



ARTIGO

Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil¹

Greta Aline Dettke^{2*} e Rinaldo Pires dos Santos³

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1663> (com documento suplementar)

RESUMO: (Morfologia externa, anatomia e histoquímica da antera e grãos de pólen de Passifloraceae do Rio Grande do Sul, Brasil). Este estudo tem por objetivo ampliar o conhecimento acerca da morfologia externa e interna da antera e 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, contribuindo com características morfológicas para as análises taxonômicas e sistemáticas do grupo. As espécies de *Passiflora* possuem anteras tetrasporangidas de deiscência rimosa, com distintos tamanhos e padrões de vascularização. Apresentam epiderme persistente, cutícula lisa à estriada, células estomiais curtas a alongadas, endotécio com espessamentos distintos e lignificados, camadas médias colapsadas, membrana tapetal evidente e orbículos pequenos. Os grãos de pólen apresentam substâncias lipofílicas sobre a esporoderme, grãos de amido e citoplasma PAS-positivo. A intina é triestratificada (estrato péctico, péctico-protéico e péctico-celulósico) e a exina é diferenciada em ectexina e endexina. Três padrões estruturais da esporoderme foram encontrados: tipo 1, esporoderme com intina espessa, ectexina internamente verrucada, ausência de camada basal compacta, nexina 1 mista com columelas imersas (subgênero *Passiflora*); tipo 2, esporoderme com intina fina, endexina internamente lisa, camada basal compacta de ectexina (subgêneros *Astrophea* e *Decaloba*); tipo 3: esporoderme com intina fina, endexina internamente lisa, ausência de camada basal, nexina 1 mista e granulosa (*P. suberosa* - *Decaloba*). Algumas características encontradas neste estudo merecem atenção pelo seu potencial filogenético, como o tamanho e vascularização das anteras, presença de células estomiais alongadas, tipos de espessamentos do endotécio, características do retículo na exina (amplitude e presença de báculas) e estrutura da esporoderme.

Palavras-chave: *Passiflora*, vascularização, esporoderme, exina, filogenia.

ABSTRACT: (Morphology, anatomy and histochemistry of anther and pollen grain of Passifloraceae in the Rio Grande do Sul State, Brazil). This study aims to expand the knowledge about the external and internal morphology of the anther and pollen grain of thirteen species of *Passiflora* L. (subgenera *Astrophea*, *Decaloba* and *Passiflora*) occurring in Rio Grande do Sul and Santa Catarina, under light and scanning electron microscopy, contributing with morphological characteristics to the taxonomic and systematic analysis of the group. The species of *Passiflora* have tetrasporangiated anthers with a longitudinal dehiscence, showing different sizes and vascularization patterns. The anthers exhibit persistent epidermis, with a smooth to striated cuticle, elongated to short stomial cells, lignified endothecium with different thicknesses, collapsed middle layers, conspicuous tapetal membrane and small orbicules. The pollen grains present lipophilic substances on the sporoderm, starch grains and PAS-positive vegetative cell. The intine is tri-stratified (pectic, pectic-protein and pectocellulosic layers). The exine is differentiated in ectexine and endexine. Three structural patterns of the sporoderm were found: type 1, with thick intine, warty ectexine internally, absence of compact basal layer, mixed nexin 1 with immersed columella (subgenus *Passiflora*); type 2, with thin intine, internally smooth endexine, compact basal layer of ectexine (subgenres *Astrophea* and *Decaloba*); type 3, with thin intine, internally smooth endexine, no basal layer, mixed and granular nexin 1 (*P. suberosa* - *Decaloba*). Some features found in this study deserve attention for their phylogenetic potential, as the size and vascular patterns of the anthers, the presence of elongated stomial cells, endothecium thickening types, patterns of the exine reticulum (amplitude and presence of bacilli) and sporoderm structure.

Key words: *Passiflora*, vascularization, sporoderm, exine, phylogeny.

INTRODUÇÃO

A antera representa a parte superior dos estames que compõem o androceu das plantas com flores e compreende a reunião de diversos microsporângios, os quais formam e protegem o tecido esporogênico. O tecido esporogênico dá origem aos micrósporos da geração esporofítica das angiospermas os quais, posteriormente, originam (após mitose) a geração gametofítica. Esta é representada, no interior da antera, pelos grãos de pólen ou gametófitos masculinos imaturos (Coccuci & Mariath 1995). A morfologia (externa e interna) da antera é extre-

mamente variável 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 sua ausência revelam os mecanismos de deiscência da antera (Keijzer 1987) bem como a evolução das espécies em vários níveis taxonômicos (Manning 1996), como assinalado para as famílias Aceraceae (Jacobs & Lersten 1994), Araceae (French 1985, 1986), Asteraceae (Dormer 1962), Begoniaceae (Tebbutt & Maciver 1999), Iridaceae (Manning & Goldblatt 1990),

1. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

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, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

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

*Autor para contato. E-mail: gretadet@yahoo.com.br

Loranthaceae (Venturelli 1983, Bhatnagar & Garg 1984), Orchidaceae (Freudenstein 1991), Solanaceae (García 2002) e várias espécies de monocotiledôneas (Gerenday & French 1988). Além da própria antera, outro importante elemento é o grão de pólen, cuja importância na taxonomia das angiospermas tem sido reconhecida em trabalhos clássicos como os de Wodehouse (1935), Erdtman (1952) e Walker & Doyle (1975) e, a partir de então, aplicada em inúmeros grupos de plantas.

Poucos trabalhos tratam da anatomia de órgãos reprodutivos de espécies de Passifloraceae, destacando-se os que abordam a origem dos verticilos, da corona e de estrutura dos tecidos secretores (Bernhard 1999, Krosnick & Freudenstein 2005, Krosnick *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, Dettke & Santos 2009) 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 *Astropheia* (DC.) Mast.: *Passiflora haematostigma* Mart. ex Mast. (ICN152173, ICN152122); 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); 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), *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 sua 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 (Tecnovit® 7100, Kulzer) (Gerrits & Smid 1983).

Seções semifinas, de 0,5 a 2 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo de rotação, equipado com navalhas descartáveis de vidro, de 6 ou 8 mm de largura. 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 o verniz vitral incolor 500® (Acrilex) 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) 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 incubados 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 glicerínada, para análise em microscopia de luz polarizada, ou montados em suportes de alumínio, para análise 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 epifluorescência.

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 glicerínada. 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. Uma gota da solução foi transferida para a superfície de 1 cm² de filme fotográfico preto e branco previamente exposto à luz e revelado, sobre o lado da emulsão (Claugher 1986), e colado sobre suportes de alumínio. O filme foi seco em estufa aquecida a 60°C. Para a obtenção de grãos de pólen fraturados, os grãos de pólen secos e aderidos sobre o filme fotográfico foram recobertos com fita adesiva, sendo esta rapidamente removida, em um único movimento.

Todo o material destinado à observação em 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 po-

sicionadas paralelamente em relação ao ovário, estando os microsporângios 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 voltados para a corona e perpendiculares ao ovário, num 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), e que 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-mediano-fixas, versáteis, tetrasporangia-das, deiscentes mediante duas fendas longitudinais. Na região terminal do filete, observa-se uma pequena porção de menor diâmetro, 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 anteras apresentam, quando deiscentes, comprimentos 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 que possui 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 das espécies estudadas apresentaram, 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 identificados nas seções transversais (Figs. 4A-F, 5A-G). No subgênero *Astrophea* e *Passiflora*, a proporção do conectivo é bem maior em relação às espécies de *Decaloba*, fato que se deve ao maior tamanho da antera nestas espécies.

A epiderme apresenta-se coberta por uma cutícula

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

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

**Figura 1.** A-L. Sequência temporal da abertura da flor de *Passiflora caerulea* L. e movimentação dos verticilos florais: anteras inicialmente intrinsas (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.

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 na ornamentação da cutícula entre as espécies analisadas.

A epiderme possui células com paredes anticlinais retas

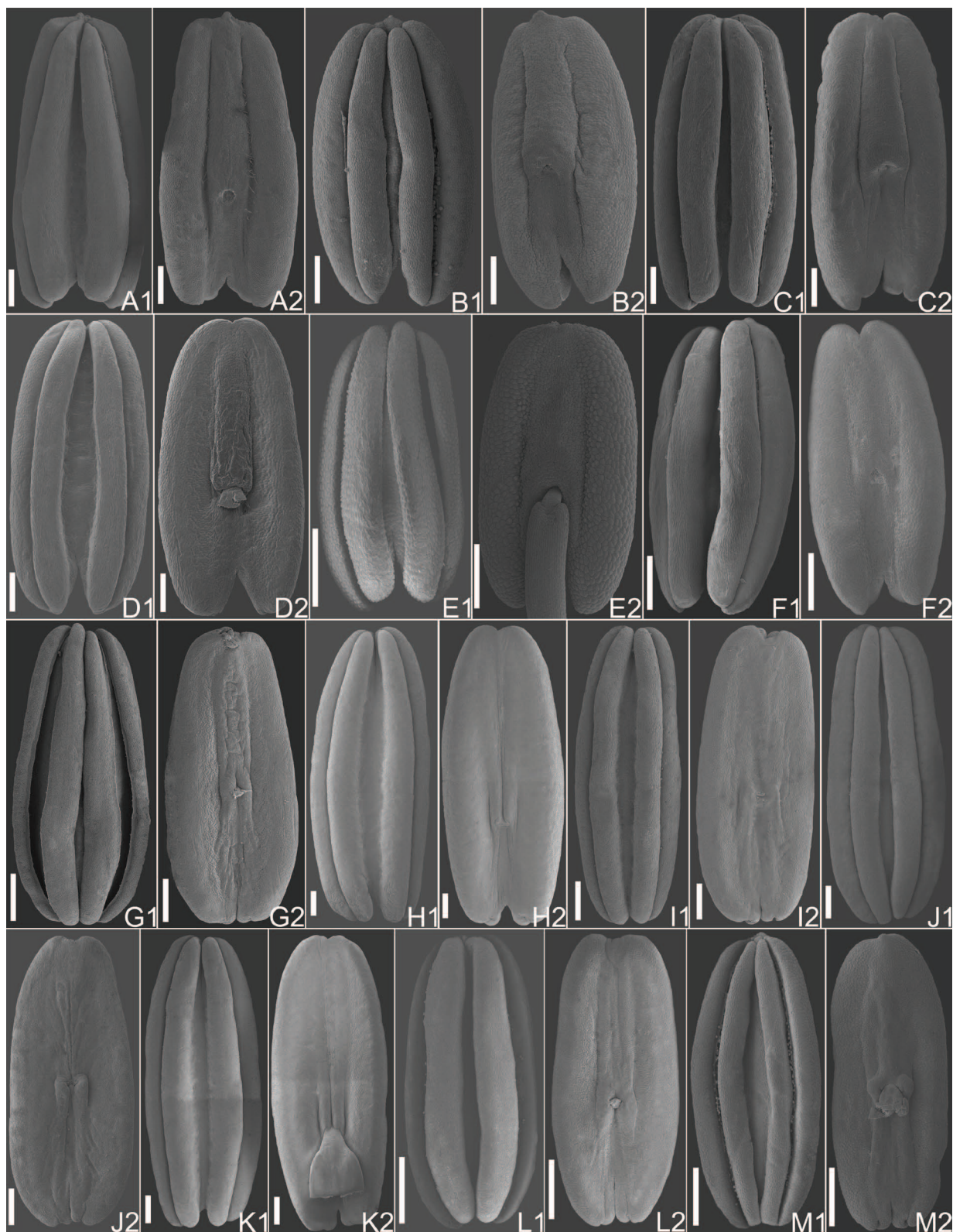


Figura 2. Morfologia externa de anteras de *Passiflora* L., em vistas ventral (1) e dorsal (2), sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). A1-2. *P. haematostigma*, B1-2. *P. capsularis*, C1-2. *P. misera*, D1-2. *P. morifolia*, E1-2. *P. suberosa*, F1-2. *P. truncata*, G1-2. *P. actinia*, H1-2.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

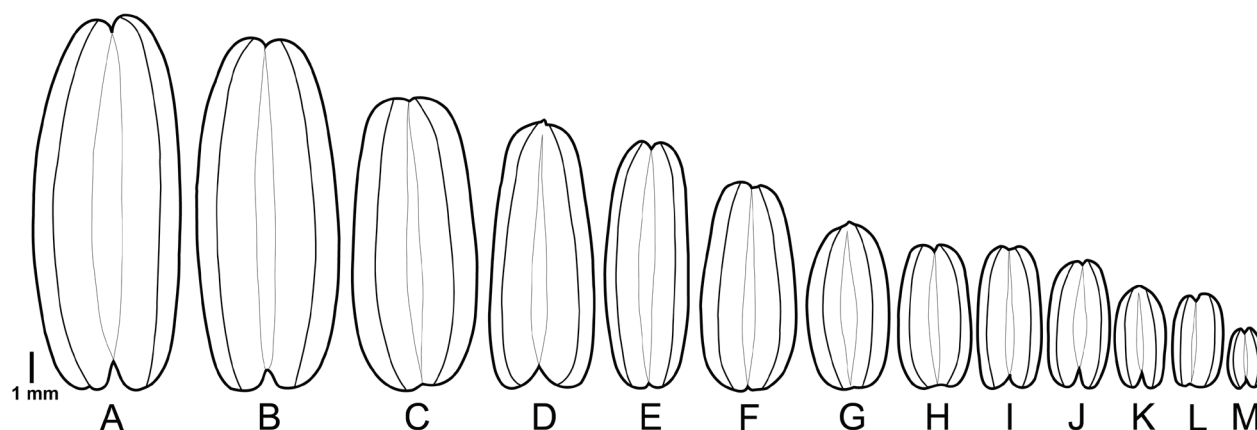


Figura 3. A-M. Relação de tamanho entre as anteras de espécies de *Passiflora* L. A. *P. edulis*, B. *P. alata*, C. *P. caerulea*, D. *P. haematostigma*, E. *P. amethystina*, F. *P. actinia*, G. *P. tenuifila*, H. *P. elegans*, I. *P. misera*, J. *P. morifolia*, K. *P. capsularis*, L. *P. truncata*,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

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 nas 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 células epidérmicas são alongadas anticlinalmente (células estomiais), com um a três estratos celulares,

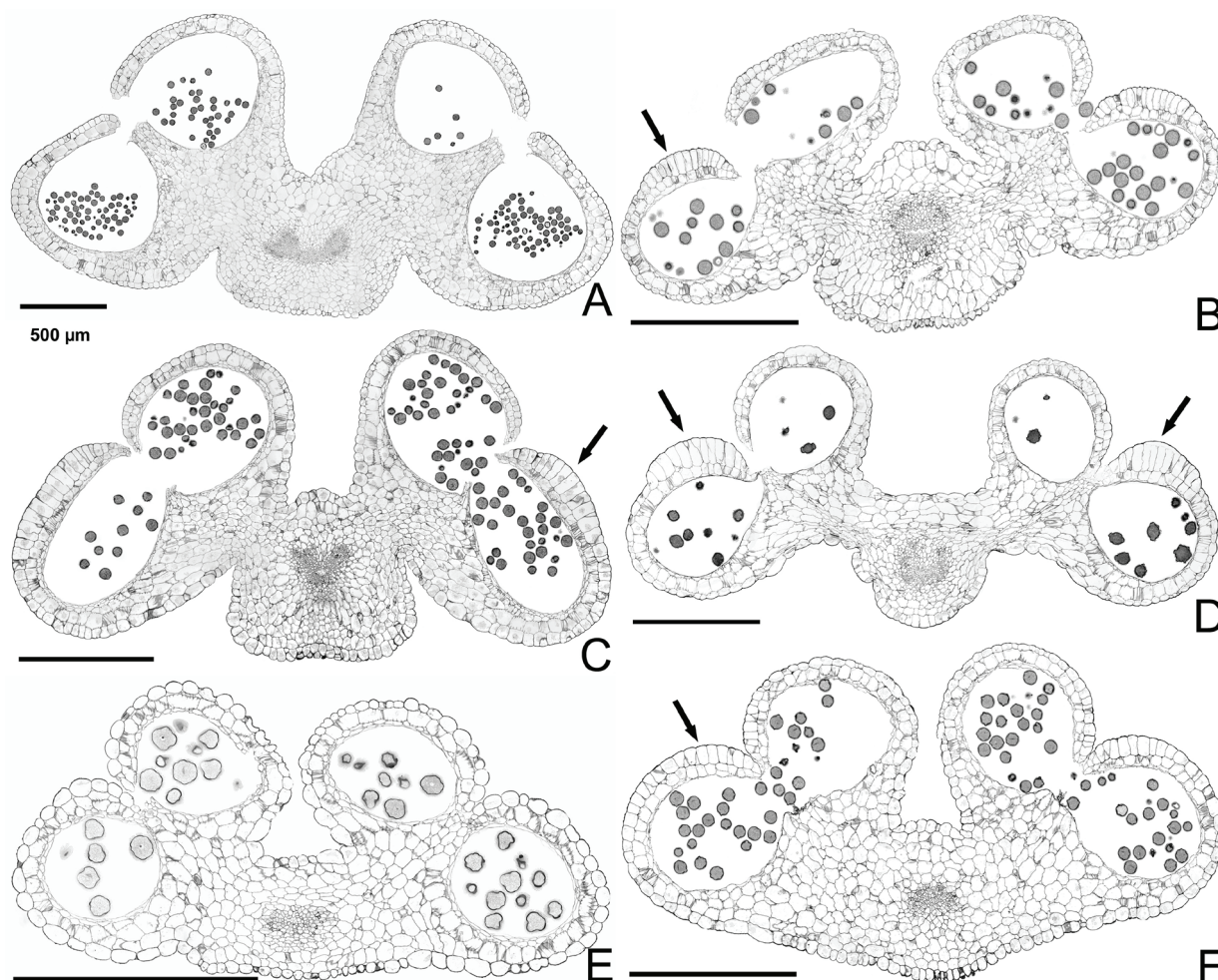


Figura 4. A-F. Seções transversais medianas em anteras de espécies de *Passiflora* L. A. *P. haematostigma*, B. *P. capsularis*, C. *P. misera*, D. *P. morifolia*, E. *P. suberosa*, F. *P. truncata*. Células estomiais indicadas pelas setas. Todas as escalas: 500 μ m.

cujas alturas 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*, o 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 (Figs. 8C-O): helicoidais e em formato de “U”. 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 es-

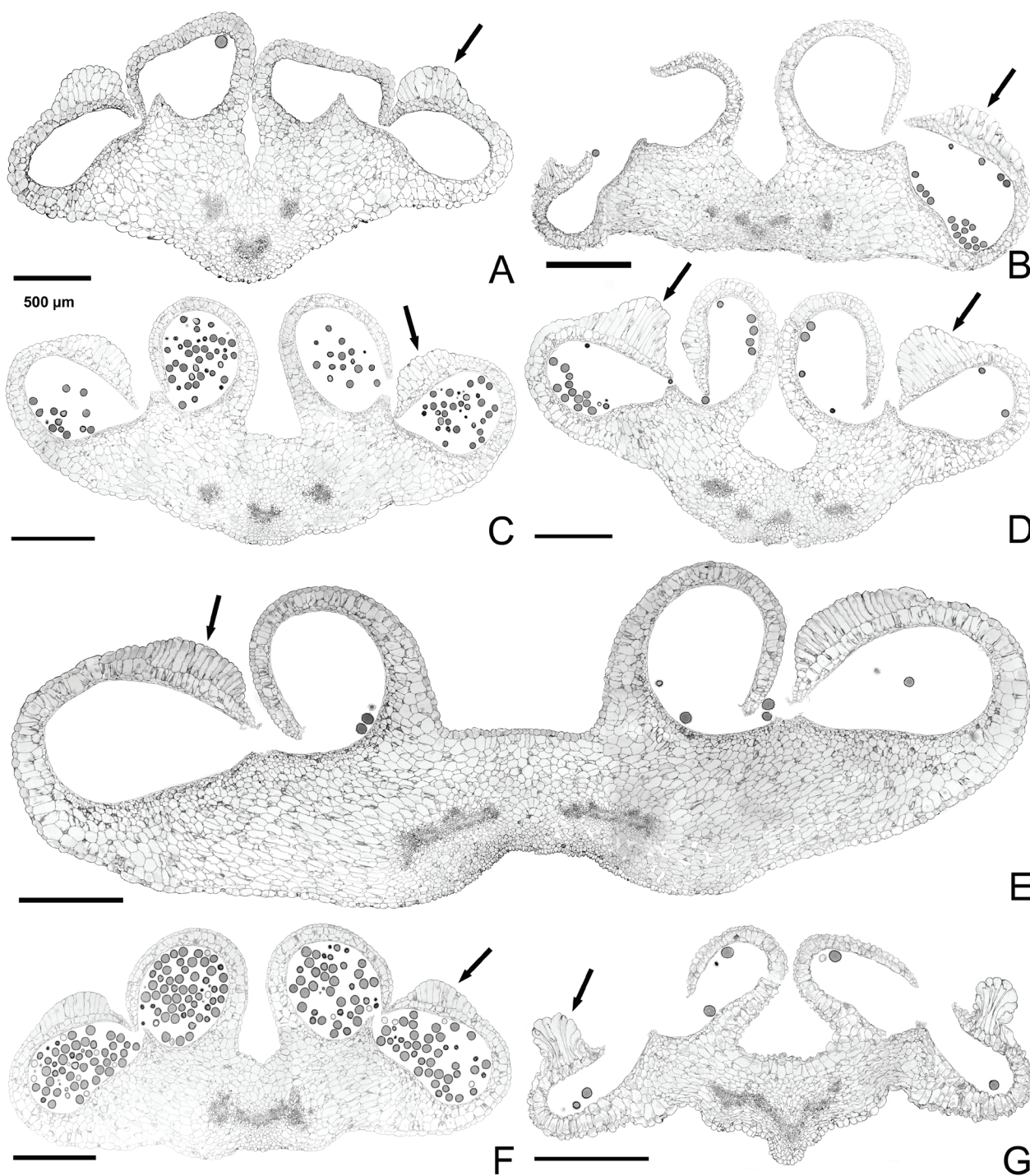


Figura 5. A-G. Seções transversais medianas de anteras de espécies de *Passiflora* L. A. *P. actinia*, B. *P. alata*, C. *P. amethystina*, D. *P. caerulea*, E. *P. edulis*, F. *P. elegans*, G. *P. tenuiflora*. Células estomiais indicadas pelas setas. Todas as escalas: 500 µm.

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 aproxima-

damente 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 possui reserva amilífera abundante, na forma de grandes grãos de amido compostos (Figs. 9A-B, E-F), os quais são reassimilados 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,

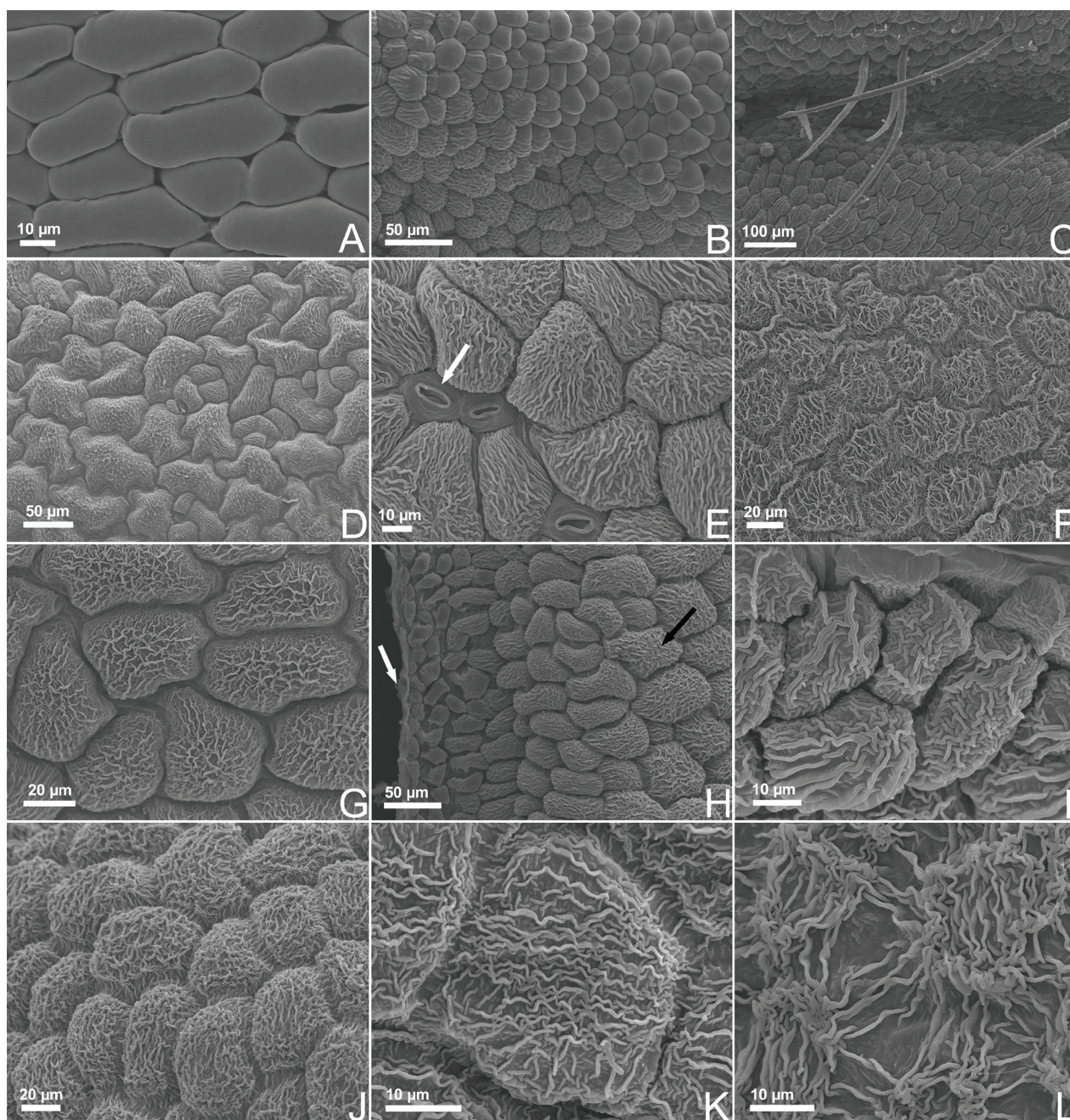


Figura 6. A-L. Detalhes da superfície epidérmica de anteras de espécies de *Passiflora* L., em MEV. A-G. Região dorsal. A. superfície lisa de *P. capsularis*. B. gradiente da ornamentação da superfície na região mediana de *P. truncata*. C. tricomas de *P. haematostigma*. D. epiderme mediana de *P. amethystina*. 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*.

em maior ou menor quantidade, dependendo da espécie analisada, dispersos aleatoriamente e não associados aos feixes vasculares (Figs. 10A-M).

A membrana peritapetal forma uma camada contínua revestindo a superfície interna da antera e apresenta mesma reação de fluorescência da exina dos grãos de pólen (Figs. 9I-K). Sobre esta, encontra-se a membrana

tapetal, formada pelos orbículos, também de reação de fluorescência similar à exina (Figs. 9I-K).

Os feixes vasculares que irrigam as anteras são anficri-vais (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.

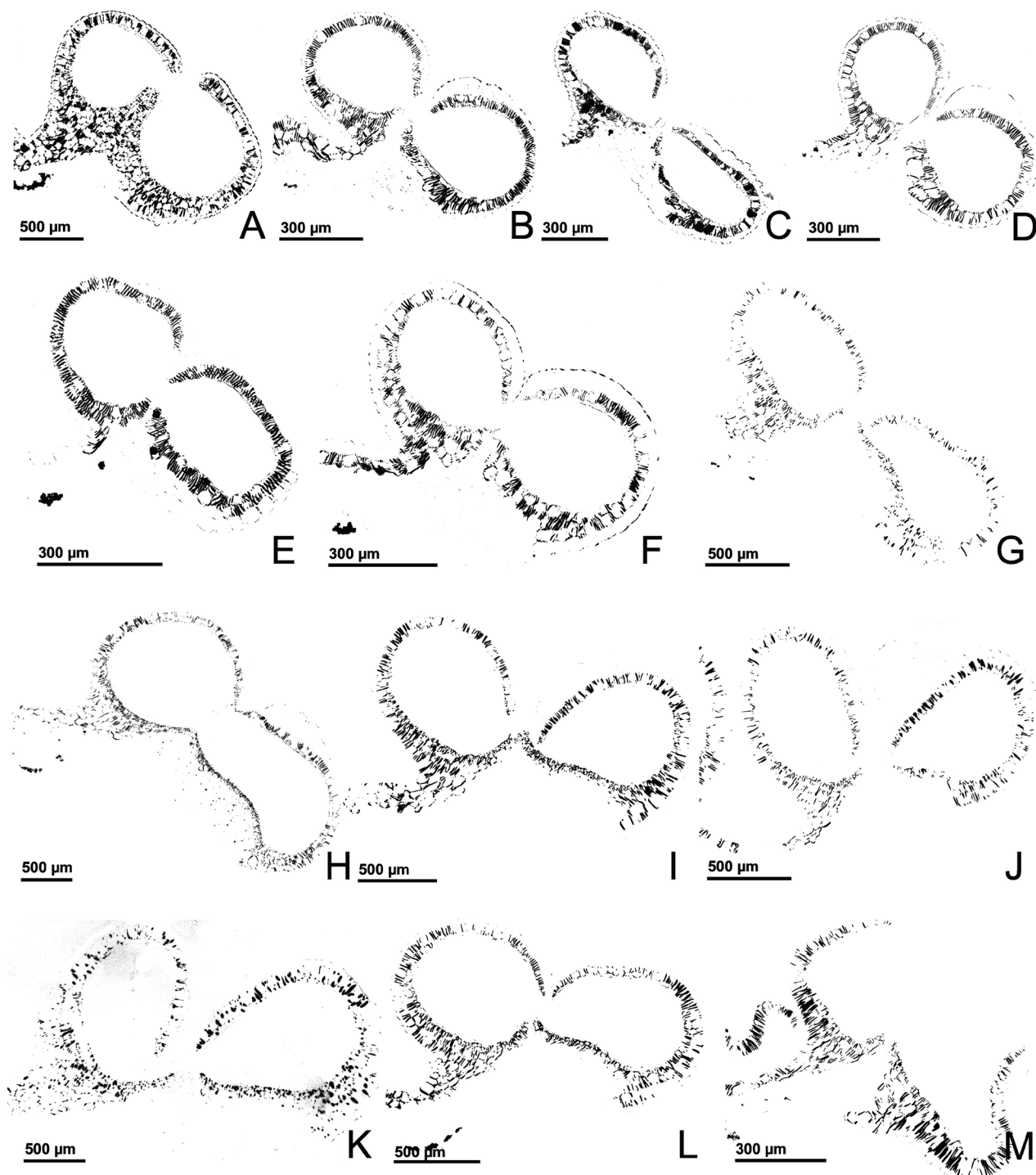


Figura 7. A-M. Distribuição dos espessamentos lignificados da parede celular em células do endotécio e conectivo em anteras de espécies de *Passiflora* L., sob microscopia óptica de luz polarizada (imagens em negativo). A. *P. haematostigma*, B. *P. capsularis*, C. *P. misera*, D. *P. morifolia*, E. *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*.

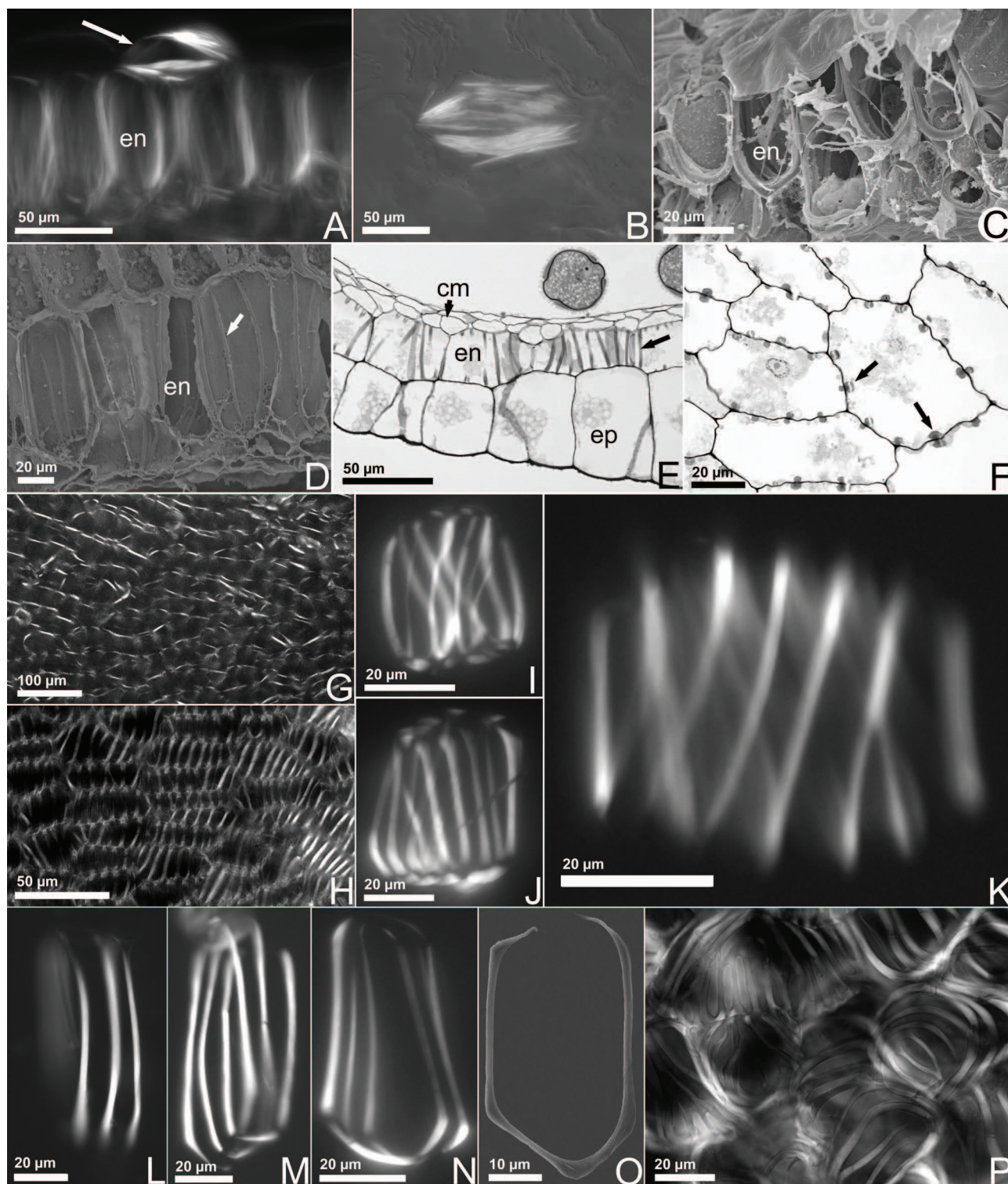


Figura 8. A-P. Epiderme e endotécio de anteras de espécies de *Passiflora* L. A-B. Idioblasto epidérmico com ráfides (seta) sobre o endotécio, em vista lateral (A) e frontal (B), em *P. tenuifila*. C. Endotécio de *P. capsularis*. D. Endotécio de *P. edulis*, mostrando espessamento da parede celular (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.

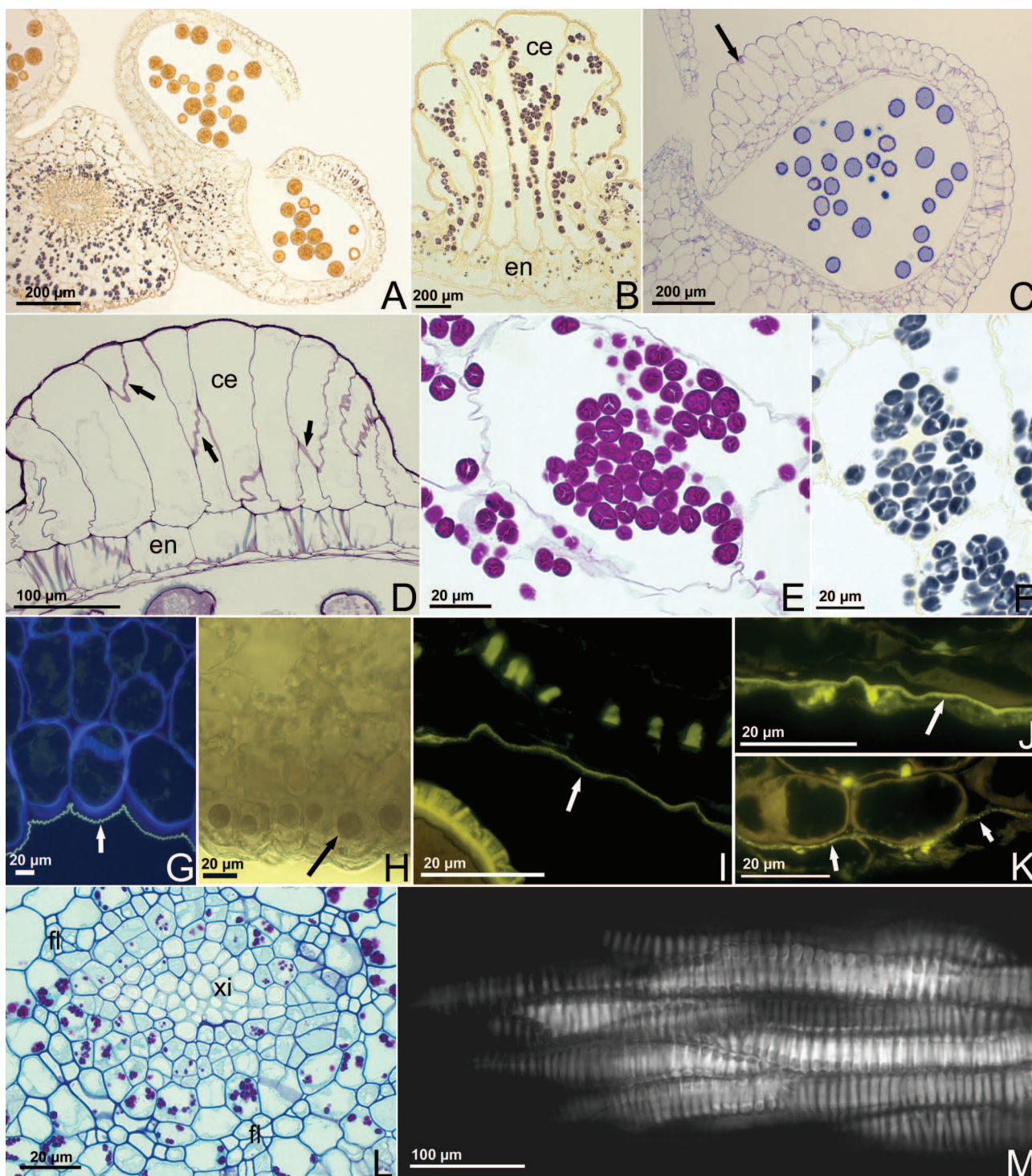


Figura 9. A-M. Seções transversais de anteras de espécies de *Passiflora* L. A-B. Detalhe dos grãos de amido no conectivo, epiderme e endotécio de *P. capsularis* (A) e *P. tenuifila* (B). C. Detalhe do arco de um dos microsporângios de *P. amethystina*, mostrando as células estomiais (seta). D. Detalhe 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 das 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.

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).

Grãos de pólen

Os 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).

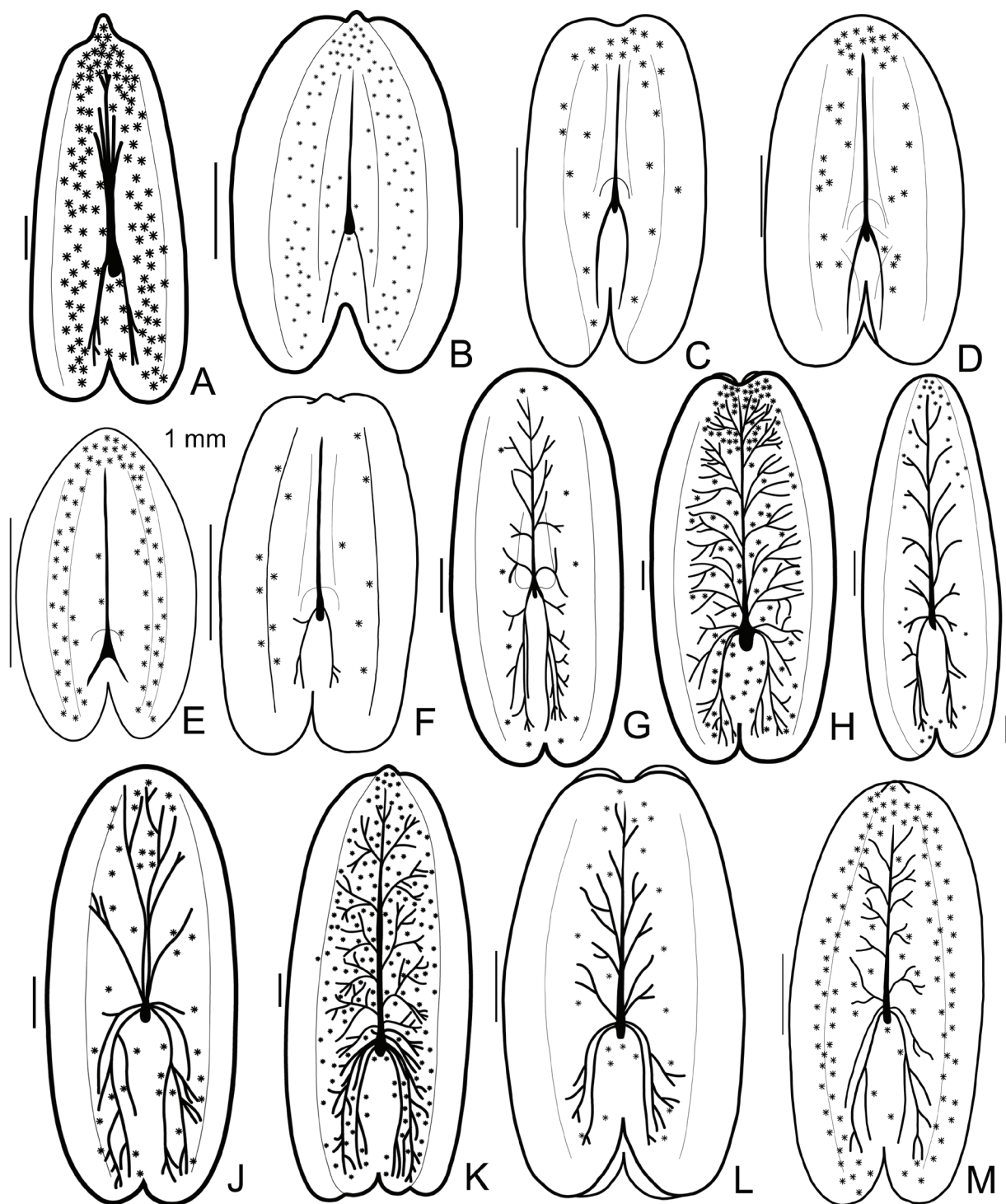


Figura 10. A-M. Vascularização (linhas) e distribuição de drusas (asteriscos) em antera de espécies de *Passiflora* L. A. *P. haematostigma*, B. *P. capsularis*, C. *P. misera*, D. *P. morifolia*, E. *P. suberosa*, F. *P. truncata*, G. *P. actinia*, H. *P. alata*, I. *P. amethystina*, J. *P. caerulea*,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

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 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.*

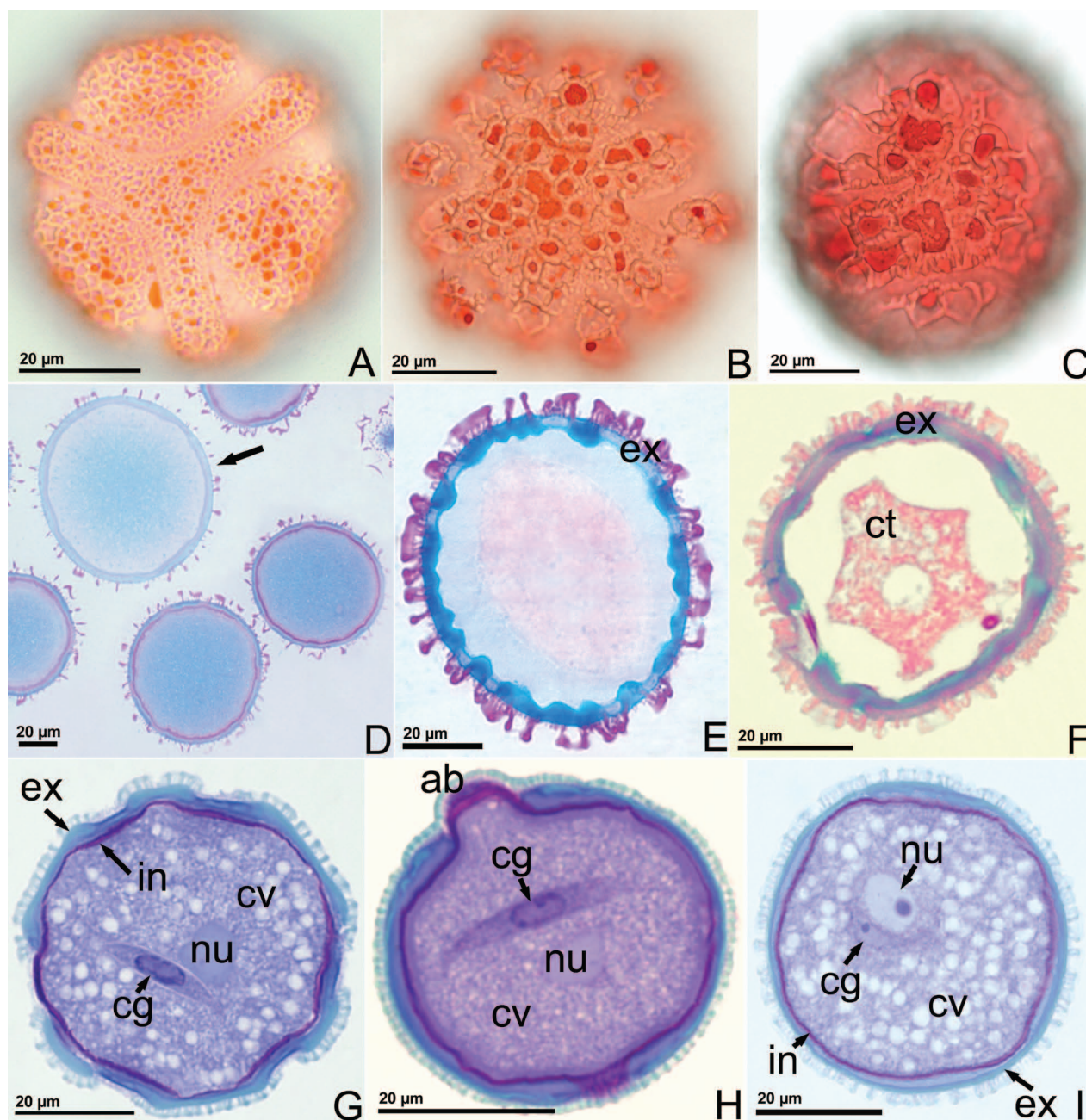


Figura 11. A-I. Grãos de pólen de espécies de *Passiflora* em microscopia óptica de campo claro. A-B. Substâncias lipofílicas (pollenkitt) sobre a esporoderme dos grãos de pólen de *P. haematostigma* (A), *P. morifolia* (B) e *P. edulis* (C). D. Seção anatômica de um grão de pólen gigante (seta) de *P. 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.

miser 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* (ICN152175), a célula vege-

tativa apresentou grandes acúmulos de polissacarídios intimamente associados ao núcleo (Fig. 12E).

No citoplasma da célula vegetativa, são encontrados grandes acúmulos de amido, na forma de grãos com-

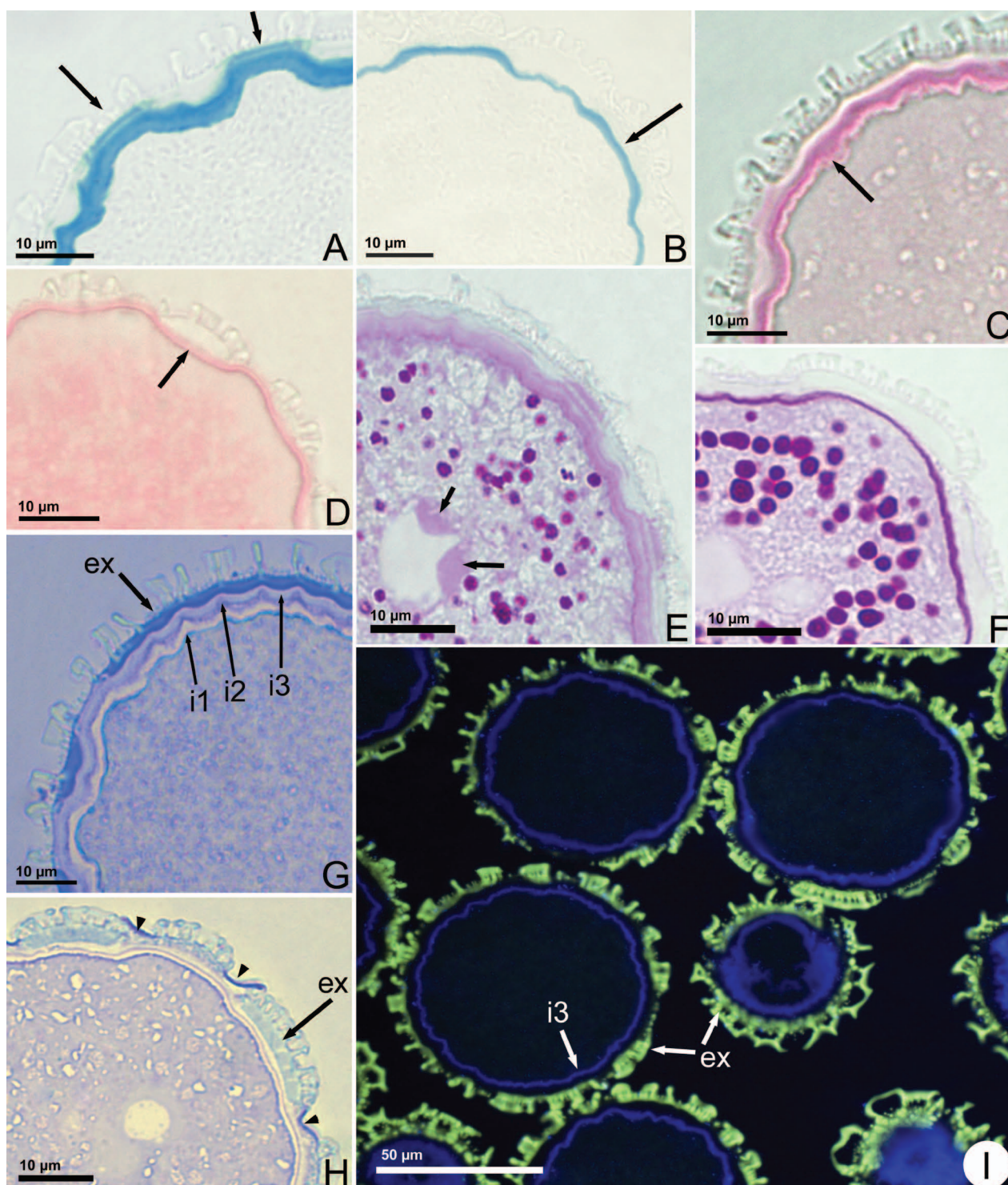


Figura 12. A-I. Seções semifinas da esporoderme de grãos de pólen de espécies de *Passiflora*. A-D. Detalhe da natureza pécica da intina em *P. amethystina* (A), *P. suberosa* (B), *P. caerulea* (C) e *P. misera* (D). Setas: aberturas (A e B) e intina (C e D). E-F: Detecção de compostos PAS-positivos 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.

postos, 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, podendo indicar a presença de polissacarídeos insolúveis (Apêndice 1-G).

Esporoderme

Todas as espécies apresentam intina composta por três estratos: o estrato mais externo, péctico (intina 3), o intermediário, péctico e protéico (intina 2), e o mais interno, péctico e celulósico (intina 1) (Figs. 12A-I; Apêndice 1-A, E-H, Tab. 2). Verifica-se uma grande variação na espessura da intina entre as espécies estudadas: as espécies

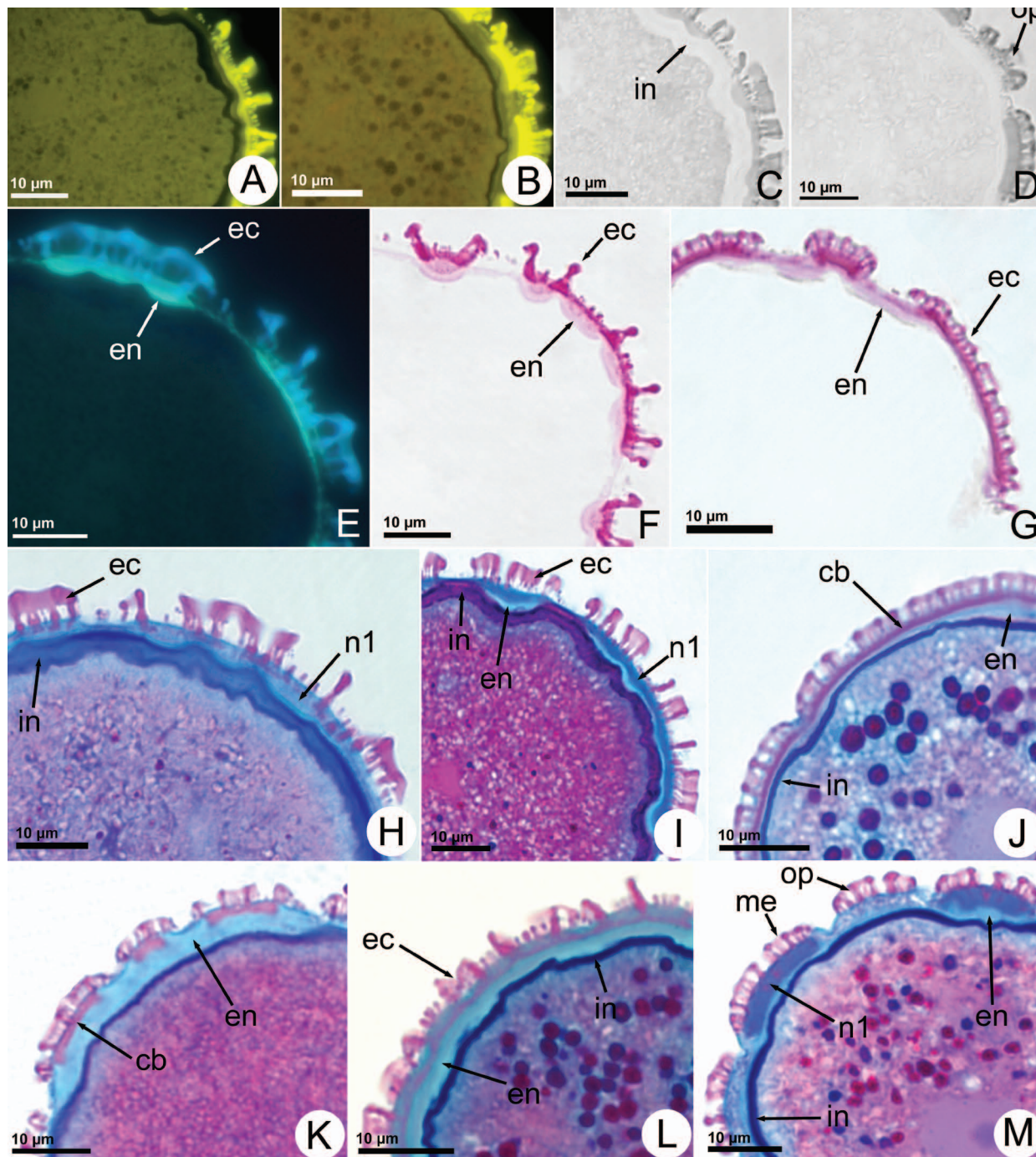


Figura 13. A-M. Seções semifinas da esporoderme em grãos de pólen de espécies de *Passiflora*. A-D. Esporopolenina na exina de *P. amethystina* (A,C), *P. capsularis* (B) e *P. suberosa* (D). E. Autofluorescência da exina em *P. actinia*. F-G. Exina do grão de pólen acetolizado em *P. actinia* (F) e *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, opérculo.

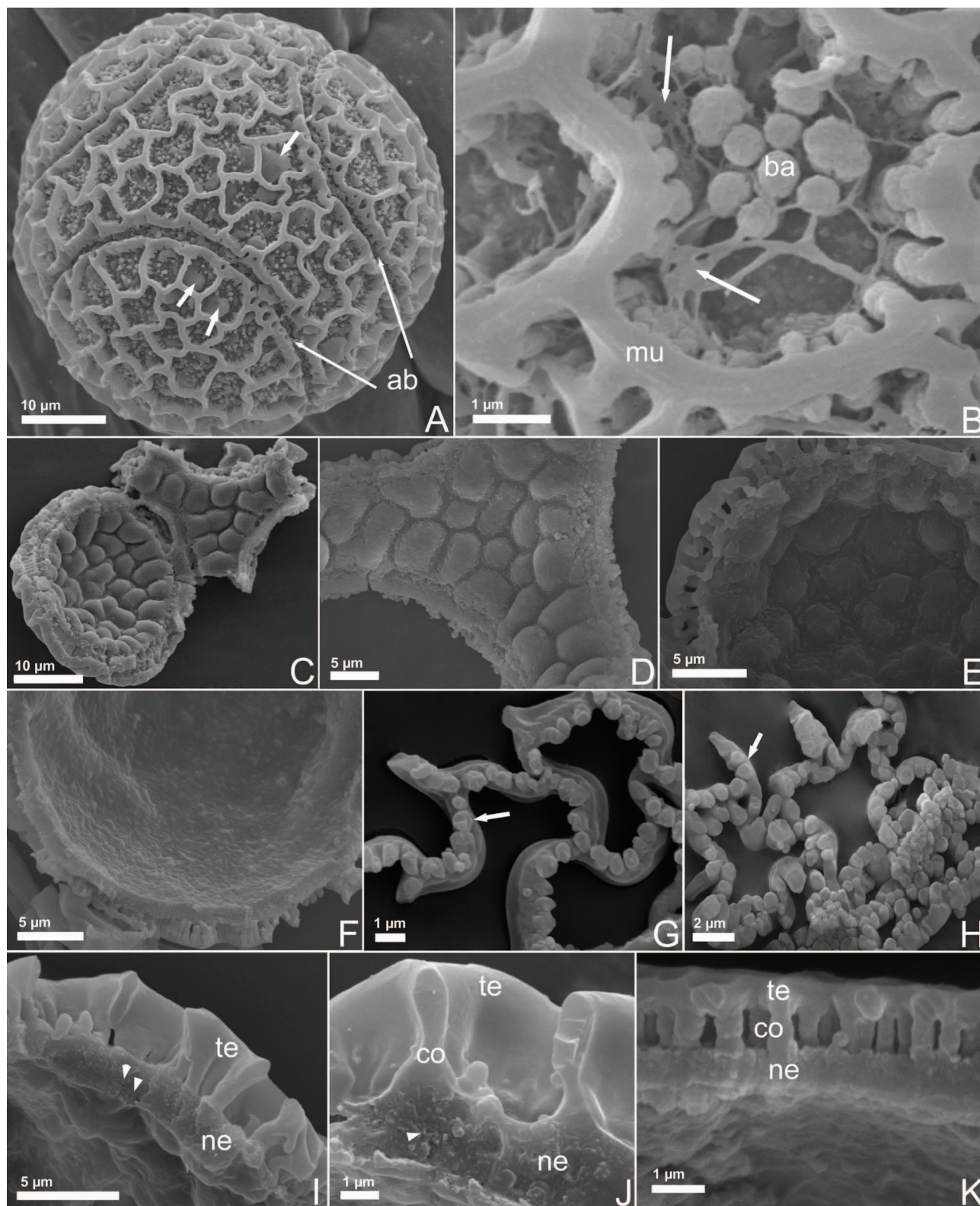


Figura 14. A-K. Esporoderme dos grãos de pólen em espécies de *Passiflora*, sob microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral do grão de pólen de *P. caerulea*, após fixação secundária em tetróxido de ósmio, mostrando o pollenkitt (setas) nos lúmens do retículo. B. Detalhe da superfície do grão 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). Abreviações: ab, aberturas; ba, báculas; co, columelas; mu, muros do retículo; ne, nexina; te, teto.

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 péciticos: 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 péciticos, hemiceluloses	CC	+	+	+	+	+	-
Hemicelulases + Azul de Astra	Hemicelulose	CC	-	-	+	+	+	-
Alcian Blue 8GX ^{5,8}	Ácidos péciticos	CC	+	++	+	-	-	-
Vermelho de Rutênio ⁶	Ácidos péciticos	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*.

do subgênero *Passiflora* possuem intina extremamente espessa, entre 2,5-3,5 μ m, podendo atingir 5,5 μ m em algumas regiões da esporoderme, como nas aberturas; as espécies dos subgêneros *Astropheia* e *Decaloba* possuem a intina relativamente fina, entre 1-1,8 μ m, atingindo aproximadamente 2,2 μ m nas áreas das aberturas. Nas espécies do subgênero *Passiflora*, a intina apresenta-se geralmente com um aspecto ondulado, especialmente se visualizadas as seções coradas 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 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 reação de PAS (Tab. 2). A endexina também apresenta coloração aproximadamente azulada com o corante metacromático Azul de Toluidina, quando anali-

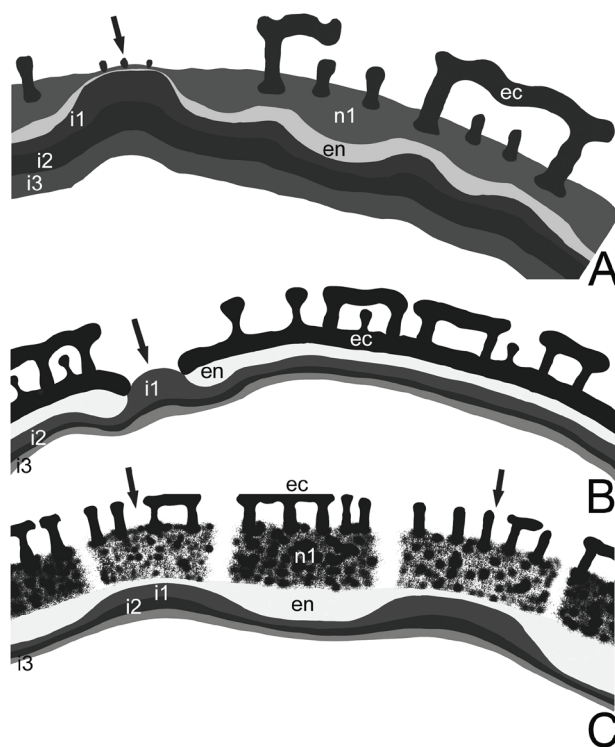


Figura 15. A-C. Esquema dos três tipos estruturais de esporoderme encontrados em espécies de *Passiflora* (ver descrição no texto). A. Tipo 1 (seta: abertura). B. Tipo 2 (seta: abertura). C. Tipo 3 (setas: opérculos nas aberturas). Abreviaturas: ec, ectexina; en, endexina; i1, intina 1; i2, intina 2;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

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), frequentes (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. tenuifolia</i> Kill.	1	2	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1

sadas 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 lúmens 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 hemiceluloses 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, foram obtidos três padrões estruturais: 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 potencial 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 estiletes (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 *Astropheia* possuem flores de grandes dimensões, destacando-se *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 citadas, também está entre as espécies com as menores flores do gênero, entre 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 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 da antera.

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* (*Astropheia*), embora possua anteras grandes, não possui células estomiais diferenciadas. Outra característica, ainda não documentada para a região do estômio, 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, e diferem dos normalmente encontrados nos demais tecidos por possuírem os cristais mais espessos. Também não são encontrados em outros órgãos do gênero *Passiflora*, como as 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" e helicoidal, com inúmeras subcategorias (Manning 1996). Em *Passiflora*, foram encontradas duas destas, em formato de "U", nas espécies de *Astropheia* 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). Em *Ilex paraguariensis*, são formados no espaço periplasmático, entre a membrana plasmática e a parede celular (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, normalmente ausentes em anteras já deiscentes. 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 (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, na forma de grandes gotas ou de aspecto fibrilar, entre as columelas livres do retículo (Souza & Pereira 2000, Souza *et al.* 2004). 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.

A diferença de tamanho dos grãos de pólen encontradas neste estudo também é relatada por outros autores, para várias espécies de *Passiflora* (Souza *et al.* 2003, 2004). Estes autores atribuem a ocorrência de pólen de grandes dimensões a 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, são resultantes de diferentes processos que geram a esterilidade. Os grãos vazios e relativamente menores indicam que a malformação 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 (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), pólen 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 pólen 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 polissacarídios (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 minimizado (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 (Coomassie 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 microsporos (Piffanelli *et al.* 1998).

Do ponto de vista morfológico, apresenta vários estratos (Erdtman 1952, Punt *et al.* 2007): a sexina é o estrato 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 deposi-

tada 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 (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 estudadas. De acordo com análises histoquímicas de Southworth (1973), a endexina também pode possuir traços de polissacarídios, 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. Segundo 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 de a 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 Fucsina 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 similar a encontrada em *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), que 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 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 Fucsina Básica (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 a 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. Hesse (2000) atribui a perda de camada basal compacta a 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, Lar-

son (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, já que 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 2009). 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 polínicas 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 2009). 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. Agradecemos, também, às Professoras Alexandra Antunes Mastroberti e Maria Luisa Lorscheitter, do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS, e ao Prof. Alfredo Eliio Cocucci, da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, pela leitura crítica e sugestões.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- BAKER, J.R. 1947. Further remarks on the histochemical recognition of lipine. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 88: 463-465.
- BAKER, H.G. & BAKER, I. 1979. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 66(5): 591-600.
- BARRIOS, L., CAETANO, C.M., CARDOSO, C.I., D'ECKENBRUGGE, G.C., ARROYAVE, J.A. & OLAYA, C.A. 2005. Caracterización del pollen de especies de los géneros *Passiflora* e *Dilkea*. *Acta Agronómica*, 54(3): 19-23.
- BERNHARD, A. 1999. Flower structure, development, and systematics in Passifloraceae and in *Abatia* (Flacourtiaceae). *International Journal of Plant Science*, 160(1): 135-150.
- BHANDARI, N.N. 1984. The microsporangium. In: JOHRI, B.M. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. p. 53-121.
- BHATNAGAR, S.P. & GARG, R. 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., TASCETTO, O.M., PAGLIARINI, M.S. & BRASIL, E.M. 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.
- CHARZYŃSKA, M., MURGIA, M., MILANESI, C. & CRESTI, M. 1989. Origin of sperm cell association in the "male germ unit" of *Brassica* pollen. *Protoplasma*, 149: 1-4.
- CLARKE, A., GLEESON, P., HARRISON, S. & KNOX, R.B. 1979. Pollen-stigma interactions: identifications and characterization of surface components with recognition potential. *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., CHAVANT, L., BURRUS, M. & AUDRAN, J.C. 1994. Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. *Sexual Plant Reproduction*, 7: 347-356.
- COCUCCI, A.E. & MARIATH, J.E.A. 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. 1262 p.
- D'ARCY, W.G. 1996. Anthers and stamens and what they do. In: D'ARCY, W.G. & KEATING, R.C. (Eds.). *The anther: form, function and phylogeny*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 1-24.
- DETTKE, G.A. & SANTOS, R.P. 2009. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Acta Botanica Brasiliense*, 29(4): 1119-1128.
- DORMER, K.J. 1962. The fibrous layer in the anthers of Compositae. *New Phytologist*, 61(2): 150-153.
- DUMAS, C., KNOX, R.B., McCONCHIE, C.A. & RUSSELL, S.D. 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. *What's New Plant Physiology*, 15: 17-20.
- EDLUND, A.F., SWANSON, R. & PREUSS, D. 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 (An Introduction to Palynology)*. Stockholm: Almqvist & Wiksell. 539 p.
- 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. & IVERSEN, J. 1964. *Textbook of pollen analysis*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 237 p.
- FERGUSON, C., TEERI, T.T., SIIKA-AHO, M., READ, S.M. & BACIE, A. 1998. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 206: 425-460.

- FEUILLET, C. & MACDOUGAL, J.M. 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., BELLANI, L., NEPI, M. & PACINI, E. 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191: 143-159.
- FRENCH, J.C. 1985. Patterns of the endothelial wall thickenings in Araceae: subfamilies Calloioideae, Lasioidae and Philodendroideae. *Botanical Gazette*, 146(4): 521-533.
- FRENCH, J.C. 1986. Patterns of the endothelial wall thickenings in Araceae: subfamilies Colocasioidae, Aroideae e Pistioideae. *Botanical Gazette*, 147(2): 166-179.
- FREUDENSTEIN, J.V. 1991. A systematic study of endothelial thickenings in the Orchidaceae. *American Journal of Botany*, 78: 766-781.
- GARCÍA, C.C. 2002. An approach to the diversity of endothelial thickenings in Solanaceae. *Flora*, 197: 214-223.
- GERENDAY, A. & FRENCH, J.C. 1988. Endothelial thickenings in anthers of porate monocotyledons. *American Journal of Botany*, 75(1): 22-25.
- GERRITS, P.O. & SMID, L. 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. & SOUZA, M.J. 2002. *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: Editora Funpec. 132 p.
- 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.
- 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. In: HESLOP-HARRISON, J. (Ed.). *Pollen: development and physiology*. London: Butterworths. p. 75-98.
- HESLOP-HARRISON, J. 1987. Pollen germination and pollen-tube growth. *Review of Cytology*, 107: 1-78.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1991. Structural and functional variation in pollen intines. In: BLACKMORE, S. & BARNES, S.H. (Eds.) *Pollen and spores: patterns of diversification*. Oxford: Clarendon Press. p. 331-343.
- 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. & PEARSON, C.B. 1978. Pollen wall and aperture development in *Helianthus annuus* (Compositae: Heliantheae). *American Journal of Botany*, 65(3): 293-309.
- HUYSMANS, S., EL-GHAZALY, G. & SMETS, E. 1998. Orbicules in angiosperms: morphology, function, distribution, and relation with tapetum types. *Botanical Review*, 64: 240-272.
- JACOBS, C.A. & LERSTEN, N.R. 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. 523 p.
- JOHRI, B.M., AMBEGAOKAR, K.B. & SRIVASTAVA, P.S. 1992. *Comparative embryology of angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag. 1221 p.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 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. & KNOX, R.B. 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. In: JOHRI, B.M. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p. 197-271.
- KNOX, R.B. & HESLOP-HARRISON, J. 1970. Pollen-wall proteins: localizations and enzymatic activity. *Journal of Cell Science*, 6: 1-27.
- KNOX, R.B., CLARKE, A., HARRISON, S., SMITH, P. & MARCHALONIS, J.J. 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. & SAZIMA, M. 1997. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. *Revista Brasileira de Botânica*, 20(2): 19-126.
- KRAUS, J.E., SOUSA, H.C., REZENDE, M.H., CASTRO, N.M., VECCHI, C. & LUQUE, R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining for plant material. *Biotechnic Histochemistry*, 73: 235-243.
- 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.
- LARSON, D.A. 1966. On the significance of the detailed structure of *Passiflora caerulea* exines. *Botanical Gazette*, 127(1): 40-48.
- LONGO, J.M. & FISCHER, E. 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. 453 p.
- MANNING, J.C. 1996. Diversity of the endothelial patterns in the angiosperms. In: D'ARCY, W.G. & KEATING, R.C. (Eds.). *The anther: form, function and phylogeny*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 136-158.
- MANNING, J.C. & LINDER, H.P. 1990. A cladistic analysis of patterns of endothelial thickenings in Poales/Restionales. *American Journal of Botany*, 77: 194-208.
- MANNING, J.C. & GOLDBLATT, P. 1990. Endothelial in Iridaceae and its systematic implications. *American Journal of Botany*, 77(4): 527-532.
- MATTHYS-ROCHON, E., PVERGNE, S. DETCHEPARE & DUMAS, C. 1987. Male germ init isolation 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-ESTEVES & 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 (Doutorado) - Instituto de Biociências. 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 & FREITAS, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, 90(8): 1229-1238.
- NEPI, M. & FRANCHI, G.G. 2000. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. *Plant Systematic and Evolution*, 222: 45-62.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Melbourne: Termarcaphi Pty. 357 p.
- PACINI, E. 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 362-366.
- PACINI, E. & HESSE, M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora*, 200: 399-415.
- PACINI, E. & JUNIPER, B.E. 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 & NEPI, M. 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 & GRACIANO-RIBEIRO, D. 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 & MURPHY, D.J. 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 & Le THOMAS, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany 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. & VIAN, B. 1991. General preparation and staining of thin sections. In: HALL, J.L. & HAWES, C. (Eds.). *Electron microscopy of plant cells*. London: Academic Press. p. 1-66
- SANTOS, R.P. 1995. *O andrófito de Ilex paraguariensis St. Hil.: estrutura e citoquímica do tubo polínico e grão de pólen*. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANTOS, R.P. 2000. *Ontogenia da esporoderme em Ilex paraguariensis A.St.Hil. (Aquifoliaceae)*. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANTOS, R.P. & MARIATH, J.E.A. 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. & MARIATH, J.E.A. 2003. Ontogeny of the orbicules in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Acta Microscópica*, 12(1): 21-26.
- SAZIMA, M. & SAZIMA, I. 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. & 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.; T.N.S. PEREIRA; M. HOFFMANN; E.J.T. MELO & 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.; T.N.S. PEREIRA & 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.; T.N.S. PEREIRA; A.J.B. DIAS; B.F. RIBEIRO & 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, M.M.; T.N.S. PEREIRA; A.P. VIANA; M.G. PEREIRA; L.C. BERNACCI; C.P. SUDRÉ & SILVA, L.C. 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 & SUDRÉ, C.P. 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 & NADOT, S. 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 & PACINI, E. 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. 480 p.
- SUÁREZ-CERVERA, M.; E. ACALÍS; A. LE THOMAS & SEOANE-CAMBA, J.A. 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. & MACIVER, C.M. 1999. The systematic significance of the endothelial in Begoniaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 131: 203-221.
- ULMER, T. & MACDOUGAL, J.M. 2004. *Passiflora: passionflowers of the world*. Portland-Cambridge: Timber Press. 430 p.
- VAN DER HAM, R. & VAN HEUVEN, B.J. 2003. A new pollen type in Old World Cucurbitaceae. *Grana*, 42: 88-90.
- VARASSIN, I.G. & SILVA, A.G. 1999. A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em vegetação de restinga. *Rodriguesia*, 50 (76/77): 5-17.
- VENTURELLI, M. 1983. Estudos embriológicos em Lorantheae: gênero *Tripodanthus*. *Kurtziana*, 16: 71-90.
- VITHANAGE, H.I.M.V. & KNOX, R.B. 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. & DOYLE, J.A. 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. Their structure, identification and significance in science and medicine*. New York: McGraw Hill. 574 p.
- YOCKTENG, R. & NADOT, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*nepGS*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 379-396.