentam intina composta por três estratos: o estrato mais externo péctico e hemicelulósico (intina 3), o intermediário péctico e protéico (intina 2) e o mais interno péctico e celulósico (intina 1) (Fig. 12A-I; Apêndice 1-A, E-H, Tab. 2). Verifica-se uma grande variação na espessura da intina entre as espécies estudadas: as espécies do subgênero *Passiflora* possuem intina extremamente espessa, em torno de 2,5-3,5 μm , podendo atingir 5,5 μm em algumas regiões da esporoderme, como nas aberturas; as espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Decaloba* possuem a intina relativamente fina, entre 1-1,8 μm , atingindo aproximadamente 2,2 μm nas áreas das aberturas. Nas espécies do subgênero *Passiflora*, a intina apresenta-se geralmente com um aspecto ondulado, especialmente se visualizadas as seções para a detecção de proteínas totais (Fig. 12G).

A intina 3 possui espessura aproximadamente uniforme por toda a extensão da esporoderme, enquanto que tanto a intina 2 quanto a intina 1 são mais espessas nas regiões das aberturas.

A exina das espécies de *Passiflora* estudadas apresenta-se diferenciada em ectexina e endexina (Figs. 13A-M). Estes dois estratos possuem como constituinte principal a esporopolenina, evidenciada pelos testes de compostos lipídicos (Auramina O e Sudan Black) (Figs. 13A-D) e de resistência à acetólise (Figs. 13F-G), e possuem constituição química diferenciada, conforme demonstrado pela coloração com Fucsina Básica, na qual a ectexina é corada de vermelho, enquanto a endexina reage fracamente ao corante (Figs. 13F-G). Esta diferenciação também se revela pela autofluorescência, onde nas espécies do subgênero *Passiflora* e em *P. suberosa*, indica a ocorrência de menores quantidades de endexina também na nexina 1 (Fig. 13E).

Além de esporopolenina, a endexina também agrega hemiceluloses, confirmado pela coloração com Azul de Astra (Figs. 13H-M) e a não coloração deste estrato após o tratamento com hemicelulases. Não há reação deste estrato da esporoderme com Alcian Blue, Vermelho de Rutênio e PAS (Tab. 2). A endexina também apresenta coloração aproximadamente azulada com o corante metacromático Azul de Toluidina, quando analisadas seções mais espessas (2 μm), indicando a presença de grupos polianiônicos, ao contrário da ectexina, que se apresenta esverdeada devido à presença de derivados fenólicos (Figs 11G-I, Apêndice 1-A: especialmente *P. truncata*, *P. haematostigma*, *P. misera*, *P. amethystina* e *P. capsularis*).

Há diferenças na superfície interna da endexina. Análises de grãos de pólen acetolizados e fraturados revelaram que a superfície interna da endexina das espécies do subgênero *Passiflora* é ondulada (verrucada), com grandes sulcos que replicam os muros do retículo da superfície externa da ectexina (Figs. 14C-E). Nas espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Decaloba*, esta superfície é lisa (Fig. 14F), somente sendo interrompida na região das endoaberturas.

Quanto à ectexina, as espécies do subgênero *Passiflora* possuem o retículo com lumes grandes e com columelas livres em seu interior (Fig. 14A). Nas espécies de *Astrophea* e *Decaloba*, os lumes são reduzidos e a presença de columelas livres é rara, exceto em *P. capsularis* e *P. morifolia*, que possuem lumens amplos e muitas columelas livres no interior (Fig. 14B). Sob o teto do retículo, é encontrada somente uma fileira de columelas (Fig. 14G-K), exceto próximo às regiões das aberturas onde mais de uma columela, em geral mais baixas, podem estar pareadas fazendo a sustentação do teto (Fig. 14H).

Em microscopia óptica de campo claro, foram evidenciados três configurações da nexina 1 e sexina. As espécies do subgênero *Passiflora* possuem a nexina 1 de composição mista, ou seja, não apresentam uma camada basal compacta (ou composta somente por ectexina) e as columelas, compostas de ectexina, encontram-se imersas na nexina 1. Este estrato morfológico apresenta reação positiva à detecção de ectexina e hemiceluloses, estas em menor intensidade que a reação com a endexina (Figs. 13H-I). As espécies de *Decaloba* (exceto *P. suberosa*) e *Astrophea* possuem a nexina 1 composta exclusivamente por ectexina (camada basal), assim como a sexina (Figs. 13J-

L). Próximo às aberturas a camada basal pode ser descontínua. *P. suberosa* apresenta a nexina 1 de aspecto granular e também com reação positiva à ectexina e hemicelulases e a sexina composta somente por ectexina. Quanto ao aspecto da exina após fratura de grãos acetolizados, vistos em MEV, *P. suberosa* e todas as espécies do subgênero *Passiflora* apresentam falhas ou orifícios vazios nas áreas correspondentes à nexina 1 (Figs. 14I-J). As demais espécies possuem a exina visualmente compacta. Estes orifícios não foram observados nas seções de grãos acetolizados observados sob microscopia óptica. O teste para proteínas totais revelou a presença destes compostos também na nexina 1, especialmente nas espécies do subgênero *Passiflora* (Fig. 12G, Apêndice 1-E). Nas demais espécies, a coloração é menos intensa, porém ocorre com grande intensidade sobre as áreas das aberturas e sobre as columelas livres dos lúmens (Figs. 12H, Apêndice 1-E).

Nas espécies que possuem opérculos sobre as aberturas (*P. misera*, *P. morifolia*, *P. truncata* e *P. suberosa*) verifica-se uma constituição diferenciada da exina entre as áreas de mesocolpo e as áreas operculares. A exina dos opérculos é em geral mais fina e menos densa à coloração com Fucsina Básica (Fig. 13M, Apêndice 1B-C).

Após a análise da esporoderme nas espécies de *Passiflora*, foram obtidos três padrões estruturais (Fig. 15): Tipo 1 - as espécies do subgênero *Passiflora* possuem intina espessa, endexina internamente ondulada e ectexina sem camada basal compacta, estando a base das columelas imersas na nexina 1, de composição mista (Fig. 15A); Tipo 2 - em *Astrophea* e na maioria das espécies de *Decaloba*, a intina é fina, a endexina lisa e a ectexina apresenta camada basal compacta (Fig. 15B); Tipo 3 - em *P. suberosa* a intina é fina, a endexina é lisa e a ectexina, sem camada basal compacta, possui aspecto granular na nexina 1, também de composição mista (Fig. 15C).

A Tabela 3 apresenta uma síntese das principais características morfológicas, com possível valor taxonômico e/ou filogenético, encontradas para as espécies de *Passiflora* em estudo, bem como suas variações entre as espécies.

DISCUSSÃO

ANTERA – No decorrer da antese, os verticilos florais de espécies de *Passiflora* apresentam um movimento característico, relatado em diversos estudos com espécies nativas e cultivadas, e responsável por estabelecer uma barreira temporal para a polinização (JANZEN, 1968; SAZIMA & SAZIMA, 1978; KOSCHNITZKE & SAZIMA, 1997; VARASSIN & SILVA, 1999; LONGO & FISCHER, 2006). Estando o pólen disponível desde o início da antese, quando as anteras já se encontram abertas, a posição ereta dos estiletos (mas já com estigmas receptivos) evita a ocorrência inicial de

polinização (incluindo autopolinização) e as flores funcionam primeiramente como doadoras de pólen e só depois, após a deflexão dos estigmas, passam a ser receptoras de pólen (JANZEN, 1968).

A morfologia da antera, especialmente da conexão entre o filete e o conectivo, é fundamental para ampliar a flexibilidade durante a movimentação, assim como a posição de inserção do filete, sempre abaixo do meio da antera. Desta forma, a extensão entre a inserção do filete e o ápice da antera é sempre maior e, conseqüentemente, o seu peso. Esta diferença pode ser importante neste movimento durante a abertura da flor.

A variação do tamanho da antera de *Passiflora* está diretamente relacionada com o tamanho das flores de cada espécie. Espécies dos subgêneros *Passiflora* e *Astrophea* possuem flores de grandes dimensões, destacando-se entre as espécies estudadas *P. edulis*, *P. alata*, *P. amethystina* e *P. caerulea*, que também possuem as maiores anteras. *P. suberosa*, que possui a antera cerca de seis vezes menor que as espécies acima citadas, também está entre as espécies com as menores flores de *Passiflora*, podendo atingir em média 1,5-2,5 cm de diâmetro (ULMER & MACDOUGAL, 2004).

As características anatômicas das espécies estudadas estão de acordo com os relatos anteriores para o grupo, quanto aos tecidos constituintes (JOHRI et al., 1992; AMELA GARCÍA et al., 2002). A região superficial da epiderme apresenta vários graus de ornamentação da cutícula, desde lisa até estriada, dependendo da região da antera considerada, e não variável entre as espécies. AMELA GARCÍA et al. (2002), baseados na análise de seções transversais da antera, relatam a presença de cutícula estriada em todas as espécies estudadas, com exceção de *P. misera*, com cutícula lisa. Neste estudo *P. misera* apresentou cutícula predominantemente estriada, em microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV), como todas as demais espécies, e lisa somente na região mediana dorsal.

A presença de células estomiais é assinalada por RAJU (1956), em *P. calcarata*, e posteriormente por AMELA GARCÍA et al. (2002), que associam sua ocorrência às anteras grandes de *P. caerulea*, *P. mooreana*, *P. foetida* e *P. chrysophylla*. Em *P. misera* e *P. suberosa*, com anteras menores, estas células seriam menos ou não alongadas anticlinalmente. Os autores atribuem a estas células a função de auxiliar na abertura da antera, promovendo forças durante a desidratação. Neste estudo, também as espécies com anteras maiores (subgênero *Passiflora*) apresentam um alongamento maior das células estomiais, sendo que nas espécies de *Decaloba* estas células são mais curtas e, em *P. suberosa*, não se diferenciam das demais células epidérmicas. Entretanto, *P. haematostigma* (*Astrophea*), embora possua antera grande, não possui células estomiais diferenciadas. Outra característica, ainda não documentada para a região do estômio em *Passiflora*, é a presença de mais de um estrato de células estomiais, mesmo em anteras de menores dimensões.

Ainda na epiderme, podem ocorrer idioblastos com ráfides, ainda não relatado para as anteras de Passifloraceae. Estão distribuídos aleatoriamente, somente na região dos arcos, diferem

dos normalmente encontrados nos demais tecidos por possuírem os cristais mais espessos. Também não são encontrados em outras regiões do gênero *Passiflora*, como folhas (DELL'AGLIO *et al.*, dados não publicados).

Tricomas foram encontrados somente na antera de *P. haematostigma* e parece ser característico da espécie, que apresenta também folhas e ovário tricomatosos (VITTA, 2006; MILWARD-DE-AZEVEDO, 2007).

O endotécio representa o estrato subepidérmico das anteras e normalmente possui espessamentos de parede característicos, de acordo com o grupo de Angiospermas (MANNING, 1996). Estes espessamentos são predominantemente lignificados (WHATLEY, 1982; FREUDENSTEIN, 1991; JACOBS & LERSTEN, 1994), mas podem ser apenas celulósicos (FOSSARD, 1969) ou conter também calose (KENRICK & KNOX, 1979). Nas espécies de *Passiflora* estudadas, estes espessamentos são lignificados, mas também reagem à detecção de celulose.

De acordo com MANNING (1996), as anteras da maioria das Angiospermas apresentam mais de um tipo de espessamento secundário nas células do endotécio e conectivo, como verificado nas espécies em estudo, útil para propósitos descritivos. Contudo, para propósitos filogenéticos, de acordo com o autor, são consideradas somente as células do endotécio presentes no arco, que têm origem nos estratos parietais da antera, enquanto que as células com origem a partir das células do conectivo não são consideradas. Estas células apresentam espessamentos em todas as paredes e frequentemente anastomosados, assim como observados em *Passiflora*.

Quanto aos tipos de espessamento do arco, são distintas três categorias principais: “baseplate”, em formato de “U” ou helicoidal, e inúmeras subcategorias (MANNING, 1996). Em *Passiflora* foram encontradas duas destas, em formato de “U”, nas espécies de *Astrophea* e *Passiflora*, e helicoidal nas espécies de *Decaloba*, indicando que esta característica pode ser útil como diagnóstica para os subgêneros e com grande potencial nas análises filogenéticas. No entanto, dada a insuficiente amostragem, em número de espécies e gêneros, não é possível polarizar esta característica para o gênero *Passiflora*. Contudo, considerando a proposta de relógio molecular de MUSCHNER (2005), na qual o clado *Decaloba* seria o primeiro a divergir (ca. 35 Ma) e, posteriormente, os clados *Astrophea* e *Passiflora* (ca. 24 Ma), é possível afirmar que o tipo plesiomórfico de espessamento é o helicoidal e o tipo de espessamento em “U” teria surgido posteriormente em *Passiflora*. A tendência do surgimento de espessamentos em formato de “U”, a partir de espessamentos helicoidais, é relatada para alguns grupos de Angiospermas, como Araceae (FRENCH, 1985, 1986) e Poales (MANNING & LINDER, 1990), mas o contrário também pode ocorrer, como em Iridaceae (MANNING & GOLDBLATT, 1990).

O endotécio é referido como o estrato mecânico das anteras com deiscência rimosa, pois gera forças na região dos arcos da antera dependendo do grau de hidratação e, conseqüentemente,

participa da abertura da antera e exposição dos grãos de pólen (KEIJZER, 1987). Nas espécies de *Passiflora*, participam da abertura da antera, as células estomiais e o endotécio. Em *P. haematostigma* e *P. suberosa*, que não apresentam células estomiais, este papel possivelmente é desempenhado somente pelo endotécio e compensado por meio do incremento de células espessadas no conectivo, em *P. haematostigma*, e pelo alongamento anticlinal das células deste tecido nos arcos, em *P. suberosa*.

Internamente ao endotécio da antera madura, permanecem alguns estratos das células médias, já colapsadas e comprimidas, que em *Passiflora* iniciam o colapso celular no estágio de micrósporo livre (AMELA GARCÍA *et al.*, 2002).

Diretamente em contato com os grãos de pólen do lóculo, encontram-se as membranas peritapetal e tapetal. A membrana peritapetal é uma camada contínua que reveste a superfície interna da antera e se rompe durante a deiscência (CHAPMAN, 1987). Esta membrana é acetólise resistente, constituída por esporopolenina e localizada sobre a face tangencial externa do tapete (BHANDARI, 1984). A membrana tapetal, composta pelos orbículos, possui natureza similar à membrana tapetal, mas de origem distinta (SANTOS, 2000).

Os orbículos são estruturas geralmente esféricas e de tamanhos variados, menores que 5 µm, que recobrem a superfície interna das células do tapete secretor (HUYSMANS *et al.*, 1998). São formados no espaço periplasmático, entre a membrana plasmática e a parede celular, como demonstrado em *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) (SANTOS & MARIATH, 2003). Após a dissolução das células do tapete, os orbículos se unem à membrana peritapetal, formando uma única camada (SANTOS, 2000).

HUYSMANS *et al.* (1998) atribuem aos orbículos possíveis funções, entre as quais a participação no mecanismo de transporte de esporopolenina, proteção contra osmose e colapso dos micrósporos em desenvolvimento, associação com a dispersão do pólen, participação na degradação das células do tapete ou somente como um produto final da atividade deste tecido. WANG *et al.* (2003) demonstram que os orbículos transportam uma proteína esporofítica necessária na fase de maturação dos grãos de pólen em cereais.

Mais de 70 famílias de Angiospermas possuem orbículos (HUYSMANS *et al.*, 1998), que foram relatados recentemente por AMELA GARCÍA *et al.* (2002) para Passifloraceae. Estes autores descrevem a ultraestrutura dos orbículos de *P. caerulea* como corpos sólidos, pequenos, entre 0,2 e 0,4 µm de diâmetro e mesma eletrodensidade da exina. Nas espécies estudadas, em microscopia de fluorescência (após o uso de Auramina O), é possível distinguir estes pequenos orbículos aderidos à membrana peritapetal pela reação semelhante à exina.

O conectivo inclui todas as partes internas da antera com exceção do tecido esporogênico (D'ARCY, 1996). Em *Passiflora*, apresenta como principal composto de reserva grandes

quantidades de amido que normalmente não estão presentes em anteras já deiscientes. Estes grãos também são comuns na epiderme e endotécio, concordando com as observações para *Passiflora* de AMELA GARCÍA *et al.* (2002), que também os encontrou nas células médias, em etapas anteriores do desenvolvimento. Em um cultivar de *Lilium*, CLÉMENT *et al.* (1994) relatam a presença de dois estágios de assimilação de amido nas anteras, o primeiro na fase de crescimento da antera e o segundo durante a maturação dos grãos de pólen, cujo amido é totalmente consumido antes da antese. Os autores destacam a grande importância do conectivo, que age fisiologicamente como um tampão, regulando o nível de açúcares solúveis na antera e disponibilizando-o para o desenvolvimento dos micrósporos.

No conectivo, são encontrados os feixes vasculares que irrigam a antera. Não existe para Passifloraceae nenhum estudo específico sobre a vascularização da antera e pouco se sabe sobre a variação da vascularização entre as espécies. AMELA GARCÍA *et al.* (2002) observam que os feixes vasculares se ramificam na região mediana da antera das espécies estudadas, exceto em *P. suberosa*. De acordo com os autores, a presença de feixes ramificados, dentre outras características, torna *P. misera* (subgênero *Decaloba*) mais similar às espécies dos outros subgêneros estudados (*Passiflora* e *Dysosmia*). É importante salientar, no entanto, que estes autores analisaram esta característica somente por meio de seções transversais da antera. As observações do presente estudo discordam parcialmente de AMELA GARCÍA *et al.* (2002).

Entre as espécies estudadas, foram observados claramente três padrões de vascularização, característicos para cada um dos subgêneros e que pode ser uma importante característica filogenética para o grupo. *Passiflora* apresenta feixes bastante ramificados e *Decaloba* apresenta feixes não ramificados. *Astrophea* apresenta um padrão que parece ser intermediário entre os dois demais subgêneros, ramificado, mas com as ramificações concentradas na região central do conectivo. Neste caso, também, devido à baixa amostragem de táxons, não é possível polarizar esta característica, mas esta pode ter relação com o tamanho das anteras, onde anteras menores possuem vascularização reduzida.

De acordo com autores de biologia evolutiva (tais como PURI, 1951; STEBBINS, 1974; CRONQUIST, 1981) os padrões mais primitivos de vascularização dos verticilos florais seriam próximos ao padrão foliáceo, bastante ramificado e, em diversos grupos, podem ter sofrido modificações, seja por redução do número de feixes vasculares ou pela coesão ou adnação entre eles (PURI, 1951). Assim, a redução extrema da vascularização pode ter sido um evento isolado somente em *Decaloba*, sendo uma apomorfia deste subgênero, embora também se apresente, de forma menos intensa na espécie representante de *Astrophea*.

GRÃOS DE PÓLEN – Os grãos de pólen de *Passiflora* apresentam tipicamente grandes quantidades de substâncias lipofílicas junto à exina (SOUZA & PEREIRA, 2000; SOUZA *et al.*, 2004), na forma de grandes gotas ou de aspecto fibrilar, entre as columelas livres do retículo. Estas substâncias, denominadas pollenkitt, são derivadas da atividade das células do tapete, liberadas quando ocorre a senescência deste tecido nas anteras maduras e depositadas sobre ou entre os espaços existentes na exina (PACINI & HESSE, 2005). O pollenkitt ocorre em grande parte das Angiospermas, na maioria espécies entomófilas, com tapete parietal ou amebóide e possui importantes funções durante a dispersão dos grãos de pólen, participando da aderência dos pólen ao corpo dos polinizadores, e no sistema de reconhecimento do pólen no estigma, pois também leva moléculas protéicas que participam desta interação (PIFFANELLI *et al.*, 1998; PACINI & HESSE, 2005). Incluindo estas, PACINI & HESSE (2005) enumeram vinte diferentes funções para o pollenkitt depositado sobre a esporoderme, entre elas, a proteção hídrica e à radiação, adesão dos grãos ao estigma, atração de polinizadores pela coloração e volatilização de compostos, entre outras.

A diferença de tamanho dos grãos de pólen encontradas neste estudo também é relatada por outros estudos, para várias espécies de *Passiflora* (SOUZA *et al.*, 2003, 2004). Estes autores atribuem a ocorrência de pólen de grandes dimensões à irregularidades na distribuição dos cromossomos durante a meiose, sendo relativamente comum a formação especialmente de tríades (e não de tétrades), como ocorre em *P. edmundoi* (SOUZA *et al.*, 2003), onde um dos grãos da tríade atinge aproximadamente o dobro do tamanho dos outros dois. Em *P. coccinea* Aubl. e *P. galbana* Mast. a frequência destes grãos pode chegar a 2,9% do total produzido (SOUZA *et al.*, 2004). Estes grãos de grandes dimensões e com número cromossômico variável, de acordo com CAETANO-PEREIRA *et al.* (1998), podem ser funcionais e participar da fecundação, podendo produzir variação no número cromossômico das gerações seguintes.

Os grãos de pólen menores possuem a esporoderme não completamente formada e são estéreis. SOUZA *et al.* (2003, 2004) denominam estes grãos de T1 e T2, onde T1 corresponde aos grãos vazios, ou com citoplasma translúcidos, e T2 aos grãos com citoplasma colapsado. De acordo com os autores, estes grãos são resultantes de diferentes processos que geram a esterilidade. Os grãos vazios e relativamente menores indicam que a mal-formação ocorreu durante a segregação dos cromossomos (microsporogênese), enquanto que os grãos com citoplasma colapsado e tamanhos relativamente maiores são o resultado da expressão gênica durante a microgametogênese. A maior frequência de grãos T1 sobre T2 em espécies de *Passiflora* indica que as maiores responsáveis pela perda de viabilidade nos grãos de pólen destas espécies são as alterações cromossômicas, conforme estudo de SOUZA *et al.* (2004).

Passifloraceae é indicada por BREWBAKER (1967) como um grupo que possui grãos de pólen bicelulares, onde a célula vegetativa engloba em seu citoplasma a célula generativa e, após a

germinação, a célula generativa sofre mitose formando as células gaméticas no tubo polínico (JOHRI *et al.*, 1992; TANAKA, 1993). As observações deste estudo concordam com esse autor e com outros estudos em *Passiflora* (SOUZA & PEREIRA, 2000; AMELA GARCÍA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2002). Segundo BREWBAKER (1967) pólenes bicelulares ocorrem na maioria das Angiospermas e sua ocorrência está diretamente relacionada com características fisiológicas como alta viabilidade e maior longevidade. A célula generativa é formada a partir da primeira divisão celular assimétrica do micrósporo e possui posição parietal; posteriormente é englobada pela célula vegetativa e assume o formato fusiforme e posição próxima ao núcleo desta célula (MAHESWARI, 1950; JOHRI *et al.*, 1992; TANAKA, 1993), podendo associar-se intimamente ao núcleo e formar a unidade germinativa masculina (“male germ unit”) (DUMAS *et al.*, 1984), como relatado para várias espécies de Angiospermas com pólenes bi ou tricolares (MATTHYS-ROCHON *et al.*, 1987; CHARZYNSKA *et al.*, 1989; SANTOS, 1995). Em *Passiflora*, a formação da unidade germinativa masculina foi observada somente em *P. misera*, sendo que nas demais espécies a célula generativa permanece próxima, mas não em contato, do núcleo da célula vegetativa.

Os grãos de pólen podem acumular reservas durante as várias etapas do desenvolvimento, especialmente na forma de amido, que durante a deiscência da antera pode ser convertido em pectinas, glicose, frutose, sacarose e vários outros polissacarídeos (FRANCHI *et al.*, 1996; PACINI, 1996; SPERANZA *et al.*, 1997; PACINI *et al.*, 2006). Durante a formação dos grãos de pólen a síntese e degradação das substâncias de reserva estão relacionadas com a ontogenia dos estratos da esporoderme e a formação do microgametófito (SANTOS & MARIATH, 1999). BAKER & BAKER (1979) relatam que a maioria das Angiospermas possui o pólen, no momento da dispersão, com pouco amido (“starchless”), enquanto que, em alguns grupos, o pólen é disperso com muito amido no citoplasma da célula vegetativa (“starchy”). A distribuição destes tipos de reserva, segundo os autores, está relacionada com as estratégias ecológicas das espécies, como a relação com os tipos de polinizadores, sendo as espécies com grãos menores e sem amido preferencialmente entomófilas. Passifloraceae não foi contemplada no estudo de BAKER & BAKER (1979), mas os resultados do presente estudo indicam que *Passiflora* se enquadra na categoria “starchless”, embora no momento da dispersão possam coexistir na mesma antera, grãos com muito ou pouco amido. Os grãos de pólen que possuem pouco ou nenhum amido, nas espécies estudadas, apresentam sempre citoplasma PAS-positivo, indicando que o amido foi convertido em outros polissacarídeos insolúveis ou que não foram extraídos durante os procedimentos de preparação das amostras.

A presença de carboidratos também pode contribuir para o balanço hídrico no interior do pólen, atuando como um tampão, de forma que o impacto com o meio externo no momento da dispersão seja minimizada (PACINI, 1996; PACINI *et al.*, 2006). PACINI (1996) cita o pólen de *P. caerulea* como parcialmente desidratado no momento da dispersão, portando como carboidrato de

reserva o amido (tendo, também, citoplasma PAS-positivo). Os grãos de pólen parcialmente desidratados resistem melhor às adversidades ambientais, como as altas temperaturas e baixas taxas de umidade relativa (PACINI *et al.*, 2006). Deste modo, os compostos de reserva do pólen de *Passiflora* são relevantes na ecologia destas espécies, seja na forma da polinização (entomófilas) e na ocupação dos ambientes tropicais.

ESPORODERME – Os grãos de pólen apresentam uma parede protetora formada conjuntamente pelo esporófito e pelo gametófito masculino, que pode ser dividida primariamente em dois estratos quimicamente distintos: a exina e a intina (ERDTMAN, 1952). A exina representa o estrato externo, primeiramente formado e composto principalmente por esporopolenina, um biopolímero extremamente resistente à ação biológica e a ação de compostos químicos não oxidativos. A intina é formada posteriormente, interna à exina, e representa o estrato polissacarídico da esporoderme, composto principalmente por pectinas, hemiceluloses e celulose (HESLOP-HARRISON, 1971).

Apesar de ser um estrato relativamente mais simples que a exina, a intina apresenta uma estrutura complexa, normalmente triestratificada, cujas funções de cada estrato estão relacionadas a importantes eventos desde a maturação dos grãos de pólen até a germinação do tubo polínico (HESLOP-HARRISON, 1987; HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1991). O estrato externo, predominantemente péctico, possui microfibrilas randomicamente dispostas e materiais amorfos incrustados, sendo importante durante a hidratação do pólen no estigma, promovendo forças para a saída do tubo polínico devido ao seu aumento de volume (HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1991; SUÁREZ-CERVERA *et al.*, 2002). O estrato intermediário é mais conspícuo e normalmente melhor visualizado nas aberturas, contém inclusões que carregam proteínas embebidas em uma matriz péctica, possivelmente relacionadas aos processos de reconhecimento do pólen (KNOX, 1984; EDLUND *et al.*, 2004), e também com reconhecidas funções enzimáticas (KNOX & HESLOP-HARRISON, 1970). Interno a este, existe um estrato celulósico e péctico, responsável por formar o tubo polínico (HESLOP-HARRISON, 1987; HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1991; FERGUSON *et al.*, 1998).

Nas espécies de *Passiflora* estudadas, também foi encontrado este padrão de intina triestratificada, como ocorre na maioria das Angiospermas (HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1991). AMELA GARCÍA *et al.* (2002) relatam para *P. caerulea* a presença de intina espessa e formada por somente dois estratos, um externo espesso e fibrilar e um interno mais fino e homogêneo. Nossas observações para esta espécie indicam a clara ocorrência de três estratos nos testes histoquímicos, especialmente para a detecção de proteínas totais (Coomasie Blue, ver Apêndice 1-E), sendo que o estrato péctico-protéico não foi detectado pelos autores anteriormente citados no estudo ultraestrutural.

Uma característica que chama a atenção é a clara diferença na espessura da intina em *Passiflora*. As espécies dos subgêneros *Decaloba* e *Astrophea* possuem intina fina, enquanto que nas espécies de *Passiflora* esta se apresenta bastante espessa. Esta diferença ainda não havia sido relatada nos estudos deste gênero e possivelmente tem importante valor na filogenia da família, necessitando de um estudo abrangendo um número maior de táxons. A maioria das Angiospermas possui intina fina, que dificilmente ultrapassa 1-2 μm , assim como *Decaloba* e *Astrophea*. Desse modo, a espessura da intina no subgênero *Passiflora* (até 5,5 μm) parece ser uma característica derivada para o gênero.

A parte externa da esporoderme, a exina, é complexa e representa um dos tipos mais elaborados de parede celular do reino Plantae. É composta principalmente por esporopolenina, um conjunto de polímeros derivados de ácidos graxos de cadeia longa e menores quantidades de compostos com anéis aromáticos oxigenados e fenilpropanóides, produzida especialmente pelo tapete da antera, polimerizada a partir do final da meiose II dos micrósporos (PIFFANELLI *et al.*, 1998).

Do ponto de vista morfológico, apresenta vários estratos (ERDTMAN, 1952; PUNT *et al.*, 2007): a sexina é o extrato mais externo, composta pelas columelas, teto e ornamentações acima do teto. A nexina representa a porção não “ornamentada” da exina, abaixo da sexina, podendo ser distintas duas regiões: a nexina 2 mais interna e em contato com a intina, e a nexina 1, abaixo da sexina.

Do ponto de vista químico e ontogenético a exina é composta por duas porções (GUÉDÈS, 1982): a ectexina, que normalmente corresponde à sexina e nexina 1; e a endexina, correspondente à nexina 2. De acordo com a revisão de GUÉDÈS (1982), a endexina é depositada em membranas tangenciais, provavelmente originadas pela membrana plasmática, enquanto que a ectexina é depositada sobre a primexina, uma matriz polissacarídica, sem a mediação de membranas. Em seu glossário de palinologia, PUNT *et al.* (2007) indicam a diferenciação destes dois componentes com base na coloração resultante da Fucsina Básica, indicado por FAEGRI (1956): a ectexina cora-se intensamente e a endexina não.

Nas espécies de *Passiflora* estudadas, é possível fazer esta diferenciação entre a ectexina e endexina, com base na coloração com Fucsina Básica, especialmente quando empregadas seções de grãos de pólen acetolizados previamente (ver Figs. 13F-G, Apêndice 1-C). A não coloração do estrato externo da intina pela Fucsina Básica, em grãos não acetolizados, dificulta a distinção da endexina, que também não cora (ver Apêndice 1-B). Estes dois componentes possuem reação diferenciada à autofluorescência, que também revela a presença de endexina na nexina 1 das espécies do subgênero *Passiflora* e *P. suberosa*.

Além de esporopolenina, a endexina (nexina 2) também contém hemiceluloses nas espécies em estudo. De acordo com análises histoquímicas de SOUTHWORTH (1973), a endexina também pode possuir traços de polissacarídeos, além da esporopolenina. Em *Helianthus annuus* L. (Asteraceae), a endexina também reage positivamente ao Azul de Anilina e PAS (HORNER & PEARSON, 1978), diferente das espécies estudadas, o que indica que a natureza química da endexina pode ser distinta nos diversos grupos vegetais. Conforme afirma HESSE (2000), vários estudos comprovam que a endexina não é um estrato tão compacto como antes admitido e que se apresenta bastante elástico, com importantes funções nos processos de desidratação e hidratação dos grãos de pólen, que levam à significativas mudanças da morfologia, especialmente no formato do pólen.

Nas espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Decaloba* (exceto *P. suberosa*), a endexina é internamente lisa, acompanhando a linearidade da camada basal. Nestas espécies, a camada basal, compacta, é composta somente por ectexina, com mesma coloração das columelas e teto, como apresentado também para a maioria das Angiospermas.

Em *P. suberosa*, a despeito da endexina ter a superfície internamente lisa, não foi visualizada uma camada basal, como nas demais espécies de *Decaloba*, e o estrato morfológico correspondente à nexina 1 apresenta-se com aspecto granuloso e com pequenas “massas” esféricas de ectexina, fortemente coradas pela Fuscina Básica, entremeadas por uma matriz que apresenta coloração semelhante à endexina, inclusive pelo Azul de Astra. Assim, nesta espécie, há uma região (nexina 1) onde endexina e ectexina se misturam.

As espécies do subgênero *Passiflora* também apresentam uma configuração parecida com *P. suberosa*, exceto que nestas espécies a nexina 1 não é granulosa, mas mais homogênea, de modo que somente as bases das columelas são vistas imergindo nesta mistura de endexina e ectexina. Também, neste subgênero, a superfície interna apresenta-se ondulada, com a formação de sulcos que imitam o retículo externo.

Um estudo detalhado da ultraestrutura da esporoderme de *P. caerulea* foi realizado por LARSON (1966) e apontou diversas características semelhantes às estudadas para o subgênero a qual esta espécie pertence. LARSON (1966) comprovou a natureza mista de endexina e ectexina de *P. caerulea* na nexina 1, que chama de estrato *iz* (“interbedded zone”). De acordo com o autor, ultraestruturalmente a ectexina é eletrodensa (após a contrastação com citrato de chumbo), enquanto que a endexina é pouco eletrodensa. A nexina 1, de composição mista, apresenta-se com uma tonalidade intermediária e neste estrato são claramente visíveis a imersão das columelas. Estas características apontadas por LARSON (1966) concordam com as observadas nos testes histoquímicos das espécies do subgênero *Passiflora*, especialmente se analisadas as seções com a combinação da reação de PAS, Azul de Astra e Fuscina Básica (ver Figs. 13H-I). Estudos posteriores da ultraestrutura da esporoderme, como os de CARREIRA (1977) e AMELA GARCÍA *et al.*

(2002), em *Passiflora coccinea* Aubl. e *P. caerulea*, respectivamente, mostram claramente esta mesma configuração da exina nas ilustrações apresentadas, porém os autores nada comentam sobre a presença de um estrato de composição mista e apenas descrevem a nexina 1 composta por ectexina.

LARSON (1966) também chama a atenção para uma mistura da endexina e da intina, numa zona intermediária, que na análise de esporodermes acetolizadas, as áreas correspondentes à intina, aparecem com espaços vazios. Neste estudo não foi possível, por meio de microscopia óptica, evidenciar esta característica. Em microscopia eletrônica de varredura da esporoderme de grãos fraturados de *Passiflora*, foi possível verificar a existência de pequenos orifícios na área correspondente à endexina, podendo se tratar, possivelmente, dos mesmos espaços assinalados pelo autor.

A existência de zonas intermediárias de natureza mista leva LARSON (1966) a uma extensa discussão de vários aspectos também discutidos por ERDTMAN (1952) sobre a estratificação da esporoderme em camadas sempre concêntricas. Verifica-se, segundo estes autores, que nem todas as Angiospermas possuem estratos totalmente diferenciados um do outro e *P. caerulea* é um exemplo disso. Também ressaltam a importância da análise da composição química da esporoderme, pois nem sempre os estratos são homólogos em distintos grupos vegetais. ERDTMAN (1952, citado por LARSON, 1966) cita características semelhantes às observadas em *Passiflora*, em relação à imersão das columelas na nexina 1, para *Cobaea penduliflora* (H. Karst.) Hook. f. (Polemoniaceae), mas nesta espécie tais características são evidentes e permitem sua visualização em microscopia óptica, sem a necessidade de seções. A ocorrência desta mesma característica, em grupos não taxonomicamente relacionados, é uma indicação que esta pode ter surgido várias vezes durante a evolução das Angiospermas (LARSON, 1966) e possivelmente está relacionada a algum aspecto da fisiologia desses grãos de pólen.

Outra observação de LARSON (1966) é que a nexina 1 não apresenta espessura uniforme ao longo de toda a esporoderme, mas uma superfície basal “ondulada”, nas seções semifinas e ultrafinas. Nas regiões onde as columelas dos muros se inserem, esta região é menos espessa, ao passo que nas regiões dos lúmens dos retículos é muito espessa. Esta “ondulação” é seguida pela endexina e responsável pelo aspecto verrucado da superfície interna dos grãos acetolizados e fraturados das espécies em estudo. PRESTING (1950) foi o primeiro a relatar esta característica para espécies de *Passiflora*, fazendo a distinção de dois tipos de exina entre as espécies estudadas: exina do tipo 1, que se apresenta internamente lisa; e exina do tipo 2, internamente ondulada. O primeiro tipo, segundo o autor, é encontrado nos gêneros e espécies “basais” da família e nas espécies de *Passiflora* hoje correspondentes os subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, *Tryphostemmatoides*. As espécies que possuem exina do tipo 2 pertencem ao grande clado *Passiflora*.

Deste modo, a “ondulação” da superfície interna da endexina reflete claramente a constituição mista da nexina 1 e a imersão das columelas neste estrato, bem como a inexistência de uma camada basal compacta. Os pontos aparentemente mais compactos correspondem às inserções das columelas dos muros, cujo principal componente é a ectexina, enquanto que nas regiões dos lúmens a nexina 1 é menos compacta pela presença de endexina e, possivelmente, de compostos pécticos também associados à este componente. De acordo com HESSE (2000), algumas espécies podem não apresentar a camada basal compacta, como a maioria das Angiospermas, mas tê-la fragmentada ou ausente. Em *Passiflora*, parece haver uma tendência no subgênero *Passiflora* a uma perda desta camada. Em *P. suberosa* (subgênero *Decaloba*), observa-se também a mesma tendência, provavelmente com origem distinta. HASSE (2000) atribui a perda de camada basal compacta à alguns eventos fisiológicos de grande importância para os grãos de pólen, como a rápida captação de água sobre a superfície estigmática e adaptação às mudanças de volume durante o desenvolvimento e dispersão do pólen. As pressões sobre esses fatores podem ter levado as espécies em estudo a desenvolver este tipo de estratégia.

A superfície interna da endexina ondulada foi relatada até o momento somente para espécies de *Passiflora* (PRESTING, 1950; LARSON, 1966) e para uma espécie de Cucurbitaceae, *Borneosicyos simplex* De Wilde, espécie monotípica de um gênero descrito recentemente para o Velho Mundo, que apresenta os grãos de pólen dispersos em tétrades (VAN DER HAM & VAN HEUVEN, 2003). No entanto, são necessários estudos detalhados da estrutura da esporoderme dessa espécie para confirmar se apresenta similaridades com *Passiflora*. Por conseguinte, a ocorrência dessa característica para grupos não relacionados taxonomicamente, como Passifloraceae e Cucurbitaceae, indica, como também sugerido por LARSON (1966), surgimentos independentes e que, provavelmente, também ocorra em outros grupos de Angiospermas.

Com relação à estrutura das columelas sob o teto, LARSON (1966) afirma, para *P. caerulea*, a existência de duplas de columelas pareadas sustentando o teto dos muros. A presente análise discorda do autor neste aspecto, como revelado em *P. caerulea* e todas as demais espécies, apenas uma columela sustenta o teto nas áreas do apocolpo e mesocolpos, como também afirmado por AMELA GARCÍA *et al.* (2002). No entanto, próximo das áreas das aberturas, pode haver mais de uma columela fazendo esta sustentação e, provavelmente, foi essa região que o autor analisou.

Ainda na exina, a análise histoquímica demonstrou a ocorrência de proteínas sobre as columelas livres, aberturas e na nexina 1. Nas espécies do subgênero *Passiflora* a nexina 1 é marcada com maior intensidade. *P. suberosa* apresentou menor intensidade e nas demais espécies, a marcação foi fraca. Estas proteínas têm possivelmente origem esporofítica, produzidas pelas células do tapete e relacionadas com o processo de reconhecimento dos grãos de pólen no estigma (KNOX *et al.*, 1976; VITHANAGE & KNOX, 1976; CLARKE *et al.*, 1979; PACINI & JUNIPER, 1979). A

ocorrência maior destas proteínas parece relacionada com a estrutura da esporoderme. Nas espécies com camada basal compacta são quase inexistentes e principalmente concentradas sobre ou entre as columelas livres e sobre as aberturas, enquanto que nas demais espécies se concentram na nexina 1. Isso leva a crer que uma função adicional possa ser atribuída à estrutura menos compacta da nexina 1 das espécies estudadas: uma via de transporte de proteínas esporofíticas.

Por fim, este estudo revela características das anteras e grãos de pólen com importante valor taxonômico para *Passiflora*. De modo geral, as espécies mantêm-se agrupadas pela morfologia externa e interna da antera nos três grandes subgêneros propostos por Feuillet & MacDougal (2003).

Entre as espécies estudadas do subgênero *Passiflora*, destoam da maioria apenas *P. actinia* e *P. tenuifila*, que possuem o ápice da antera apiculado, ao contrário das demais espécies que possuem ápice lobado, e *P. edulis*, que possui compostos fenólicos nas células epidérmicas. Em *Decaloba*, diferenciam-se da maioria *P. morifolia* e *P. capsularis*, que apresentam lúmens amplos e com várias columelas livres no seu interior, características estas encontradas principalmente no subgênero *Passiflora*. *P. capsularis* também apresenta o ápice da antera apiculado. A presença de lúmens amplos parece ser mais derivada no que diz respeito ao grão de pólen e indicam uma posição avançada das espécies no grupo, também apoiada pela complexidade maior das aberturas em *P. capsularis* (PRESTING, 1950; DETTKE & SANTOS, dados não publicados – Artigo 2). Outra espécie distinta no grupo é *P. suberosa*, que possui ápice da antera truncado, células estomiais não diferenciadas, e estrutura da exina (Tipo 3) bastante distinta das demais espécies de *Decaloba*.

Em relação à *Astrophea*, a única espécie analisada apresenta algumas características distintas das demais espécies, como a presença de tricomas, ausência de células estomiais (como *P. suberosa*) e endotécio desenvolvido presente entre as tecas. Entretanto, características da antera a tornam próxima de *Passiflora* (como o tamanho das anteras e tipo de espessamento do endotécio) e características polínica próximas de *Decaloba* (como lúmens reduzidos com poucas columelas livres, superfície interna do pólen lisa e estrutura da exina do Tipo 1), embora a forma das aberturas seja similar às encontradas em *Passiflora* (Dettke & Santos, dados não publicados – Artigo 2). Com relação à vascularização, *Astrophea* parece ter um padrão intermediário entre *Passiflora* e *Decaloba*.

Algumas das características encontradas neste estudo merecem especial atenção pelo seu potencial uso na filogenia do grupo, com necessidade de estudos mais amplos. Entre eles o tamanho das anteras, presença de células estomiais, tipos de espessamentos do endotécio, padrões de vascularização, características do retículo (amplitude e presença de columelas livres) e estrutura da exina.

Este estudo é o primeiro a evidenciar diferenças marcantes na esporoderme de várias espécies de *Passiflora*, com a distinção de três tipos principais. Estas características, além de importantes como características filogenéticas, certamente têm relação com as pressões ambientais e direções evolutivas que tomaram os subgêneros de *Passiflora*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi executado no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS e no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMELA GARCÍA, M.T.; B.G. GALATI & A.M. ANTON. 2002. Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 139: 383-394.
- AMELA GARCÍA, M.T.; B.G. GALATI & A.M. ANTON. 2003. Development and ultrastructure of the megagametophyte in *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 142: 73-81.
- AMELA GARCÍA, M.T.; B.G. GALATI & P. HOC. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). **Flora** 202: 302-315.
- ARAÚJO, R.C.M. & F.A. SANTOS. 2004. Palinologia de espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Stientibus série Ciências Biológicas** 4(1/2): 37-42.
- BAKER, J.R. 1947. Further remarks on the histochemical recognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science** 88: 463-465.
- BAKER, H.G. & I. BAKER. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany** 66(5): 591-600.
- BARRIOS, L.; C.M. CAETANO; C.I. CARDOSO; G.C. D'EECKENBRUGGE; J.A. ARROYAVE & C.A. OLAYA. 2005. Caracterización del pollen de especies de los géneros *Passiflora* e *Dilkea*. **Acta Agronômica** 54(3): 19-23.
- BERNHARD, A. 1999. Flower structure, development, ad systematics in Passifloraceae and in *Abatia* (Flacourtiaceae). **International Journal of Plant Science** 160(1): 135-150.
- BHANDARI, N.N. 1984. The microsporangium, p.53-121. In: B.M. JOHRI (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

- BHATNAGAR, S.P. & R. GARG. 1984. Endothelial thickenings in the another wall of *Phthirusa adunca* (Loranthaceae). **Plant Systematic and Evolution** 146: 265-267.
- BREWBAKER, J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. **American Journal of Botany** 54(9): 1069-1083.
- CAETANO-PEREIRA, C.M.; O.M. TASCHETTO; M.S. PAGLIARINI & E.M. BRASIL. 1998. Spontaneous mixoploidy in mayze anthers. **Cytologia** 63: 305-309.
- CARREIRA, L.M.M. 1977. Aspectos da ultra-estrutura do pólen de *Passiflora coccinea* Aubl. (Passifloraceae). **Acta Amazônica** 7(3): 329-332.
- CHAPMAN, G.P. 1987. The tapetum. **International Review of Cytology** 107: 111-125.
- CHARZYNSKA, M.; M. MURGIA; C. MILANESI & M. CRESTI. 1989. Origin of sperm cell association in the “male germ unit” of *Brassica* pollen. **Protoplasma** 149: 1-4.
- CLARKE, A.; P. GLEESON; S. HARRISON & R.B. KNOX. 1979. Pollen-stigma interactions: identifications and characterization of surface components with recognition potencial. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 76(7): 3358-3362.
- CLAUGHER, D. 1986. Pollen wall structure, a new interpretation. **Scanning Electron Microscopy** 1 :291-299.
- CLÉMENT, C.; L. CHAVANT; M. BURRUS & J.C. AUDRAN. 1994. Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. **Sexual Plant Reproduction** 7: 347-356.
- COCUCCI, A.E. & J.E.A. MARIATH. 1995. Sexualidade das plantas. **Ciência Hoje** 106(18): 50-61.
- CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press.
- D'ARCY, W.G. 1996. Anthers and stamens and what they do, p. 1-24. *In*: W.G. D'ARCY & R.C. KEATING (Eds.). **The anther: form, function and phylogeny**. Cambridge, Cambridge University Press.
- DORMER, K.J. 1962. The fibrous layer in the anthers of Compositae. **New Phytologist** 61(2): 150-153.
- DUMAS, C., R.B.KNOX, C.A. McCONCHIE & S.D. RUSSELL. 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. **What's New Plant Physiology** 15: 17-20.
- EDLUND, A.F.; R. SWANSON & D. PREUSS. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **The Plant Cell** 16(S): 84-97.
- ERDTMAN, G. 1952. **Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms**. Stockholm, Almqvist & Wiksell.
- ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift** 39: 561-564.

- FAEGRI, K. 1956. Recent trends in palynology. **Botanical Review** 22: 639–664.
- FAEGRI, K. & J. IVERSEN. 1964. **Textbook of pollen analysis**. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- FERGUSON, C.; T.T. TEERI; M. SIIKA-AHO; S.M. READ & A. BACIE. 1998. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. **Planta** 206: 425-460.
- FEUILLET, C. & J.M. MACDOUGAL. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** 13: 34-35, 37-38.
- FOSSARD, R.A. 1969. Development and histochemistry of the endothecium in the anthers of in vitro grown *Chenopodium rubrum* L. **Botanical Gazette** 130: 10-22.
- FRANCHI, G.G.; L. BELLANI; M. NEPI & E. PACINI. 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. **Flora** 191: 143-159.
- FRENCH, J.C. 1985. Patterns of the endothecial wall thickenings in Araceae: subfamilies Calloideae, Lasioideae and Philodendroideae. **Botanical Gazette** 146(4): 521-533.
- FRENCH, J.C. 1986. Patterns of the endothecial wall thickenings in Araceae: subfamilies Colocasioideae, Aroideae e Pistioideae. **Botanical Gazette** 147(2): 166-179.
- FREUDENSTEIN, J.V. 1991. A systematic study of endothecial thickenings in the Orchidaceae. **American Journal of Botany** 78: 766-781.
- GARCÍA, C.C. 2002. An approach to the diversity of endothecial thickenings in Solanaceae. **Flora** 197: 214-223.
- GERENDAY, A. & J.C. FRENCH. 1988. Endothecial thickenings in anthers of porate monocotyledons. **American Journal of Botany** 75(1): 22-25.
- GERRITS, P.O. & L. SMID. 1983. A new, less polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132: 81-85.
- GUÉDÈS, M. 1982. Exine stratification, ectexine structure and angiosperm evolution. **Grana** 21: 161-170.
- GUERRA, M. & M.J. SOUZA. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto.
- HANSEN, A.K.; L.E. GILBERT; B.B. SIMPSON; S.R. DOWNIE; A.C. CERVI & R.K. JANSEN. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31(1): 138-150.
- HERR, J.M. 1971. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany** 58(8): 785-790.

- HESLOP-HARRISON, J. 1971. The pollen wall: structure and development, p.75-98. *In*: J. HESLOP-HARRISON (Ed.). **Pollen: development and physiology**. London, Butterworths.
- HESLOP-HARRISON, J. 1987. Pollen germination and pollen-tube growth. **Review of Cytology** 107: 1-78.
- HESLOP-HARRISON, J. & Y. HESLOP-HARRISON. 1991. Structural and functional variation in pollen intines, p. 331-343. *In*: S. BLACKMORE & S.H. BARNES (Eds.) **Pollen and spores: patterns of diversification**. Oxford, Clarendon Press.
- HESLOP-HARRISON, Y. 1977. The pollen–stigma interaction: pollen-tube penetration in *Crocus*. **Annals of Botany** 41: 913–922.
- HESSE, M. 2000. Pollen wall stratification and pollination. **Plant Systematic and Evolution** 222: 1-17.
- HORNER, H.T. & C.B. PEARSON. 1978. Pollen wall and aperture development in *Helianthus annuus* (Compositae: Heliantheae). **American Journal of Botany** 65(3): 293-309.
- HUYSMANS, S.; G. EL-GHAZALY & E. SMETS. 1998. Orbicules in angiosperms: morphology, function, distribution, and relation with tapetum types. **Botanical Review** 64: 240-272.
- JACOBS, C.A. & N.R. LERSTEN. 1994. Microsporogenesis and endothelial wall patterns in black maple (*Acer saccharum* subsp. *nigrum*, Aceraceae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 121(2): 180-187.
- JANZEN, D.H. 1968. Reproductive behavior in the Passifloraceae and some of its pollinators in Central America. **Behavior** 32: 33-48.
- JENSEN, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, MacGraw-Hill.
- JOHRI, B.M.; K.B. AMBEGAOKAR & P.S. SRIVASTAVA. 1992. **Comparative embryology of angiosperms**. Berlin, Springer-Verlag.
- JUDD, W.S.; C.S. CAMPBELL; E.A. KELLOG & P.F. STEVENS. 1999. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland, Sinauer Associates.
- KEIJZER, C.J. 1987. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. **New Phytologist** 105(3): 487-498.
- KENRICK, J. & R.B. KNOX. 1979. Pollen development and histochemistry in some Australian species of *Acacia*. **Australian Journal of Botany** 27: 413-427.
- KNOX, R.B. 1984. The pollen grain, p. 197-271. *In*: B.M. JOHRI (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- KNOX, R.B. & J. HESLOP-HARRISON. 1970. Pollen-wall proteins: localizations and enzymatic activity. **Journal of Cell Science** 6: 1-27.

- KNOX, R.B.; A. CLARKE; S. HARRISON; P. SMITH & J.J. MARCHALONIS. 1976. Cell recognition in plants: determinants of the stigma surface and their pollen interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 73(8): 2788-2792.
- KOSCHNITZKE, C. & M. SAZIMA. 1997. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica** 20(2):19-126.
- KRAUS, J.E.; H.C. SOUSA; M.H. REZENDE; N.M. CASTRO; C. VECCHI & R. LUQUE. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining for plant material. **Biotechnic Histochemistry** 73: 235-243.
- KROSNICK, S.E. & J.V. FREUDENSTEIN. 2005. Monophyly and floral character homology of Old World *Passiflora* (subgenus *Decaloba*: supersection *Disemma*): **Systematic Botany** 30(1): 139-151.
- KROSNICK, S.E.; E.M. HARRIS & J.V. FREUDENSTEIN. 2006. Patterns of anomalous floral development in the Asian *Passiflora* (subgenus *Decaloba*: supersection *Disemma*). **American Journal of Botany** 93(4): 620-636.
- LARSON, D.A. 1966. On the significance of the detailed structure of *Passiflora caerulea* exines. **Botanical Gazette** 127(1): 40-48.
- LONGO, J.M. & E. FISCHER. 2006. Efeito da taxa de secreção de néctar sobre a polinização e a produção de sementes em flores de *Passiflora speciosa* Gardn. (Passifloraceae) no Pantanal. **Revista Brasileira de Botânica** 29(3): 481-488.
- MAHESHWARI, P. 1950. **Introduction to the embryology of angiosperms**. New York, McGraw-Hill.
- MANNING, J.C. 1996. Diversity of the endothelial patterns in the angiosperms, p. 136-158. In: W.G. D'ARCY & R.C. KEATING (Eds.). **The anther: form, function and phylogeny**. Cambridge, Cambridge University Press.
- MANNING, J.C. & H.P. LINDER. 1990. A cladistic analysis of patterns of endothelial thickenings in Poales/Restionales. **American Journal of Botany** 77: 194-208.
- MANNING, J.C. & P. GOLDBLATT. 1990. Endothelial in Iridaceae and its systematic implications. **American Journal of Botany** 77(4): 527-532.
- MATTHYS-ROCHON, E.; P. VERGNE; S. DETCHEPARE & C. DUMAS. 1987. Male germ initiation from three tricellular pollen species: *Brassica oleracea*, *Zea mays*, and *Triticum aestivum*. **Plant Physiology** 83: 464-466.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A. 2007. Passifloraceae do Parque Estadual de Ibitiboca, Minas Gerais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 25(1): 71-79.

- MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; V. GONÇALVES-ESTEVEES & J.F. BAUMGRATZ. 2004. Palinotaxonomia das espécies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rehb. (Passifloraceae) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 27(4): 655-665.
- MUSCHNER, V.C. 2005. **Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MUSCHNER, V.C.; A.P. LORENZ; A.C. CERVI; S.L. BONATTO; T.T. SOUZA-CHIES; F.M. SALZANO & L.B. FREITAS. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90(8): 1229-1238.
- NEPI, M. & G.G. FRANCHI. 2000. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. **Plant Systematic and Evolution** 222: 45-62.
- O'BRIEN, T.P. & M.E. McCULLY. 1981. **The study of plant structure - principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty.
- PACINI, E. 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. **Sexual Plant Reproduction** 9: 362-366.
- PACINI, E. & M. HESSE. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. **Flora** 200: 399-415.
- PACINI, E. & B.E. JUNIPER. 1979. The ultrastructure of pollen-grain development in the olive (*Olea europea*). 1. Proteins in the pore. **New Phytologist** 83: 157-163.
- PACINI, E.; M. GUARNIERI & M. NEPI. 2006. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation and dispersal: a short review. **Protoplasma** 228: 73-77.
- PAIVA, J.G.A.; S.M. FANK-DE-CARVALHO; M.P. MAGALHÃES & D. GRACIANO-RIBEIRO. 2006. Verniz vitral incolor 500[®]: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica** 20(2): 257-264.
- PIFFANELLI, P.; J.H.E. ROSS & D.J. MURPHY. 1998. Biogenesis and functions of the lipidic structures of pollen grains. **Sexual Plant Reproduction** 11: 65-80.
- PRESTING, D. 1965. Zur morphologie der Pollenkörner der Passifloraceen. **Pollen et Spores** 7: 193-247.
- PUNT, W., P.P. HOEN; S. BLACKMORE; S. NILSSON & A. Le THOMAS. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Paleobotany and Palynology** 143: 1-81.
- PURI, V. 1951. The role of floral anatomy in the solutions of morphological problems. **Botanical Review** 17(7): 471-553.
- RAJU, M.V.S. 1956. Embryology of the Passifloraceae. I. Gametogenesis and seed development of *Passiflora calcarata* Mast. **Journal of the Indian Botanical Society** 35: 126-138.

- ROLAND, J.C. & B. VIAN. 1991. General preparation and staining of thin sections, p.1-66. *In*: J.L. HALL & C. HAWES (Eds.). **Electron microscopy of plant cells**. London, Academic Press.
- SANTOS, R.P. 1995. **O andrófito de *Ilex paraguariensis* St. Hil.: estrutura e citoquímica do tubo polínico e grão de pólen**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.
- SANTOS, R.P. 2000. **Ontogenia da esporoderme em *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae)**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANTOS, R.P. & J.E.A. MARIATH. 1999. Storage substances in the androgametogenesis and mature pollen grain of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 22(2): 125-131.
- SANTOS, R.P. & J.E.A. MARIATH. 2003. Ontogeny of the orbicules in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). **Acta Microscópica** 12(1): 21-26.
- SAZIMA, M. & I. SAZIMA. 1978. Bat-pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in Southeastern Brazil. **Biotropica** 10(2): 100-109.
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 21: 73-80.
- SOUZA, M.M. & T.N.S. PEREIRA. 2000. Development of pollen grain in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** 23(2): 469-473.
- SOUZA, M.M.; T.N.S. PEREIRA; M. HOFFMANN; E.J.T. MELO & R.P. LOURO. 2002a. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** 25(4): 471-475.
- SOUZA, M.M.; T.N.S. PEREIRA & E.R. MARTINS. 2002b. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia** 26(6): 1209-1217.
- SOUZA, M.M.; T.N.S. PEREIRA; A.J.B. DIAS; B.F. RIBEIRO & A.P. VIANA. 2006. Structural, histochemical and cytochemical characteristics of the stigma and stile in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49(1): 93-98.
- SOUZA, M.M.; T.N.S. PEREIRA; A.P. VIANA; M.G. PEREIRA; L.C. BERNACCI; C.P. SUDRÉ & L.C. SILVA. 2003. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia** 56(2): 161-169.
- SOUZA, M.M.; T.N.S. PEREIRA; A.P. VIANA; L.C. SILVA & C.P. SUDRÉ. 2004. Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). **Beitraege zur Biologie der Pflanzen** 73: 359-376.

- SOUZA-CHIES, T.T.; R. YOCKTENG & S. NADOT. 2005. Systématique moléculaire comparée en France et au Brésil du genre *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Cahiers Agricultures** 14(2): 209-215.
- SPERANZA, A.; G.L. CALZONI & E. PACINI. 1997. Occurrence of mono or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains. **Sexual Plant Reproduction** 10: 110-115.
- SPIRLET, M.L. 1965. Utilisation taxonomique des grains de pollen de Passifloracées. **Pollen et Spores** 7: 249-301.
- STEBBINS, G.L. 1974. **Flowering Plants – evolution above the species level**. Cambridge, Harvard University Press.
- SUÁREZ-CERVERA, M.; E. ACALÍS; A. LE THOMAS & J.A. SEOANE-CAMBA. 2002. Pectin distribution pattern in the apertural intine of *Euphorbia peplus* L. (Euphorbiaceae) pollen. **Sexual Plant Reproduction** 14: 291-298.
- TANAKA, I. 1993. Development of male gametes in flowering plants. **Journal of Plant Research** 106: 55-63.
- TEBBITT, M.C. & C.M. MACIVER. 1999. The systematic significance of the endothelial in Begoniaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 131: 203-221.
- ULMER, T. & J.M. MACDOUGAL. 2004. **Passiflora – Passionflowers of the world**. Portland-Cambridge, Timber Press.
- VAN DER HAM, R. & B.J. VAN HEUVEN. 2003. A new pollen type in Old World Cucurbitaceae. **Grana** 42: 88-90.
- VARASSIN, I.G. & A.G. SILVA. 1999. A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em vegetação de restinga. **Rodriguesia** 50 (76/77): 5-17.
- VENTURELLI, M. 1983. Estudos embriológicos em Loranthaceae: gênero *Tripodanthus*. **Kurtziana** 16: 71-90.
- VITHANAGE, H.I.M.V. & R.B. KNOX. 1976. Pollen-wall proteins: quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. **Journal of Cell Science** 21: 423-435.
- VITTA, F.A. 2006. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Passifloraceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 24: 9-12.
- WALKER, J.W. & J.A. DOYLE. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 62: 664-723.
- WANG, A.; Q. XIA; W. XIE; R. DATLA & G. SELVARAJ. 2003. The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. **PNAS** 100(24): 14487-14492.

- WHATLEY, J.M. 1982. Fine structure of the endothelial and developing xylem in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist** 91: 561-570.
- WODEHOUSE, R.P. 1935. **Pollen grains**. New York, McGraw Hill.
- YOCKTENG, R. & S. NADOT. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*nepGS*). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31: 379-396.

Tabela 1. Aspectos morfológicos da antera em espécies de *Passiflora* L. Valores extremos de 10 anteras maduras, medidas sob microscópio estereoscópio.

Espécie	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Formato do ápice	Formato da base
<i>P. haematostigma</i>	0,90-0,94	0,32-0,35	apiculado	tetralobado
<i>P. capsularis</i>	0,34-0,38	0,17-0,19	apiculado	bilobado
<i>P. misera</i>	0,43-0,46	0,20-0,23	bilobado	tetralobado
<i>P. morifolia</i>	0,40-0,44	0,20-0,25	bilobado	tetra-bilobado
<i>P. suberosa</i>	0,20-0,23	0,11-0,14	truncado	bilobado
<i>P. truncata</i>	0,29-0,31	0,16-0,18	bilobado	tetra-bilobado
<i>P. actinia</i>	0,71-0,75	0,32-0,34	apiculado	tetralobado
<i>P. alata</i>	1,10-1,30	0,56-0,59	bilobado	tetralobado
<i>P. amethystina</i>	0,88-0,92	0,33-0,35	bi-tetralobado	tetralobado
<i>P. caerulea</i>	0,84-0,87	0,36-0,40	bilobado	tetralobado
<i>P. edulis</i>	1,15-1,30	0,48-0,51	bilobado	tetra-bilobado
<i>P. elegans</i>	0,59-0,62	0,30-0,32	bilobado	tetralobado
<i>P. tenuifila</i>	0,52-0,55	0,20-0,24	apiculado	tetralobado

Tabela 2. Súmula dos testes histoquímicos empregados para a esporoderme dos grãos de pólen em espécies de *Passiflora* L.

Corante ou reagente	Especificidade	Microscopia	Estratos da Esporoderme					
			Intina			Exina		
			Intina 3	Intina 2	Intina 1	Endexina Nexina 2	Ectexina Nexina 1 Sexina	
Azul de Toluidina O ⁹	Grupos ácidos polianiónicos: azul; Compostos fenólicos: verde; Ácidos pécticos: púrpura	CC	púrpura	púrpura escuro	púrpura	azulado	verde claro	verde claro
IKI (Lugol) ⁶	Amido	CC	-	-	-	-	-	-
PAS ⁹	Polissacarídeos insolúveis	CC	++	+	++	-	-	-
Coomassie Blue R-250 ^{3,7,10}	Proteínas totais	CC	-	++	-	-	+	-
Azul de Astra	Ácidos pécticos, hemiceluloses	CC	+	+	+	+	+	-
Hemicelulases + Azul de Astra	Hemicelulose	CC	-	-	+	+	+	-
Alcian Blue 8GX ^{5,8}	Ácidos pécticos	CC	+	++	+	-	-	-
Vermelho de Rutênio ⁶	Ácidos pécticos	CC	+	++	+	-	-	-
Calcofluor White ⁹	β-D-glucanos (celulose)	UV	+	-	-	-	-	-
Acetólise ¹	Esporopolenina	CC	-	-	-	+	+	+
Auramina O ⁴	Lipídios (incluindo ceras)	UV	-	-	-	+	++	++
Fucsina Básica ²	Grupos carregados negativamente, ectexina	CC	-	-	-	-	+	+
Sudan Black B ⁵	Lipídios (incluindo fosfolipídios)	CC	-	-	-	+	++	++

Referências: ¹Erdtman (1960); ²Faegri & Iversen (1964); ³Fisher (1968); ⁴Heslop-Harrison (1977); ⁵Jensen (1962); ⁶Johansen (1940); ⁷Knox (1979); ⁸Lillie (1965); ⁹O'Brien & McCully (1981); ¹⁰Southworth (1973). CC, campo claro; UV, fluorescência.

* somente espécies do subgênero *Passiflora* e *P. suberosa*.

Tabela 3. Súmula das características morfológicas encontradas em espécies de *Passiflora* L., com possível valor taxonômico e/ou filogenético*. **1.** Tamanho das anteras: pequenas (0), grandes (1); **2.** Formato do ápice: lobado (0), truncado (1), apiculado (2); **3.** Compostos fenólicos na epiderme: ausente (0), presente (1); **4.** Tricomas: ausente (0), presente (1); **5.** Células estomiais: ausente (0), presente (1); **6.** Espessamento secundários: somente nos arcos (0), contínuo entre as tecas (1); **7.** Espessamento do endotécio: helicoidal (0), anelar (1); **8.** Vascularização: não ramificada (0), pouco ramificada (1), ramificada (2); **9.** Amplitude do retículo: lúmens reduzidos (0), lúmens amplos (1); **10.** Columelas livres nos lúmens: raras (0), freqüentes (1); **11.** Padrão da ectexina: tipo 2 (0), tipo 1 (1), tipo 3 (2); **12.** Superfície interna da endexina: lisa (0), verrucada (1); **13.** Espessura da intina: fina (0), espessa (1).

Espécies estudadas / características	1*	2	3	4	5*	6	7*	8*	9*	10*	11*	12*	13*
Subgênero <i>Astrophea</i>													
<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	1	2	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Subgênero <i>Decaloba</i>													
<i>P. capsularis</i> L.	0	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>P. misera</i> H.B.K.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. morifolia</i> Mast.	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>P. suberosa</i> L.	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>P. truncata</i> Regel	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Subgênero <i>Passiflora</i>													
<i>P. actinia</i> Hook.	1	2	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1
<i>P. alata</i> Curtis	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1
<i>P. amethystina</i> Mik.	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1
<i>P. caerulea</i> L.	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1
<i>P. edulis</i> Sims	1	0	1	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1
<i>P. elegans</i> Mast.	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1
<i>P. tenuifila</i> Kill.	1	2	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1



Figura 1. A-L. Seqüência temporal da abertura da flor de *Passiflora caerulea* L. e movimentação dos verticilos florais: anteras inicialmente introrsas (A-D), após giro de 90° (E-H) e 270° (I-L); estigmas eretos (A-J) e deflexos (K-L). Horas, minutos e segundos no formato hh:mm:ss, no canto inferior esquerdo de cada figura.

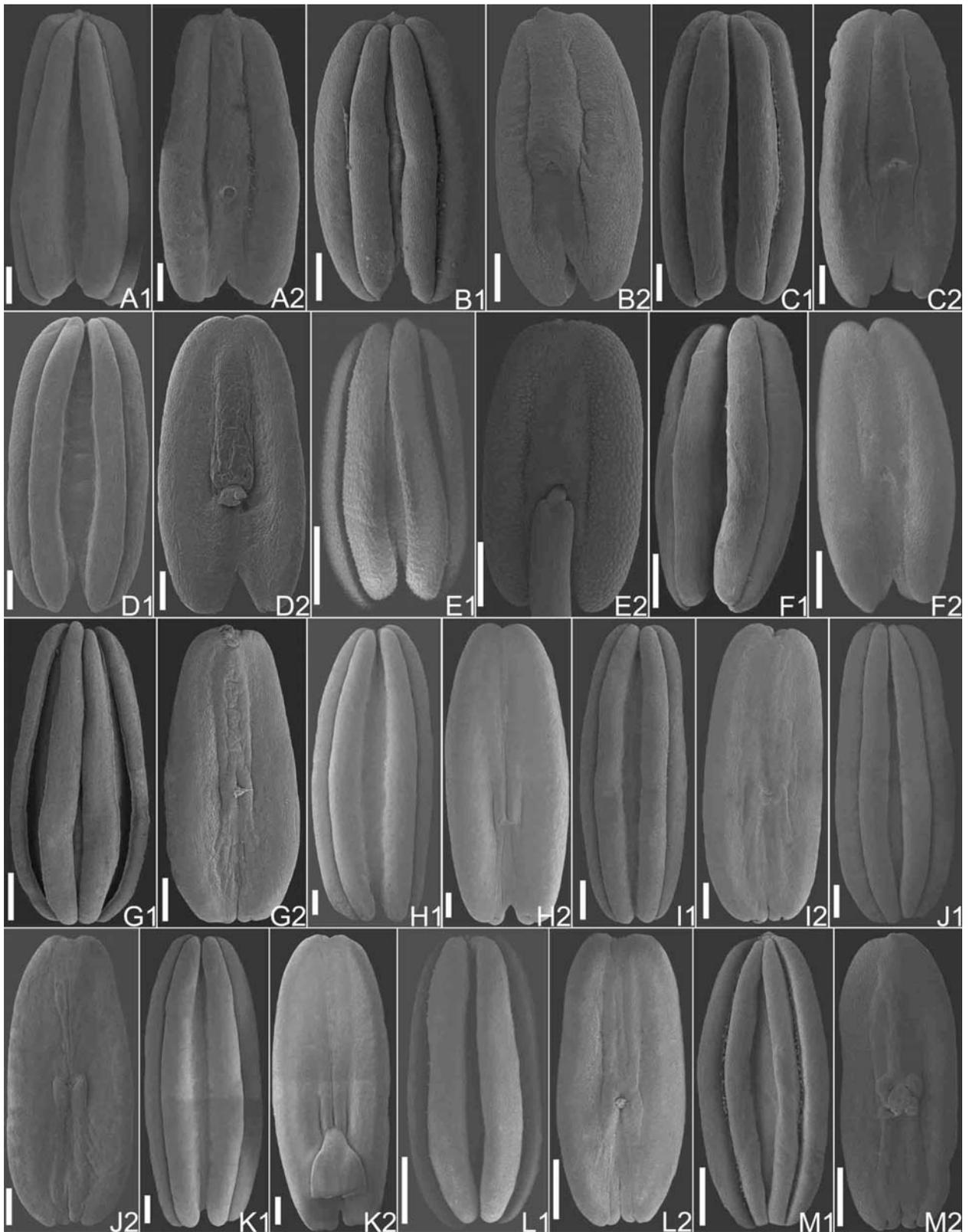


Figura 2. Morfologia externa de anteras de *Passiflora* L., em vistas ventral (1) e dorsal (2), sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). A1-2. *P. haematostigma*, B1-2. *P. capsularis*, C1-2. *P. misera*, D1-2. *P. morifolia*, E1-2. *P. suberosa*, F1-2. *P. truncata*, G1-2. *P. actinia*, H1-2. *P. alata*, I1-2. *P. amethystina*, J1-2. *P. caerulea*, K1-2. *P. edulis*, L1-2. *P. elegans*, M1-2. *P. tenuifila*. Barras: 500 μ m (B-E) e 1 mm (A, G-M).

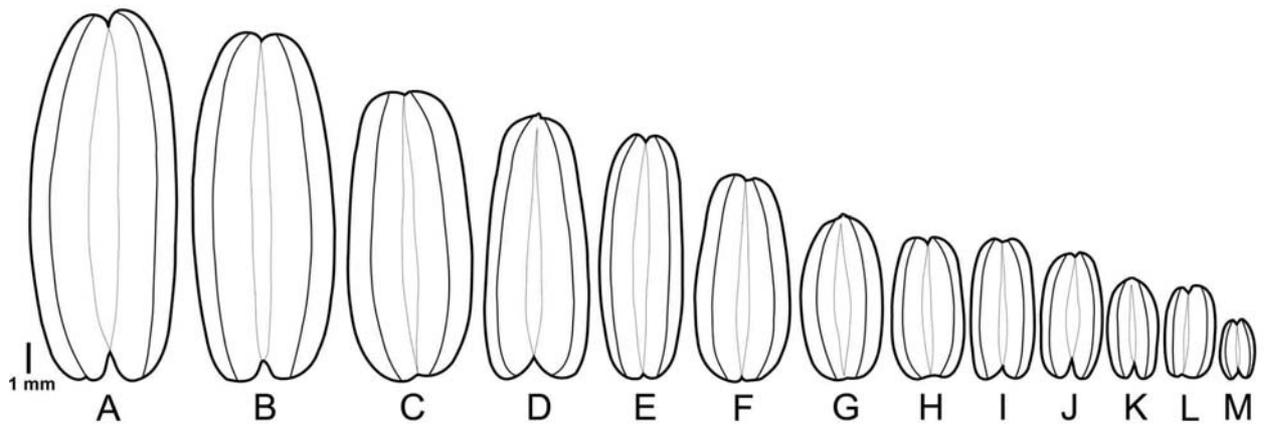


Figura 3. A-M. Relação de tamanho entre as anteras de espécies de *Passiflora* L. A. *P. edulis*, B. *P. alata*, C. *P. caerulea*, D. *P. haematostigma*, E. *P. amethystina*, F. *P. actinia*, G. *P. tenuifila*, H. *P. elegans*, I. *P. misera*, J. *P. morifolia*, K. *P. capsularis*, L. *P. truncata*, M. *P. suberosa*.

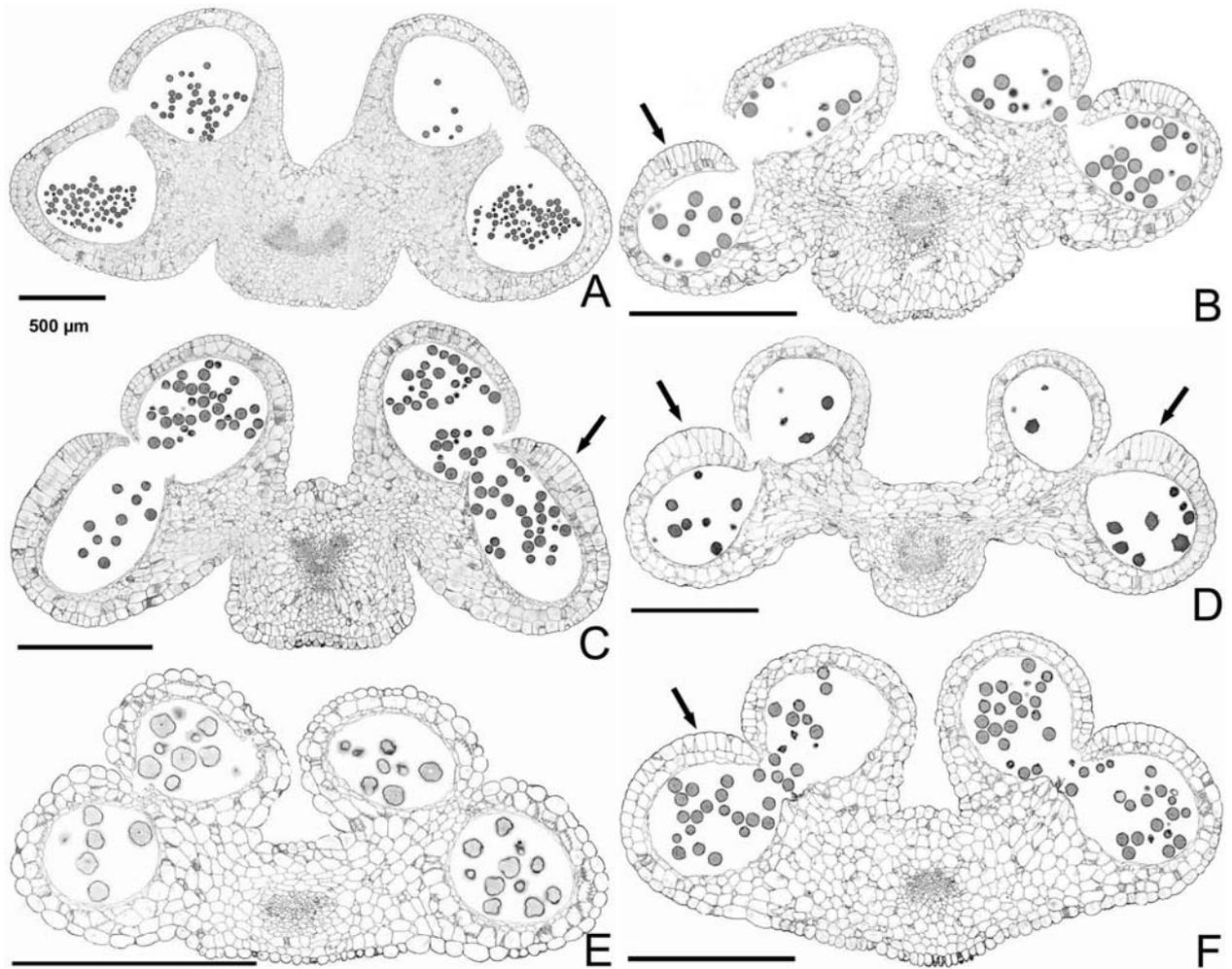


Figura 4. A-F. Seções transversais medianas em anteras de espécies de *Passiflora* L. A. *P. haematostigma*, B. *P. capsularis*, C. *P. misera*, D. *P. morifolia*, E. *P. suberosa*, F. *P. truncata*. Células estomiais indicadas pelas setas. Todas as escalas: 500 µm.

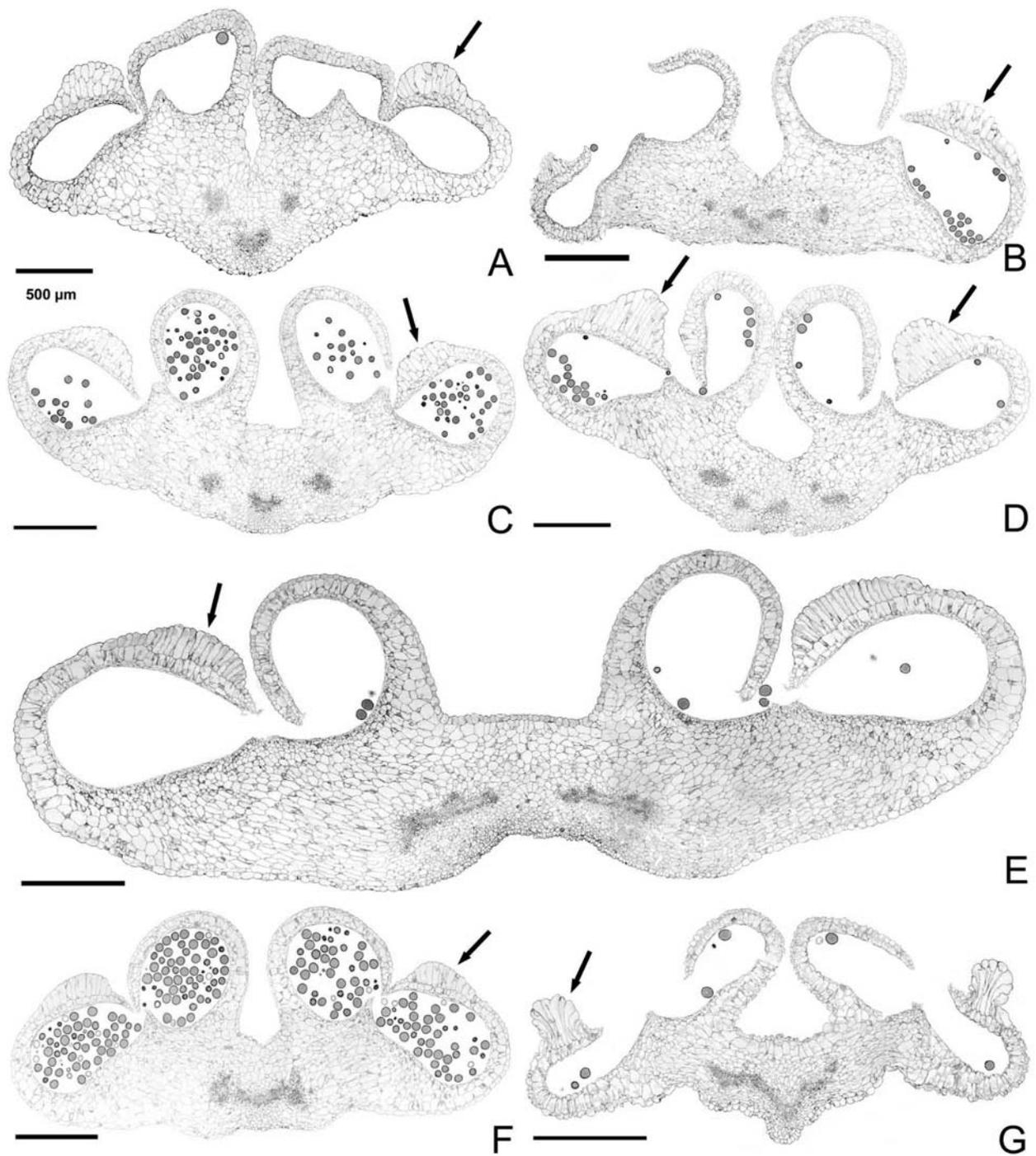


Figura 5. A-G. Seções transversais medianas de anteras de espécies de *Passiflora* L. A. *P. actinia*, B. *P. alata*, C. *P. amethystina*, D. *P. caerulea*, E. *P. edulis*, F. *P. elegans*, G. *P. tenuifila*. Células estomiais indicadas pelas setas. Todas as escalas: 500 μm .

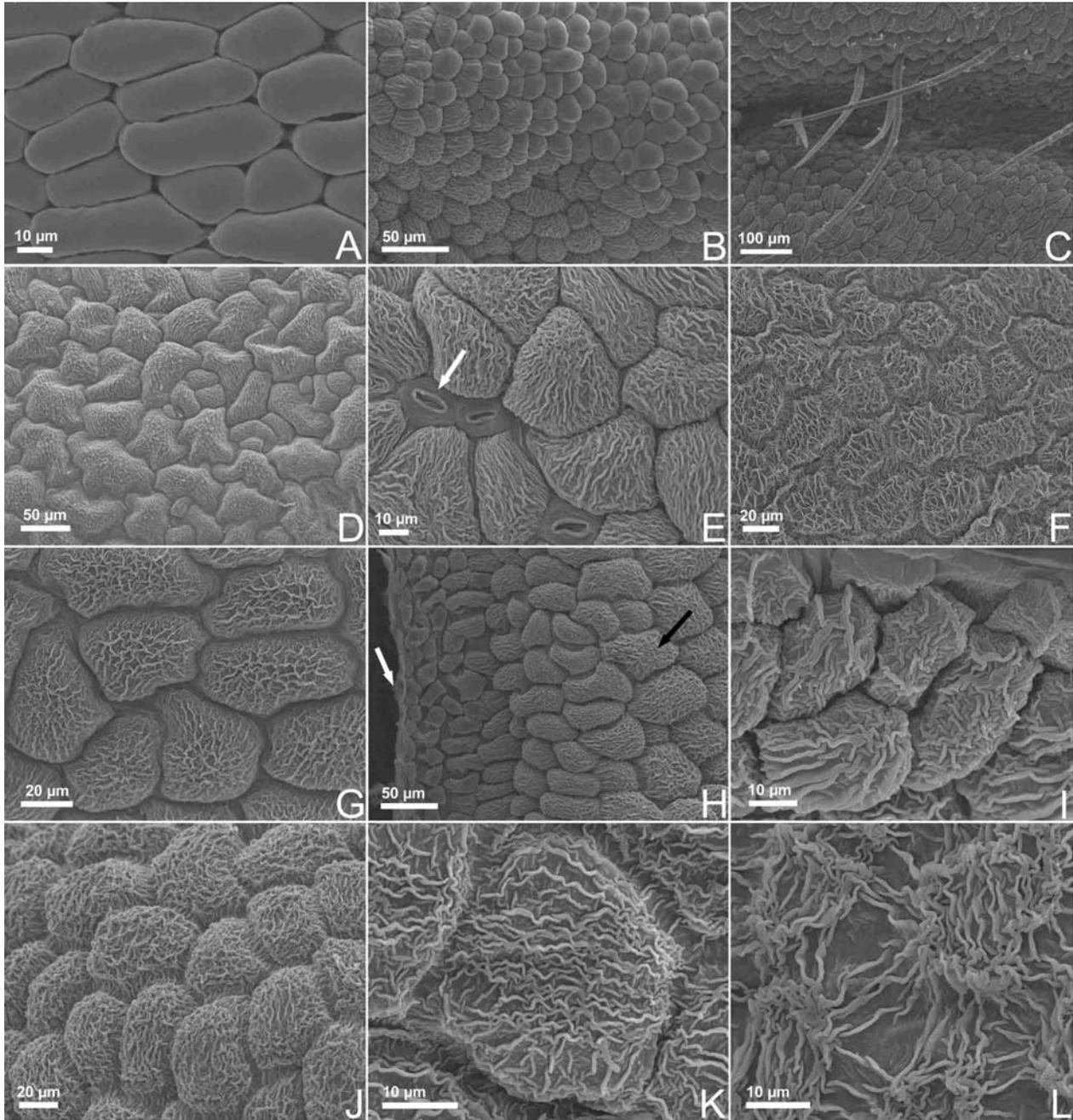


Figura 6. A-L. Detalhes da superfície epidérmica de anteras de espécies de *Passiflora* L., em MEV. A-G. Região dorsal. A. superfície lisa de *P. capsularis*. B. gradiente da ornamentação da superfície na região mediana de *P. truncata*. C. tricomas de *P. haematostigma*. D. epiderme mediana de *P. amethystina*. E. estômatos de *P. capsularis* (seta). F. epiderme da base de *P. truncata*. G. epiderme da base de *P. suberosa*). H-L. Região ventral. H. região do estômio de *P. actinia* (estômio, seta branca, superfície das células estomiais, seta preta). I. superfície próximo ao estômio de *P. suberosa*. J. epiderme sobre o arco de *P. caerulea*. K. superfície das células estomiais de *P. truncata*. L. superfície das células estomiais de *P. capsularis*.

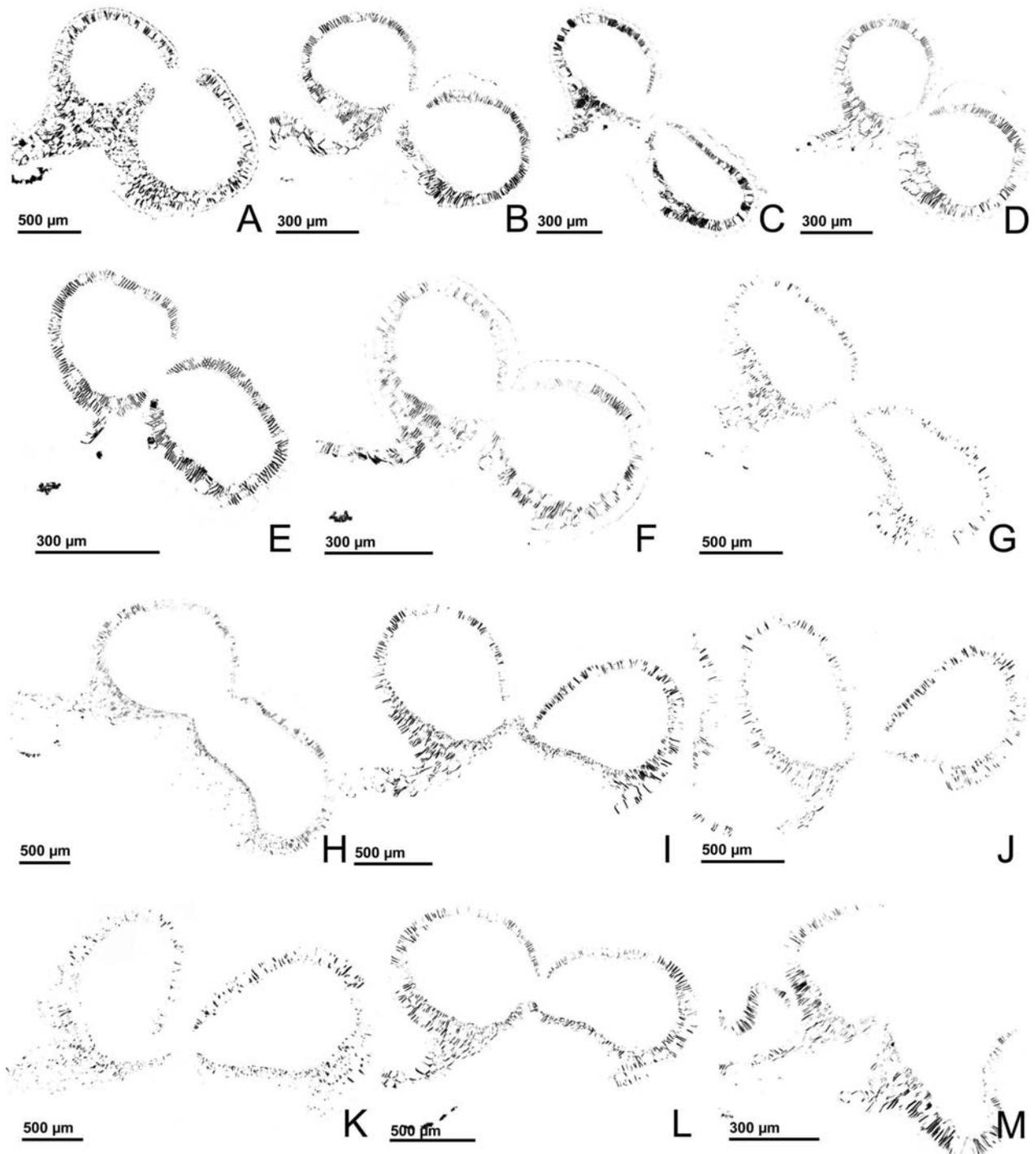


Figura 7. A-M. Distribuição dos espessamentos lignificados da parede celular em células do endotécio e conectivo em anteras de espécies de *Passiflora* L., sob microscopia óptica de luz polarizada (imagens em negativo). A. *P. haematostigma*, B. *P. capsularis*, C. *P. misera*, D. *P. morifolia*, E. *P. suberosa*, F. *P. truncata*, G. *P. actinia*, H. *P. alata*, I. *P. amethystina*, J. *P. caerulea*, K. *P. edulis*, L. *P. elegans*, M. *P. tenuifila*.

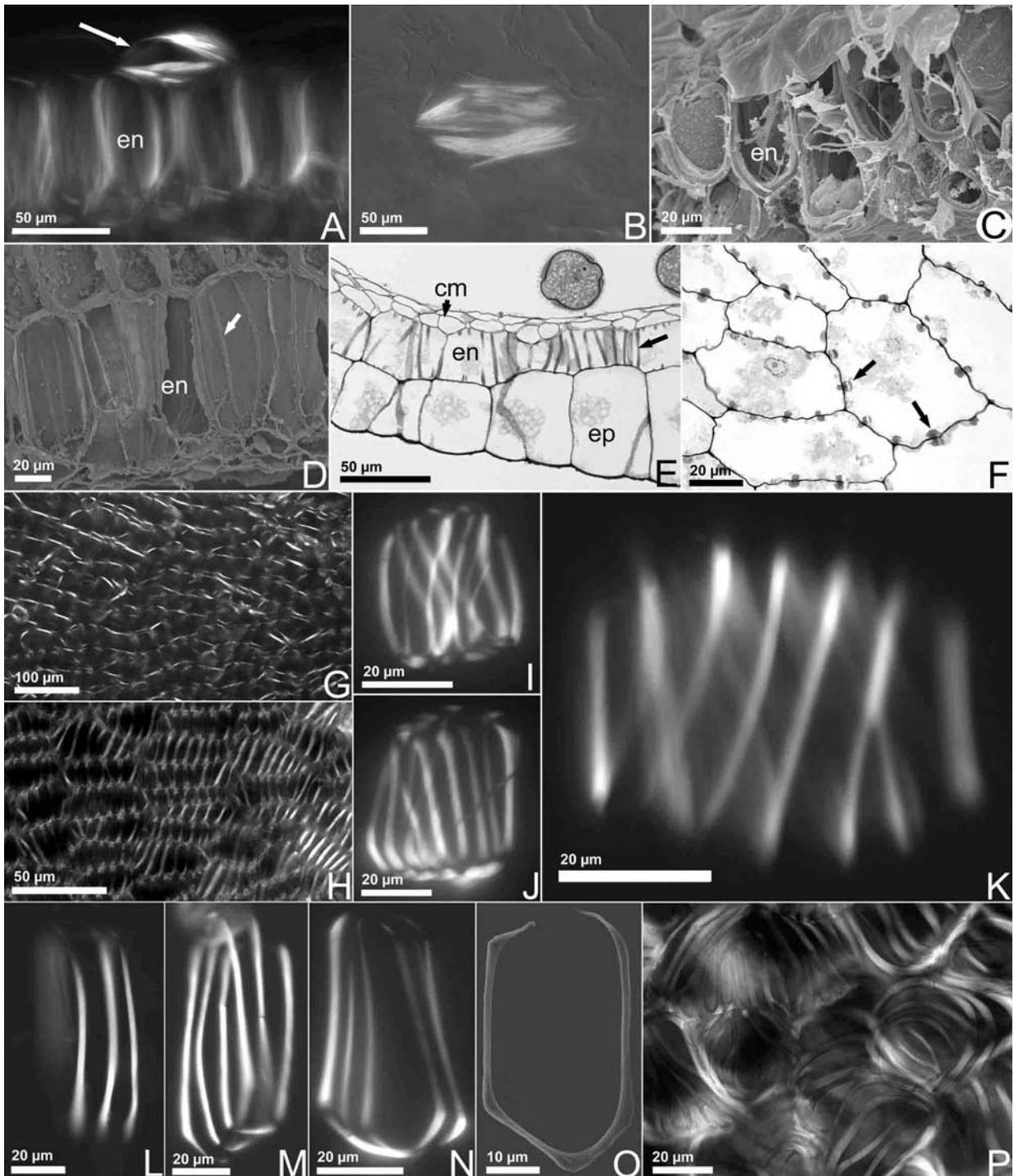


Figura 8. A-P. Epiderme e endotécio de anteras de espécies de *Passiflora* L. A-B. Idioblasto epidérmico com ráfides (seta) sobre o endotécio, em vista lateral (A) e frontal (B), em *P. tenuifila*. C. Endotécio de *P. capsularis*. D. Endotécio de *P. edulis*, mostrando espessamento da parede celular (seta). E. Detalhe de seção transversal do arco em *P. suberosa* e espessamento do endotécio (seta). F. Detalhe de seção paradérmica do endotécio de *P. haematostigma*, mostrando espessamentos da parede celular (setas). G-H. Detalhe do endotécio do arco, em vista frontal, de *P. caerulea* (G) e *P. suberosa* (H). I-N. Células isoladas do endotécio de *P. capsularis* (I), *P. misera* (J), *P. suberosa* (K), *P. tenuifila* (L), *P. edulis* (M) e *P. elegans* (N). O. Detalhe do espessamento (isolado) do endotécio de *P. amethystina*. P. Detalhe de espessamentos em células do conectivo de *P. suberosa*. (A, G-N, P: microscopia óptica de luz polarizada; B: microscopia óptica de contraste interferencial; C-D, O: microscopia eletrônica de varredura; E-F: microscopia óptica de campo claro. Abreviaturas: cm, camadas médias; en, endotécio; ep, epiderme.

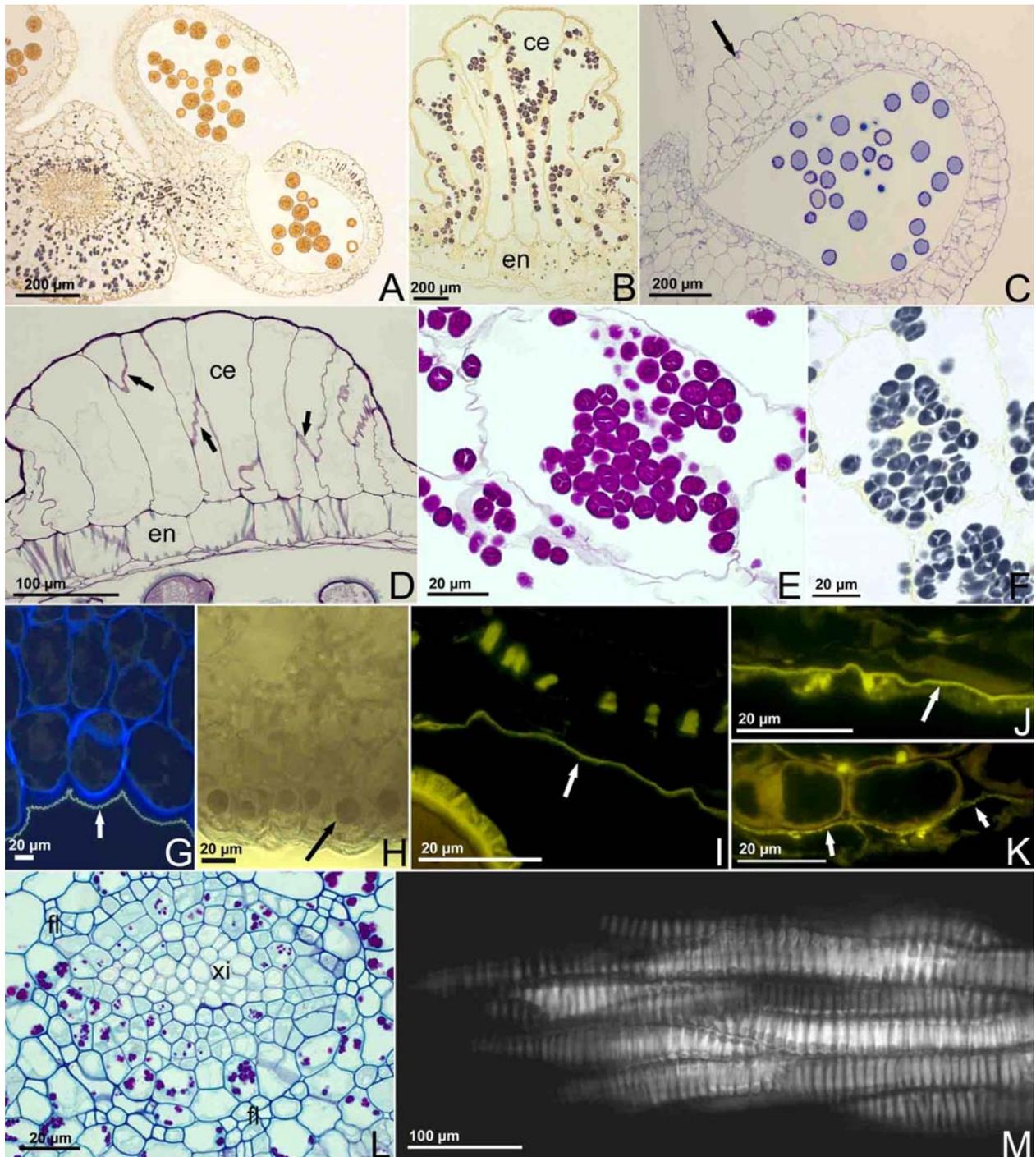


Figura 9. A-M. Seções transversais de anteras de espécies de *Passiflora* L. A-B. Detalhe dos grãos de amido no conectivo, epiderme e endotécio de *P. capsularis* (A) e *P. tenuifila* (B). C. Detalhe do arco de um dos microsporângios de *P. amethystina*, mostrando as células estomiais (seta). D. Detalhe das células estomiais de *P. morifolia*, mostrando a estratificação (setas). E-F. Grãos de amido no conectivo de *P. alata*. G. Epiderme e conectivo de *P. amethystina*, mostrando detalhe da cutícula (seta). H. Compostos fenólicos na epiderme de *P. edulis*. I-K. Detalhe da membrana tapetal e orbículos (setas) de *P. capsularis* (I), *P. haematostigma* (J) e *P. caerulea* (K). L. Detalhe de um feixe vascular anficrival de *P. amethystina*, com grãos de amido. M. Detalhe dos traqueídes no xilema de *P. suberosa*. Colorações/testes histoquímicos: A-B, F: solução de Lugol; C-D: Azul de Toluidina; E: PAS; G: Calcofluor White + Auramina O; H: Cloreto Férrico; I-K: Auramina O; L: PAS + Azul de Astra. (A-F, H, L: microscopia óptica de campo claro; G, I-K: microscopia óptica de fluorescência; M: microscopia óptica de luz polarizada). Abreviaturas: ce, células estomiais; en, endotécio; fl, floema; xi, xilema.

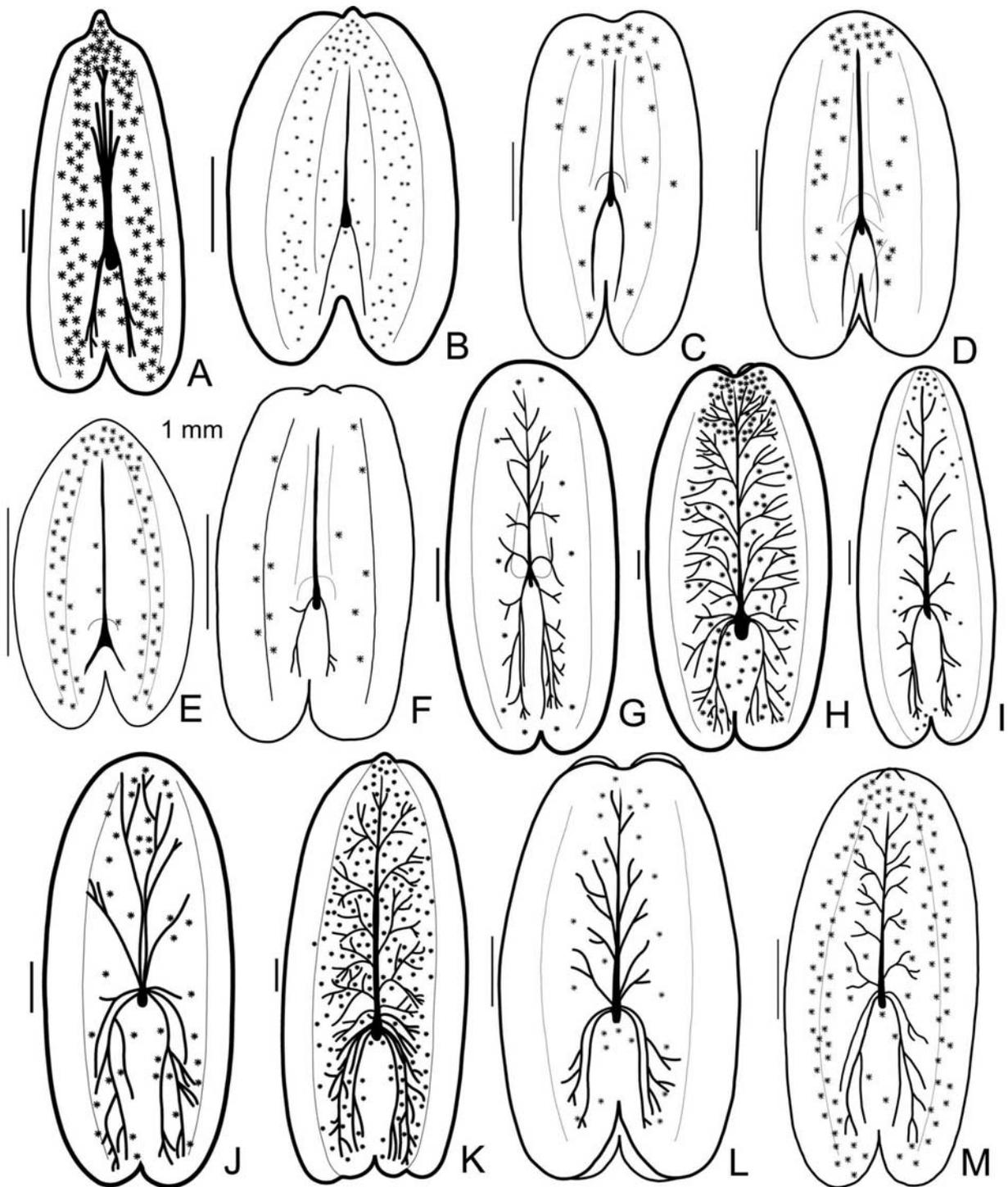


Figura 10. A-M. Vascularização (linhas) e distribuição de drusas (asteriscos) em antera de espécies de *Passiflora* L. A. *P. haematostigma*, B. *P. capsularis*, C. *P. misera*, D. *P. morifolia*, E. *P. suberosa*, F. *P. truncata*, G. *P. actinia*, H. *P. alata*, I. *P. amethystina*, J. *P. caerulea*, K. *P. edulis*, L. *P. elegans*, M. *P. tenuifila*. Todas as escalas: 1 mm.

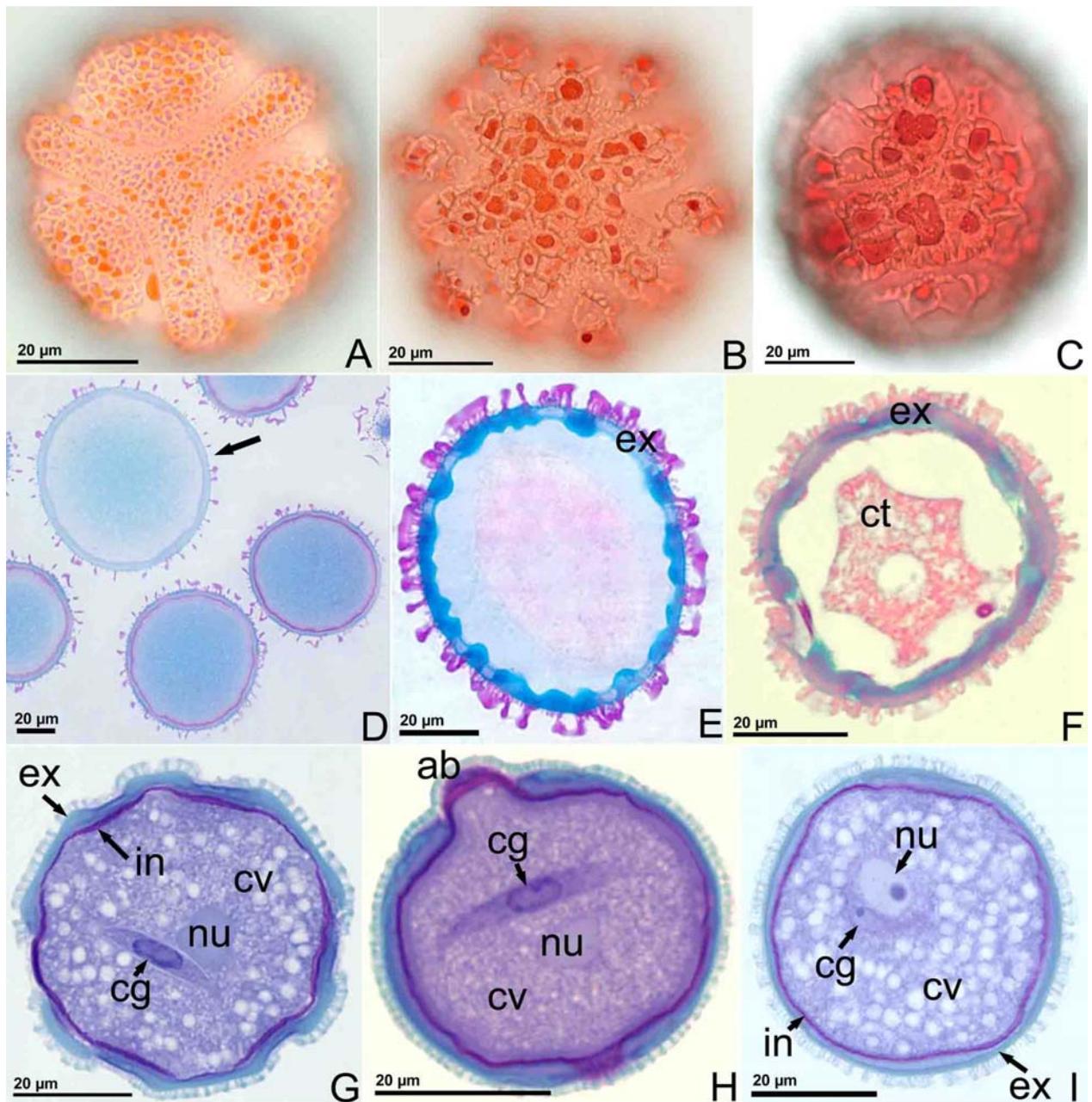


Figura 11. A-I. Grãos de pólen de espécies de *Passiflora* em microscopia óptica de campo claro. A-B. Substâncias lipofílicas (pollenkitt) sobre a esporoderme dos grãos de pólen de *P. haematostigma* (A), *P. morifolia* (B) e *P. edulis* (C). D. Seção anatômica de um grão de pólen gigante (seta) de *P. edulis* em meio ao pólen normal. E. Seção anatômica de um grão de pólen de *P. actinia*, com citoplasma translúcido. F. Seção anatômica de um grão de pólen de *P. capsularis*, com citoplasma colapsado. G-I. Seções anatômicas mostrando a célula generativa nos grãos de pólen de *P. haematostigma* (G), *P. truncata* (H) e *P. misera* (I). (colorações: A-C: Sudan III, D-F: Azul de Astra + PAS + Fucsina Básica, G-I: Azul de Toluidina). Abreviaturas: ab, abertura; ct, citoplasma colapsado; cg, célula generativa; cv, célula vegetativa; ex, exina; in, intina; nu, núcleo da célula vegetativa.

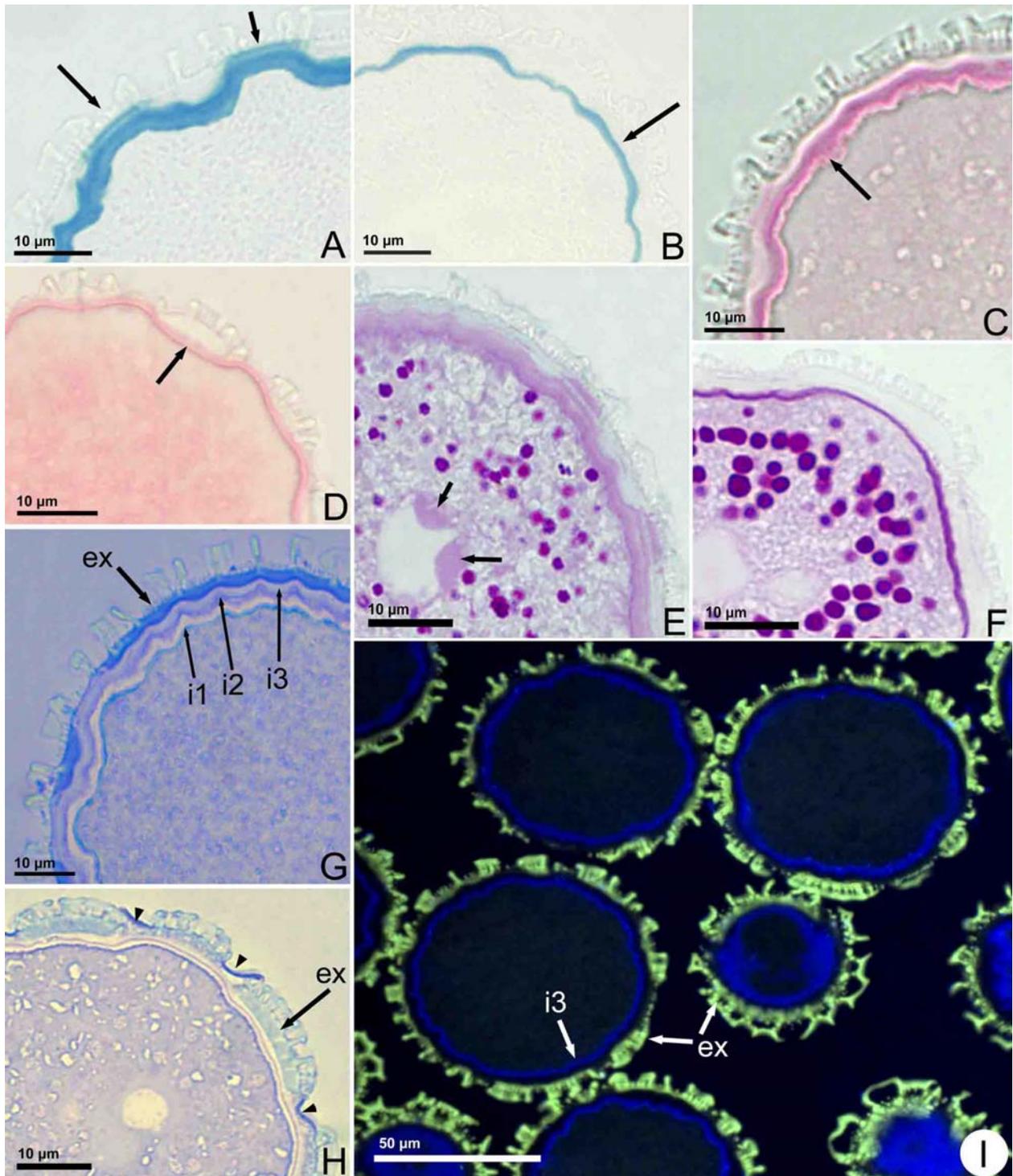


Figura 12. A-I. Seções semifinas da esporoderme de grãos de pólen de espécies de *Passiflora*. A-D. Detalhe da natureza péctica da intina em *P. amethystina* (A), *P. suberosa* (B), *P. caerulea* (C) e *P. misera* (D) Setas: aberturas (A e B) e intina (C e D). E-F: Detecção de compostos PAS-positivos na intina e citoplasma, na forma de grãos de amido, e próximo ao núcleo da célula vegetativa (setas) em *P. caerulea* (E) e *P. haematostigma* (F). G-H. Detecção de proteínas totais na exina, intina e sobre as aberturas (pontas de seta) em *P. amethystina* (G) e *P. suberosa* (H). I. Detecção de celulose no extrato interno da intina (azul) e esporopolenina (verde-amarelado) na exina em *P. actinia*. Colorações/testes histoquímicos: A-B: Alcian Blue; C-D: Vermelho de Rutênio; E-F: PAS; G-H: Coomassie Blue; I: Calcofluor White + Auramina O. (A-H: microscopia óptica de campo claro; I: microscopia óptica de fluorescência). Abreviaturas: ex, exina; i1, intina 1; i2, intina 2; i3, intina 3.

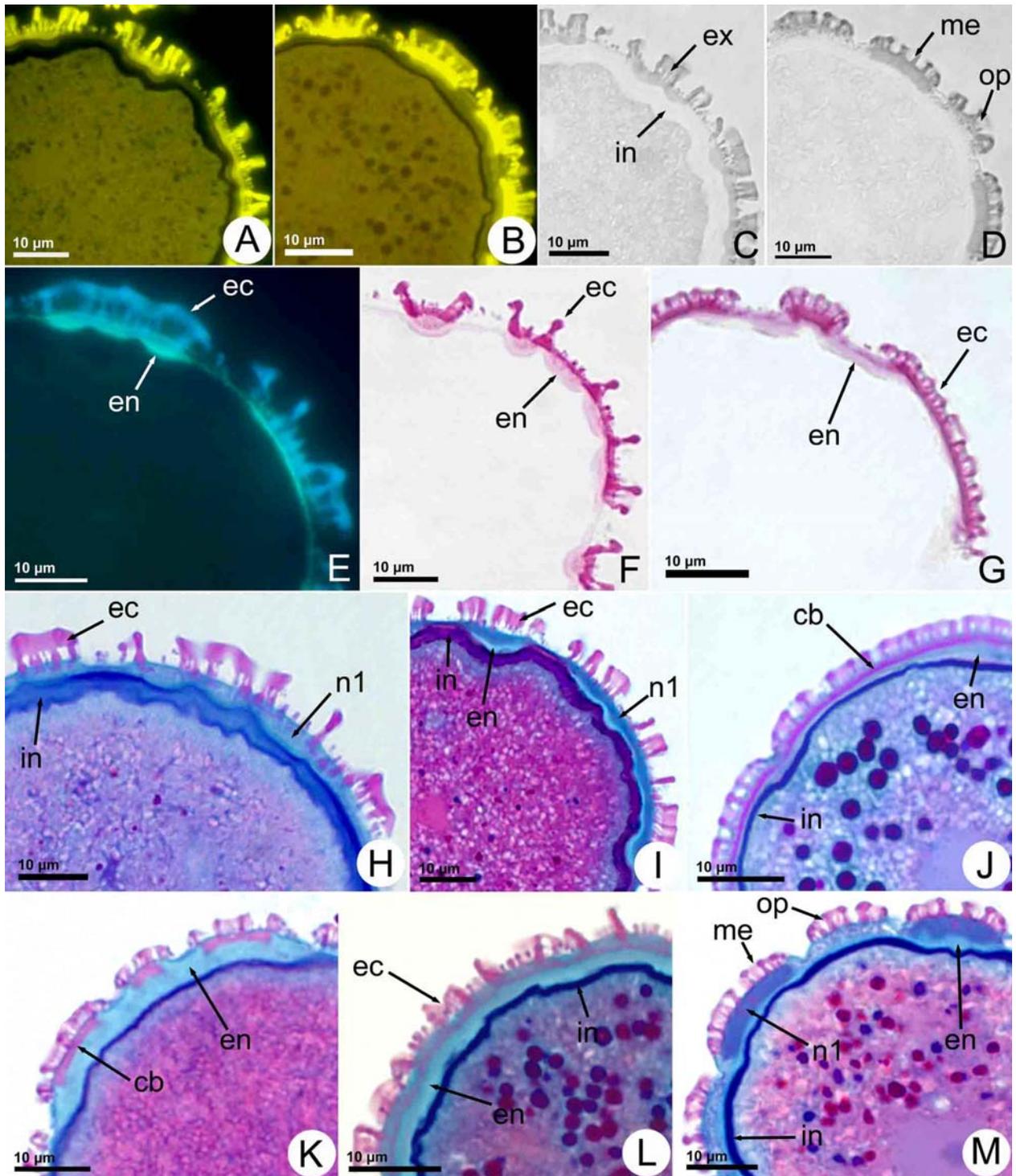


Figura 13. A-M. Seções semifinas da esporoderme em grãos de pólen de espécies de *Passiflora*. A-D. Esporopolenina na exina de *P. amethystina* (A,C), *P. capsularis* (B) e *P. suberosa* (D). E. Autofluorescência da exina em *P. actinia*. F-G. Exina do grão de pólen acetolizado em *P. actinia* (F) e *P. haematostigma* (G), mostrando a diferenciação entre a ectexina e a endexina. H-M. Detalhe mostrando os vários tipos da estrutura da esporoderme em *P. actinia* (H), *P. amethystina* (I), *P. haematostigma* (J), *P. misera* (K), *P. capsularis* (L) e *P. suberosa*. Colorações/testes histoquímicos: A-B: Auramina O; C-D: Sudan Black; F-G: Fucsina Básica; H-M: PAS+Azul de Astra+Fucsina Básica. (A-B, E: microscopia óptica de fluorescência, C-D, F-M: microscopia óptica de campo claro). Abreviaturas: cb, camada basal; ec, ectexina; en, endexina; ex, exina; in, intina; me, mesocolpo; n1, nexina 1; op, operculo.

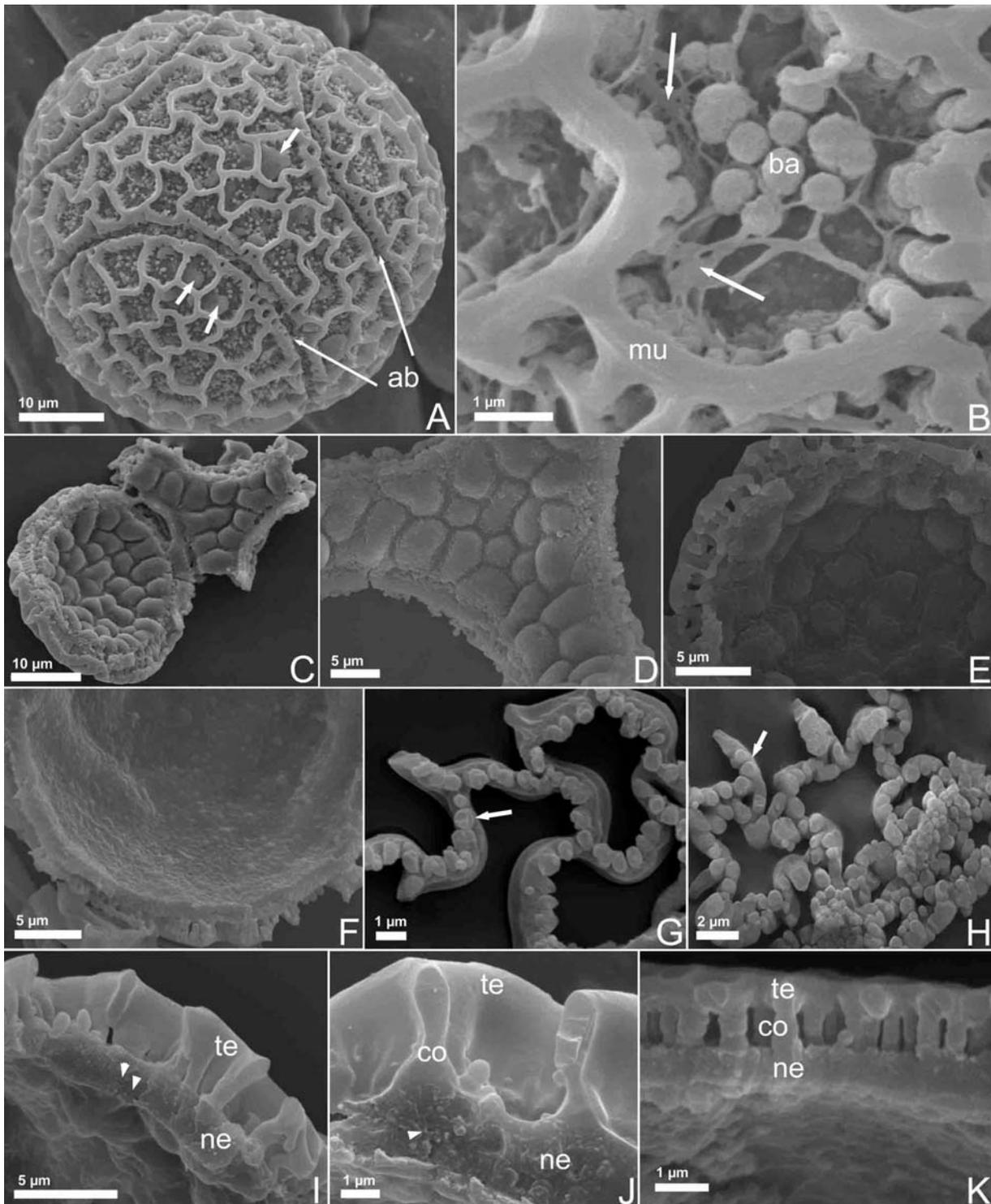


Figura 14. A-K. Esporoderme dos grãos de pólen em espécies de *Passiflora*, sob microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral do grão de pólen de *P. caerulea* após fixação secundária em tetróxido de ósmio, mostrando o pollenkitt (setas) nos lúmens do retículo. B. Detalhe da superfície do grão de pólen de *P. capsularis*, mostrando restos fibrilares de pollenkitt (setas) entre as báculas dos lúmens (pólen não acetolizado). C-F. Detalhes da superfície interna da exina de grãos de pólen acetolizados de *P. actinia* (C), *P. amethystina* (D), *P. elegans* (E) e *P. capsularis* (F), mostrando a superfície verrucada (C-E) e lisa (F). G-H. Detalhes da fratura das columelas e teto (posição invertida) no mesocolpo de *P. caerulea* (G) e próximo das aberturas em *P. tenuifila*, mostrando as columelas (seta). I-K: Detalhes da esporoderme acetolizada e fraturada de *P. elegans* (I), *P. actinia* (J) e *P. haematostigma* (K), contendo pequenos “orifícios” vazios na nexina (pontas de setas). Abreviaturas: ab, aberturas; ba, báculas; co, columelas; mu, muros do retículo; ne, nexina; te, teto.

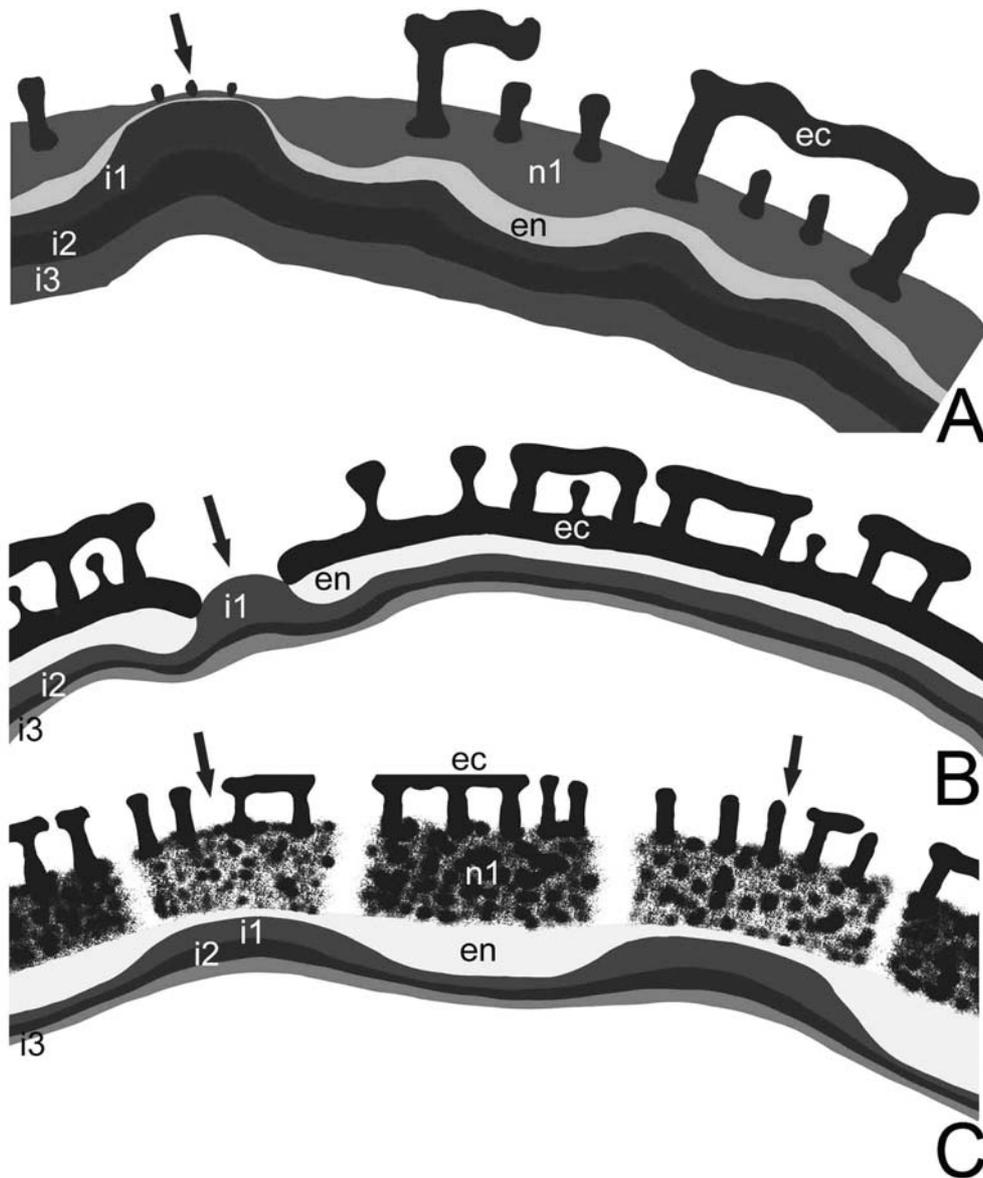
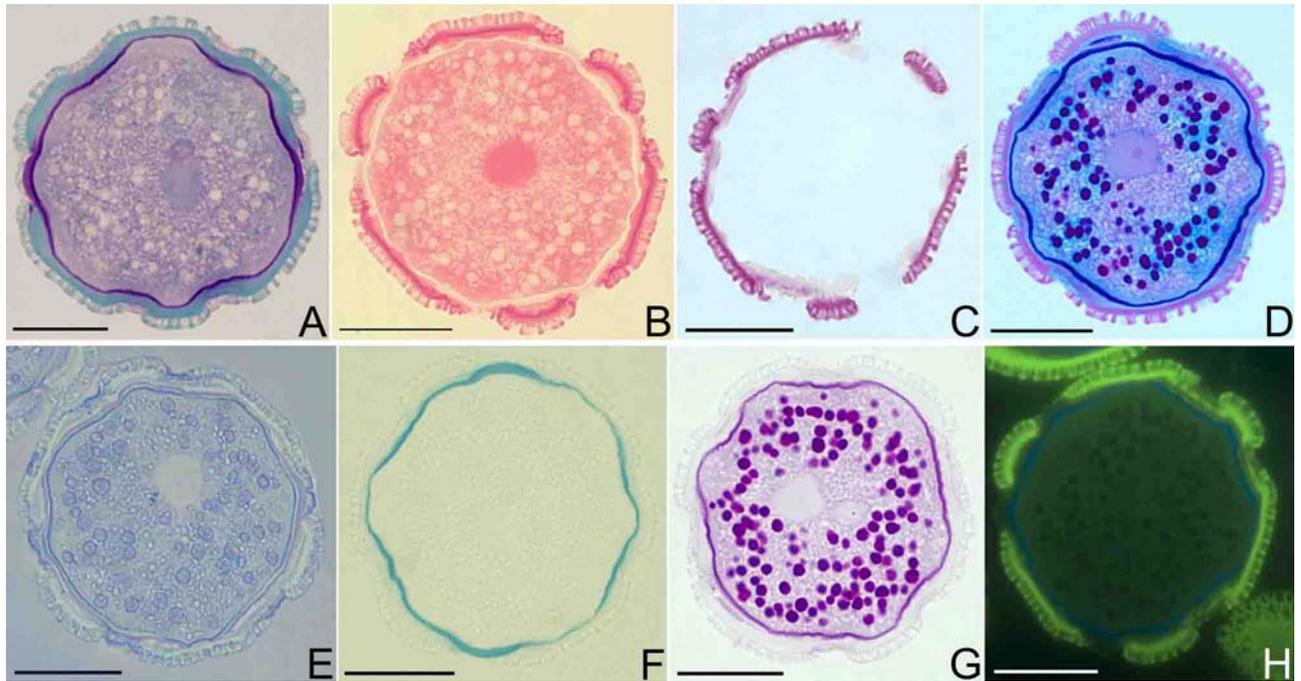


Figura 15. A-C. Esquema dos três tipos estruturais de esporoderme encontrados em espécies de *Passiflora* (ver descrição no texto). A. Tipo 1 (seta: abertura). B. Tipo 2 (seta: abertura). C. Tipo 3 (setas: opérculos nas aberturas). Abreviaturas: ec, ectexina; en, endexina; i1, intina 1; i2, intina 2; i3, intina 3; n1, nexina 1.

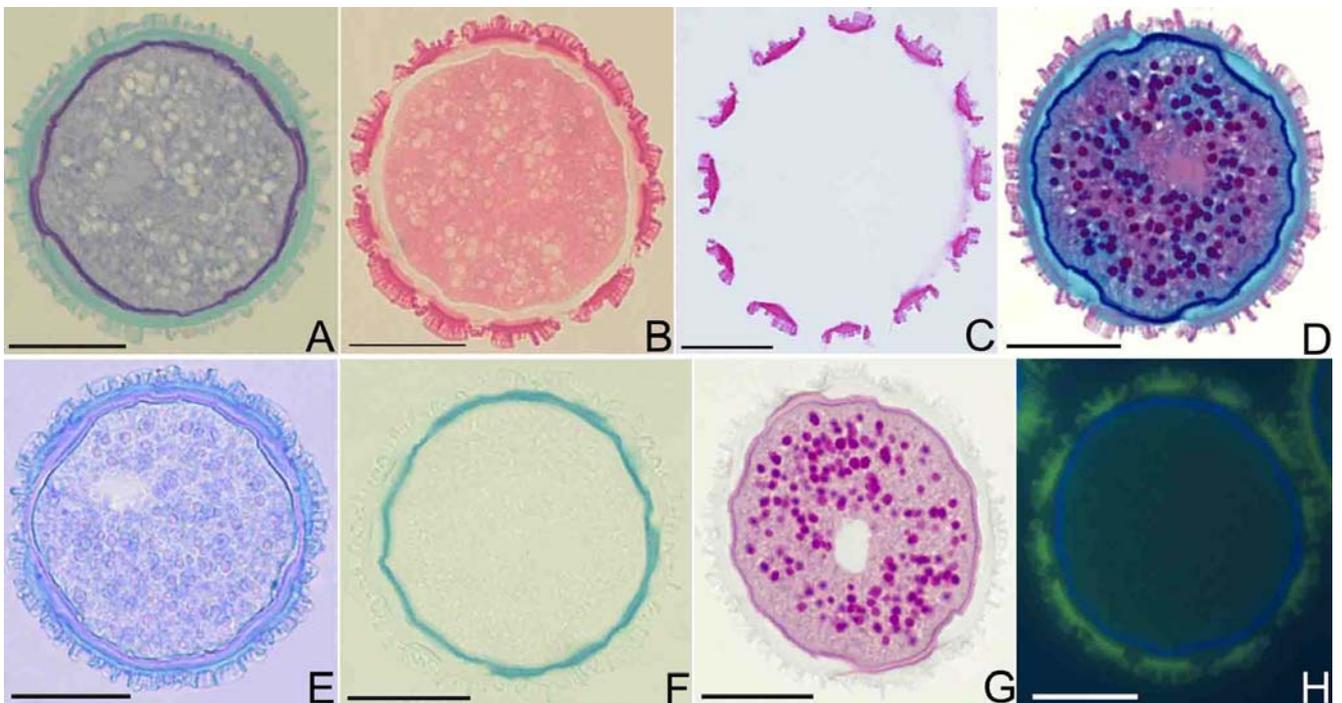
APÊNDICE I

Legenda

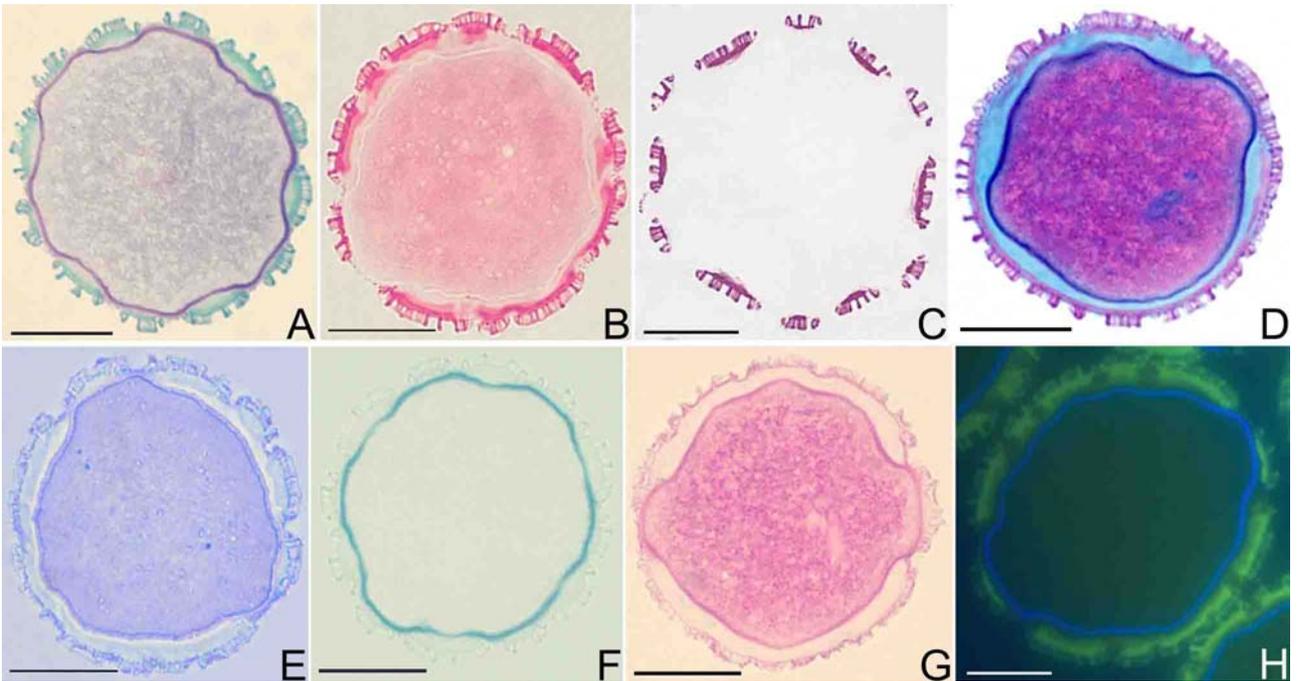
Testes histoquímicos em seções transversais dos grãos de pólen em espécies de *Passiflora*. A. Azul de Toluidina. B. Fucsina Básica em pólen não acetolizado. C. Fucsina Básica em pólen acetolizado. D. Azul de Astra+PAS+Fucsina Básica. E. Coomassie Blue. F. Alcian Blue. G. PAS. H. Calcofluor White+Auramina O. (A-G: microscopia óptica de campo claro, H: microscopia óptica de fluorescência). Barras = 20 μm .



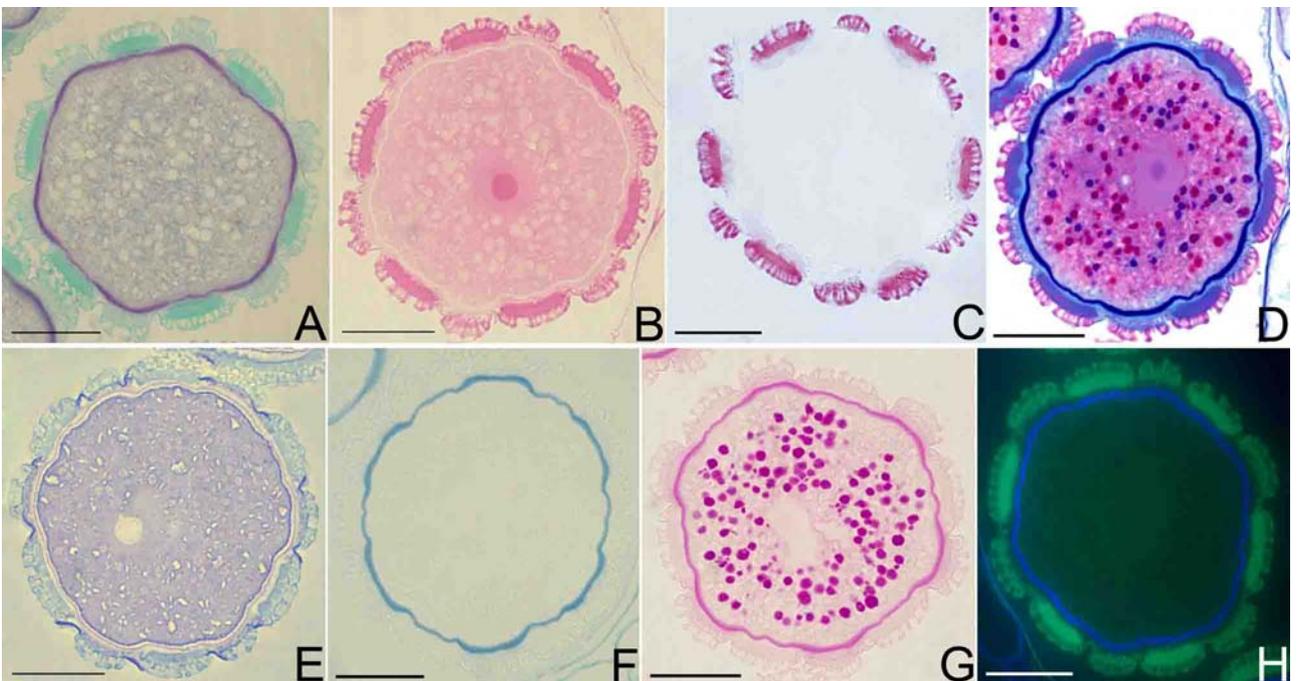
Passiflora haematostigma Mart ex. Mast.



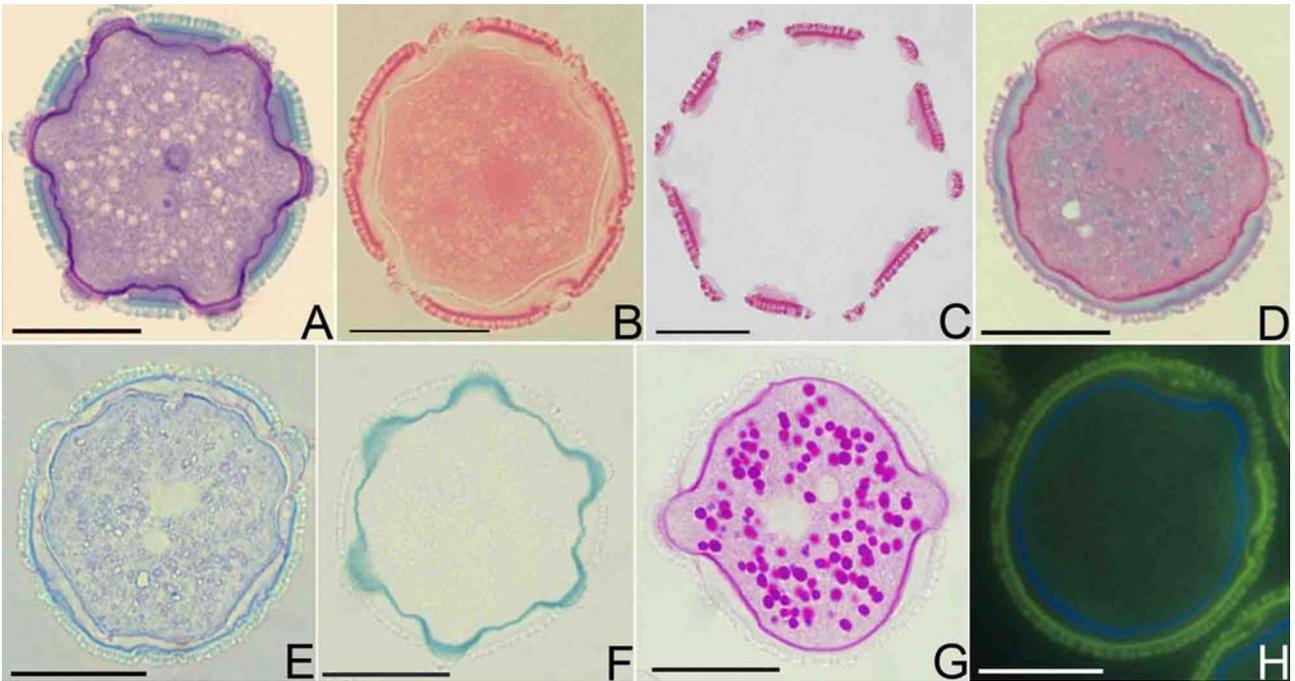
Passiflora capsularis L.



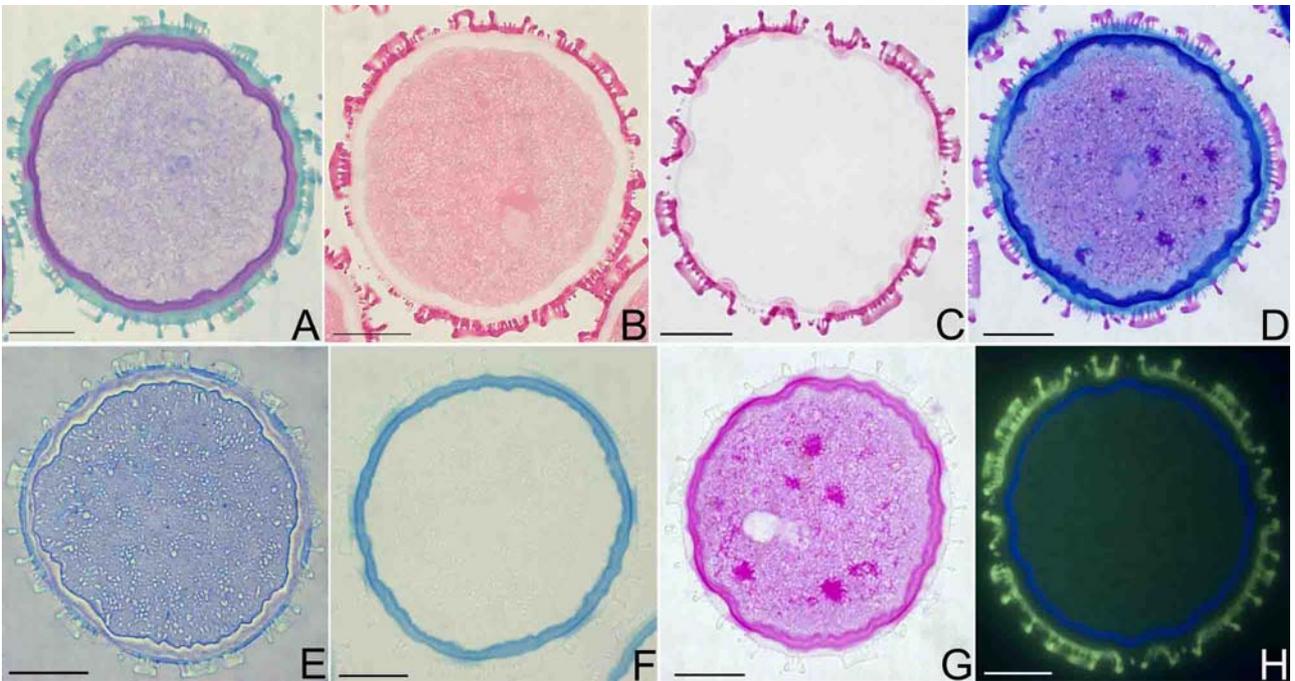
Passiflora misera H.B.K.



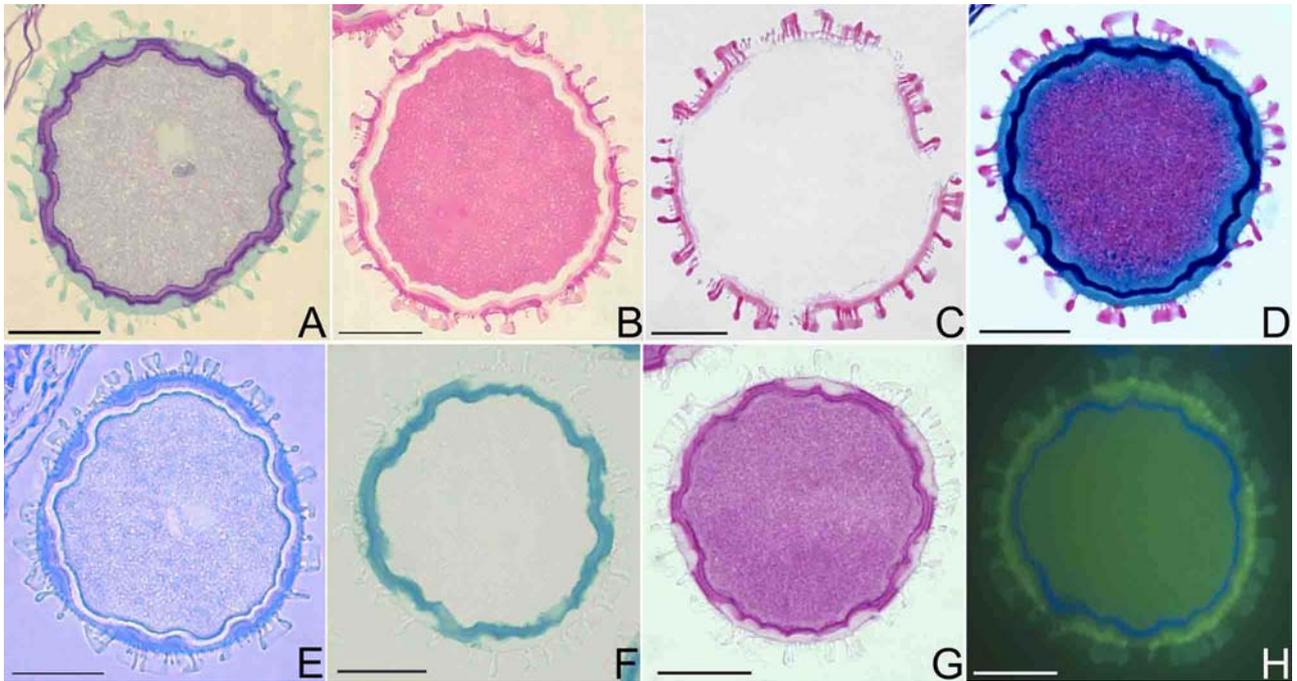
Passiflora suberosa L.



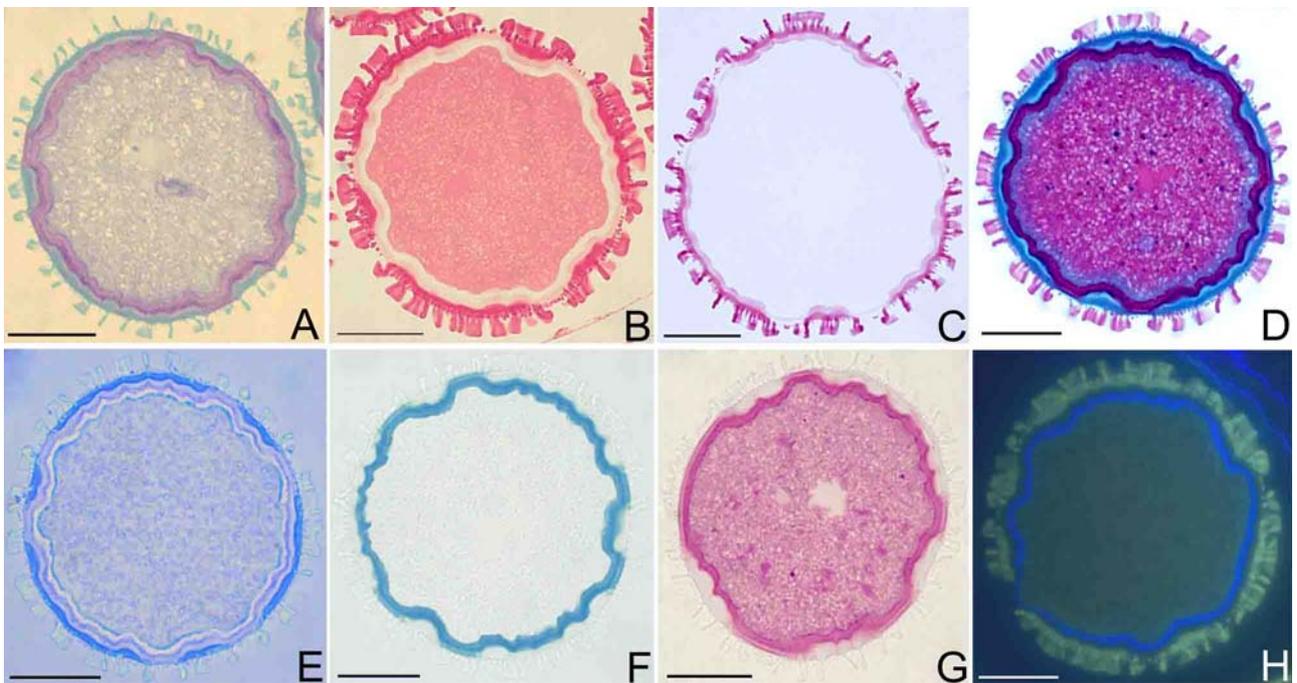
Passiflora truncata Regel.



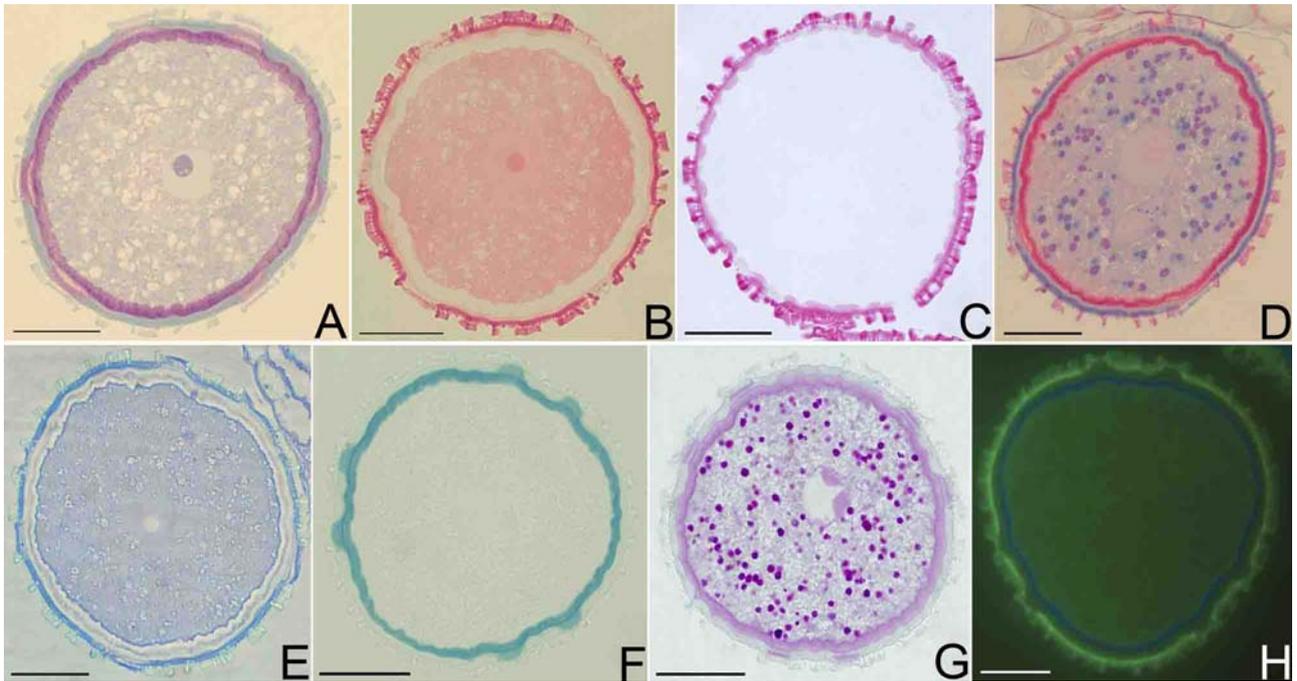
Passiflora actinia Hook.



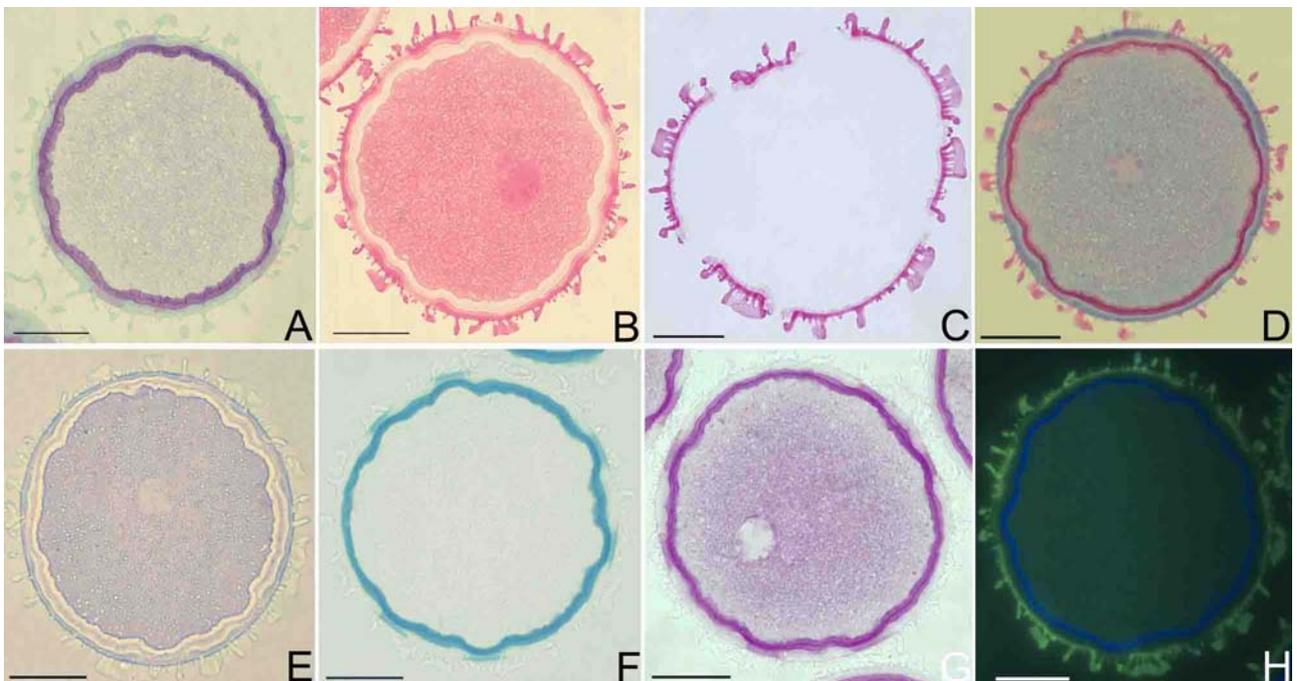
Passiflora alata Curtis.



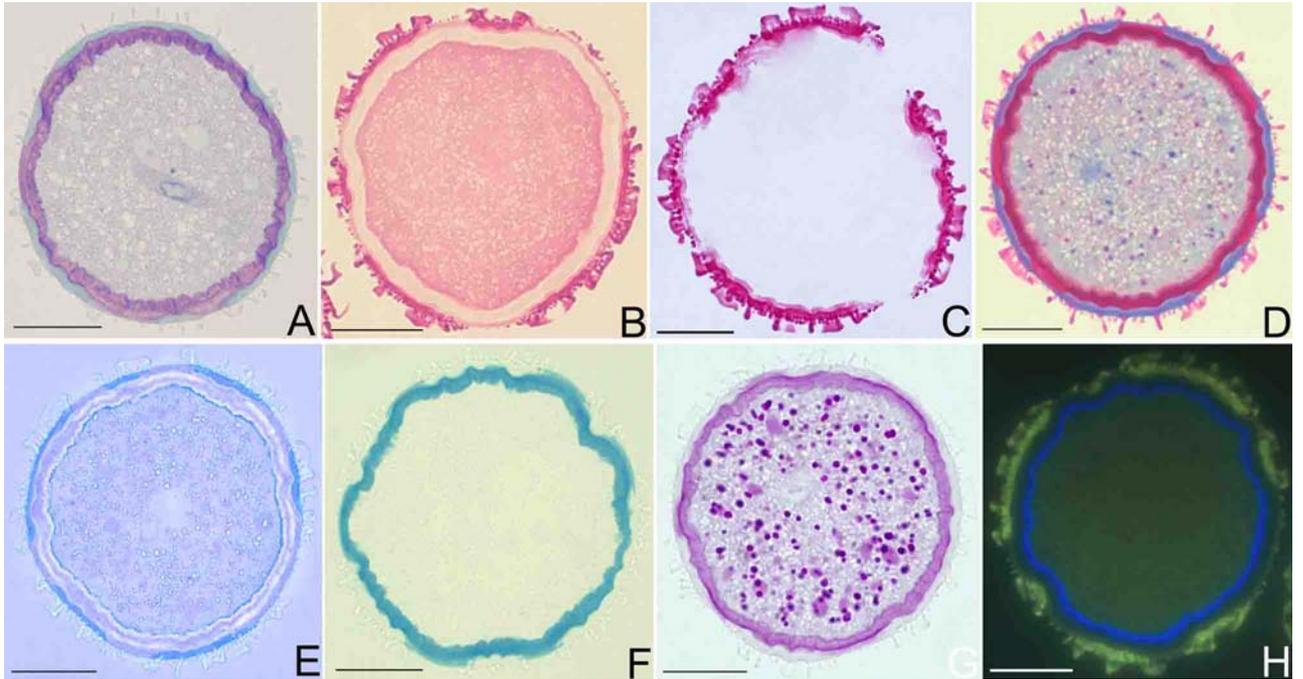
Passiflora amethystina Mik.



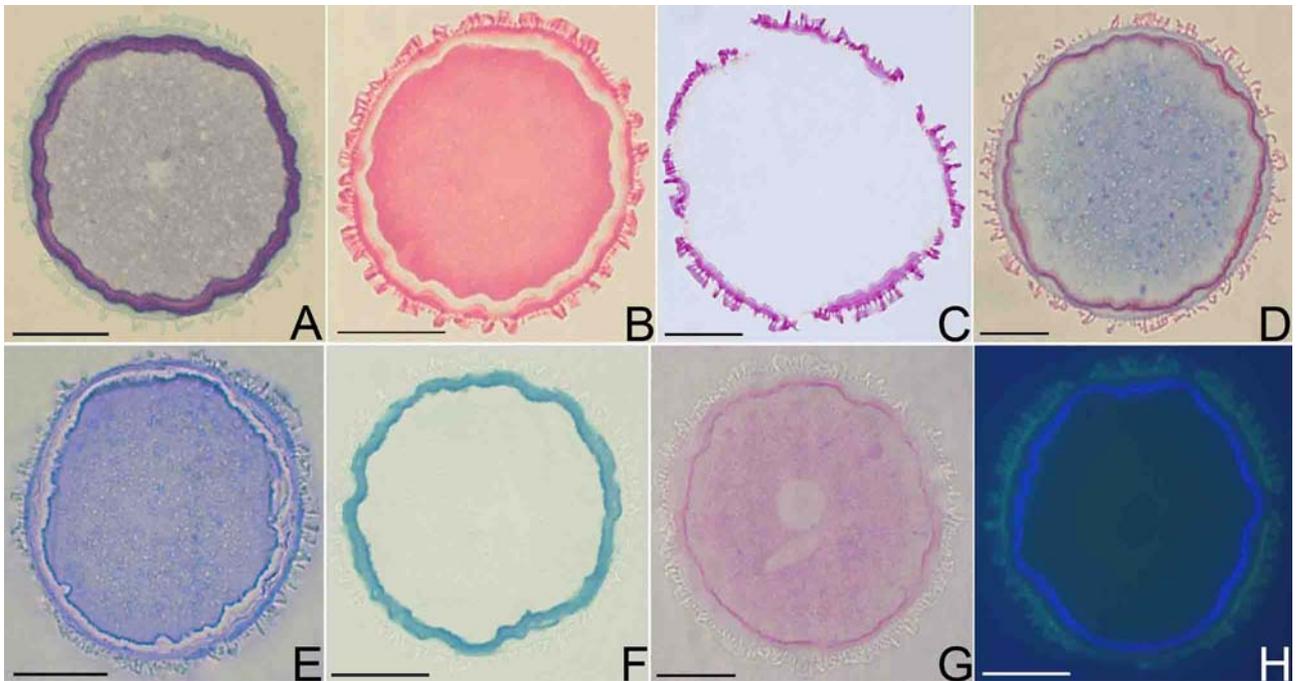
Passiflora caerulea L.



Passiflora edulis Sims.



Passiflora elegans Mast.



Passiflora tenuifila Kill.

**Artigo 2. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L.
(Passifloraceae)**

Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae)¹

Greta Aline Dettke^{2,4}, Rinaldo Pires dos Santos³

¹ Parte da Dissertação de Mestrado da primeira Autora, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Bloco IV, Prédio 43433, Campus do Vale, Bairro Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Professor Adjunto. Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Autor para correspondência: gretadet@yahoo.com.br.

RESUMO (Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae)). Estudos palinológicos revelam uma ampla variação de formas, número e tipos de aberturas nos grãos de pólen em *Passiflora*. Este estudo o objetivo de caracterizar as aberturas polínicas de onze espécies do gênero ocorrentes no Rio Grande do Sul e duas em Santa Catarina (Brasil), pertencentes à três dos quatro subgêneros atualmente reconhecidos: *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*, utilizando várias técnicas de microscopia óptica de campo claro e microscopia eletrônica de varredura. *Passiflora haematostigma* (*Astrophea*) possui grãos de pólen 6-colporados, com três endoaberturas lalongadas. *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. edulis* (*Passiflora*) apresentam pólen 6-colpados, com fusões das ectoaberturas, aos pares, na região do apocolpo. *P. actinia*, *P. elegans* e *P. tenuifila* (*Passiflora*) apresentam grãos de pólen com 6 a 12 colpos, também fusionados aos pares. *P. misera*, *P. morifolia*, *P. suberosa* e *P. truncata* (*Decaloba*) apresentam grãos de pólen 6-colporados operculados, com diferenças no tamanho das endoaberturas e largura do opérculo. *P. capsularis* (*Decaloba*) apresenta pólen 12-colporado. São discutidos os principais termos relacionados às descrições polínicas do grupo e indicados os termos mais apropriados e sinônimos. Ao final, é apresentado um pequeno glossário dos termos e conceitos utilizados.

Palavras-chave: *Passiflora*, tipos aberturais, pseudopérculo, opérculo, palinologia.

ABSTRACT (Types of the pollen grains apertures of *Passiflora* L. species (Passifloraceae)). Palynological studies reveal a wide variation in format, number and types of apertures in the *Passiflora* pollen grains. This study aimed characterizing the apertures of pollen grains of eleven species of Rio Grande do Sul State and two species in Santa Catarina State (Brazil), belonging to the three of the four subgenera now recognized: *Astrophea*, *Decaloba* and *Passiflora*, with several techniques of light and scanning electron microscopy. *Passiflora haematostigma* (*Astrophea*) has pollen grains 6-colporate, with three lalongate endoapertures. *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea* and *P. edulis* (*Passiflora*) present pollen grains 6-colpate, with fusion of the pairs of ectoapertures in the apocolpium. *P. actinia*, *P. elegans* and *P. tenuifila* (*Passiflora*) present pollen grains with 6 to 12 colpus, also fused to the pairs. *P. misera*, *P. morifolia*, *P. suberosa* and *P. truncata* (*Decaloba*) present pollen grains 6-colporate operculate, with differences in the endoaperture size and operculum width. *P. capsularis* (*Decaloba*) has pollen 12-colporate. This work discussed the main palynological terms and synonyms of literature. In the end, is presented a small glossary of the terms and used concepts.

Key words: *Passiflora*, apertures types, pseudopericulum, operculum, palynology.

Introdução

Passiflora L. é o maior dos gêneros de Passifloraceae, com cerca de 530 espécies (Feuillet & MacDougal 2007). No Brasil, Cervi (2006) refere um total de aproximadamente 140 espécies validamente descritas para o gênero.

Este gênero apresenta uma classificação bastante complexa, com a distinção de 23 subgêneros (Killip 1938; Escobar 1989). Recentemente, a delimitação dos níveis infragenéricos é questionada num contexto de análises filogenéticas baseadas também em seqüências gênicas. Feuillet & MacDougal (2003) propõem, com base na morfologia externa e características ecológicas das espécies, uma nova classificação infragenérica para *Passiflora*, reduzindo o número de subgêneros para apenas quatro: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L. Esta proposta tem sido parcialmente confirmada por estudos de filogenia molecular (Muschner *et al.* 2003; Yockteng & Nadot 2004; Muschner 2005; Souza-Chies *et al.* 2005; Hansen *et al.* 2006).

Do ponto de vista palinológico, Passifloraceae mostra-se uma família bastante interessante, pois os grãos de pólen apresentam grande variabilidade de características, algumas ainda fracamente exploradas do ponto de vista sistemático e filogenético.

As primeiras observações sobre a morfologia dos grãos de pólen foram relatadas por Mohl, em 1834, Fritzsche, em 1837, e Fischer, em 1890 (Presting 1965; Spirlet 1965). Posteriormente, Erdtman (1952) descreve em seu tratado os grãos de pólen de sete espécies de Passifloraceae, pertencentes aos gêneros *Mitostemma*, *Passiflora* e *Tetrapathaea*, como possuindo de três a 12 colpos ou colporos e exina reticulada. Em 1965, dois importantes trabalhos são publicados, simultaneamente por Spirlet (1965) e Presting (1965). O primeiro trata da utilização taxonômica dos grãos de pólen de Passifloraceae, revelando uma ampla gama de características relevantes para o grupo, desde a estrutura da exina até a complexa gradação de vários tipos de aberturas. Presting (1965) realiza o estudo até então mais abrangente e pormenorizado sobre os grãos de pólen de Passifloraceae, contemplando 153 espécies da família, distribuídas em 13 gêneros. O autor destaca a importância do entendimento da evolução das aberturas dos grãos de pólen de Passifloraceae para a realização das descrições polínicas.

Após Presting (1965) e Spirlet (1965), poucos estudos foram realizados com grãos de pólen de Passifloraceae. Destacam-se, entre eles, o de Amela García *et al.* (2002), no estudo da microesporogênese, microgametogênese e morfologia polínica de seis espécies de *Passiflora* da Argentina; Araújo & Santos (2004), com o estudo morfológico de 12 espécies de *Passiflora* da Bahia, estabelecendo três tipos polínicos entre as espécies estudadas;

Milward-de-Azevedo *et al.* (2004), com a descrição polínica de oito espécies de *Passiflora*, subgênero *Decaloba*; e Barrios *et al.* (2005), com a caracterização de 121 espécies de *Passiflora* e 2 espécies de *Dilkea* e aplicação da morfologia polínica à nova classificação infragenérica de *Passiflora*.

Em estudos anteriores, que abrangem os grãos de pólen de Passifloraceae e do gênero *Passiflora*, percebe-se a utilização de diferentes termos para as diferentes regiões da esporoderme. Este termos se complementam e giram em torno de um conceito de evolução similar para as aberturas do pólen, como pontopérculo, opérculo primário, opérculo secundário e pseudopérculo (por exemplo Erdtman, 1952; Spirlet, 1965 e Presting, 1965). Contudo, na literatura recente, verifica-se que estes termos não têm sido aplicados sempre de forma correta e algumas vezes são confundidos pelos autores, comprometendo as descrições polínicas, e, conseqüentemente, a aplicação dos resultados destes trabalhos. Assim, não há consenso quanto ao tipo e número de aberturas em muitas espécies. Por exemplo, o pólen de *P. suberosa* é descrito como 6-colpado, com opérculos sobre os colpos (Araújo & Santos 2004), 6-colporado, com opérculos secundários (Presting 1965) e 12-colpado (Milward-de-Azevedo *et al.* 2004). Nestes casos, é necessária a análise mais minuciosa dos tipos aperturais, se possível com vários métodos de abordagem, podendo então ser indicados, com mais segurança, o número e forma das aberturas, bem como a presença ou não de opérculos.

Deste modo, o presente estudo tem por objetivo a análise dos tipos aperturais de onze espécies de *Passiflora* que ocorrem no estado do Rio Grande do Sul e duas espécies de Santa Catarina, pertencentes a três subgêneros (Feuillet & MacDougal 2003): *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*, utilizando diferentes técnicas de microscopia óptica de campo claro e microscopia eletrônica de varredura. Também se pretende discutir as diferentes nomenclaturas propostas para os grãos de pólen da família, os termos sinônimos, bem como indicar os termos mais adequados para as diversas estruturas, a fim de uniformizar as descrições polínicas. Ao final do trabalho é apresentado um pequeno glossário com os principais termos e conceitos empregados.

Materiais e Métodos

Foram estudadas as seguintes espécies, cujo material testemunho das populações estudadas está depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN): subgênero *Astrophea* (DC.) Mast.: *Passiflora haematostigma* Mart. ex Mast. (ICN152173-SC, ICN152122-SC); subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb.: *P. capsularis*

L. (ICN152171, ICN150004, ICN153009), *P. misera* Kunth (ICN152190, ICN152269), *P. morifolia* Mast. (ICN159142), *P. suberosa* L. (ICN152091, ICN152272, ICN153002, ICN122178, ICN152176), *P. truncata* Regel (ICN152128-SC); e subgênero *Passiflora* L.: *P. actinia* Hook. (ICN152094), *P. alata* Curtis (ICN152273, ICN152353), *P. amethystina* J.C. Mikan (ICN152177), *P. caerulea* L. (ICN152093, ICN152175, ICN152173-SC), *P. edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg. (ICN159143, ICN152179, cultivada: Victor Graeff e Porto Alegre (RS)), *P. elegans* Mast. (ICN152092) e *P. tenuifila* Killip (ICN152275).

Para a análise em microscopia óptica de campo claro foram utilizadas duas técnicas: 1) Acetólise dos grãos de pólen (Erdtman, 1960), sendo que parte destes foi montada em lâminas palinológicas semipermanentes, com gelatina glicerinada, e parte incluída em resina acrílica a base de hidroxietilmetacrilato (Tecnovith 7100, Kulzer) (Gerrits & Smid 1983); 2) Inclusão de grãos de pólen, quimicamente fixados, em resina acrílica, para a confecção de seções semifinas, em diversos planos, dos grãos de pólen. Para esta segunda técnica, os grãos de pólen, ainda no interior das anteras, foram fixados em uma mistura de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (Roland & Vian 1991) e, após lavagem em tampão de mesma osmolaridade, o material foi desidratado em série crescente de etanol e incluído em resina acrílica. Seções semifinas, de 0,5 a 2 μm , foram feitas em micrótomo de rotação equipado com navalhas descartáveis de vidro e montadas sobre lâminas histológicas. Para a análise das regiões das aberturas e da exina dos opérculos e mesocolpos, foram utilizados como corantes/testes histoquímicos: Azul de Toluidina O (C.I. 52040), em concentração de 0,05% e pH 4,4 (O'Brien & McCully 1981); Azul de Alciano 8GX 1% (C.I. 74240), em solução acética 3%, para ácidos polissacarídicos e ácidos pécticos (intina) (Jensen 1962); Fucsina Básica (C.I. 42500) 0,05% em solução alcoólica 2,5% (ectexina e endexina) (Faegri & Iversen 1964; Punt *et al.* 2007).

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), parte das anteras fixadas foi desidratada em série crescente de etanol, transferida para acetona 100% e processadas em secador de ponto crítico. As anteras foram montadas em fita adesiva metálica sobre suportes de alumínio e fraturadas para a observação dos grãos de pólen. Também parte do pólen acetolizado, após lavagem, foi ressuspenso em água destilada. Uma gota da solução foi transferida para a superfície de 1 cm^2 de filme fotográfico, sobre o lado da emulsão, previamente exposto à luz, revelado e colado sobre suportes de alumínio. O filme foi seco em estufa aquecida a 60°C. Os grãos de pólen, secos e aderidos sobre o filme fotográfico, foram recobertos com fita adesiva, sendo esta rapidamente removida, em um único movimento, obtendo-se grãos de pólen fraturados (Claugher 1986). O material foi

recoberto com 10 a 15 nm de ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6060, sob 10 kV.

Resultados e Discussão

Este estudo comprova, entre as espécies estudadas, a variação no número e tipo de aberturas, como ressaltado em diversos estudos palinológicos de Passifloraceae (Tab.1).

Entre as espécies estudadas verifica-se a existência de três grandes grupos, ou “tendências”, cujas espécies representam os três subgêneros, *Astrophea*, *Passiflora* e *Decaloba*, conforme classificação de Feuilett & MacDougal (2003).

A espécie representante do subgênero *Astrophea*, *P. haematostigma*, possui grãos de pólen 6-colporados, com 3 endoaberturas lalongadas (Fig. 1-6, Tab. 1). As ectoaberturas encontram-se arranjadas aos pares, mas não apresentam fusões na região do apocolpo. Esta espécie apresenta pontopérculo, de acordo com a definição de Erdtman (1952), e utilizada por Punt *et al.* (2007). Nesta espécie, os pontopérculos, juntamente com a região do apocolpo, formam uma estrutura trirradiada, como assinalado por Araújo & Santos (2004) para outra espécie de *Astrophea* (*P. rhamnifolia* Mast.). Cada endoabertura está associada a duas ectoaberturas pareadas, conforme também descrito para *P. rhamnifolia* (Araújo & Santos 2004).

De acordo com a teoria de Presting (1965), os grãos de pólen com seis aberturas e derivados, característicos de espécies de *Passiflora*, possuem origem a partir de grãos 3-colporados, que desenvolveram opérculos sobre as aberturas. Estes opérculos tornaram-se mais largos e suas duas extremidades fundiram-se na região do apocolpo, de modo que deixaram de ser funcionalmente opérculos, incorporando-se ao mesocolpo. Cada um passou a delimitar, nestes novos grãos, duas novas aberturas. Presting (1965) chama estes opérculos de opérculos primários (*die Primäropercula*). As endoaberturas, sob estes opérculos, podem permanecer únicas e alongar-se (lalongadas) ou podem individualizar-se pela deposição de endexina sobre a superfície interna do opérculo primário, originando então seis endoaberturas.

O que Presting (1965) denomina de opérculo primário corresponde ao que Erdtman (1952) chama de pontopérculo, cujo conceito foi utilizado posteriormente por Spirlet (1965) e Araújo & Santos (2004). Assim, estes termos podem ser considerados sinônimos, dando-se preferência para a utilização do termo pontopérculo, que se encontra mais difundido na literatura (Punt *et al.* 2007) e gera menos confusão que o emprego do termo opérculo primário, já que também existem, na literatura, os termos opérculo secundário e opérculo. Outro termo utilizado para a descrição destes grãos de pólen é geminicolpado (Amela García

et al. 2002) (ou geminicolporado, no caso), referindo-se à disposição pareada das aberturas (Fig. 4) e sinonimizado por Punt *et al.* (2007) como pontopérculo.

As espécies estudadas do subgênero *Passiflora* (Fig. 7-15, Tab. 1) apresentam tipo de abertura distinto de *P. haematostigma*. Nestas espécies observa-se a fusão de colpos na região do apocolpo. *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. edulis* apresentam grãos de pólen 6-sincolpados (seis colpos fundidos aos pares na região do apocolpo; Fig. 10). *P. actinia* apresenta de 10 a 12 colpos e *P. elegans* e *P. tenuifila* apresentam de 8 a 10 colpos. Em todos, fundidos aos pares (Fig. 14). Nestas espécies, não foram encontradas endoaberturas, seja em microscopia óptica de campo claro como em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de grão acetolizados e fraturados (Fig. 12).

De acordo com Presting (1965), estes grãos de pólen têm origem a partir dos últimos (como os de *P. haematostigma*), nos quais as ectoaberturas se fusionam aos pares no apocolpo. Em relação às endoaberturas, observa-se uma clara tendência, segundo o autor, de tornarem-se reduzidas ou desaparecerem por completo. Após a fusão, partes do mesocolpo são delimitadas por estas aberturas, e estas regiões são denominadas de pseudopérculos (*die Pseudopercula*), pois funcionam como opérculos durante a germinação dos grãos de pólen sobre o estigma e frequentemente se desprendem nas preparações palinológicas (Fig. 11). Contudo, na realidade, são originalmente mesocolpos. Para Presting (1965), de forma inexplicável, o número de pseudopérculos pode chegar a 12 (representando 24 aberturas fundidas aos pares), distribuídos uniformemente por toda a esporoderme. Spirlet (1965) explica a formação deste tipo polínico por meio de fusões longitudinais e também transversais dos colpos.

Com relação ao número de aberturas, este estudo concorda com a maioria dos estudos envolvendo espécies do subgênero *Passiflora* (Erdtman 1952; Presting 1965; Spirlet 1965; Huynh 1972; Amela García *et al.* 2002; Araújo & Santos 2004; Milward-de-Azevedo *et al.* 2004; Barrios *et al.* 2005), diferindo apenas para *P. alata*, a qual Presting (1965) apresenta como possuindo pólen com quatro aberturas e para *P. edulis*, na qual o mesmo autor apresenta com grãos de pólen com oito a dez aberturas. Estas variações não foram observadas no material analisado neste trabalho. Ainda, *P. tenuifila* apresenta um intervalo maior de aberturas (6-10) do que o apresentado por Presting (1965) (6-8 aberturas).

Quanto ao tipo de aberturas, há divergências na literatura. Este estudo concorda com Spirlet (1965), Huynh (1972), Amela García *et al.* (2002) e Araújo & Santos (2004), quanto à presença de colpos nestas espécies. Presting (1965) apresenta *P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. edulis* com aberturas colporoidadas. Barrios *et al.* (2005) caracterizam o subgênero *Passiflora*

(76 espécies analisadas) com aberturas colporoidadas, que, segundo os autores, possuem estruturas oroides não muito distintas. Discordamos destes autores neste estudo, onde aberturas do tipo colporoidada não foi observada para as espécies deste subgênero.

As espécies do subgênero *Passiflora*, assim como *P. haematostigma*, possuem pontopérculos (*sensu* Erdtman 1952) ou opérculos primários (*sensu* Presting 1965). Nas espécies que apresentam, de forma constante, três aberturas (*P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. edulis*) este termo é apropriado para as descrições e não gera confusões. Entretanto, para as demais espécies (*P. actinia*, *P. elegans* e *P. tenuifila*), nos quais é difícil o reconhecimento exato dos pontopérculos, propomos a utilização do termo mesocolpo para toda a região entre os pseudopérculos (Fig. 13-15).

As espécies do último subgênero estudado, *Decaloba*, possuem uma característica peculiar que as une como grupo, mas que se apresenta derivada em algumas espécies e não muito fácil de ser visualizada: a presença de opérculos. *P. misera*, *P. morifolia*, *P. suberosa* e *P. truncata* apresentam grãos de pólen 6-colporados, com opérculos sobre as aberturas (Fig. 16-26). *P. suberosa* eventualmente apresenta os colpos fusionados aos pares na região do apocolpo (Fig. 20). *P. capsularis* apresenta grãos 12-colporados, com estreitas faixas de exina sobre algumas aberturas (Fig. 27-34). *P. suberosa* apresenta grandes endoaberturas sob os opérculos (Fig. 22a), de difícil visualização em microscopia óptica, mas evidentes na análise em MEV de material acetolizado, quando os opérculos caem (Fig. 23). *P. misera* e *P. morifolia* apresentam endoaberturas relativamente menores e opérculos largos (Fig. 22b), ao passo que em *P. truncata* estas endoaberturas são pequenas e os opérculos, sobre elas, são estreitos (Figs. 22c, 24-26).

Presting (1965) afirma, em sua teoria sobre a evolução das aberturas dos grãos de pólen de Passifloraceae, que os grãos de pólen descritos acima e característicos de espécies atualmente pertencentes à *Decaloba*, têm origem a partir de grãos 6-colporados (novamente como os de *P. haematostigma*), mas que sobre as aberturas houve a formação de estreitas faixas de ectexina, que, progressivamente, se tornaram mais largas até a caracterização de um opérculo, que o autor denomina de opérculo secundário (*die Sekundäropercula*), para diferenciá-lo do opérculo primário (formado anteriormente e ainda presente nestes grãos). O opérculo secundário, tal como se apresenta nestas espécies corresponde ao próprio conceito de opérculo (*operculum*) de Wodehouse (1935), adotado por Punt *et al.* (2007). Assim, este termo é aconselhado em lugar de opérculo secundário para a caracterização destes tipos de aberturas. Devido à dificuldade de diferenciar, nestes grãos de pólen, as áreas de pontopérculos (3) e do mesocolpo (3), pois sua largura é bastante próxima, o melhor termo

aplicado para estas regiões é mesocolpo (Fig. 17, 21, 24). Outra característica que comprova que esta parte da esporoderme é um opérculo é a estruturação diferenciada da parede nesta região (Figs. 18 e 19, para *P. misera* e *P. suberosa*, respectivamente). *P. misera*, não apresenta endexina na região do opérculo, local da endoabertura, enquanto que além da ausência de endexina, *P. suberosa* também apresenta constituição diferenciada da nexina 1 entre as regiões do opérculo e mesocolpos (Dettke & Santos, dados não publicados).

A partir dos grãos 6-colporados operculados, podem surgir novas formas, mais complexas, e cuja interpretação das partes resultantes torna ainda mais importante o conhecimento sobre a origem e evolução das aberturas nesta família. Esta nova forma é representada neste estudo por *P. capsularis*. Nesta espécie, além da presença dos opérculos, as extremidades de cada abertura se unem, aos pares, com as extremidades da abertura vizinha, tal como acontece nas espécies do subgênero *Passiflora* analisadas neste estudo, delimitando um pseudopérculo. Assim, têm-se como estruturas resultantes três pontopérculos, seis opérculos e três pseudopérculos (Figs. 27-28). No entanto, embora Presting (1965) tenha denominado as regiões de pseudopérculo em *P. capsularis*, o mesmo não se enquadra totalmente no conceito do autor, pois representa somente a união das ectoaberturas, enquanto que a endexina mantém estas regiões fortemente unidas e, funcionalmente, não é um opérculo, como facilmente visualizado nas preparações palinológicas, onde não há o desprendimento desta região.

Da mesma forma, os opérculos de *P. capsularis* não se desprendem após a acetólise, indicando que algo mantém estas estruturas presas no restante da esporoderme. A razão se revela quando visualizada a região interna, próximo das endoaberturas (Fig. 32). Nesta região, são depositadas faixas de endexina que, como resultado, individualiza as endoaberturas, uma de cada lado do opérculo e prendem o opérculo ao restante da sexina. Assim, no grão de pólen de *P. capsularis* há 12 endoaberturas e o opérculo não é mais funcionalmente um opérculo, separando duas ectoaberturas (e conseqüentemente há 12 ectoaberturas), local onde o tubo polínico irá germinar. Uma seção semifina do grão de pólen mostra claramente, para esta espécie, a existência de 12 regiões onde a intina é mais espessa (Fig. 29), demarcando as aberturas, contraponto com somente seis regiões observadas em *P. misera* e *P. suberosa* (Figs. 18-19). Além disso, as regiões correspondentes aos opérculos em *P. capsularis*, não possuem a estrutura da esporoderme diferenciada das demais regiões (Fig. 29).

Com relação ao número e tipo de abertura, há consenso entre as descrições polínicas para *P. capsularis* (Presting 1965; Huynh 1972; Milward-de-Azevedo *et al.* 2002). O mesmo não ocorre com as demais espécies. *P. misera*, *P. morifolia* e *P. suberosa* são descritas por

Presting (1965) e *P. suberosa* por Huynh (1972) como possuindo grãos de pólen 6-colporados, com opérculos, concordando com os resultados apresentados para as espécies analisadas neste estudo. Araújo & Santos (2004) descrevem o pólen de *P. misera* e *P. suberosa*, em microscopia óptica de campo claro, como 6-colpados. A presença de endoaberturas foi confirmada, neste estudo, para estas espécies, embora sejam de difícil visualização em *P. suberosa*. Em *P. misera*, são bastante evidentes em técnicas simples de microscopia óptica. Barrios *et al.* (2005) descrevem os grãos de pólen do subgênero *Decaloba* como 6 ou 12-colporados, não discriminando as espécies, e concordando, quanto ao tipo de abertura, com este estudo.

Amela García *et al.* (2002) descrevem o pólen de *P. misera* e *P. suberosa* como 12-colpados e Milward-de-Azevedo *et al.* (2004) referem-se à grãos de pólen 12-colporados para *P. misera* e *P. morifolia*, 12-colpados para *P. suberosa* e 6-colporados, sem opérculos, para *P. truncata*. Quanto à presença de endoabertura, possivelmente as técnicas utilizadas pelos autores não permitiram a visualização destas estruturas nos pólenes descritos como colpados. *P. truncata* apresentou neste estudo a presença de opérculos, ainda que estreitos, ao contrário do descrito por Milward-de-Azevedo *et al.* (2002).

Com relação ao número de aberturas, a discordância é ainda maior e gerada por um grave equívoco na interpretação da teoria de Presting (1965), além de um conflito com a própria definição de abertura utilizado por Punt *et al.* (2007). Amela García *et al.* (2002) e Milward-de-Azevedo *et al.* (2004) interpretam cada uma das laterais dos opérculos como uma abertura, que estariam fusionadas nas extremidades, de modo que estes grãos de pólen possuiriam 12 aberturas. Milward-de-Azevedo *et al.* (2004), inclusive, utiliza o termo pseudopéculo para a região entre as aberturas (correspondente ao opérculo). Como ressaltado neste estudo e por Presting (1965), a presença de 12 aberturas nos grãos de pólen de *Passiflora* somente ocorre quando há deposição de endexina na superfície interna do opérculo, de modo que esta estrutura se fusione ao restante da exina e não mais se desprenda durante o crescimento do tubo polínico. Entre as 106 espécies de *Passiflora* analisadas por Presting (1965) (aproximadamente 20% das espécies do gênero), somente quatro espécies são caracterizadas como 12-colporadas: *P. capsularis*, *P. hahnii* (E. Fourn.) Mast., *P. pohlii* Mast. e a maioria dos grãos de *P. biflora* Lam., indicando que a presença de 12 aberturas é uma característica rara para o gênero.

Também a utilização do termo pseudopéculo por Milward-de-Azevedo *et al.* (2004) é equivocada e posto à prova somente pela análise superficial da teoria sobre a origem das aberturas de Presting (1965) e salientada por Spirlet (1965), onde os autores afirmam que a

fusão das ectoaberturas ocorre somente entre as extremidades da abertura de um par com a extremidade de uma abertura do par vizinho. Isto não ocorreria se levado em consideração a interpretação de Amela García *et al.* (2002) e Milward-de-Azevedo *et al.* (2004), onde as “aberturas” que estariam fusionadas na região do apocolpo são do mesmo par.

Esta variação de opiniões, entre 6 e 12 aberturas nos grãos de pólen destas espécies, certamente não está relacionada com algum tipo de variabilidade intraespecífica, especialmente em relação à *P. suberosa*, visto todas as condições para a formação de um grão de pólen com 12 aberturas. Além disso, a análise das ilustrações apresentadas pelos autores (Amela García *et al.* 2002; Araújo & Santos 2004; Milward-de-Azevedo *et al.* 2004) mostra tratar-se de grãos de pólen morfológicamente bastante semelhantes, variando somente a interpretação dos autores.

Este estudo torna evidente a importância da utilização de várias técnicas de microscopia para a análise dos tipos de aberturas, especialmente neste gênero tão diverso do ponto de vista palinológico como *Passiflora*. A uniformização dos termos por parte dos autores torna-se essencial para que os dados gerados nos estudos palinológicos possam ser utilizados em estudos taxonômicos e filogenéticos. A interpretação equivocada de estruturas, como o número e tipos de aberturas podem comprometer a confecção de chaves polínicas, como a apresentada por Milward-de-Azevedo *et al.* (2007), onde estas características são utilizadas para a entrada na chave.

Quanto à utilização dos termos propostos para a família, os termos pontopérculo e opérculo já são utilizados na literatura e definidos nos glossários. O termo pseudopérculo é bastante prático e representa uma característica de sincolpismo facilmente reconhecida no gênero, especialmente para o subgênero *Passiflora*. No entanto, sua utilização para as espécies de *Decaloba*, que também apresentam fusão das aberturas na região do apocolpo (como *P. capsularis*), pode gerar confusões. Nestes grãos, embora sejam facilmente visíveis e possíveis de serem denominadas as regiões de pontopérculos, opérculos e pseudopérculos, pela direção das fusões e tamanho dos fragmentos delimitados, sugere-se a utilização genérica de mesocolpo para as descrições polínicas, já que nenhuma destas regiões se desprende nas preparações e são difíceis de ser delimitadas em microscopia óptica de campo claro.

Conforme a nova classificação infragenérica de *Passiflora* (Feuillet & MacDougal 2003), este estudo apóia a existência de duas linhas principais de desenvolvimento das aberturas em *Passiflora*, correspondente aos subgêneros *Passiflora*, com tendência à fusão dos colpos aos pares, delimitando pseudopérculos circulares e distribuídos uniformemente ao longo do grão, e o subgênero *Decaloba*, com o desenvolvimento de opérculos sobre os

colporos e também com tendências de fusões de aberturas em poucas espécies. O subgênero *Astrophea* possui aberturas mais próximas, morfologicamente, às descritas para o subgênero *Passiflora*, indicando a proximidade filogenética destes dois subgêneros, como indicada por Muschner (2005) e Hansen *et al.* (2006).

Glossário

Abertura (Erdtman 1952; Thanikaimoni 1986; Punt *et al.* 2007) – Uma região especializada da esporoderme, mais fina e que geralmente difere do restante pela estrutura ou ornamentação; representa o local de saída do tubo polínico durante a germinação; é onde a intina apresenta-se, geralmente, mais espessa. As **ectoaberturas** representam o adelgaçamento da sexina/ectexina e as **endoaberturas** representam o adelgaçamento da nexina/endexina.

Apocolpo (Erdtman 1952; Punt *et al.* 2007) – Representa a região polar dos grãos de pólen zonocolpados, delimitado pelas linhas que conectam o ápice das aberturas.

Mesocolpo (Erdtman 1952; Punt *et al.* 2007) – Representa a região superficial do grão de pólen, delimitada pelas linhas entre os ápices de ectoaberturas adjacentes.

Opérculo (Wodehouse 1935; Thanikaimoni 1986; Punt *et al.* 2007) – Uma região distinta de sexina/ectexina, que cobre parte da abertura e que está completamente isolada do restante da sexina. Sinônimos em Passifloraceae: *opérculo secundário* – Presting (1965).

Pontopérculo (Erdtman 1952; Spirlet 1965; Thanikaimoni 1986; Punt *et al.* 2007) – Um tipo de opérculo não completamente isolado do restante da sexina, mas ligado a ela pelas extremidades das aberturas. Sinônimos em Passifloraceae: *opérculo primário* – Presting (1965).

Pseudopérculo (Presting 1965) – Região do mesocolpo delimitada pela fusão, aos pares, das extremidades das aberturas; funciona como um opérculo durante o crescimento do tubo polínico e facilmente se desprende do restante da exina nas preparações palinológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Renan Theodor Dettke, pela confecção dos desenhos esquemáticos dos grãos de pólen; e a bióloga Érica Duarte pela revisão do abstract. Este trabalho foi executado no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS e no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

Referências Bibliográficas

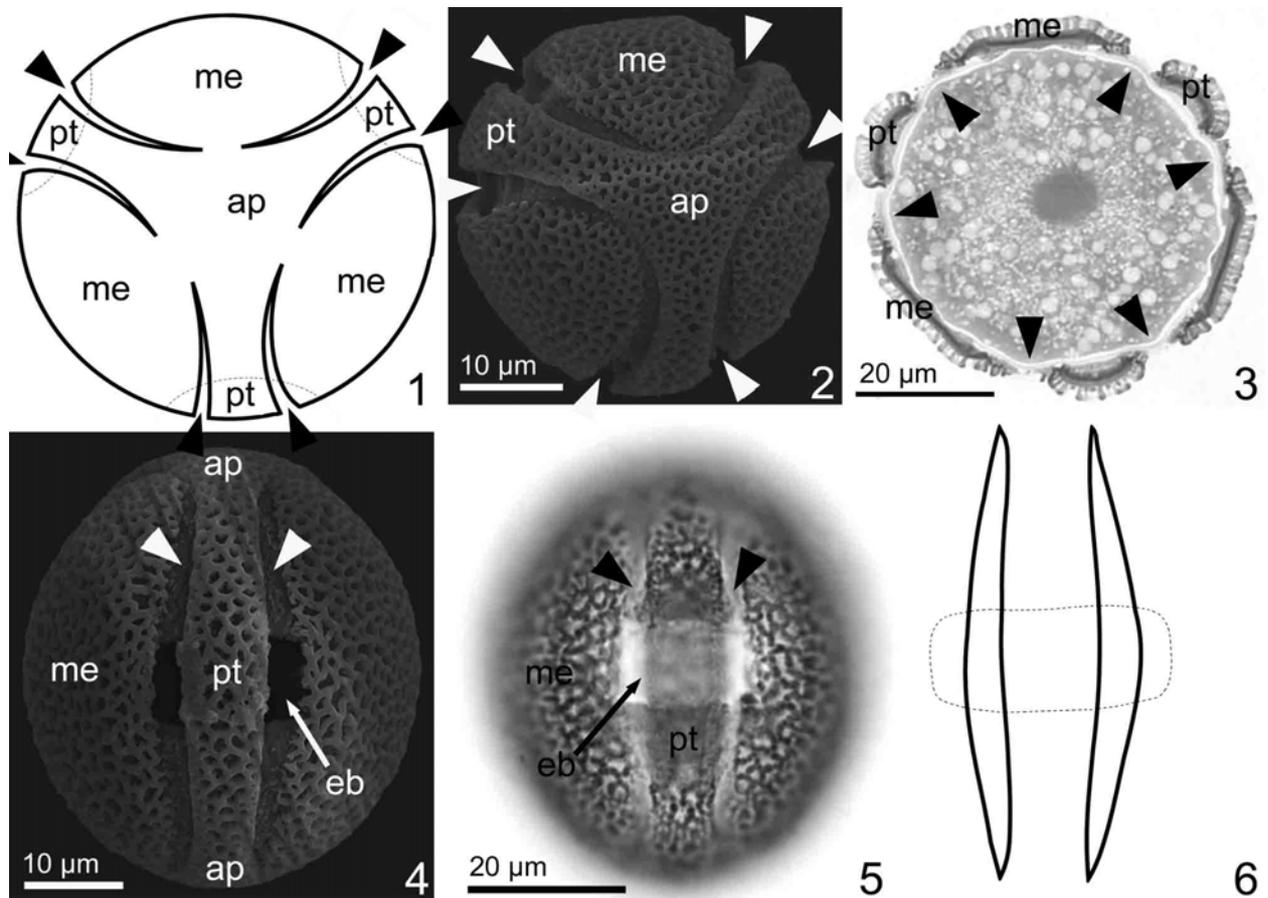
- Amela García, M.T.; Galati, B.G. & Anton, A.M. 2002. Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 139: 383-394.
- Araújo, R.C.M. & Santos, F.A. 2004. Palinologia de espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Stientibus, série Ciências Biológicas** 4(1/2): 37-42.
- Barrios, L.; Caetano, C.M.; Cardoso, C.I.; D'Eeckenbrugge, G.C.; Arroyave, J.A. & Olaya, C.A. 2005. Caracterización del pollen de especies de los géneros *Passiflora* e *Dilkea*. **Acta Agronômica** 54(3): 19-23.
- Cervi, A.C. 2006. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem** 16: 1-5.
- Claugher, D. 1986. Pollen wall structure, a new interpretation. **Scanning Electron Microscopy** 1 :291-299.
- Erdtman, G. 1952. **Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms**. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift** 39: 561-564.
- Escobar, L.K. 1989. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 76: 877-885.
- Faegri, K. & Iversen, J. 1964. **Textbook of pollen analysis**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Feuillet, C. & Macdougall, J.M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** 13: 34-35, 37-38.
- Feuillet, C. & Macdougall, J.M. 2007. Passifloraceae. Pp. 270-281. K. Kubitzki (Ed.) **The families and genera of vascular plants**. Vol. 9. Springer Berlin Heidelberg.
- Gerrits, P.O. & Smid, L. 1983. A new, less polymerization system for the embedding of soft tissues in glicol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132: 81-85.
- Hansen, A.K.; Gilbert, L.E.; Simpson, B.B.; Downie, S.R.; Cervi, A.C. & Jansen, R.K. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31(1): 138-150.
- Huynh, K.L. 1972. Étude de l'arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de dones cytologiques – IV Le genre *Passiflora*. **Pollen et Spores** 14: 51-60.

- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry - principles and practice**. San Francisco, W.H.Freeman and Company.
- Killip, E. 1938. The American species of Passifloraceae. **Field Museum of Natural History, Botanical Series** 19: 1-613.
- Milward-De-Azevedo, M.A.; Gonçalves-Esteves, V. & Baumgratz, J.F. 2004. Palinotaxonomia das espécies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 27(4): 655-665.
- Muschner, V.C. 2005. **Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Muschner, V.C.; Lorenz, A.P.; Cervi, A.C.; Bonatto, S.L.; Souza-Chies, T.T.; Salzano, F.M. & Freitas, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90(8): 1229-1238.
- O'Brien, T.P. & McCully, M.E.. 1981. **The study of plant structure - principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty.
- Presting, D. 1965. Zur morphologie der Pollenkörner der Passifloraceen. **Pollen et Spores** 7: 193-247.
- Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S. & Le Thomas, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of paleobotany and Palynology** 143: 1-81.
- Roland, J.C. & Vian, B. 1991. General preparation and staining of thin sections. Pp.1-66. *In*: J.L HALL & C. HAWES (Eds.) **Electron Microscopy of Plant Cells**. London, Academic Press.
- Souza-Chies, T.T.; Yockteng, R. & Nadot, S. 2005. Systématique moléculaire comparée en France et au Brésil du genre *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Cahiers Agricultures** 14(2): 209-215.
- Spirlet, M.L. 1965. Utilisation taxonomique des grains de pollen de Passifloracées. **Pollen et Spores** 7: 249-301.
- Thanikaimoni, G. 1986. Pollen apertures: form and function. Pp. 119-136. *In*: S. Blackmore & I.K. Ferguson (Eds.) **Pollen and Spores: form and function**. London: Academic Press.
- Wodehouse, R.P., 1935. **Pollen Grains. Their structure, identification and significance in science and medicine**. McGraw-Hill, New York.

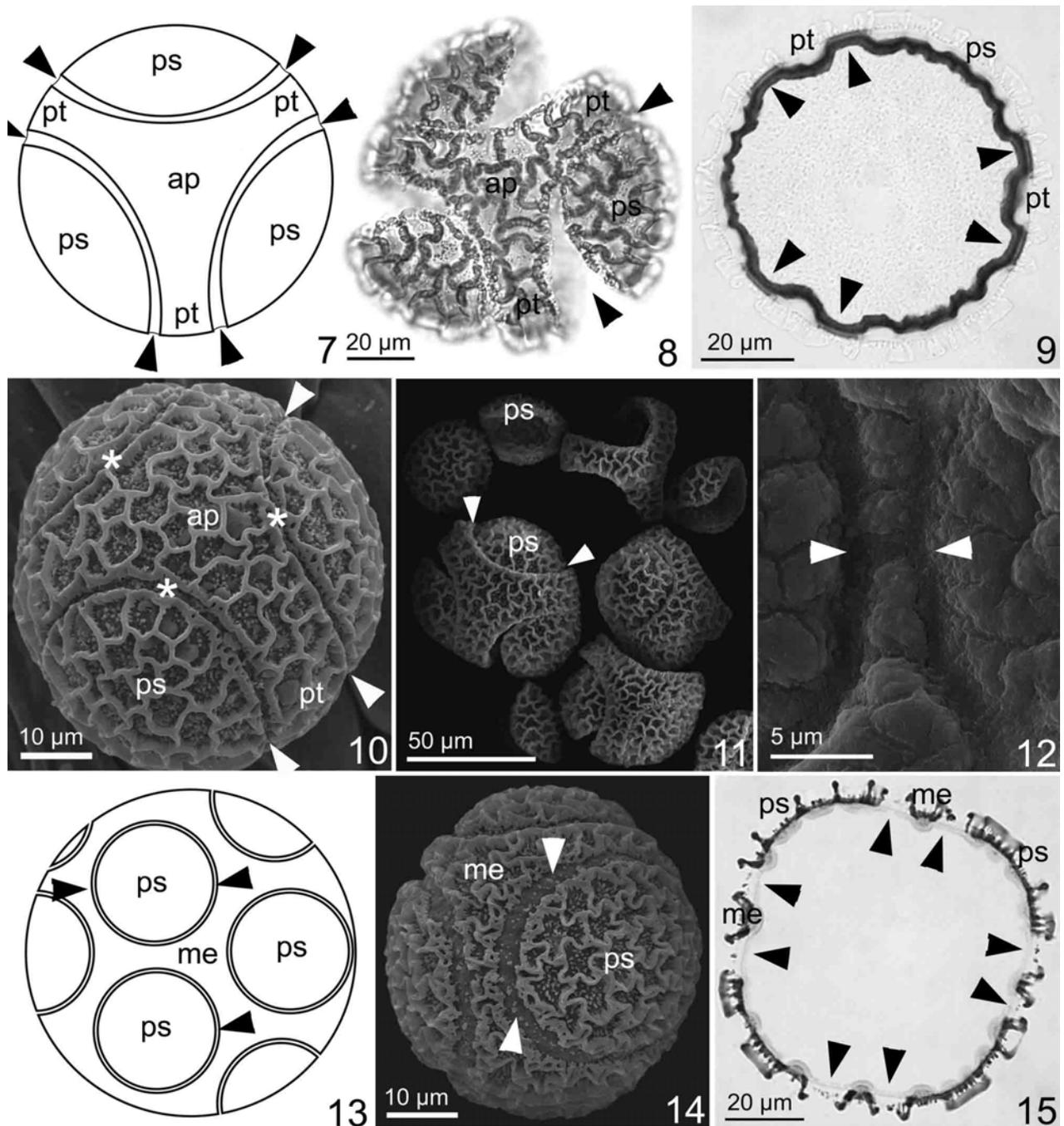
Yockteng, R. & Nadot, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*ncpGS*). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31: 379-396.

Tabela 1. Súpula dos tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L., segundo diversos autores, comparados aos resultados obtidos neste trabalho (última coluna). Número de aberturas – tipo da abertura – (número de endoaberturas). * com opérculos sobre as aberturas.

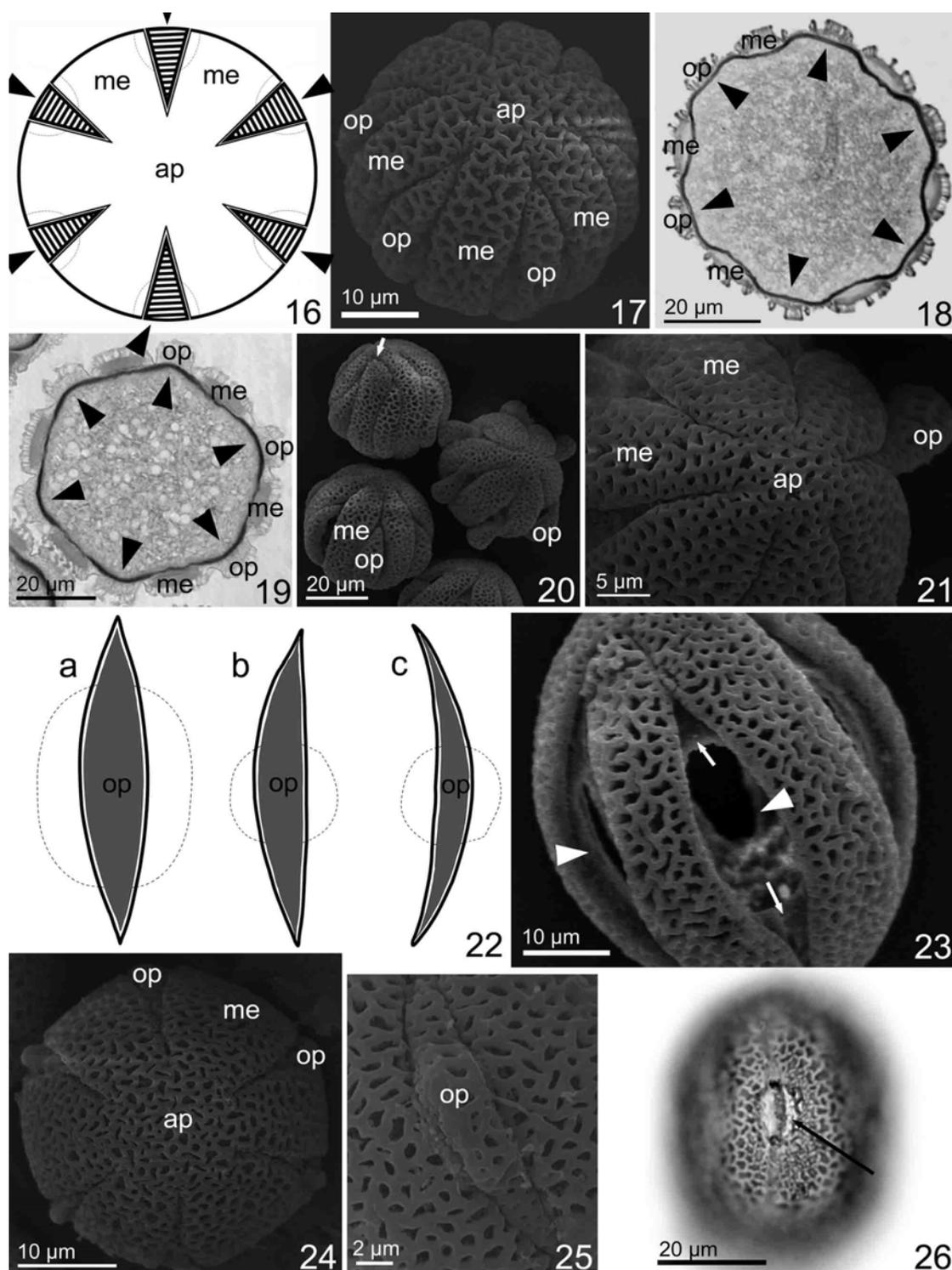
Espécies estudadas	Presting (1965)	Spirlet (1965)	Huynh (1972)	Amela Garcia <i>et al.</i> (2002)	Araújo & Santos (2004)	Milward-de-Azevedo <i>et al.</i> (2004)	Este estudo
Subgênero Astrophea							
<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	-	-			-	-	6 – colporo (3)
Subgênero Passiflora							
<i>P. actinia</i> Hook.	12 - colpo	-			-	-	10-12 - colpo
<i>P. alata</i> Curtis	6 (4)- colpo	-			6 - colpo	-	6 - colpo
<i>P. amethystina</i> Mik.	6 – colporoide (6)	6 - colpo			-	-	6 - colpo
<i>P. caerulea</i> L.	6 – colporoide (6)	6 - colpo	6 - colpo	6 - colpo	-	-	6 - colpo
<i>P. edulis</i> Sims	6 (8-10) – colporoide (6-10)	6 - colpo			-	-	6 - colpo
<i>P. elegans</i> Mast.	-	-			-	-	8-10 - colpo
<i>P. tenuifila</i> Kill.	6-8 - colpo	-			-	-	8-10 (6) - colpo
Subgênero Decaloba							
<i>P. capsularis</i> L.	12 – colporo (12)	-	12 - colporo		-	12 - colporo	12 – colporo (12)
<i>P. misera</i> H.B.K.	6 - colporo* (6)	-		12 - colpo	6 - colporo*	12 - colporo	6 - colporo* (6)
<i>P. morifolia</i> Mast.	6 - colporo* (6)	-			-	12 - colporo	6 - colporo* (6)
<i>P. suberosa</i> L.	6 - colporo* (6)	-	6 – colporo*	12 - colpo	6 - colporo*	12 - colpo	6 - colporo* (6)
<i>P. truncata</i> Regel	-	-			-	6 - colporo	6 - colporo* (6)



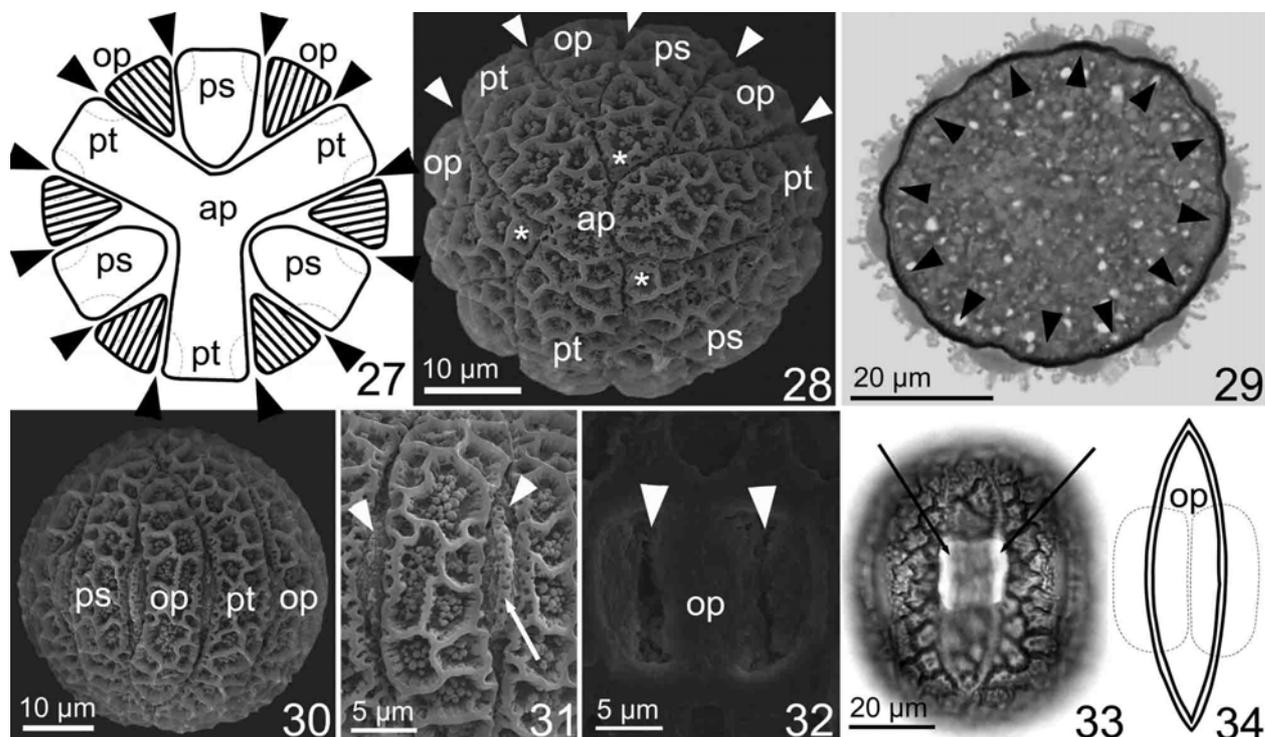
Figuras 1-6. Estrutura das aberturas dos grãos de pólen de *Passiflora L.* - subgênero *Astrophea* (*P. haematostigma*). 1. Esquema do grão de pólen em vista polar. 2. Grão de pólen acetolizado em vista polar, sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). 3. Seção semifina do grão de pólen, no nível da região equatorial (microscopia óptica de campo claro). 4. Grão de pólen acetolizado, em vista equatorial (MEV). 5. Grão de pólen acetolizado, em vista equatorial (microscopia óptica de campo claro), destacando a endoabertura. 6. Esquema de um par de aberturas e a endoabertura. Abreviaturas: ap, apocolpo; eb, endoabertura; me, mesocolpo; pt, pontopérculo. Pontas de setas, aberturas. Linhas pontilhadas, endoaberturas.



Figuras 7-15. Estrutura das aberturas dos grãos de pólen de *Passiflora* L. - subgênero *Passiflora*. 7. Esquema de um grão de pólen 6-colpado, em vista polar. 8. Grão de pólen acetolizado de *P. alata*, em vista polar (microscopia óptica de campo claro). 9. Seção semifina do grão de pólen, no nível da zona equatorial, de *P. amethystina*, 6-colpado, com coloração da intina (microscopia óptica de campo claro). 10. Grão de pólen de *P. caerulea*, em vista equatorial inclinada (microscopia eletrônica de varredura (MEV)). 11. Grãos de pólen acetolizados de *P. amethystina*, mostrando o desprendimento dos pseudopérculos (MEV). 12. Detalhe da superfície interna das aberturas do grão de pólen acetolizado e fraturado de *P. tenuifila*, mostrando a ausência de endoaberturas (MEV). 13. Esquema de um grão de pólen com mais de 6 colpos. 14. Grão de pólen de *P. tenuifila*, 8-colpado (MEV). 15. Seção do grão de pólen acetolizado de *P. actinia*, mostrando 8 aberturas (microscopia óptica de campo claro). Abreviaturas: ap, apocolpo; me, mesocolpo; ps, pseudopérculo; pt, pontopérculo. Pontas de setas, aberturas; *, fusão das aberturas no apocolpo.



Figuras 16-26. Estrutura das aberturas dos grãos de pólen de *Passiflora* L. - subgênero *Decaloba*. 16. Esquema de um grão de pólen 6-colporado operculado, em vista polar (opérculos hachurados). 17. Grão de pólen de *P. misera* em vista polar inclinada (microscopia eletrônica de varredura - MEV). 18-19. Seção semifina do grão de pólen, no nível da zona equatorial, de *P. misera* (18) e *P. suberosa* (19), mostrando a posição dos opérculos e aberturas (microscopia óptica de campo claro). 20. Grãos de pólen acetolizados de *P. suberosa*, mostrando opérculos parcialmente desprendidos e fusão parcial no apocolpo (seta) (MEV). 21. Grãos de pólen acetolizados de *P. suberosa*, mostrando o apocolpo em detalhe (MEV). 22. Esquema das endoaberturas do grão de pólen de *P. suberosa* (a), *P. misera* e *P. morifolia* (b) e *P. truncata* (c). 23. Grão de pólen de *P. suberosa* sem os opérculos, mostrando a endoabertura (setas) (MEV). 24. Grão de pólen de *P. truncata*, em vista polar (MEV). 25. Detalhe do opérculo do grão de pólen de *P. truncata* (MEV). 26. Grão de pólen acetolizado de *P. truncata*, mostrando endoabertura (seta) (microscopia óptica de campo claro). Abreviaturas: ap, apocolpo; me, mesocolpo; op, opérculo. Pontas de setas, aberturas. Linhas pontilhadas, endoaberturas.



Figuras 27-34. Estrutura das aberturas dos grãos de pólen de *Passiflora L.* - subgênero *Decaloba* (*P. capsularis*). 27. Esquema de um grão de pólen 12-colporado, em vista polar (opérculos hachurados). 28. Grão de pólen, em vista polar (microscopia eletrônica de varredura-MEV). 29. Seção semifina do grão de pólen, com 12 indicadas (setas), no nível da zona equatorial (microscopia óptica de campo claro). 30. Grão de pólen em vista equatorial (MEV). 31. Detalhe do mesocolpo, mostrando uma estreita faixa de exina sobre uma das aberturas (seta) (MEV). 32. Detalhe da superfície interna, na região da endoabertura, de um grão de pólen acetolizado e fraturado (MEV). 33. Grão de pólen acetolizado, mostrando as endoaberturas (setas) (microscopia óptica de campo claro). 34. Esquema de uma abertura e endoaberturas. Abreviaturas: ap, apocolpo; op, opérculo; ps, pseudopérculo; pt, pontopérculo. Pontas de setas, aberturas. *, fusão das aberturas no apocolpo. Linhas pontilhadas, endoaberturas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo pretendeu ampliar o conhecimento acerca da morfologia da antera e grãos de pólen do gênero *Passiflora*. Verifica-se que neste gênero há grande variabilidade de características e várias com potencial de aplicação nas análises filogenéticas do grupo. No entanto, devido à pequena quantidade de estudos dedicados às Passifloraceae, não há informações de como estas características se apresentam nos demais gêneros da família, sendo imprescindível a análise de um número maior de táxons para o completo entendimento da evolução destes caracteres no grupo.

De modo geral, as características apresentadas confirmam as recentes propostas de redução do número de subgêneros, com fortes caracteres morfológicos na antera que sustentam os três principais subgêneros (*Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*). Quanto à relação entre estes subgêneros, algumas características aproximam *Astrophea* de *Passiflora* (especialmente características da antera e morfologia das aberturas), enquanto outras aproximam *Astrophea* de *Decaloba* (especialmente características da esporoderme). *Passiflora* e *Decaloba* representam grupos bastante distintos entre si quanto aos caracteres encontrados, confirmando vários estudos em outras áreas de pesquisa, que demonstram tratar-se de dois grupos com evolução bastante diferenciada, onde diferentes fatores atuaram como seletivos.

Dentre as características descritas neste estudo, algumas geram uma série de questionamentos e merecem a atenção em abordagens futuras:

- Presença de compostos fenólicos na epiderme de *P. edulis*: seria esta característica exclusiva desta espécie? Teria relação com o seu amplo cultivo? Qual sua função?

- Células estomiais: teriam elas relação direta com a deiscência como relatado na literatura? Que mecanismos provocariam as forças auxiliares na abertura? A desidratação destas células? A mobilização de substâncias de reservas, como o amido?

- Endotécio: os tipos de espessamentos encontrados têm relação com o tamanho da antera? O mecanismo de deiscência é diferenciado nestas espécies? Ou o fator genético é determinante?

- Vascularização: os padrões encontrados se mantêm quando analisadas um número maior de espécies? Qual é o estado de carácter plesiomórfico? Representa

uma apomorfia em *Decaloba*? Tem relação com o tamanho da antera e necessidades de suprimento vascular?

- Esporoderme: a diversidade estrutural da esporoderme nas espécies do subgênero *Passiflora* tem relação com aspectos fisiológicos? A aparente seleção de uma estrutura menos compacta e mista da nexina 1 reflete em uma maior e mais rápida captação de água para o início do crescimento do tubo polínico? Possibilita uma maior elasticidade da esporoderme às mudanças de volume dos grãos de pólen destas espécies?

- Proteínas da nexina 1: qual sua origem? Esporofítica, como a maior parte dos trabalhos indica? Ou gametofítica? Quais suas relações nos sistemas de reconhecimento dos grãos de pólen pela superfície estigmática?

- Aberturas: qual a importância do sincolpismo em *Passiflora*? Estaria relacionado com a formação de maiores áreas para a saída do tubo polínico? Que fatores durante o desenvolvimento determinam a variabilidade no número de aberturas observado em algumas espécies? Evolutivamente, que tipos de pressões seletivas podem ter determinado o aumento do número de aberturas neste gênero? As duas tendências principais quanto ao tipo de abertura (formação de pseudopérculos e desaparecimento de endoaberturas; e formação de opérculos e multiplicação de endoaberturas) representam diferentes estratégias para maximizar a germinação do pólen? Qual a relação destas tendências com a estrutura da esporoderme?

Por fim, alguns aspectos morfológicos descritos para as anteras e grãos de pólen de *Passiflora* são inéditos na literatura do grupo, dentre eles:

- Diferenças nos padrões de ornamentação da cutícula de acordo com a região da antera;

- Células estomiais com mais de um estrato celular;

- Presença de idioblastos com ráfides na epiderme da antera;

- Existência de dois diferentes padrões de espessamento de endotécio;

- Três diferentes tipos de arranjos na vascularização da antera;

- Diferenças na estrutura da esporoderme entre mesocolpo e opérculo nas espécies com pólen operculado;

- Variação na estrutura da esporoderme, com a distinção de três tipos entre as espécies estudadas.