

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Aspectos embriológicos de espécies do gênero
Passiflora, com ênfase no potencial de herança
organelar

Adriano Silvério

Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath (Orientador)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Botânica da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Porto Alegre
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Aspectos embriológicos de espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae),
com ênfase no potencial de herança organelar**

Adriano Silvério

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Botânica da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Porto Alegre

2009

Versos para uma flor

"...só a primavera que traz a florada
rebrotando o pasto da estância torena
Pelas invernadas olfato teu cheiro
por entre os campestres da pampa serena
O sol adormece a tarde se atora
e é chegada a hora de rever minha morena...
Desencilho o pingo no oitão do rancho
oreando os arreios sob a ramada
o amargo cevado me espera espumando
enquanto retoça latindo a cuscada
eu colho o mate das mãos da donzela
e ofereço pra ela uma flor colorada."

(César Oliveira e Rogério Melo)

Meu avô Antônio Mineiro (*in memorian*) e minha avó Carmen,

dedico!

Pai, Mãe, Pat e Ninho,

Amo vocês!!!

Agradecimentos,



Aos meus pais, por sempre terem acreditado em mim e por me permitirem ter estudado, mesmo nos períodos mais difíceis.

Ao meu amigo, orientador (chefe), Jorge Ernesto de Araujo Mariath, pelo entusiasmo contagiante e por toda a confiança nesses cinco anos de trabalho em conjunto.

Ao meu grande amigo de infância, Paulo Roberto da Silva, por me mostrar o caminho da Biologia e depois de Porto Alegre.

A minha namorada Érica, por todo companheirismo, no trabalho e fora dele, muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos de fé, os quais Porto Alegre me permitiu conhecer, que hoje são parte da minha família, Anderson Machado, Júlio César de Lima e Rafael Arenhart.

Aos professores Alexandra Mastroberti e Rinaldo Pires dos Santos, pela paciência e atenção durante as minhas infinitas dúvidas durante a rotina de laboratório.

As amigas Ana Cristina e Diana que muito prontamente me receberam no

LAVeg, e os demais colegas da época, Alba Lins, Carlos Frederico, Daniele Munareto, Evelise Bach, Jaqueline Sarzi Sartori, João Marcelo de Oliveira, Juliana Troleis (agora técnica do LAVeg), Lia Rosane Rodrigues, Rivete Silva de Lima, pela amigável recepção.

As amigas de Adriana Farias Braum, Bianca Brasil, Sônia Tormes, Kalianne Freire Godeiro, pelo alegre convívio.

As demais colegas de laboratório Aline Tonin, Fernanda Santos, Carla Pelegrin, Natividad Fagundes.

A Professora Loreta Brandão de Freitas e Aline Lorenz-Lemke, pelas valiosas sugestões de coleta para as passifloras e Silvia Venturi, Greta Aline Dettke e Luis Fernando de Paiva Lima, por encontrarem a espécie *Passiflora haematostigma* no Estado de Santa Catarina.

Ao Professor Armando Carlos Cervi, pela atenção e empenho em coletar e nos mandar coleta de plantas nos momentos finais do trabalho.

Ao Professor Thomas Stützel, pelo envio de valiosa bibliografia de *Passiflora* da Alemanha.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica e a seus funcionários, principalmente Cristiane e Moema, pelo auxílio no uso dos equipamentos, sem os quais parte desse trabalho não poderia ser realizado.

A coordenação do programa de Pós-Graduação em Botânica, na época a professora Lúcia Dillemburg, por todo empenho na mudança de nível.

Aos professores e colegas de curso do PPGBot com os quais convivi nos últimos anos.

Aos meus primeiros mestres da minha universidade de origem em Maringá, professores Káthia Socorro Mathias Mourão, Rosilaine Carrenho, Ismar Sebastião Mosqueta e Luiz Antonio de Souza, por toda atenção e paciência em meu ingresso na Anatomia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante os anos de pós-graduação.

...e a todos demais que participaram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho.

Adriano Silvério

Porto Alegre, março de 2009

Prefácio

O presente trabalho compõe parte de uma série de trabalhos envolvendo aspectos reprodutivos e vegetativos do gênero *Passiflora* realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal em conjunto com professores de outras áreas, como os Departamentos de Genética e de Zoologia.

O presente trabalho encontra-se formatado na forma de tese, com a intenção de um melhor aproveitamento de resultados que possivelmente seriam suprimidos nas publicações.

A escolha das espécies levou em conta primeiramente questões taxonômicas, com uma espécie de cada subgênero do gênero *Passiflora*, com relação ao potencial de herança organelar.

As coletas para *Passiflora elegans* e *P. suberosa* foram realizadas em Porto Alegre, enquanto que para a espécie *P. haematostigma* foram necessárias coletas no Estado de Santa Catarina, pelo limite de distribuição geográfica da espécie.

Trata-se de um trabalho comparativo entre duas espécies, e a espécie *Passiflora elegans* como é utilizada como modelo nas descrições e figuras.

Dessa forma as características semelhantes são descritas uma única vez e as variações encontradas são evidenciadas no texto e em figuras ilustrativas, bem como na discussão.

Todas as etapas foram analisadas em ambas as espécies, exceto a formação do androsporângio que foi observada unicamente em *P. elegans*, por motivos de dificuldade em coleta das primeiras fases do desenvolvimento de *P. haematostigma*.

A espécie *P. suberosa* é utilizada somente na análise ultraestrutural do pólen bicelular, uma vez que a embriologia da espécie já foi realizada em uma dissertação de mestrado e os resultados são utilizados na discussão.

Resumo

O presente trabalho analisou as etapas de formação de rudimentos seminiais e grãos de pólen de *Passiflora elegans* e *P. haematostigma*. As espécies foram analisadas fazendo-se o uso de microscopia fotônica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. O gineceu apresenta um estigma com emergências estigmáticas, estilete sólido e ovário tricarpelar e unilocular. O ovário apresenta inúmeros rudimentos seminiais que formam-se a partir de divisões periclinais da camada central. Os rudimentos são crassinucelados e os tegumentos têm origem dérmica. A célula arqueosporial divide-se mitoticamente antes da meiose. A meiose resulta em uma tétrade linear, com ginósporo calazal viável. A ginogametogênese é do tipo *Poligonum* e, durante a diferenciação do ginófito, os estratos parietais do nucelo são parcialmente consumidos e a epiderme nucelar divide-se periclinamente na porção apical. As antípodas são efêmeras e o ginófito maduro apresenta duas sinérgides com aparelho fibrilar desenvolvido, oosfera e núcleo secundário no pólo micropilar. O rudimento seminal é anátropo, arilado, bitegmentado e com micrópila em “zig-zag”. O androceu é constituído por cinco anteras tetrasporangiadas. Os estratos parietais desenvolvem-se do tipo Dicotiledôneo e as camadas médias são persistentes na antera madura de *P. haematostigma*. As células do tapete são poliplóides e colapsam liberando os conteúdos no interior do lóculo. A citocinese é do tipo simultânea e as tétrades são tetraédricas na maioria. O pólen é liberado na fase bicelular, apresenta número de colpos variável em *P. elegans* e seis colpos em *P. haematostigma*. A esporoderme não apresenta camada basal em *P. elegans* e é mais espessa do que em *P. haematostigma*. Plastídios e mitocôndrias são englobados durante a formação da célula generativa e persistem até a fase de pólen maduro.

Palavras chave: *Passiflora*, esporogênese, gametogênese, pólen, herança plastidial.

Abstract.

The present work analyzed the different developmental stages of the ovule and of the pollen grain in *Passiflora elegans* and *P. haematostigma*. The species were analyzed using photonic microscopy and scanning and transmission electron microscopy. The gynoecium has a stigma with stigmatic outgrowths, solid style and tricarpeal and unilocular ovary. The ovary has several seminal rudiments that are originated from the periclinal divisions of the central layer. The ovule is crassinucelate and the dermal layer originates the integuments. The arquesporial cell divides mitotically before meiosis. The meiosis results into a linear tetrad and only the chalazal gynospore is viable. The gynogametogenesis is of the *Poligonum* type, the nucellus parietal layers are partially degraded during the gynophyte differentiation, and nuclear epidermis divides periclinally in the apical portion. The antipodal cells are ephemeral and the mature gynophyte has two synergids with a developed filiform apparatus, egg cell and secondary nuclei in the micropilar pole. The ovule is anatropous, arillate, bitegmic and with zig-zag micropile. The androecium is constituted of five tetrasporangiate anthers. The parietal layers develop like the Dicotyledoneous type and middle layers are persistent in the mature anther of *P. haematostigma*. The tapetal cells are polyploids and collapse releasing their contents to the locus. The cytokinesis is of the simultaneous type and most of the tetrads are tetrahedral. The pollen is released during the bicellular stage, has a variable number of colpus in *P. elegans* and six colporus in *P. haematostigma*. The sporoderm does not have a basal layer in *P. elegans* and is thicker than in *P. haematostigma*. Plastids and mitochondria are enclosed during the generative cell formation and persist until the mature pollen stage.

Key words: *Passiflora*, sporogenesis, gametogenesis, pollen, plastidial inheritance.

Sumário

1 - Introdução	1
Família Passifloraceae	1
Histórico do gênero.....	2
Caracterização morfológica.....	3
Classificação da família e os problemas taxonômicos infragenéricos.....	5
O subgênero <i>Astrophea</i>	7
O subgênero <i>Deidamioides</i>	8
O subgênero <i>Decaloba</i>	9
O subgênero <i>Passiflora</i>	11
Importância do gênero.....	13
A reprodução em <i>Passiflora</i>	13
Embriologia do gênero <i>Passiflora</i>	14
Herança organelar.....	14
2 - Objetivos	17
3 - Material e métodos	17
4 - Resultados	20
Gineceu.....	20
Ginosporângio e ginosporogênese.....	24
Ginogametogênese.....	25
Rudimento seminal.....	27
Androceu.....	28
Estratos parietais e a formação do androsporângio.....	28
Antera madura.....	30
Androsporogênese.....	31

Androgametogênese.....	34
Esporoderme.....	36
Exina.....	36
Intina.....	37
Morfologia externa do pólen.....	38
Dinâmica de plastídios e mitocôndrias.....	39
Figuras.....	40
5 - Discussão	82
Gineceu.....	82
Ginosporângio e ginosporogênese.....	85
Ginogametogênese.....	87
Rudimento seminal maduro.....	88
Androceu.....	90
Estratos parietais e a formação do androsporângio.....	90
Antera madura.....	90
Androsporogênese.....	97
Androgametogênese.....	99
Esporoderme.....	100
Exina.....	100
Intina.....	105
Morfologia externa do pólen.....	107
Dinâmica de plastídios e mitocôndrias.....	109
6 – Considerações finais.....	113
7 - Referências bibliográficas.....	115

1 - Introdução

Família Passifloraceae

A família Passifloraceae pertence a Ordem Malpighiales (APG II, 2003) e conta com cerca de 17 gêneros e 750 espécies com distribuição essencialmente pantropical, com poucas espécies temperadas distribuídas no norte da América do Sul, sudeste da China e Nova Zelândia.

O Gênero *Passiflora* é o mais representativo com cerca de 500 espécies ocorrendo na América, mais 24 na Austrália e sul asiático (Feuillet & MacDougal, 2007). Deginani (2001) classifica a distribuição do gênero como pantropical, com a maior parte das espécies americanas ocorrendo na região Centro e Sul da América do Sul, com a maior concentração de espécies do gênero ocorrendo entre os Trópicos de Câncer e de Capricórnio, chegando aos 40° de latitude Sul na Argentina com a espécie *P. caerulea* L. (Deginani, 2001).

No Brasil ocorrem cerca de 127 espécies, sendo superado somente pela Colômbia com 167, sendo esse o país com maior riqueza específica, principalmente na região andina, entre a Colômbia e Equador, sendo o centro de maior diversidade para o gênero *Passiflora* (Pérez *et al.* 2007).

No estado do Rio Grande do Sul, o gênero *Passiflora* conta com 14 espécies (Mondin, 2001), pertencentes a dois subgêneros: ***Decaloba*** (DC.) Rchb.: *P. capsularis* L.; *P. misera* H.B.K.; *P. morifolia* Mast.; *P. organensis* Gardn.; *P. suberosa* L.; *P. tricuspis* Mast.; e ***Passiflora***: *P. actinia* Hook.; *P. amethystina* Mik.; *P. caerulea* L.; *P. edulis* Sims; *P. eichleriana* Mast.; *P. elegans* Mast.; *P. foetida* L.; *P. tenuifila* Kill. Neste último subgênero inclui-se também *P. alata* Curtis, que apesar de ser uma espécie amplamente encontrada no estado, é considerada como subespontânea e não nativa, a qual está colonizando ativamente áreas previamente não ocupadas anteriormente (Koehler-Santos *et al.* 2006a; 2006b).

Histórico do gênero

O histórico do gênero *Passiflora* L. começa a se definir por ocasião da expansão européia durante a conquista e exploração do Novo Mundo, desde a sua descoberta, sendo talvez a planta americana que maior admiração causou aos colonizadores espanhóis dos séculos XVI e XVII, não só pela sua beleza, mas também pelo misticismo que a sua morfologia suscitou (Cervi, 1997). O gênero também era conhecido por povos pré-colombianos, demonstrado por artefatos produzidos por ourives nativos (Figura 1.1).



Figura 1.1. Flor de *Passiflora* (provavelmente *P. ligularis*) feita em ouro por ourives pré-colombianos da cultura Malagana na Colômbia, a.C. 200 - 200 d.C (Banco da República da Colômbia, Museu de Ouro, Bogotá) in Pérez (2007).

O nome *Passiflora* deve-se ao simbolismo que a primeira espécie representou aos homens de fé católica (atualmente conhecida como *Passiflora incarnata* L.), ao associarem as partes da flor e folhas em relação a alguns instrumentos da paixão de Cristo. Assim as folhas recordavam a lança que transpassou o Salvador na cruz; as gavinhas o açoite; a coroa de filamentos, de coloração vermelha e azul, a coroa de espinhos; os três estiletos simulavam os

três cravos e as cinco anteras representavam as chagas do Cristo crucificado (Cervi, 1997) (Figura 1.2).



Figura 1.2. Primeiros desenhos de *Passiflora*, representando a paixão de Cristo: a esquerda, Parlasca, monge Dominicano, em 1609; a direita, por Euginio Petrelli em 1610 (extraídos da obra de Ulmer & MacDougal 2004, **Passiflora** – Passionflowers of the World)

Segundo Cervi (1997) somente no final do século XVII é que surge a primeira citação científica e taxonômica referente a passiflora, e somente em 1735, com a primeira edição do “Sistema Naturae” de Linneau, que se estabelece o gênero *Passiflora*, com a descrição de *Passiflora incarnata* L. Em 1938, E. P. Killip publica “The American Species of Passifloraceae”, sendo esta a obra revisional mais completa par a família até então.

Caracterização morfológica

Cervi (1997) descreve o gênero *Passiflora* sendo caracterizado pela presença de vegetais herbáceos ou cipós, que se elevam com o auxílio de gavinhas, ou ainda arbustos subscandentes. A haste é cilíndrica e as folhas são sempre alternadas, podendo ser inteiras ou lobadas, com margem geralmente inteira ou serrilhada; usualmente trinervadas, mas ainda pentanervadas. As flores apresentam cálice e corola, sendo as pétalas e sépalas sempre em

número de cinco. As sépalas podem ser lineares, oblongas, lanceoladas e de coloração normalmente igual ao tubo do cálice, e na maioria das vezes carnosas. As pétalas geralmente são membranáceas e nascem sobre a margem do tubo do cálice, sendo alternas com as sépalas e de coloração muito variável. No interior no tubo do cálice encontra-se um conjunto de estruturas ordenadas em uma ou mais séries circulares sucessivas e de grande importância taxonômica denominada corona. As séries externas (radii) costumam ser alongadas e coloridas, enquanto que as internas são menores, e denominadas “pali”.

Ainda segundo Cervi (*l.c.*), internamente a corona também está presente um anel nectarífero, constituído por uma proeminência anelar entre o límen e o opérculo, que é responsável pela produção de néctar. As anteras e o ovário estão situados acima do androginóforo, que é uma coluna que se inicia na base central do tubo do cálice. O androceu é isostêmone, com cinco estames livres no ápice e mais ou menos soldados na base. Os filamentos dos estames são dorsifixos e as anteras são tetrasporangiadas. O ovário é unilocular, está acima dos estames e apresenta três placentas parietais com rudimentos seminais anátropos. O fruto é uma baga de formato, cor e tamanho variável, encerrando em seu interior inúmeras sementes comprimidas, de testa dura e com o arilo recobrendo toda a semente.

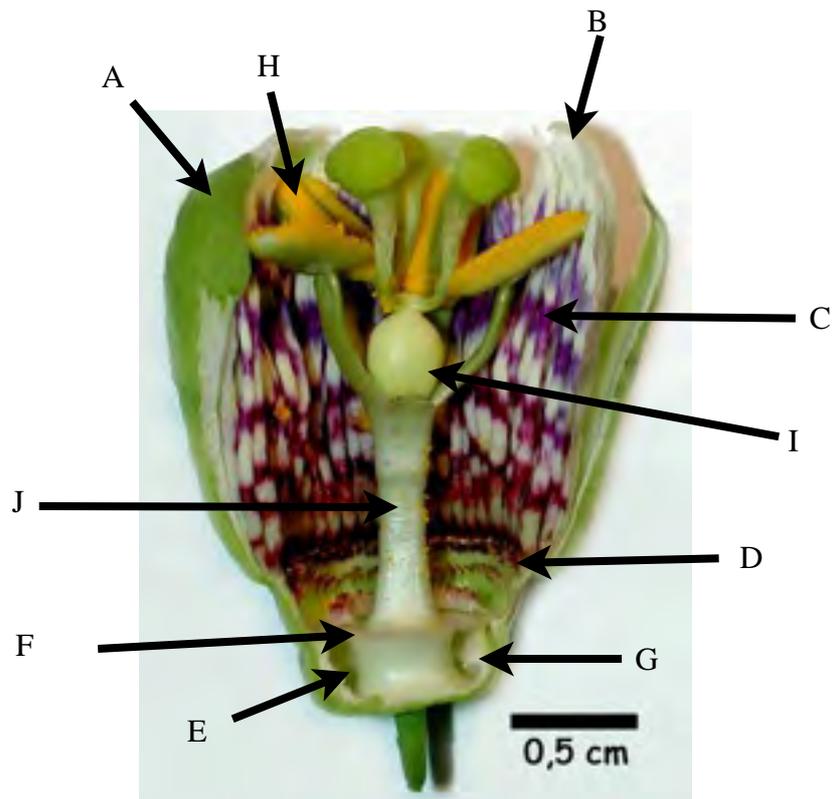


Figura 1.3. Flor de *P. elegans* com remoção de parte dos verticilos. A - cálice; B - corola; C - corona (radii); D - corona (pali); E - anel nectarífero; F - límen; G - opérculo; H - anteras; I - ovário; J - androginóforo.

Classificação da família e os problemas taxonômicos infragenéricos

A obra “The American species of Passifloraceae” (Killip, 1938) é atualmente o trabalho revisional mais abrangente para a família, no qual é citada ocorrência de quatro gêneros para o Novo Mundo: *Dilkea*, *Mitostemma*, *Tetrastylis* e *Passiflora*, sendo o último composto por vinte e dois subgêneros e estes, por sua vez, subdivididos em seções e/ou séries. O autor também afirma que o gênero é primariamente do novo mundo, precisamente

da região tropical da América do Sul, localizando-se no Centro-Norte do Brasil, o seu maior centro de distribuição geográfica.

Feuillet & MacDougal (2003) propõem somente quatro subgêneros, baseados principalmente em caracteres morfológicos e citogenéticos.

Muschner *et al.* (2003) simplificam os 22 subgêneros propostos por Killip (1938), em três clados denominados *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*, utilizando três marcadores moleculares, sendo dois deles plastidiais (trnL-trnF e rps4) e um nuclear (nrITS). A monofilia de *Passiflora* não pode ser comprovada neste trabalho e as inter-relações entre os clados e entre os gêneros relacionados em cada clado, permanecem não resolvidas (Muschner *et al.* 2003).

Hansen *et al.* (2006) analisaram dois marcadores plastidiais (rpoC1 e trnT) e seus resultados sugerem uma redução dos 22 subgêneros propostos por Killip (1938) para quatro subgêneros, reforçando dessa forma o proposto por Feuillet & MacDougal (2003) que consideram o gênero *Passiflora* como circunscrito com os subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*. A monofilia dos grupos morfológicos dos subgêneros com número cromossômico $n=6$ e $n=9$, correspondendo aos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, respectivamente, são fortemente suportados.

As espécies relacionadas com os subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, e *Passiflora* deixam poucas dúvidas a respeito de seus graus de parentesco (Muschner *et al.*, 2003; Feuillet & MacDougal, 2003; Souza-Chies *et al.*, 2005; Krosnick & Freundstein, 2005; Hansen *et al.* 2006; Pérez, 2007), ficando somente o subgênero *Deidamioides* com o posicionamento indefinido até o momento.

Para o presente trabalho adotou-se a classificação de Feuillet & MacDougal (2003), e abaixo são descritos três dos quatro subgêneros:

O subgênero *Astrophea* (MacDougal & Feuillet, 2004)

O subgênero *Astrophea* apresenta 57 espécies distribuídas nas Américas Central e do Sul. São lianas lenhosas, as vezes pequenas árvores. Apresentam folhas não lobadas, nunca variegadas e com venação pinada com dois nectários peciolares próximos do ápice e ausentes na lâmina foliar e com minúsculas estípulas. Os pedúnculos apresentam de 1 a 5 flores, que nascem raramente na base de gavinhas; brácteas minúsculas e flores coloridas, variando de rosa e vermelho até alaranjado, com corona amarela e tubo floral, ou brancas com corona amarela; opérculo não plicado e número cromossômico $n=12$.

P. haematostigma Martius (Fig. 1.4)

Passiflora haematostigma Martius ocorre desde o Estado de Minas Gerais até Santa Catarina, descendo pela costa leste do Brasil. Planta de hábito escandente, lenhosa e com gavinhas pouco desenvolvidas. Apresenta estípulas setáceas e caducas, pecíolos com 2-4 centímetros e com dois nectários apicais. As folhas são inteiras e não lobadas, podendo chegar a até 13 cm de comprimento, com brácteas setáceas e decíduas. O tubo floral é cilíndrico-campanulado, com flores brancas medindo cerca de 3-4 cm de comprimento por 4-6 cm de diâmetro. As sépalas e pétalas são brancas e lineares, e apresentam corona com duas séries filamentos, sendo a interna de formato clavado. O ovário é piloso e cinco anteras encontram-se presas na extremidade do androginóforo. Sacco (1980).



Figura 1.4. *P. haematostigma* (Sacco, 1980)

O subgênero *Deidamioides* (MacDougal & Feuillet, 2004).

O subgênero *Deidamioides* apresenta 13 espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central. São lianas lenhosas e as vezes apresentam gavinhas bifurcadas ou discos apicais;

folhas não lobadas e nunca variegadas, com estípulas minúsculas e dois nectários peciolares; pedúnculos com uma ou duas flores ou com flores nascendo a partir das gavinhas; brácteas minúsculas e flores brancas e esverdeadas com corona amarela, ou amarelas com corona alaranjada e número cromossômico $n=12$.

O trabalho não apresenta nenhuma espécie do do subgênero.

O subgênero *Decaloba* (MacDougal & Feuillet, 2004)

O subgênero *Decaloba* apresenta 214 espécies distribuídas pelas Américas do Sul e do Norte, Sudeste Asiático e Austrália. São lianas, com pequenas flores, pequenos frutos de cor roxa. Folhas 2,3-lobadas, raramente 5-lobada, as vezes variegadas. Estípulas pilosas e foliáceas; dois nectários peciolares ou ausentes, raramente quatro; lâmina com nectários como pontos entre as nervuras principais. Flores pequenas e variáveis, de cor verde-amarelada a brancas, ou avermelhadas, raramente com tubo floral; corona com 1-3 séries de filamentos, as vezes vermelhos com manchas rosas; opérculo plicado e frutos roxos a pretos, ou esverdeados, amarelos, laranjas, ou avermelhados. Número cromossômico $n=6$.

P. suberosa L. (Fig. 1.5)

P. suberosa é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, ocorrendo desde os Estados Unidos até a Argentina e sul do Brasil, com exceção das Guianas. Caracteriza-se como uma liana glabra ou pubescente, de caule espessamente suberificado nas porções inferiores. Caracteriza-se como uma liana glabra ou pubescente de caule suberificado nas porções inferiores, com estípulas lineares subuladas, folhas com grande polimorfismo, variando em forma e tamanho, de inteiras até profundamente trilobadas. O pecíolo é biglandular, de glândulas subsésseis. As flores apresentam coloração amarelo-esverdeada, são axilares,

solitárias ou aos pares, e desprovidas de pétalas, medindo cerca de 0,8 a 3,0 cm de diâmetro. O ovário é ovóide a sub-globoso e com cinco anteras no ápice do androginóforo. O fruto é de formato globoso a ovóide, de cor púrpura escuro ou preta quando maduro (Sacco, 1980).

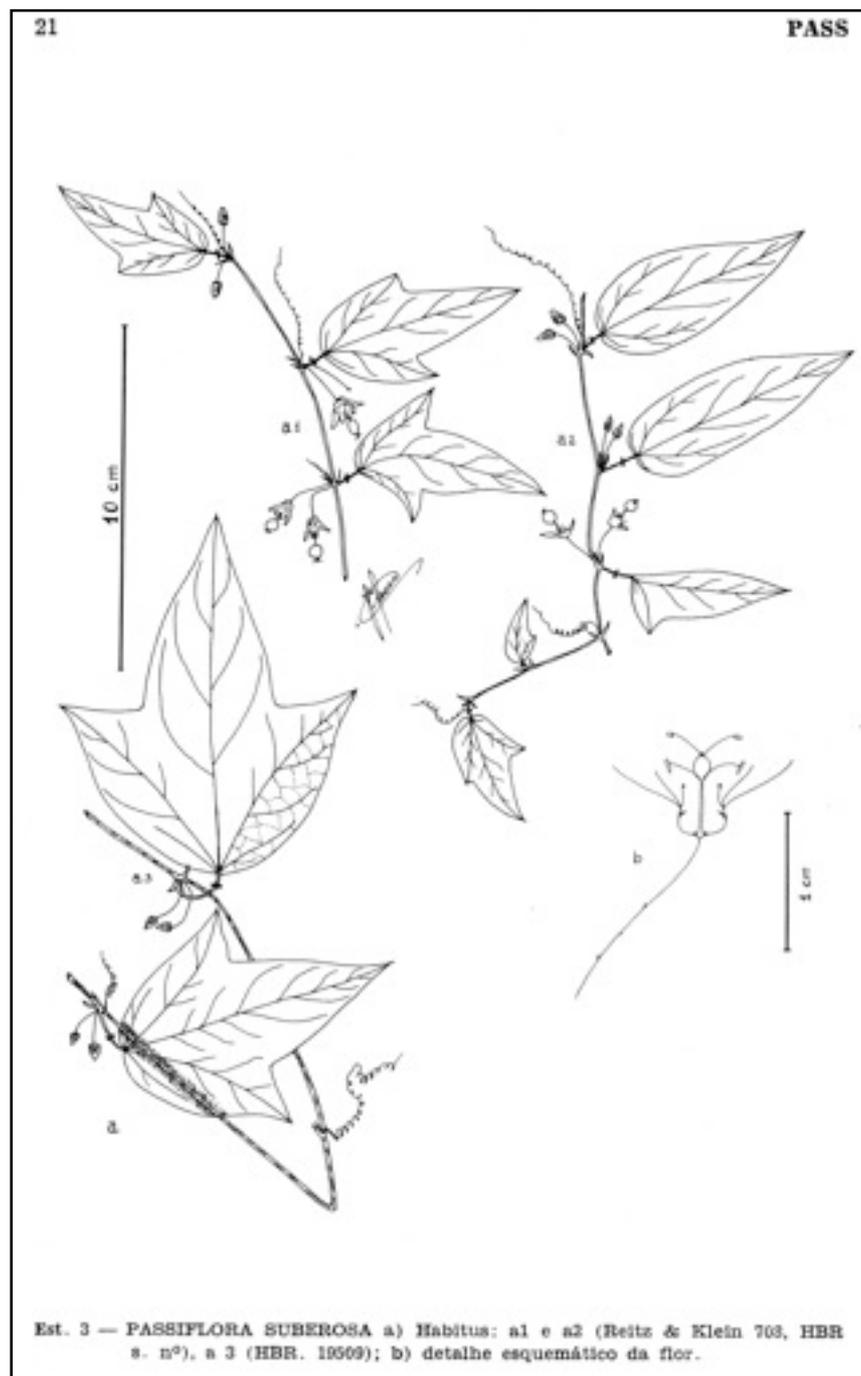


Figura 1.5. *P. suberosa* (Sacco, 1980)

O subgênero *Passiflora* (MacDougal & Feuillet, 2004)

O subgênero *Passiflora* contém 236 espécies ocorrendo principalmente na América do Sul. Hábito escandente, sendo algumas lianas lenhosas, com flores coloridas e grandes frutos. As folhas costumam ser lobadas e nunca variegadas com 2 a 6 nectários peciolares. As flores são axilares e de tamanho variado, e corona podendo apresentar de 1 a até 20 séries. Número cromossômico $n=9$, podendo ocorrer também $n=10$ ou 11 .

P. elegans Masters (Fig. 1.6)

Passiflora elegans Masters é uma espécie restrita à região sul da América do Sul, ocorrendo no Brasil somente nos estados do Rio Grande do Sul e parte de Santa Catarina, na Argentina nas províncias de Córdoba e Misiones e no Uruguai na Ilha Gaspar e Salto (Deginani, 2001).

Trata-se de uma planta escandente, glabra, e de caule cilíndrico. As folhas são simples, trilobadas no terço superior e truncadas na base. As flores medem cerca de 1,45 cm de diâmetro. Apresentam tubo do cálice curto e campânulado. As sépalas são oblongo-lanceoladas, verdes na face abaxial e alvas na face adaxial. As pétalas são brancas e membranosas. Apresenta corona de filamentos com 4 séries bandeados de branco e lilás na porção inferior e de branco e roxo na no ápice.

O ovário é globoso e com cinco anteras no ápice do androginóforo. O fruto é de formato globoso e amarelo quando maduro (Cervi, 1997).

É uma planta trepadeira que atinge os pontos mais altos da mata, com exemplares completamente desenvolvidos chegando a apresentar tronco com diâmetro de superior a 100 mm (Sacco, 1962).

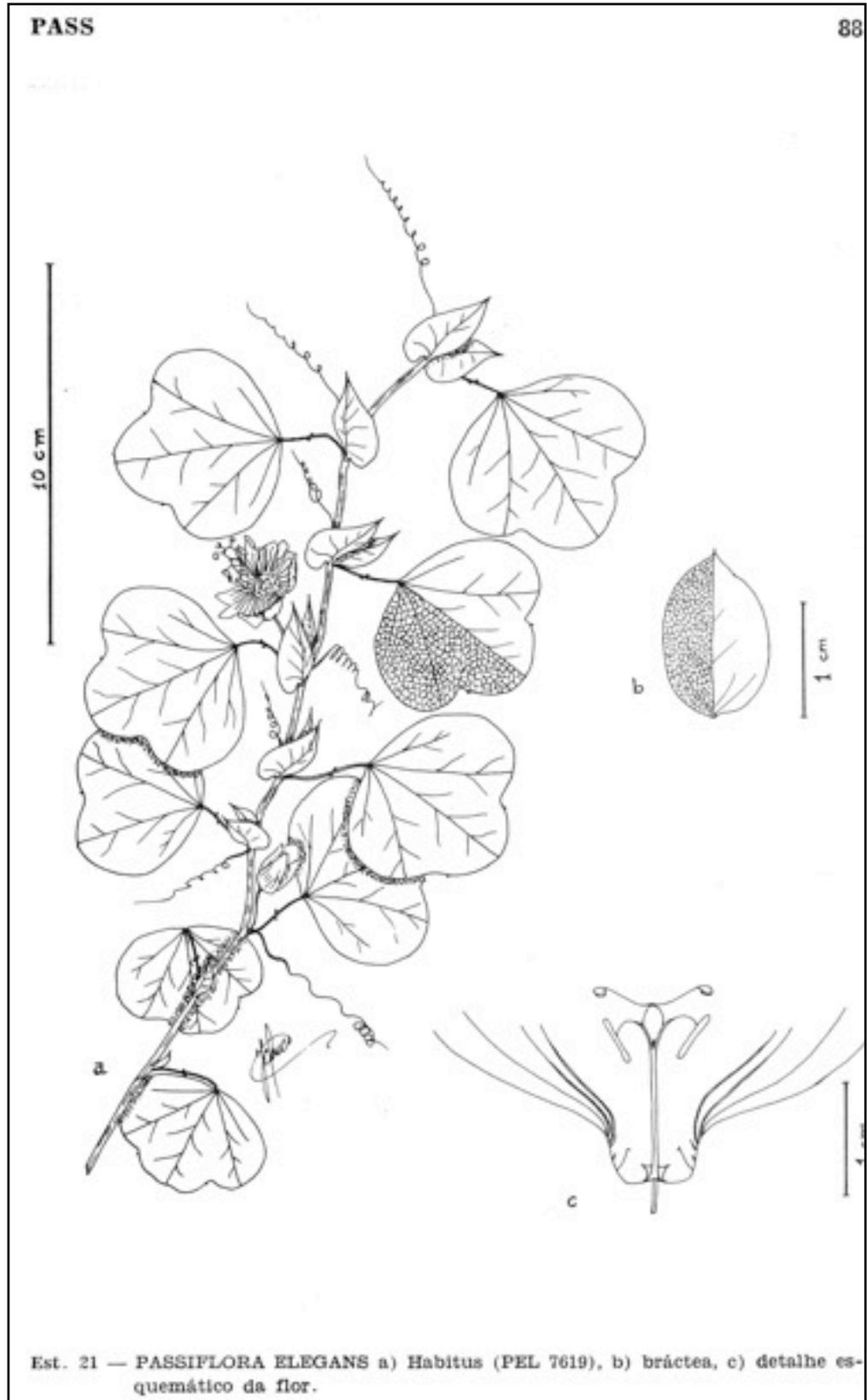


Figura 1.6. *P. elegans* (Sacco, 1980)

Importância do gênero

Algumas espécies do gênero têm sido intensivamente cultivadas nos últimos tempos visando o interesse comercial, e dentre elas pode-se citar o popular maracujá azedo (*Passiflora edulis*). A palavra maracujá tem origem a partir de morukuiá do idioma tupi, que significa em português “cuia para beber água”.

De acordo com dados do IBGE (2003) o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com uma produção de 479 mil toneladas, em uma área de 33 mil hectares. A Bahia é o estado de maior produção, com 77 mil toneladas, em 7,8 mil hectares, sendo São Paulo o segundo maior produtor com 58 mil toneladas em 3,7 mil hectares.

Espécies como *P. edulis* e *P. incarnata* costumam ser muito utilizadas também na medicina caseira, principalmente na região sul do país, ora sob a forma de chá, feito com as folhas, ora sob a forma de refresco feito com a parte suculenta do fruto. Na medicina popular, a folha é utilizada para candidíase bucal, limpeza do sangue e febrífugo (Sacco, 1980).

Dhawan *et al.* (2004), em uma revisão sobre os principais compostos químicos encontrados em espécies do gênero, relatam a ocorrência de alcalóides, fenóis e glicosídeos cianogênicos, o que demonstra o potencial farmacológico do gênero.

A reprodução em *Passiflora*

Pesquisas envolvendo biologia floral ainda são escassas para o gênero, sendo restritas a poucas espécies de interesse econômico. Alguns estudos foram realizados sobre a biologia floral de *P. suberosa* (Acioli, 1999, 2003), *P. foetida* (Amela Garcia, 1998), visando uma maior compreensão ecológica do processo de polinização e interação com o agente polinizador.

Dentre os trabalhos realizados, foram obtidos dados importantes como o movimento das peças florais, horário de antese e fechamento das flores, tipo de sistema reprodutivo, produção de néctar, disponibilidade e morfologia do pólen, receptividade dos estigmas, visitantes florais e viabilidade da semente (Koschnitzke e Sazima, 1997).

Embriologia do gênero *Passiflora*

Apesar do gênero *Passiflora* apresentar inúmeras espécies, poucas foram analisadas com relação aos seus caracteres embriológicos e dentre os principais trabalhos, Cook (1909) descreve etapas da formação do saco embrionário em *P. adenophilla*, com destaque ao peculiar crescimento do tubo polínico dentro da sinérgide.

Raju (1952) analisou o pólen de *P. Leschenaultii* e *P. foetida*, e descreve aspectos da formação do tapete e pólen, formação do rudimento seminal, saco embrionário e desenvolvimento da semente. Na sequência, (Raju, 1956) analisa etapas da formação dos esporângios e a gametogênese de *P. calcarata*.

Padhye & Despande (1960) analisaram os gametófitos masculino e feminino em *P. foetida* com destaque a presença de um arquespório multicelular no rudimento seminal.

Trabalhos mais recentes analisaram a formação do pólen (Souza & Pereira, 2000) e do saco embrionário (Souza *et al.*, 2002) em *P. edulis*, e Amela Garcia *et al.* (2002, 2003), sendo os dois últimos os únicos trabalhos de embriologia abordando aspectos ultraestruturais do gênero, com a descrição do pólen e saco embrionário, respectivamente.

Herança organelar

Uma característica da família que tem levantado questionamentos nos últimos tempos é a transmissão diferenciada de organelas parentais. O trabalho de Corriveau &

Coleman (1988) foi o pioneiro para a família Passifloraceae, detectando a presença de DNA citoplasmático na célula generativa em *Passiflora edulis*.

Posteriormente, outros trabalhos com o gênero *Passiflora* demonstraram variações com relação a herança plastidial, podendo variar dentro dos subgêneros, podendo ser materna para o subgênero *Decaloba* e paterna para espécies do subgênero *Passiflora*, enquanto que a herança mitocondrial materna se manteve nos dois grupos analisados por Muschner *et al.* (2006). Esses autores sugerem também a importância no conhecimento do tipo de herança, principalmente na interpretação de dados sobre o fluxo de genes do citoplasma para o gênero.

Da mesma forma, Pérez (2007), com a análise dos genomas extranucleares em espécies de *Passiflora*, sugere que as divergências entre os subgêneros parecem ligadas as taxas de evolução, a evolução reticulada e, também ao modo de transmissão organelar do grupo.

Adicionalmente, alguns resultados têm despertado interesse especial, como nos dois casos a seguir. No primeiro deles, Hansen *et al.* (2007), analisando cruzamentos intra- e inter-específicos, observaram que os resultados para a herança plastidial poderiam se expressar de forma variável. Em todos os cruzamentos intra-específicos os resultados evidenciaram a herança como sendo do tipo materna, e cruzamentos entre indivíduos da progênie mostrou casos de herança biparental, enquanto que todos os cruzamentos interespecíficos resultaram em herança do tipo paterna. No segundo caso foi analisada a ultraestrutura do pólen em *P. caerulea* por Amela Garcia *et al.* (2002) e somente mitocôndrias estavam presentes no citoplasma da célula generativa. Essa constatação discorda dos resultados apresentados por Muschner *et al.* (2003, 2006) para o clado *Passiflora*, segundo a classificação proposta por Feuillet & MacDougal (2003), como grupo no qual o tipo de herança plastidial seria paterna, ou seja, transmitida pelo pólen com presença obrigatória de

plastídios.

Uma vez que resultados adicionais com outras espécies evidenciaram a herança plastidial como paterna, análises complementares são necessárias a fim de confirmar o tipo de herança característica para os demais subgêneros, principalmente *Passiflora*.

No entanto, problemas na análise e interpretação do pólen de *P. caerulea*, podem ter ocorrido, visto que o trabalho mostra somente uma imagem em seção transversal, não contemplando as extremidades do alongado citoplasma, onde poderiam estar dispersos os plastídios, ou então a presença de plastídios não é uma característica incorporada ao subgênero *Passiflora*, o que justifica análises adicionais para o grupo. Por outro lado, não se tem informações quanto ao tipo de herança em *Astrophea* e *Deidamioides*. Esse pouco conhecimento dentro da própria família contrasta com o estabelecimento de herança plastidial materna para Violaceae, e paterna e biparental para Clusiaceae (Corriveau & Coleman, 1988) e também para Turneraceae, sendo essa última já confirmada em níveis molecular (Shore *et al.* 1994; Shore & Triassi, 1998, Zhang *et al.* 2003) e estrutural (Ji *et al.* 2004). Cabe ressaltar que Turneraceae é um grupo taxonômico muito relacionado com Passifloraceae (APG II, 2003) de forma que Cronquist (1981) sugere que juntamente com Malesherbiaceae, constituem três famílias muito relacionadas e, provavelmente, compartilhem um ancestral em comum com Flacourtiaceae.

Dessa forma, a análise das características ontogenéticas, durante as etapas de formação de rudimentos e grãos de pólen, poderiam fornecer informações adicionais à embriologia do grupo, bem como a análise da presença ou ausência de plastídios e mitocôndrias na célula generativa do pólen das espécies em estudo, poderia fornecer informações complementares a respeito do potencial genético para a herança organelar em espécies de Passifloraceae e de Malpighiales (APG II, 2003).

2- Objetivos

Objetivo geral

◆O presente trabalho tem por objetivo acompanhar o processo de formação dos rudimentos seminiais e grãos de pólen nas espécies *Passiflora elegans* e *P. haematostigma*;

Objetivos específicos

◆fornecer informações sobre a formação dos esporângios;

◆detectar os eventos relacionados com esporogênese e gametogênese;

◆acompanhar a ocorrência ou não de plastídios e mitocôndrias no citoplasma da célula generativa;

3 - Material e Métodos

O material analisado é proveniente de coletas realizadas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O material botânico foi coletado a partir de exemplares de *P. elegans* e *P. suberosa* ocorrentes no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com material testemunho incorporado ao Herbário ICN do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob números 152108 e 152427, respectivamente. As amostras de *P. haematostigma* foram provenientes do município de Santa Rosa de Lima, no Estado de Santa Catarina, com registros no mesmo herbário, sob o número 152173.

Foram coletados botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e após dissecação, ovários e anteras foram fixados em solução de formaldeído 2% e glutaraldeído

2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) (Roland & Vian 1991). Para análise em microscopia de campo claro, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH7,2, desidratado em série etílica e incluído em hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid 1983). Cortes com espessura entre 2 e 5 μ m foram confeccionados em micrótomo de rotação Zeiss Mikron. Como coloração básica, foi utilizado Azul de Toluidina O 0,05% pH4,4 (Feder & O'Brien, 1968) e Azul de Astra com Fucsina Básica dos identificação dos estratos da exina (Nepi & Franchi, 2000). Os testes histoquímicos realizados foram: lugol, para amido (Sass, 1951); Alcian Blue 8GX 1% em solução acética 3%, para ácidos mucopolissacarídeos (Lillie, 1965); Coomassie Blue Brilhante R-250 0,25% em solução acética 7%, para proteínas totais (Southworth, 1973); Ácido Periódico - Reativo de Schiff (reação de PAS), para polissacarídeos totais (O'Brien e McCully, 1981); Sudan III em etanol 80%, para lipídios, (Sass, 1951); Auramina O, com filtro de excitação sob luz ultravioleta (540 nm), para a localização de lipídios na esporoderme; Azul de Anilina em concentração 0,1% em tampão fosfato (pH 8,5), seguida de excitação sob luz ultravioleta (395 nm), para localização de calose (Martin, 1959) e Calcofluor White em solução aquosa 0,01% (Pacini *et al.*, 1999) com excitação sob luz ultravioleta (395 nm), para identificação de celulose.

As observações e fotomicrografias foram realizadas ao microscópio Leica DMR-HC, com captura digital através de câmera Leica DFC 500 e microscópio Olympus BX 41 com máquina fotográfica analógica acoplada, sendo utilizados os filmes Kodak ProImage e Fuji Superia, ASA 100.

Para a análise ultraestrutural, o material fixado foi lavado em em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2), pós-fixado em OsO₄ 1% com K₃Fe(CN)₆ 0,4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) (Weber, 1992). Como material de inclusão, foram utilizadas resina epoxi de baixa viscosidade (Spurr, 1969) e LR White (EMS Hard Grade). Seções ultrafinas, entre 80

e 90 nm, foram obtidas com ultramicrotomo Leica Ultracut UCT equipado com navalha de diamante. As seções foram, montadas em telas de 200 mesh, contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (Bozzola & Russel, 1998) e solução de chumbo 5% (Hanaich *et al.*, 1986) e permanganato de potássio com solução de chumbo (Bray & Wagenaar, 1978). As seções foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1200 ExII sob 80 kV, com o registro de imagens obtido em películas preto e branco Kodak SO 163 e Kodak 4489.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura, grãos-de-pólen provenientes de antera deiscentes, não-acetolisados e acetolisados (Erdtman, 1960) foram apenas desidratados em estufa a 50 °C, aderidos em suportes de alumínio, recobertos com ouro em metalizador Balzers SCD 050, observados em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6060 com tensão de 20kV. A nomenclatura utilizada para caracterização do pólen segue Punt *et al.* (2007) e as terminologias utilizadas para nomenclatura embriológica seguem Doyle (1953).

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

4 - Resultados

Gineceu

As espécies apresentam o ovário tricarpelar e unilocular, formado pela fusão de três carpelos que se projetam individualmente no estágio de botão floral jovem (fig 4.1A). No ovário ainda jovem, cada uma das três regiões apresenta uma nítida polarização celular, apresentando cada uma a individualização de uma porção dorsal, com células vacuoladas e opostas a porção ventral, com células de citoplasma denso e com divisões celulares mais frequentes. Na porção mediana central de cada carpelo percebe-se também a diferenciação do meristema provascular dorsal do ovário (fig.4.1A).

Os carpelos fusionam-se através de suas porções laterais, diferenciando duas zonas placentárias contíguas, de posição ventral e de estrutura trizonada (Fig. 4.1B). Ao longo do desenvolvimento desse órgão, ocorre uma proliferação celular nessa região, formando um maciço placentário, que dá origem a até seis rudimentos seminiais em um mesmo plano de corte. Oposto ao maciço placentário ocorrem três feixes vasculares ventrais, resultado da fusão dos feixes ventrais carpelares (fig. 4.1C).

O ovário jovem, seccionado longitudinalmente, revela a projeção de inúmeros rudimentos seminiais (fig. 4.1D), a partir das três regiões placentárias voltadas para o interior do lóculo (fig. 4.1C).

Em ambas as espécies, o ovário apresenta formato triangular, de ângulos arredondados e com feixes vasculares dorsais em seus vértices, enquanto que os feixes ventrais iniciam a diferenciação próximos às regiões medianas entre os ângulos, locais esses, onde emergem os rudimentos seminiais (fig. 4.1.C e 4.2A). A espécie *P. elegans* apresenta ovário glabro, enquanto que *P. haematostigma* apresenta ovário piloso, com tricomas unicelulares, originados pela diferenciação de células da epiderme carpelar, ao mesmo tempo

que os rudimentos seminiais encontram-se já alongados e em processo de curvatura (fig 4.2A, B, C e D).

O estilete é tripartido, alongado e comunica a porção apical do ovário com o estigma. Anatomicamente, o estilete é do tipo sólido, e em vista transversal apresenta formato circular, com um leve sulco na porção ventral (fig.4.2E). A epiderme contém células de formato variado quando vistas em corte, variando de retangulares a contorno circular, sendo as primeira mais freqüentes, e organizadas circundando o parênquima de células vacuoladas e de tamanhos variados localizados na região central (fig. 4.2E).

Um feixe vascular colateral ocorre na porção dorsal (fig.4.2F), ao longo da maior extensão do órgão, assumindo formato côncavo na porção apical próxima ao estigma (fig. 4.2G). O tecido transmissor ocorre oposto ao feixe vascular, próximo a região ventral, sendo composto por pequenas células em seção transversal (fig. 4.2F), porém de formato alongado acompanhando a maior extensão do estilete, quando em seção longitudinal (fig. 4.2G,H). Na porção distal do estilete, esse tecido prolifera em forma de “pincel”, não alcançando o estigma. A interface entre o estigma e o tecido transmissor é preenchida por células parenquimáticas de parede celular fina e formato irregular (fig.4.2G,I).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento, a porção apical do estigma apresenta uma superfície levemente sinuosa (fig. 4.3A) e células de núcleo evidente com porções de cromatina condensada. As células da camada subdérmica apresentam um grande vacúolo e núcleo posicionado junto à parede periclinal externa (fig. 4.3B). Na sequência, a superfície externa apresenta uma variação conformacional, caracterizada pelo alongamento das células da camada subdérmica. Essa projeção é acompanhada por divisões anticlinais e pelo alongamento radial das células epidérmicas que aumentam em seu número (fig. 4.3C).

Na sequência, as células epidérmicas, em pontos descontínuos passam a ser

deslocadas por células da camada subdérmica, através de um alongamento longitudinal (fig. 4.3C), seguido por divisões transversais (fig. 4.3D). A célula derivada externa fica em contato direto com células epidérmicas, principalmente com a parede anticlinal interna, local esse onde predomina o acúmulo de compostos de natureza péctica (fig. 4.3D,G).

Ao final do desenvolvimento tem-se a formação de uma estrutura especializada na superfície estigmática, formada principalmente por células do estrato epidérmico, com a participação de algumas poucas células da camada subdérmica (fig. 4.3D,E).

Uma vez formada, a superfície estigmática aparenta um aspecto papiloso em sua extremidade, constituída por emergências epidérmicas, que analisadas em microscopia eletrônica de varredura, mostram-se como inúmeras projeções multicelulares (fig. 4.3E) e que, vistas em corte transversal sob microscopia fotônica, mostram-se como inúmeras projeções multicelulares (fig. 4.3F).

As estruturas estigmáticas formadas, participam dos eventos de polinização do gênero *Passiflora*, visto que após a germinação do pólen, o percurso do tubo polínico coincide com a porção central da emergência, rica em compostos pécticos ao longo das paredes anticlinais e periclinais internas (fig. 4.3G).

Os rudimentos seminais emergem da placenta através de divisões periclinais da camada central e, principalmente, anticlinais nas camadas dérmica e subdérmica, acompanhando a projeção do rudimento (fig. 4.4A). Na sequência, tornam-se alongados, adquirindo também a estrutura trizonada (fig. 4.4B).

Uma célula central da camada subdérmica divide-se periclinamente, iniciando a formação do esporângio do tipo crassinucelado. A derivada externa, denominada célula parietal primária, participa da formação dos estratos parietais do nucelo, enquanto que a derivada interna, denominada célula arquesporial, participa da formação do arquespório. As

células posicionadas abaixo das células do jovem esporângio, derivadas de proliferação da camada central e camada subdérmica participam da formação do funículo (fig.4.4C).

O jovem rudimento seminal alonga-se devido a uma proliferação desigual das células da região funicular, resultando na curvatura anátropa característica das espécies de *Passiflora* (fig.4.4D).

Os tegumentos surgem na região entre o nucelo e funículo, sinalizado através do alongamento de células epidérmicas, antecedendo a divisão periclinal das mesmas (fig. 4.4D; 4.5A). Ambos os tegumentos se formam exclusivamente por divisões periclinais da camada dérmica, com o tegumento interno surgindo primeiro (fig. 4.4D; 4.5A) sendo acompanhado na seqüência pelo tegumento externo, algumas células epidérmicas abaixo do sítio de formação do primeiro (fig.4.4D; 4.5B). A análise da morfologia externa, através de microscopia eletrônica de varredura, revela a formação de dois anéis circulares contíguos, próximos da região apical do rudimento seminal (fig.4.5C,D).

A epiderme nucelar divide-se somente no plano anticlinal, acompanhando a proliferação celular do nucelo, decorrente do incremento oriundo das divisões periclinais da camada sub-dérmica, enquanto que os tegumentos avançam alcançando a região mediana do nucelo (fig.4.5B; 4.6A).

As células arquesporais apresentam variações que antecedem o evento meiótico, visto que dividem-se mitoticamente antes de entrar em diferenciação celular pré-meiótica (PCD) (fig. 4.6A,B). Posteriormente, outras divisões podem ocorrer tanto no plano periclinal (fig. 4.6B), quanto anticlinal (fig. 4.6C) resultando em duas novas células. As divisões podem prosseguir (fig. 4.6D), de forma que o número e a forma das células resultantes podem variar (fig. 4.6E,F).

Ginosporângio e ginosporogênese

As células do arquespório diferenciam-se das demais células do nucelo pelo tamanho e posição, visto que são maiores e posicionadas internamente em relação às demais células do esporângio. Apesar de observado um número variável de células arquesporiais, somente uma inicia a diferenciação celular pré-meiótica, sinalizada pelo formato oval a alongado, com núcleo em prófase I (fig 4.7A,B; 4.8A). Nessa fase, observa-se o início de divisões periclinais de células epidérmicas da porção funicular, que posteriormente irão formar o arilo (fig. 4.8A).

A meiose apresenta dois ciclos de divisão celular, sendo que no segundo, a díade calazal divide-se primeiro que a micropilar, resultando depois uma tétrade linear de ginósporos (fig. 4.8B).

A tétrade madura apresenta meiócitos com condições distintas de atividade nuclear, sendo o da célula de posição calazal, diferenciado dos demais, apresentando núcleo hialino e nucléolo conspícuo, diferentemente dos demais que apresentam porções de cromatina condensada em seus limites nucleares e nucléolos reduzidos (fig. 4.8C).

A meiose resulta uma tétrade linear de ginósporos (fig. 4.7C; 4.8C). O teste de calose foi negativo para a espécie *P. elegans* e nenhuma parede calósica foi constatada durante as etapas analisadas., enquanto que em *P. haematostigma* ocorreu a deposição de uma parede calósica somente nas paredes transversais dos meiócitos, com reação mais intensa no limite do ginósporo calazal (fig. 4.8D).

Durante a meiose, ocorre uma maior expansão do nucelo, decorrente da maior proliferação celular principalmente por divisões periclinais de células da região lateral e apical do esporângio, envolvendo o ginosporócito (fig. 4.7A,B,C,D). O teste para amido revelou um acúmulo preponderante, dessa substância ergástica, nas células dos estratos parietais, ocorrendo principalmente na porção apical e nas células da porção lateral próximas

da tétrade (fig. 4.7 D).

Os tegumentos continuam em constante desenvolvimento, aproximando-se do ápice do nucelo em *P. elegans* (fig. 4.7A) e ultrapassando-o em *P. haematostigma* (fig. 4.8A,B). Ambos os tegumentos apresentam dois ou três estratos celulares, exceto na sua porção apical, que apresentam um número maior de camadas (fig. 4.7D; 4.8A).

Ginogametogênese

O ginófito é de origem monospórica, sendo que somente o esporo calazal dá seqüência na formação do mesmo, com os demais assimilados pelas células do entorno. O gametófito feminino durante a sua fase uninucleada, apresenta um grande núcleo central que ocupa a maior porção do citoplasma da célula (fig. 4.9A). Nessa etapa, as células nucelares ao redor do ginófito, apresentam-se vacuoladas e aparentemente sem conteúdo de reserva, enquanto que as células da porção apical apresentam o citoplasma mais denso. A célula arqueosporial, abaixo da célula-mãe de ginósporo, sofre divisão mitótica e diferencia-se como as demais células do nucelo (fig. 4.9A).

A epiderme nucelar divide-se principalmente através de seções anticlinais acompanhando o crescimento em expansão do esporângio. No entanto, ao final da meiose, divisões periclinais são percebidas na extremidade apical, contribuindo por sua vez, no incremento de camadas celulares na porção apical do nucelo (fig.4.9B).

A primeira divisão mitótica resulta na formação de um gametófito alongado, binucleado, com núcleos deslocados para pólos opostos da célula, estando separados por um vacúolo central, contendo compostos pécticos dissolvidos no seu interior (fig. 4.9C,D).

Nessa fase do desenvolvimento, o nucelo apresenta vários estratos celulares e as células contíguas ao ginófito em formação, apresentam grandes vacúolos, sem apresentar

amido. O tegumento interno, com a sua projeção, delimita uma micrópila, formando a endóstoma (fig. 4.9C).

A fase tetranuclear é caracterizada pelo posicionamento ortogonal dos fusos acromáticos durante o evento de divisão celular. O núcleo da porção calazal divide-se perpendicularmente em relação ao maior eixo do nucelo (fig. 4.10A), enquanto que o núcleo do pólo micropilar divide-se no plano oposto (fig. 4.10A,B). O vacúolo central apresenta conteúdo similar a fase anterior, com maior acúmulo próximo ao pólo micropilar, região essa que expande lateralmente, comprimindo as células nucelares do entorno (fig. 4.10B).

As células nucelares da porção apical começam a acumular conteúdos de natureza péctica (fig. 4.10B) e as divisões periclinais da epiderme nucelar são mais pronunciada em *P. haematostigma* (fig. 4.10C), de forma que, após inúmeras divisões, resulta na formação de uma projeção apical que alcança o ápice dos tegumentos, bem mais aguda do que em *P. elegans* (fig 4.10B) formando um “capuz nucelar”.

O nucelo de *P. haematostigma* apresenta as regiões da hipóstase e da calaza mais alongadas do que de *P. elegans*, com proliferação celular seguindo linhagens celulares na região calazal (fig. 4.10D).

A ginogametogênese em ambas espécies é do tipo *Polygonum*, resultando um gametófito octonucleado formado a partir de três ciclos mitóticos de um único ginósporo funcional.

As células que compõem o aparelho oosférico apresentam formato oval a piriforme, com os vacúolos das sinérgides voltados para o pólo calazal e da oosfera voltado para o micropilar; e organizadas em um arranjo triangular (fig. 4.11A). As sinérgides apresentam núcleo proeminente, com ausência de parede celular na porção em contato com a célula média. Na porção apical, a parede apresenta um aspecto sinuoso, com acúmulo de substâncias

de composição péctica, constituindo o aparelho fibrilar (fig. 4.11B).

As antípodas são efêmeras e não perduram até a antese da flor. A célula média ocupa a maior parte do ginófito, apresentando um vacúolo de grandes dimensões e dois núcleos polares com nucléolos conspícuos, posicionados lateralmente na célula (fig.4.11C), que formarão o núcleo secundário de localização próxima ao aparelho oosférico (fig. 4.11D).

Nessa fase do desenvolvimento, as células da porção apical do nucelo apresentam suas paredes com alta concentração de compostos pécticos e parte de suas células são consumidas, restando poucas camadas celulares na região em torno do aparelho oosférico. As células restantes na porção apical são derivadas da epiderme nucelar, e apresentam aspecto frouxo e um comportamento particular, com incremento da matriz péctica em suas paredes (fig. 4.11D; 4.12A).

Os estratos parietais do nucelo, presentes em grande número até as fases finais da gametogênese, são consumidos em parte durante a diferenciação do aparelho oosférico, restando somente algumas camadas de células, que ocorrem próximas da epiderme nucelar. Todas as células dessa região são menores e apresentam densos citoplasmas, quando comparadas com as demais células da região lateral e basal do nucelo, que apresentam-se vacuoladas e com grãos de amido (fig. 4.11E).

Rudimento seminal

O rudimento seminal maduro apresenta curvatura anátropa, estando o nucelo envolto por dois tegumentos (fig. 4.12A,B,C). A micrópila é do tipo ziz-zag em ambas espécies, com poro micropilar formado por ambos os tegumentos, sendo a exóstoma e endóstoma formadas pelos tegumentos externo e interno, respectivamente composta pelo tegumento externo, e a endóstoma pelo interno. Cabe salientar que o tegumento interno apresentam maior tamanho

na porção funicular, mas sem ultrapassar o tegumento externo (fig. 4.12A).

O funículo é alongado e apresenta ainda um tecido provascular que alcança a região calazal (fig. 4.12A) e um arilo, que forma-se exclusivamente a partir de divisões periclinais da camada dérmica (fig. 4.12A,B,D), sendo mais desenvolvido em *P. elegans* (fig. 4.12D), do que em *P. haematostigma* (fig. 4.12E).

Ao final do desenvolvimento, os rudimentos seminais apresentam diferenças morfológicas entre as espécies, sendo o de *P. elegans* com um maior diâmetro na região mediana basal (fig. 4.12D), diferentemente de *P. haematostigma*, que mostra formato mais alongado (fig. 4.12E).

Androceu

Os estratos parietais e a formação do androsporângio

Os primórdios estaminais apresentam formato elipsóide no início do desenvolvimento, quando visto em seção transversal. Nessa etapa, percebem-se duas regiões distintas, uma dorsal constituída por células altamente vacuoladas, e outra ventral com células de citoplasma denso (Fig. 4.13A).

Percebe-se a presença dos três estratos celulares ao longo de toda extensão do primórdio, sendo o mais externo denominado camada dérmica (C1), o segundo estrato, imediatamente abaixo é denominado camada subdérmica (C2) e a porção restante e mais interna, denominada camada central (C3) (Fig. 4.13A).

A camada dérmica apresenta células de tamanho e formato variados, sendo maiores e altamente vacuoladas na porção dorsal, e menores e de seção retangular no lado ventral, com núcleos grandes e nucléolos conspícuos (Fig. 4.13A).

As células da camada subdérmica na porção ventral são semelhantes às do estrato

externo e dividem-se principalmente no sentido periclinal, sendo menos freqüentes as divisões no plano anticlinal, e divisões anticlinais ocorrem em células isoladas e próximas da região conectival, participando dessa forma, do processo de crescimento e expansão da antera (Fig. 4.13A).

A camada central, por sua vez, apresenta as células vacuoladas diferenciando-se das demais, e em sua região dorso-central um pequeno grupo de células de menor diâmetro constituído pelo meristema pró-vascular, na região conectival (Fig. 4.13A).

Com o desenvolvimento do esporângio, e conseqüentemente proliferação de células da camada subdérmica, o formato elipsóide é perdido e a antera passa a apresentar lobos. As divisões são mais pronunciadas na porção dorsal, sendo acompanhadas na seqüência pelas células da porção ventral. As divisões da camada subdérmica resultam na camada parietal primária (CPP), ocorrendo mais externamente, e as células arquesporais (CAr) estando voltada para a porção interna da antera. A primeira, através de inúmeras divisões, formará os estratos estéreis do esporângio, enquanto que a segunda, participará na formação do tecido arquesporial (Fig. 4.13B).

As células da camada parietal primária dividem-se periclinalmente, resultando dois novos estratos: a camada parietal secundária externa (CPSE) e camada parietal secundária interna (CPSI). Nessa fase é notada o surgimento de um sulco na região mediana da face ventral decorrente da maior proliferação celular na região dos lobos (Fig. 4.13B). Nos flancos do tecido arquesporial, divisões periclinais e anticlinais tanto em células da camada central, quanto da camada subdérmica, contribuem no processo de expansão da região conectival (Fig. 4.13B).

A CPSE divide-se formando endotécio e camada média e a CPSI diferencia-se no tapete, que por sua vez, sofre divisões anticlinais acompanhando a expansão do órgão (Fig.

4.13C). A camada média pode sofrer uma ou duas divisões periclinais, resultando 2 ou 3 estratos celulares (Fig. 4.13D).

As células arquesporais expandem consideravelmente seu volume e passam a acumular conteúdo de reserva no citoplasma, ao mesmo tempo que as células do tapete iniciam o processo de alongamento e divisão nuclear. (Fig. 4.13D).

Antera madura

A antera madura, em seção transversal mediana, apresenta variações morfológicas entre as duas espécies analisadas, com variação nos septos. *Passiflora elegans* apresenta em sua face dorsal, duas leves sinuosidades próximas a região central, enquanto que na face ventral um agudo sulco alcança a região mediana do conectivo, entre as duas tecas (fig. 4.14A). Em *P. haematostigma*, os sulcos dorsais são mais amplos, tornando as tecas mais separadas do que em *P. elegans* (fig. 4.14B).

O conectivo apresenta um feixe vascular em ambas as espécies (fig. 4.14A,B) e células com espessamentos em *P. haematostigma* (fig. 4.14B).

As células epidérmicas apresentam conteúdo de amido distribuído de maneira desigual entre os dois lados do septo, em ambas as espécies (fig. 4.15B,C), e somente *P. elegans* apresenta células estomiais na região próxima ao septo entre os dois esporângios (fig. 4.15A,B).

O endotécio encontra-se composto por um estrato celular em sua maior extensão podendo apresentar camadas adicionais próximas ao flancos da antera (fig. 4.14A,B). As células apresentam espessamentos em forma de U ao longo das paredes em ambas as espécies (fig. 4.16A,B,C) e um tipo adicional, de formato circular, foi observado em *P. haematostigma* em células próximas ao endotécio (fig. 4.16C).

Idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio foram observados na região conectival (fig. 4.16E) e próximas a zona estomial (fig. 4.16D) em *P. haematostigma*.

As camadas médias são efêmeras em *P. elegans* (fig. 4.16A,B) e persistem até a antese, adquirindo espessamentos em *P. haematostigma* (fig. 4.16B,E).

O tapete entra em colapso, não alcançando a antese, com os seus conteúdos citoplasmáticos liberados no lóculo ou sobre a superfície do pólen, constituindo o pollenkitt (fig. 4.16E).

Androsporogênese

A antera jovem completamente formada, apresenta quatro esporângios na região ventral-lateral e opostos ao conectivo, sendo este composto por células de formato irregular, com o feixe vascular inserido em sua região central (fig. 4.17A).

As células epidérmicas, assim como o endotécio e camadas médias, apresentam células vacuoladas com núcleo grande e evidente. As camadas médias apresentam núcleos com porções de cromatina condensada e pequenos vacúolos (fig. 4.17B,D).

Na porção ventral, internamente a epiderme tem-se o endotécio, sendo esse estrato composto principalmente, por uma camada celular ao longo de toda a sua extensão, e uma camada adicional nos flancos e região dorsal-lateral da antera (fig. 4.17B). Duas ou mais camadas médias, composta por células de menor tamanho (fig. 4.17D) e um tapete como estrato celular mais interno, delimitando e envolvendo completamente o arquespório, com células volumosas e de núcleo conspícuo (fig.4.17B,D).

As células do tapete são alongadas radialmente. Apresentam citoplasma denso, com pequenos vacúolos e núcleos com nucléolos conspícuos. Cabe mencionar que nessa etapa, as paredes do tapete não reagem ao teste para celulose (fig. 4.17C) e suas células são

polinucleadas (fig. 4.17D).

O arquespório, por sua vez, apresenta as maiores células do esporângio medindo cerca de 20 a 30 μm de diâmetro cada uma delas. Suas paredes são finas e reagem com menor intensidade ao teste de celulose. O citoplasma apresenta grandes grânulos de reserva, de constituição lipídica. Os núcleos são hialinos, com poucas porções de cromatina condensada e com nucléolos conspícuos (fig. 4.17D).

As células do tapete apresentam grandes vacúolos no citoplasma nas etapas antecedente a meiose, com núcleos apresentando cromatina condensada (fig. 4.18A), enquanto que as células arquesporiais passam a apresentar o citoplasma homogêneo (fig. 4.18A,B).

Ao iniciar a meiose, as células do tapete dividem-se periclinamente, formando estratos adicionais que projetam-se em direção ao lóculo do esporângio, ao mesmo tempo em que são observadas divisões e fusões nucleares em suas células (fig. 4.18C).

As células do tapete permanecem com o citoplasma homogêneo, enquanto que a cromatina inicia o condensamento do DNA, iniciando dessa forma os eventos relacionados com a prófase I meiótica (fig. 4.18C,D).

Concomitantemente ao início da meiose, uma parede calósica inicia a sua deposição, ao redor do androsporócito, primeiramente nos ângulos das células (fig 4.18D), e igualando-se ao longo de todo o contorno celular durante as fases de tétrade (fig 4.18E). Os eventos de divisão celular não são sincronizados entre células do mesmo esporângio, com a ocorrência de comunicações citoplasmáticas entre o citoplasmas de células vizinhas (fig. 4.18F).

O isolamento dos andrósporos jovens ocorre através da formação de uma parede de calose, após a fase tetranucleada, caracterizando dessa forma a citocinese como do tipo simultânea (fig. 4.19A,B). Durante a meiose, o esporângio expande e as células do tapete

passam a acumular conteúdos PAS positivos no interior de seus vacúolos. No interior do esporângio, percebe-se um distanciamento entre tétrades, possivelmente decorrente do acúmulo de conteúdos semelhantes aos encontrados nos vacúolos do tapete (fig 4.19A).

As tétrades apresentam arranjo espacial tetraédrico (fig. 4.19A,B,C,D). A esporoderme inicia a sua deposição ao redor dos futuros andrósporos ainda na fase de tétrade, através da formação da primexina sobre a parede de calose (fig. 4.19E). A primexina é depositada somente nas regiões intercolpos, sendo ausente nas regiões das aberturas e apresenta constituição polissacarídica (fig. 4.19F) e protéica (fig.4.19G). Através da reação de PAS, pequenos grânulos de natureza polissacarídica, possivelmente amido, são observados no seu citoplasma dos andrósporos (fig. 4.19F).

Associada à primexina, ainda na fase de tétrade de andrósporos, a estrutura da exina se torna complexa. Em *P. elegans* o aspecto reticulado da futura exina é percebido quando submetido à análise com contraste interferencial (fig.4.20A) e a deposição de esporopolenina no interior da tétrade foi confirmada com Auramina O (fig. 4.20B). Em *P. haematostigma*, os andrósporos foram observados momentos antes da completa dissociação do arranjo tetraédrico (fig. 4.20C) com a formação de uma parede de exina (fig. 4.20D) antes mesmo da completa dissolução da calose (fig. 4.20E).

Os andrósporos jovens são liberados no interior do lóculo e adquirem o formato esférico em ambas as espécies (fig. 4.21A,B). No entanto, em *P. haematostigma*, esse formato difere um pouco e apresenta seção triangular, quando vistas em seção (fig. 4.22B,C).

Os andrósporos apresentam núcleo grande e nucléolo conspícuo, com citoplasma denso, e com pequenos vacúolos em seu interior. Os testes histoquímicos revelaram a ocorrência de pequenos grânulos de amido, como compostos de reserva (fig. 4.21C) . Em *P. elegans* foi observado a presença de estruturas com cerca de 5 µm de diâmetro que reagem

negativamente aos testes histoquímicos (fig. 4.21B).

A exina cora-se de verde com Azul de Toluidina e a presença do oncus da exina é facilmente identificável pela sua composição péctica na região dos colpos de *P. haematostigma* (fig.4.22B,C).

Androgametogênese

A fase gametofítica inicia-se com a formação de vacúolo central e polarização do citoplasma do andrósporo (fig. 4.21D). O núcleo, antes central, passa a ocupar posição periférica e torna-se hialino e com nucléolo conspícuo. O citoplasma torna-se denso e concentra seu maior volume junto a célula polarizado (fig. 4.21D; 4.22D,E).

A exina encontra-se praticamente formada, enquanto que a intina projeta-se internamente, tornando-se espessa sob os colpos, e delgada nas regiões intercolpos (fig. 4.21D; 4.22E,F).

Após a polarização, o núcleo do andrósporo divide-se mitoticamente (fig. 4.22F), formando a célula vegetativa (CV) e a célula generativa (CG) (fig. 4.23A,B).

As células do tapete, que anteriormente se apresentava alongadas e organizadas ao redor do lóculo, passam a apresentar formato irregular (fig.4.21E; 4.22B). Os vacúolos citoplasmáticos continuam presentes e os núcleos poliplóides apresentam variações com relação ao grau de fusão, desde totalmente livres, passando a parcialmente fusionados até a completa fusão, visto apresentarem maior volume, quando comparados aos demais isolados (fig. 4.21E; 4.22B).

Uma vez ocorrida a divisão mitótica, o vacúolo central se reduz e o núcleo vegetativo retorna para a porção mediana do citoplasma, enquanto que a célula generativa mantém-se em posição parietal (fig. 4.23A,B).

A parede que separa as duas células é contínua com a intina (fig. 4.23A,B). A célula generativa migra para a região central da célula vegetativa, adquirindo formato lenticular a falciforme (fig. 4.23C,D). A partir dessa fase, a célula vegetativa acumula grande quantidade de amido em seu citoplasma. (fig.4.24A,B). Esse amido é hidrolisado de forma distinta durante a diferenciação do pólen, de forma que ambas as espécies apresentam pólen com e sem amido durante a antese (fig. 4.24C,D). Nos casos em que o amido é hidrolisado, o citoplasma é reativo a reação de PAS (fig. 4.24C), enquanto que nos demais, sem hidrólise, a reação de PAS do citoplasma é mais fraca (fig. 4.24D). A presença de pólen abortivo, em processo de degradação do citoplasma, sem conteúdo também foi observado durante as fases finais do desenvolvimento (fig. 4.23E,F).

O grão de pólen maduro apresenta, em seção, um núcleo vegetativo hialino, com formato arredondado e nucléolo conspícuo. A célula generativa encontra-se imediatamente ao seu lado e apresenta forma alongada e núcleo com porções de cromatina condensada (fig. 4.23C,D).

Os tecidos da antera acumulam poucas variações, sendo as mais expressivas ocorrendo em células do tapete. Após a meiose, as células antes alongadas e organizadas ao redor do lóculo, passam a apresentar formato irregular. O citoplasma permanece denso e sem conteúdos de reserva aparente, com os conteúdos do interior do vacúolo desaparecendo nessa etapa. O núcleos apresentam grandes porções de cromatina condensada com variações no tamanho, decorrente dos variados níveis de poliploidização (fig. 4.25A). Ao final da gametogênese, o citoplasma das células do tapete passam a acumular material de reserva granular (fig. 4.25B,C).

Acúmulos de material com características semelhantes a da esporoderme, na forma de orbículos, ocorrem na cavidade locular (fig. 4.22F; 4.25A) e no interior do citoplasma da

células tapetais, bem como ao longo das paredes periclinais formando a membrana peritapetal (fig. 4.25D,E,F). Na seqüência, as células do tapete entram em colapso com os conteúdos do citoplasma liberados na cavidade locular ou sobre a superfície dos grão de pólen constituindo o “*pollenkitt*” (fig.4.24E,F).

Esporoderme

Exina

A formação da esporoderme inicia-se durante a fase de tétrade de andrósporos e a exina apresenta dois estratos (ectexina e endexina) que reagem distintamente aos testes histoquímicos e de coloração.

A coloração combinada entre Azul de Astra e Fucsina Básica permite uma distinção entre a ecto e endexina, com a primeira corando-se com a Fucsina Básica, enquanto que a endexina, cora-se com o Azul de Astra (fig. 4.26B; 4.28A,B) e ambos coram-se de verde azulado com Azul de Toluidina O (fig. 4.26A,D; 4.28C) e com Auramina O (fig. 4.26C; 4.28D).

A ectexina em *P. elegans* não apresenta camada basal (nexina 1), de forma que as columelas, encontram-se inseridas diretamente na endexina (nexina 2) (fig. 4.26B; 4.30C), e como pontos mais intensos com Auramina O (fig. 4.26C; 4.29A).

A ectexina em *P. haematostigma* apresenta camada basal na forma de uma camada delgada ao longo da parede, sendo interrompida nas aberturas (fig. 4.28A,B) e com forte reação com Auramina O (fig. 4.28D), enquanto que a endexina cora-se com Azul de Astra, através de uma fina camada ao longo da região intercolpos. Apresenta maior espessura nas extremidades próximas às regiões das aberturas (fig. 4.28A,B) e reagem mais fracamente à reação com Auramina O (fig. 4.28D).

Em *P. elegans*, a região das aberturas exina torna-se embebido por material péctico (4.27A,B,D) e polissacarídico (fig. 4.27C) ao longo de toda a extensão do colpo (fig. 4.26E; 4.27B,D) e permanece até a fase de pólen maduro, diferente dos apresentados por *P. haematostigma* que apresentam aberturas do tipo colporo (fig. 4.22C; 4.31B).

Através da análise ultraestrutural nota-se que a esporoderme de *P. elegans* (fig. 4.32A) é mais espessa que em *P. haematostigma* (fig. 4.32B). A ectexina é mais eletrodensa que a endexina em ambas as espécies, de forma que em *P. haematostigma* percebe-se a presença da camada basal contínua (fig. 4.31B,C), ausente em *P. elegans* (fig. 4.29C,D; 4.30A,B).

A endexina, em *P. elegans*, mistura-se com a intina em sua porção basal na região de contato entre ambas (fig. 4.29C,D; 4.30B; 4.32A) e estende-se sobre as regiões das aberturas, como uma fina camada, contendo minúsculas báculas em sua superfície (fig. 4.29B,C; 4.30A E).

Intina

A intina, assim como a exina, é mais espessa em *P. elegans*, quando comparada com *P. haematostigma* (fig. 4.32A,B) e apresenta-se constituída por três estratos quimicamente distintos de natureza péctico-protéico-celulósico. O mais externo, de natureza péctica, inicia a deposição durante a fase de andrósporos e torna-se mais espessa na região das aberturas, através da formação do oncus da intina (fig. 4.27A). No pólen maduro a porção péctica envolve todo o grão e apresenta maior espessura na região das aberturas (fig. 4.26E).

Em *P. haematostigma*, a intina apresenta a porção péctica dilatada na região central do colporo (fig. 4.28C,E) e a análise ultraestrutural revela que essa região dilatada é composta por dois estratos, de forma que o externo apresenta maior eletrodensidade que o interno, e

tornam-se um único estrato ao longo das regiões intercolpos (fig. 4.31C).

Um estrato péctico-protéico ocorre imediatamente abaixo da porção péctica, apresentando espessura pouco variável, exceto na região das aberturas, onde é levemente espesso em *P. haematostigma* (fig. 4.26F; 4.28F;), e em ultraestrutura, aparece como um estrato intermediário de maior eletrodensidade na região mediana da intina (fig. 4.29C).

O estrato celulósico da intina é a camada mais interna da parede do pólen, forma-se após o englobamento da célula generativa, e ocorre ao longo de toda a circunferência em ambas a espécies (fig. 4.26G; 4.28G). Em ultraestrutura, mostra-se como uma camada de aspecto granular, internamente a porção péctica da intina, de aspecto fibrilar em ambas as espécies (fig. 4.29C,D; 4.31B,C).

Morfologia externa do pólen

P. elegans e *P. haematostigma* apresentam exina semitectada, e as porções de teto presentes, conferem um aspecto reticulado aos grão de pólen, sendo o retículo mais frouxo em *P. elegans* (fig. 4.29E; 4.33B,C) quando comparado com *P. haematostigma* (fig. 4.31E; 4.33E,F). Em *P. elegans*, as porções da exina onde o teto encontra-se ausente, permitem a visualização das báculas em seu interior com microscopia eletrônica de varredura (fig. 4.33D).

O pólen de *P. elegans* apresenta formato esférico, medindo cerca de 50 μm , com 6 ou 8 colpos, que se fusionam aos pares nas regiões dos pólos (fig. 4.29E; 4.33B,C). A exina é acetólise resistente, exceto nas regiões dos colpos, onde se rompem liberando os pontopérculos (4.29F).

O pólen de *P. haematostigma* é prolato (fig. 4.31D,E), medindo cerca de 40 μm em sua maior dimensão, e apresentando aberturas compostas do tipo colporos, que ocorrem aos

pares formando três grupos de dois colporos cada (fig. 4.33E,F). Os colpos (exoabertura) ocorrem longitudinalmente ao longo do eixo equatorial e suas extremidades alcançam, isoladamente cada uma, a porção apical em ambos os pólos (fig. 4.31E). Os colporos são acetólise-resistentes, exceto na região central, onde os poros comunicam colporos paralelos, formando um único poro central (fig. 4.31F).

Dinâmica de plastídios e mitocôndrias

As CMA, com núcleos em profase I (fig. 4.34A), apresentam um citoplasma rico em organelas (fig. 4.34B,C) onde facilmente se percebe a ocorrência de plastídios e mitocôndrias em seu interior (fig. 4.34B,C). Inúmeras mitocôndrias, de formato globoso a elíptico em seção, ocorrem dispersas por todo o citoplasma (fig. 4.34B,C; 4.35) principalmente nos limites junto a parede, com cerca de 1 μm de comprimento (fig. 4.34D,E). Os plastídios são maiores, com cerca de 2 μm e apresentam formatos variados, principalmente alongados (fig. 4.34D,E; 4.35). Entre meiócitos vizinhos ocorrem comunicações através da parede grandes o suficiente para a passagem de organelas entre ambos os lados (fig. 4.34D,F).

Durante a fase de tétrade com calose (fig.4.36A), e após a separação dos andrósporos, observa-se uma polarização de organelas junto aos limites celulares, em menor número, nas regiões próximas ao núcleo (fig.4.36B). As mitocôndrias passam a apresentar estruturas digitiformes em seu interior e ocorrem principalmente, próximas aos plastídios (fig. 4.36B,C).

Após a meiose (fig. 4.37A) e conseqüente liberação dos andrósporos, o núcleo volumoso passa a ocupar a região central do citoplasma. Apresenta nucléolo ativo, e com regiões de material amorfo (fig. 4.37B). As mitocôndrias ocorrem em grupos próximos ao núcleo e numerosos plastídios encontram-se dispersos ao longo do citoplasma (fig. 4.37B).

Com a vacuolação do andrósporo, a célula polarizada passa a apresentar o núcleo em posição periférica e próximo a esporoderme, oposto ao grande vacúolo que ocupa a região central (fig. 4.37C,D; 4.38). O citoplasma se restringe à região periférica da célula, com grande quantidade de organelas como dictiossomos, retículo endoplasmático e inúmeros ribossomos (fig. 4.37D; 4.38). As mitocôndrias são alongadas e menores que os plastídios que continuam apresentando formato variável em seção, passando de globoso a elíptico e com grânulos eletrodensos em seu interior (fig. 4.38).

Após a mitose e formação das células vegetativa e generativa, uma parede péctica contínua com a intina é depositada ao redor da célula generativa (fig. 4.39A,B) que apresenta o seu citoplasma já individualizado (fig. 4.39B) com o predomínio de plastídios e mitocôndrias sobre as demais organelas (fig. 4.39C,D).

A etapa de polen bicelular foi analisada também nas espécies *P. haematostigma* (fig. 4.40A,B) e *P. suberosa* (fig. 4.40C), e ambas apresentaram o citoplasma da célula generativa com inúmeras organelas, com o predomínio de plastídios.

No pólen maduro de *P. elegans*, a célula generativa, uma vez englobada pelo citoplasma da célula vegetativa, migra para a região central do pólen (fig. 4.41A) e adquire formato falciforme em seção longitudinal (fig. 4.41.B,C). O citoplasma da célula generativa madura contém um núcleo posicionado na região central, e inúmeras mitocôndrias e plastídios dispersos pelo citoplasma (fig. 4.41C).

Figura 4.1 - Projeção da placenta e dos rudimentos seminiais no ovário de *P. elegans*. (A) Ovário tricarpelar e unilocular em seção transversal na porção mediana do botão floral jovem. Região do meristema provascular dorsal (seta). (B) Carpelos fusionados diferenciando duas zonas placentárias (*). (C) Feixe vascular ventral único em seção transversal do ovário localizado no centro do botão floral (seta). (D) Seção longitudinal do ovário jovem com a projeção de inúmeros rudimentos seminiais.

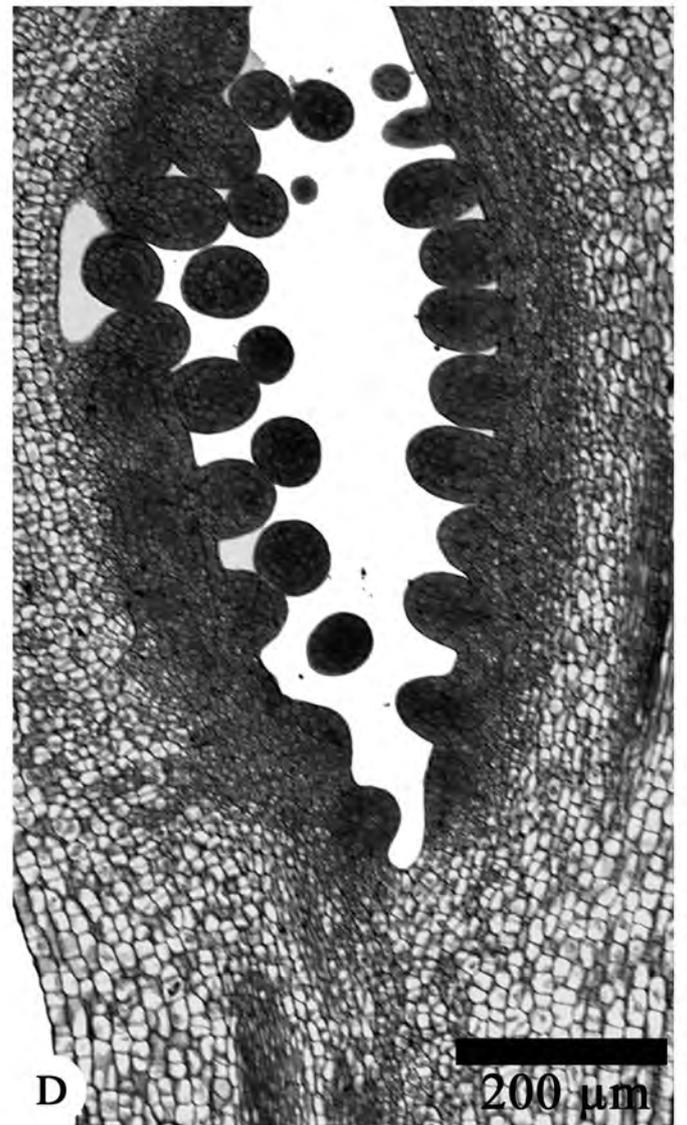
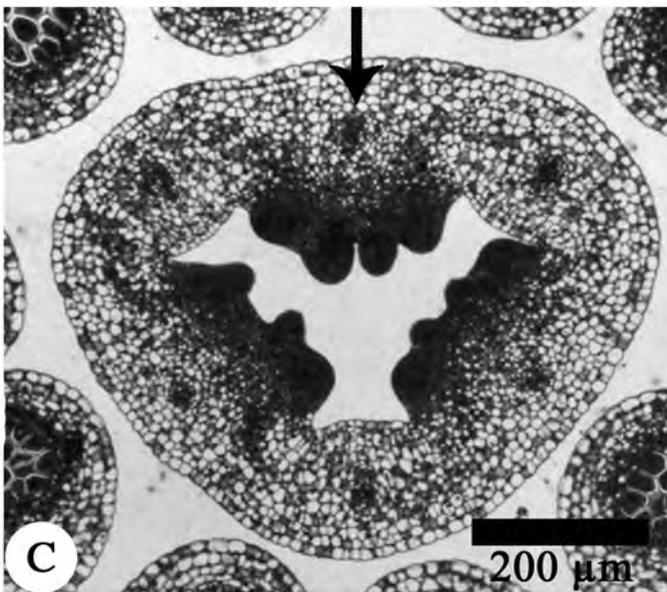
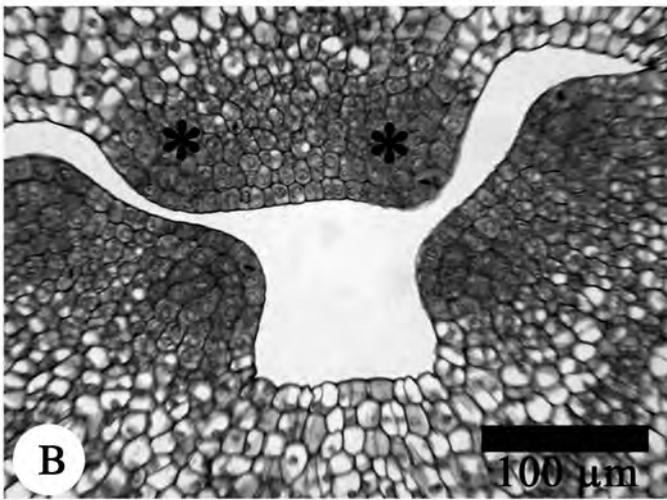
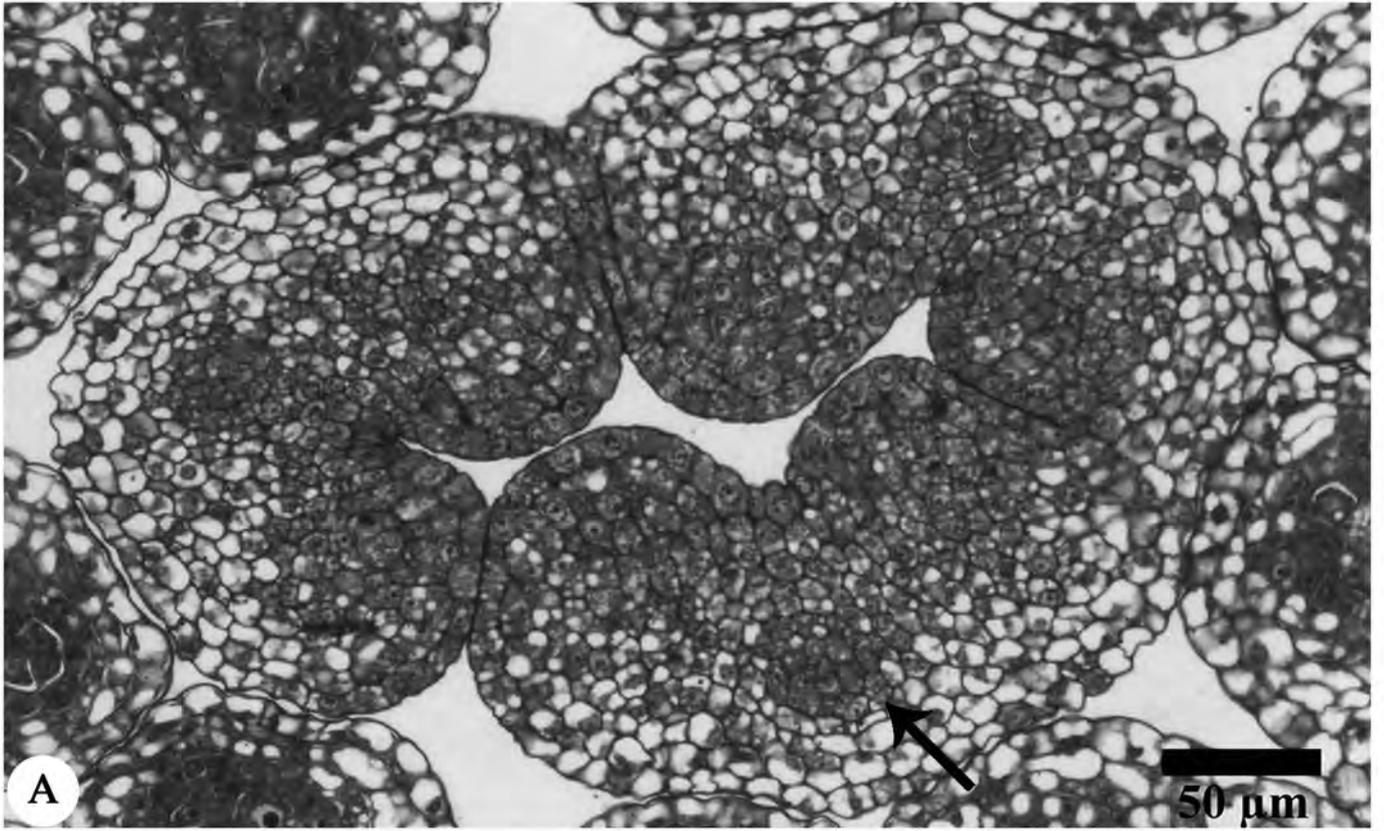


Figura 4.2 - Gineceu. (A) Seção transversal do ovário com rudimentos seminiais em *P. haematostigma*. (B-C) Tricomas na superfície do ovário de *P. haematostigma*. (D) Microscopia eletrônica de varredura da superfície do ovário com tricomas de *P. haematostigma*. (E) Seção transversal do estilete de *P. elegans*. A seta indica um leve sulco na porção ventral do estilete. (F) Detalhe do estilete em seção transversal com feixe vascular e tecido transmissor. (G) Seção longitudinal do estilete de *P. elegans* mostrando ramificação do feixe vascular na região apical. (H) Detalhe do tecido transmissor no estilete em corte longitudinal. (I) Interface entre o estigma e o tecido transmissor preenchida por células parenquimáticas (*). Legenda: (Fv) feixe vascular; (Tt) tecido transmissor.

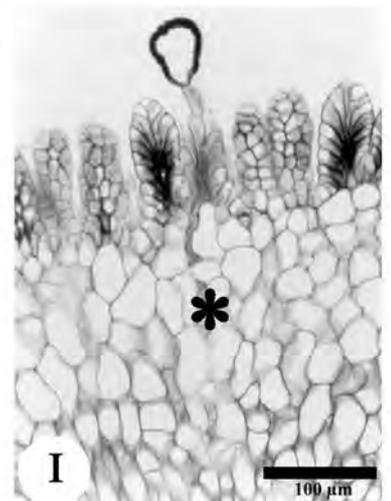
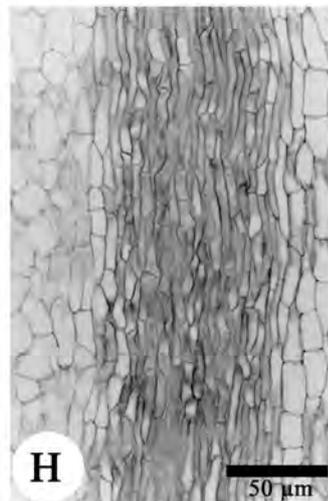
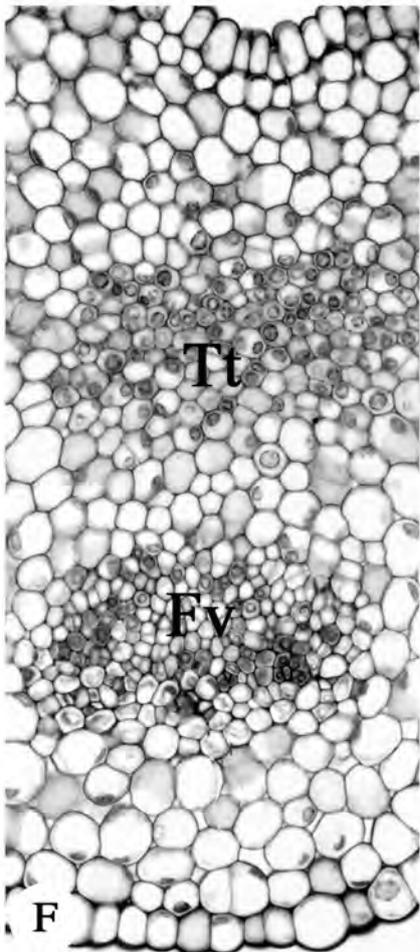
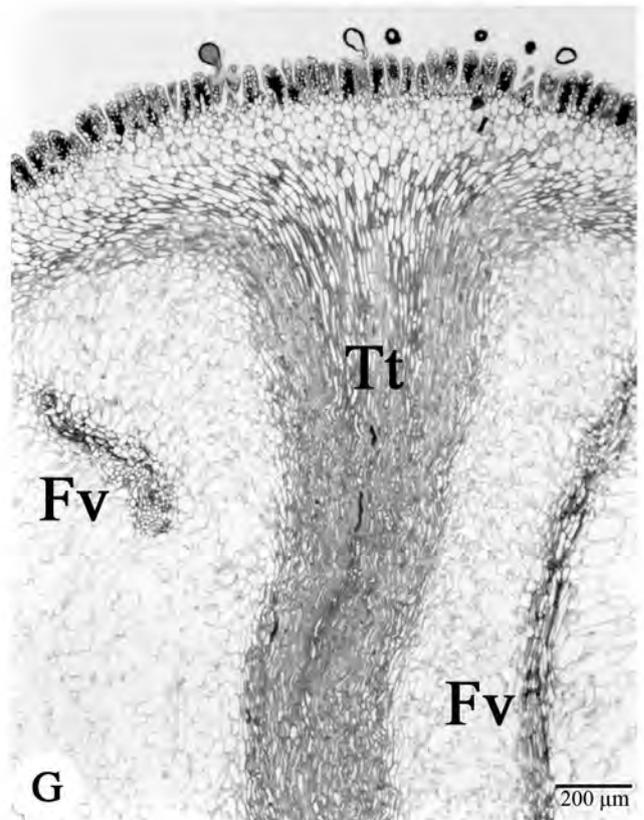
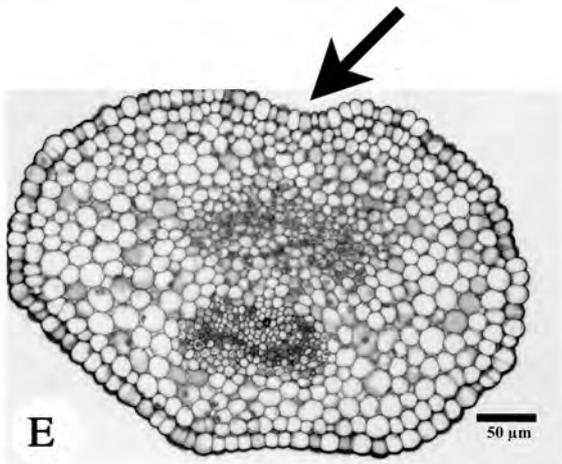
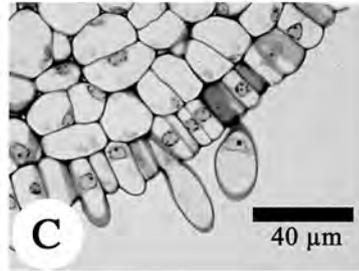
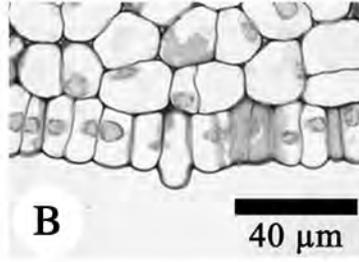


Figura 4.3 - Estigma de *P. elegans*. (A) Superfície estigmática jovem vista em microscopia eletrônica de varredura. (B) Seção longitudinal do estigma jovem com as células das camada subdérmica com grandes vacúolos (*). (C) Seção longitudinal do estigma mostrando células epidérmicas sendo empurradas pela células da camada subdérmica (*). (D) Divisão transversal da célula subdérmica. (E) Vista longitudinal, em MEV, do estigma maduro e detalhe das emergências na superfície do estigma (F) Seção transversal das emergências estigmáticas evidenciando células com cavidade central (seta). (G) Superfície estigmática com crescimento do tubo polínico na porção central da emergência.

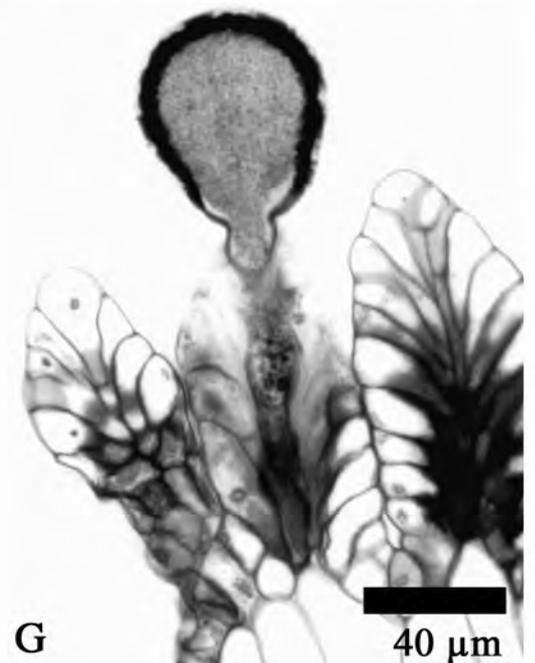
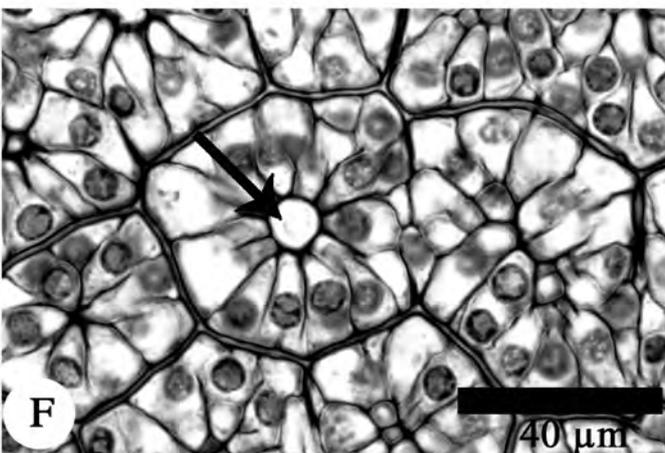
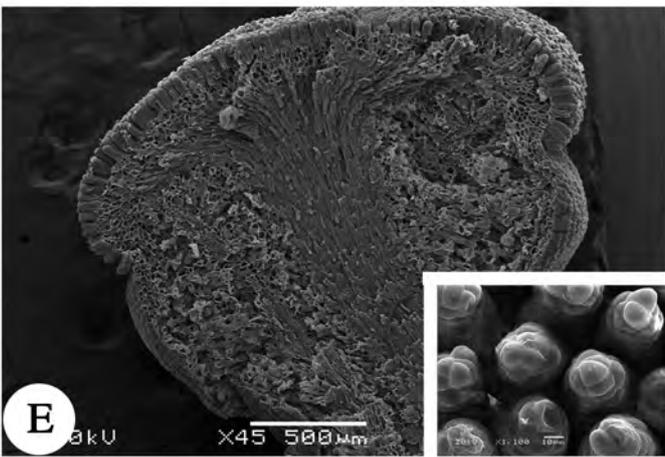
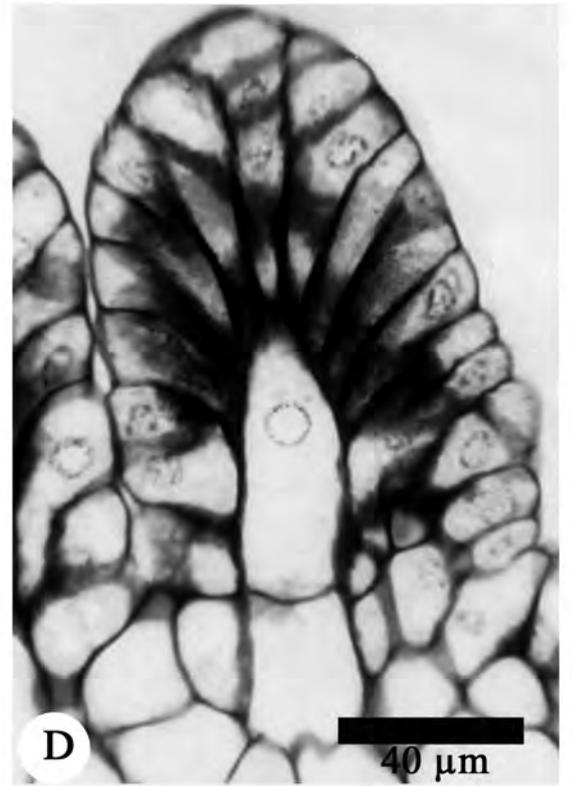
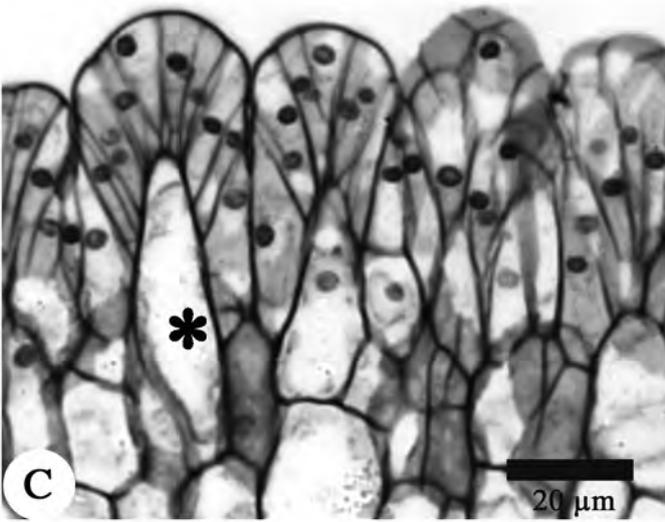
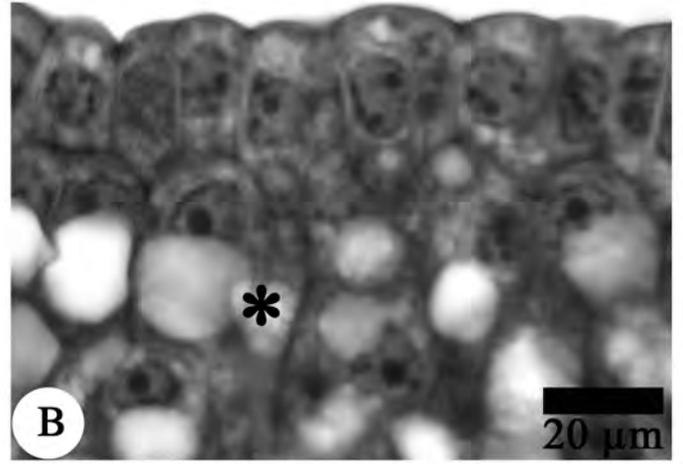
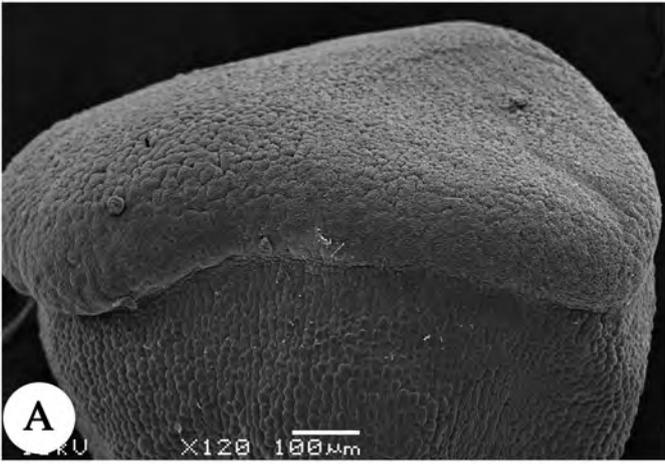


Figura 4.4 - Formação dos rudimentos seminiais em *P. elegans*. (A) Divisões periclinais da camada central (*). (B) Projeção dos rudimentos seminiais. (C) Detalhe do rudimento seminal com divisão periclinal na camada subdérmica. (D) Proliferação da região funicular com o início da curvatura anátropa e surgimento dos tegumentos (setas).
Legenda: (C1) camada dérmica; (C2) camada subdérmica; (C3) camada central; (Fu) funículo; (Nu) nucelo.

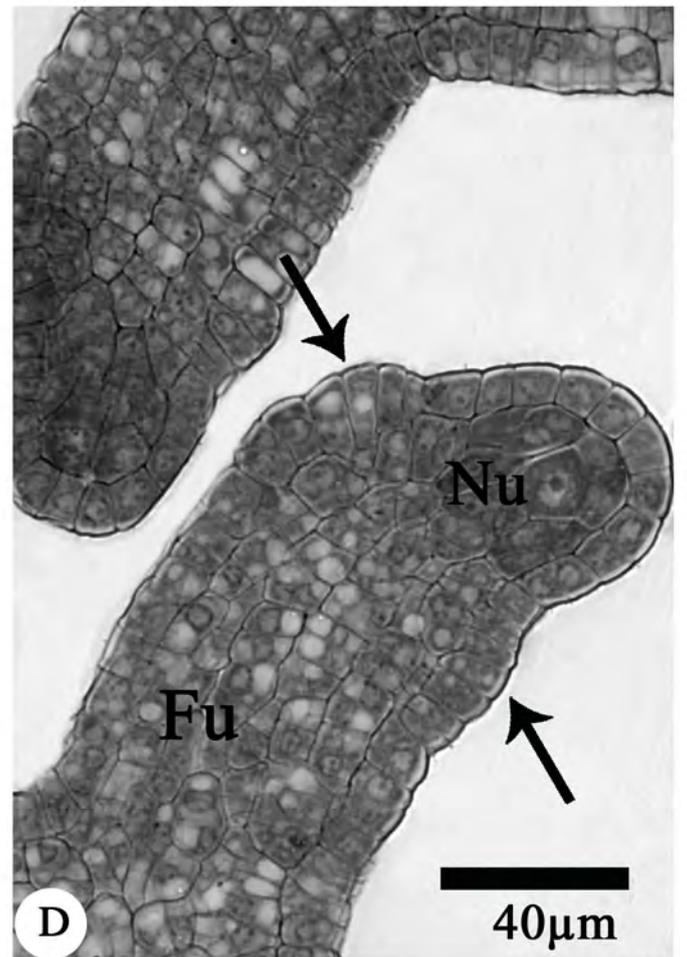
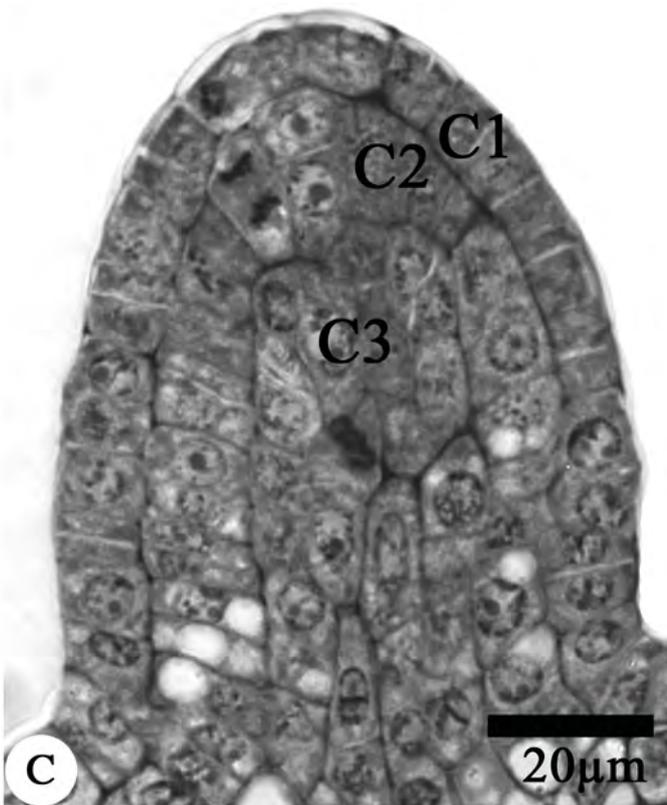
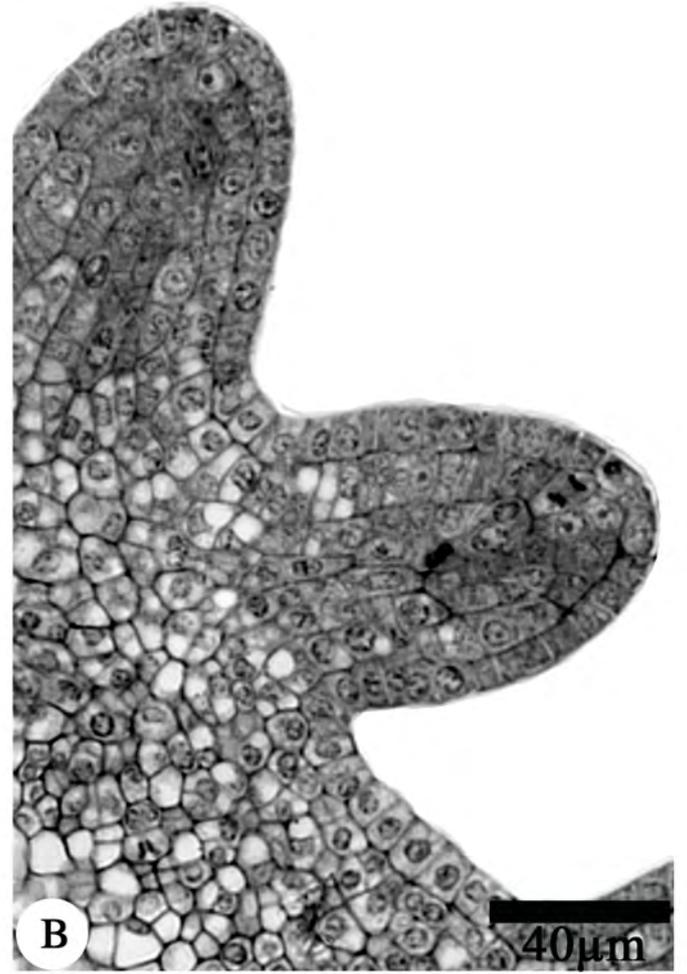
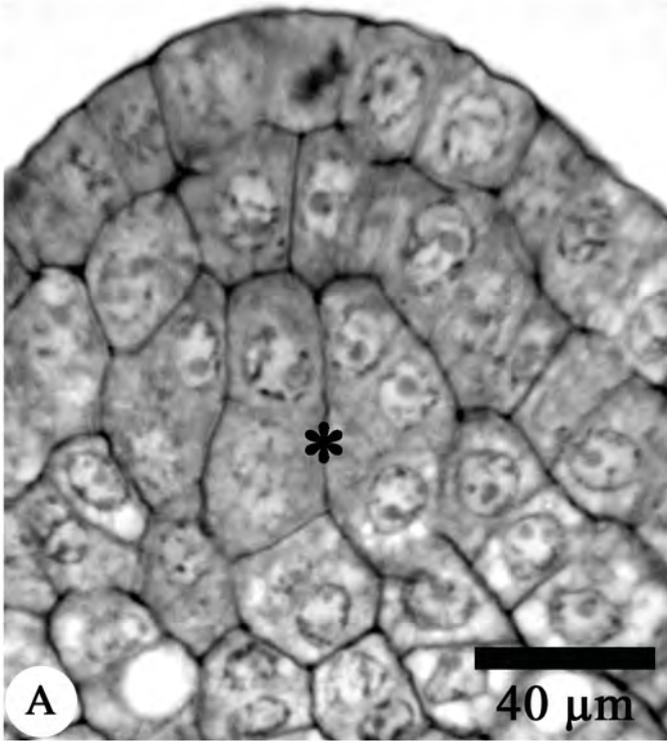


Figura 4.5 - Rudimento seminal e formação dos tegumentos em *P. haematostigma*. (A) Desenvolvimento do tegumento interno, e alongamento das células precursoras do tegumento externo. (B) Desenvolvimento do tegumento externo. (C-D) Microscopia eletrônica de varredura, revela a formação de dois anéis circulares contíguos à região apical do rudimento seminal. (D) Detalhe. Legenda: (Fu) funículo; (Nu) nucelo; (TE) tegumento externo; (TI) tegumento interno.

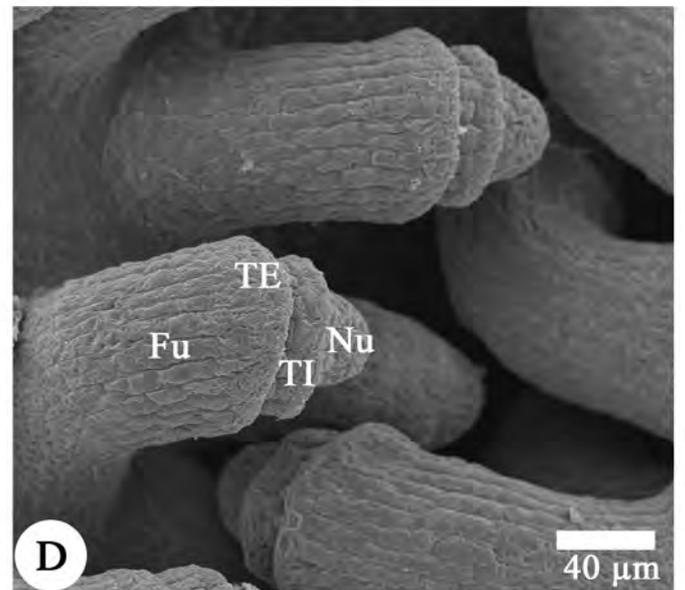
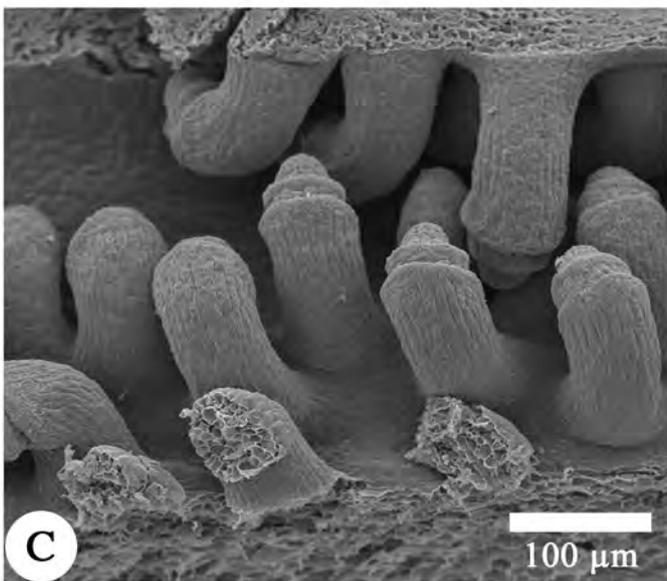
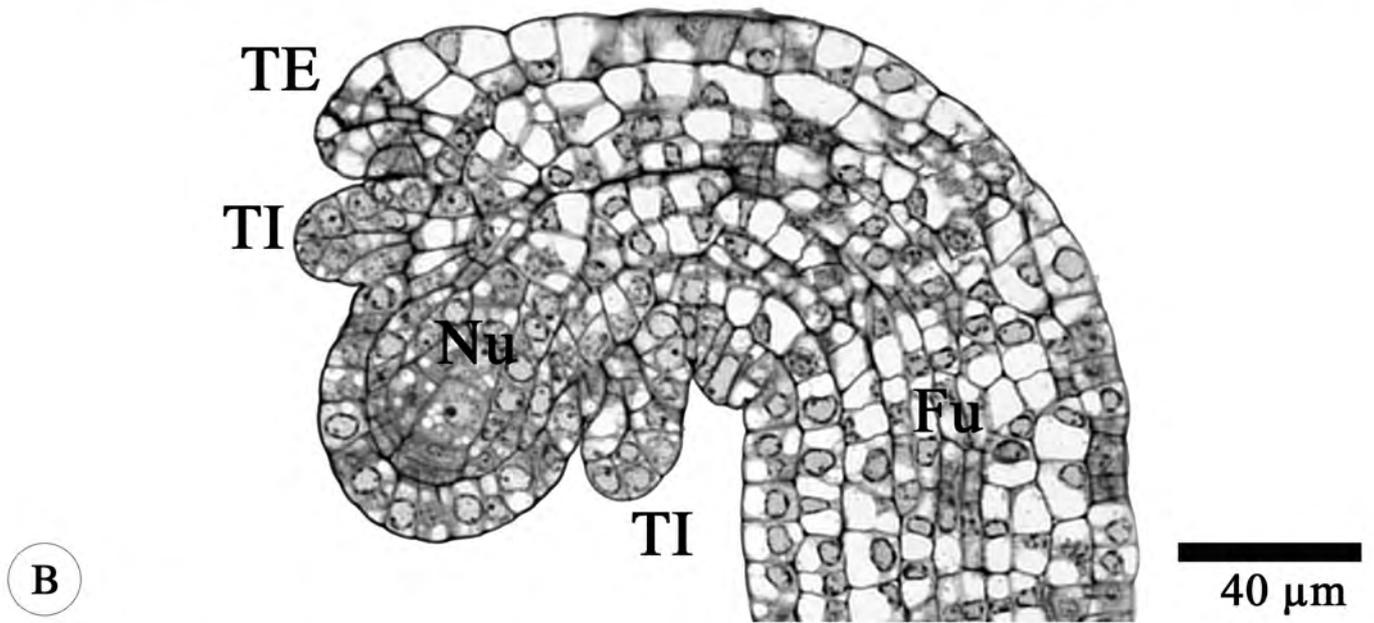
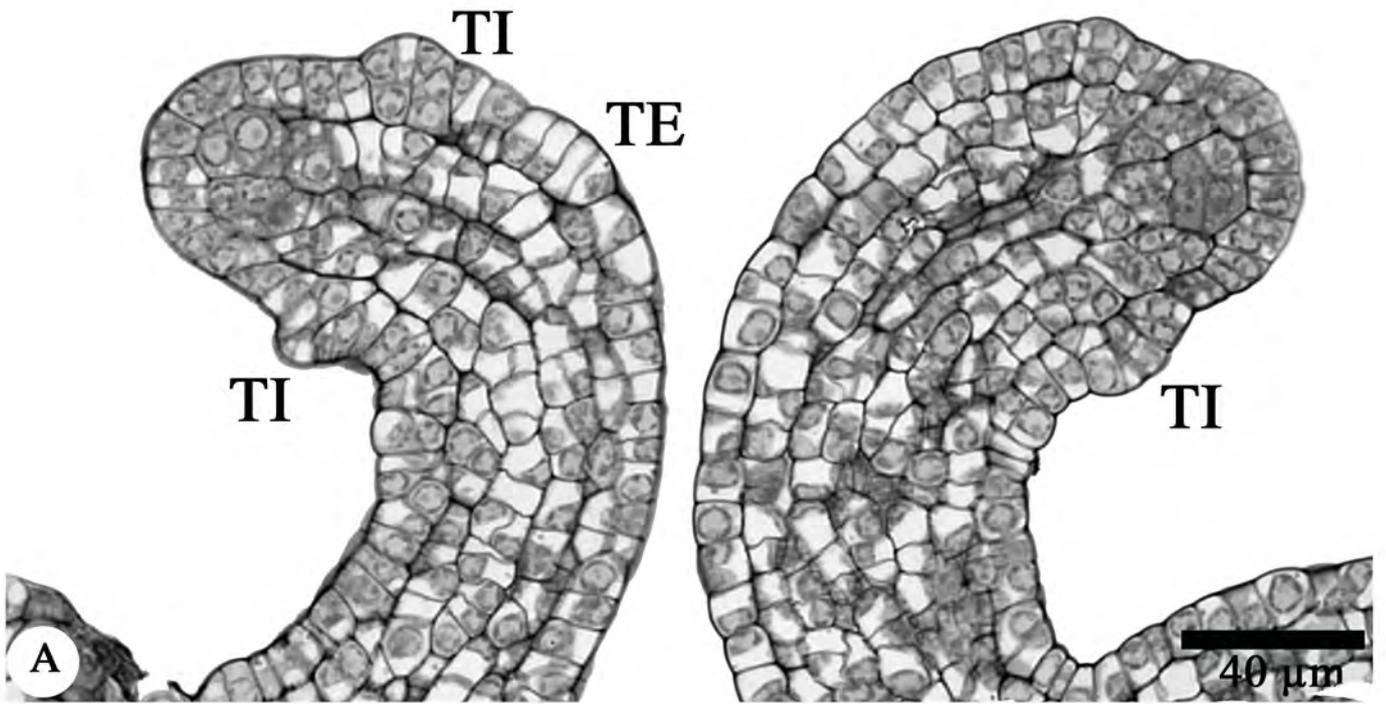


Figura 4.6 - Arquespório pré-meiotico de *P. elegans*. (A) Célula arquesporial alongada (*). (B-F) Mitoses da célula arquesporial (*). (B) Mitose transversal. (C) Mitose longitudinal. (D-E) Duas mitoses formando um arquespório tritelular. (F) Arquespório tetraclular.

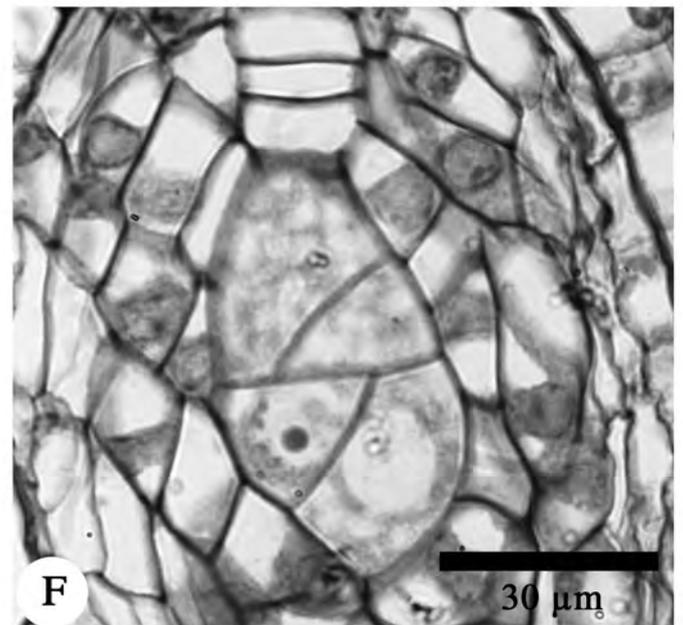
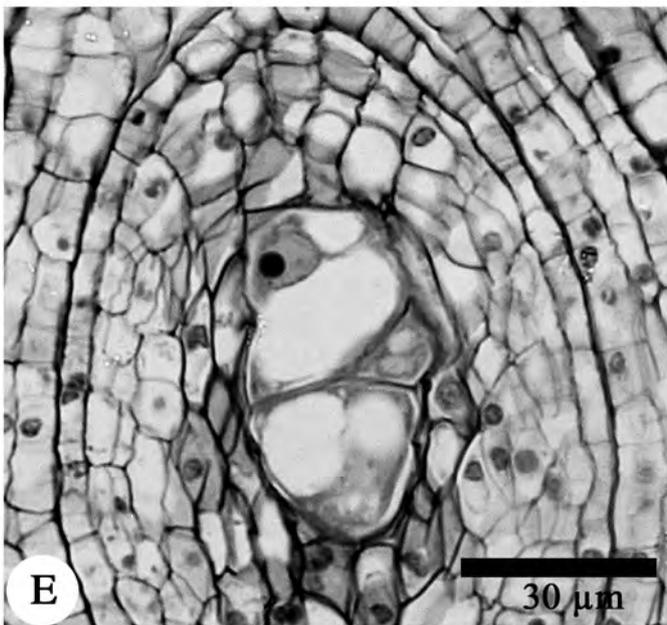
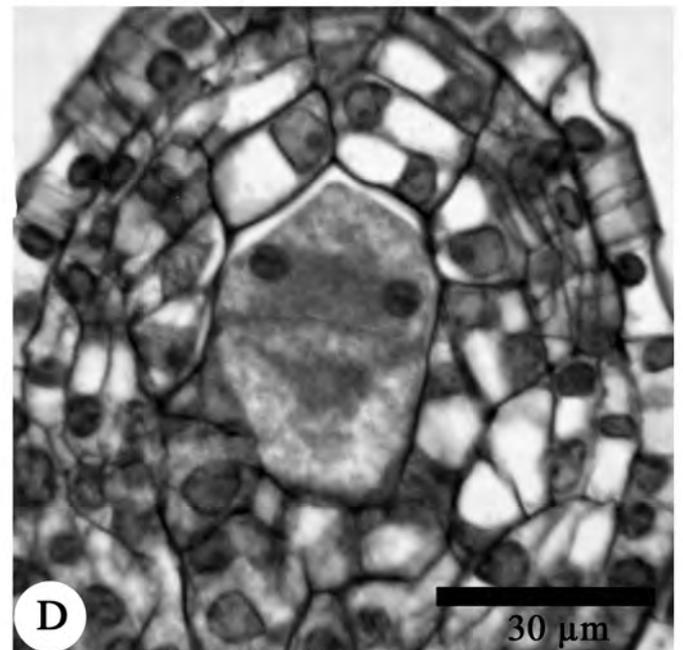
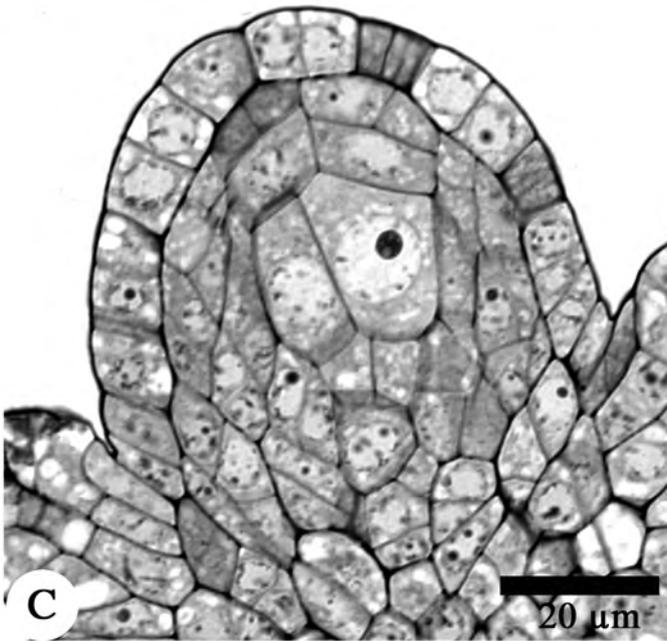
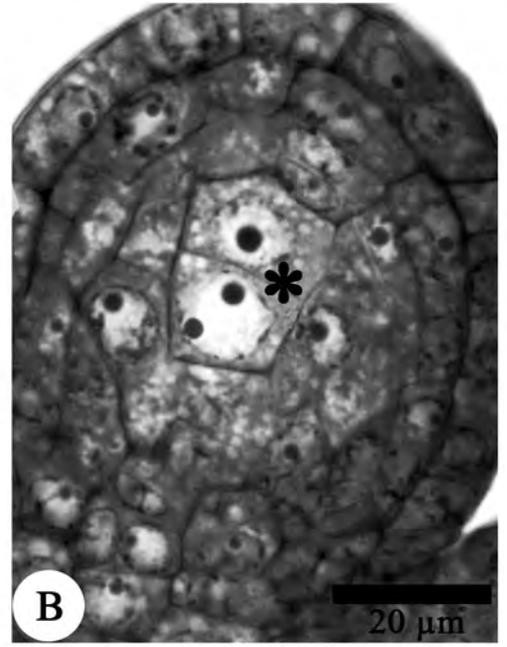
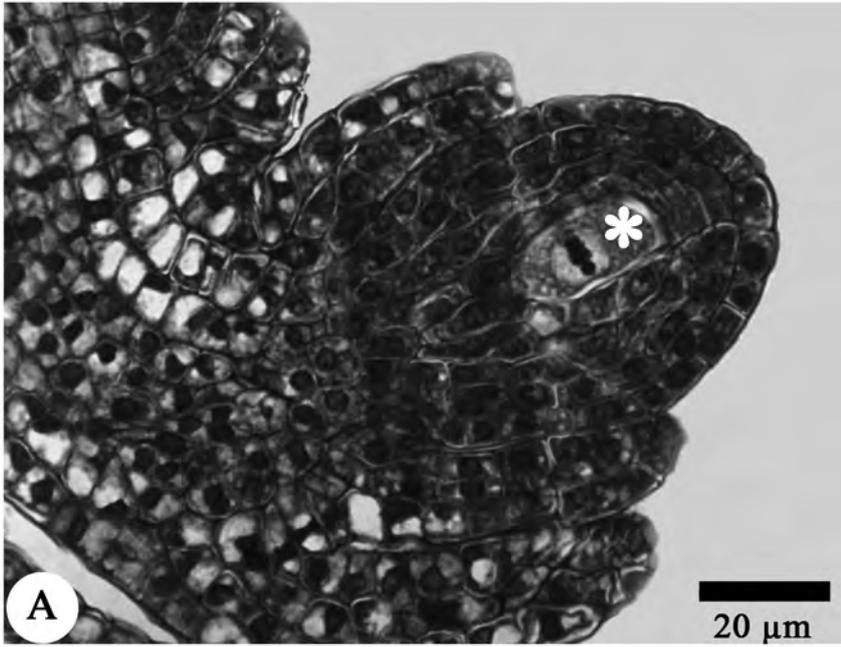


Figura 4.7 - Meiose de ginósporo em *P. elegans* (A,B) Célula-mãe de ginósporo (*) com tegumentos em porção mediana (A) e ultrapassando o ápice do nucelo (B). (C) Tétrade de ginósporos em contraste interferencial. (D) Acúmulo de amido no nucelo.
Legenda: (TE) tegumento externo; (TI) tegumento interno.

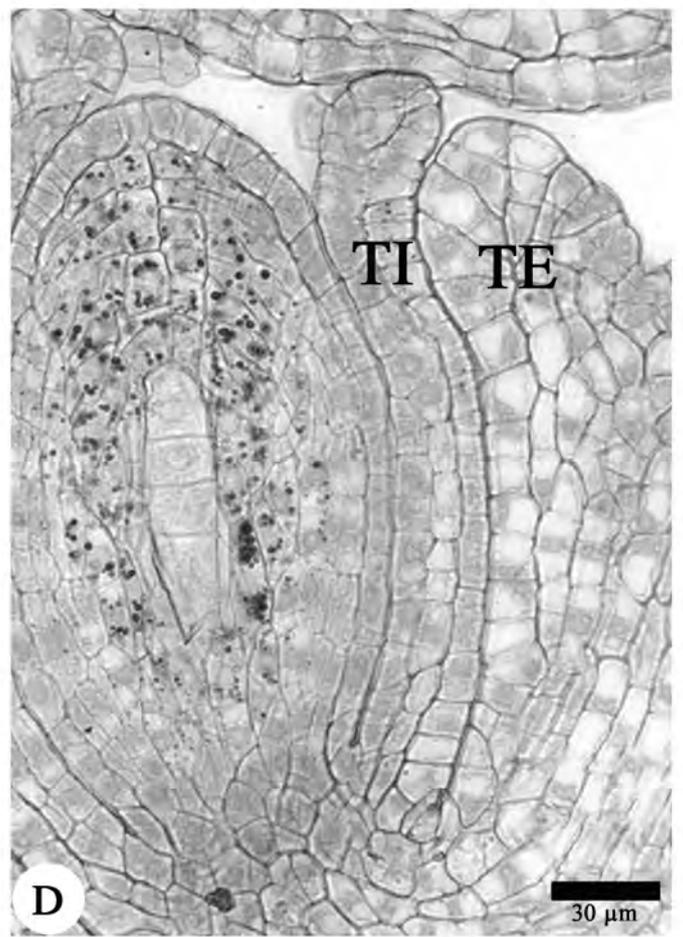
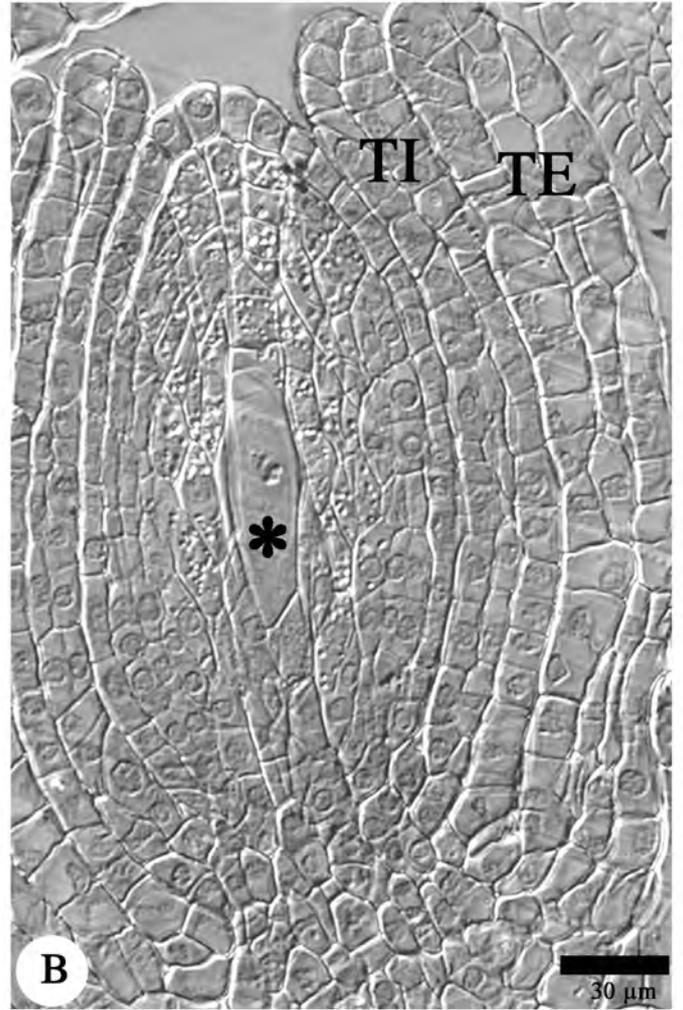
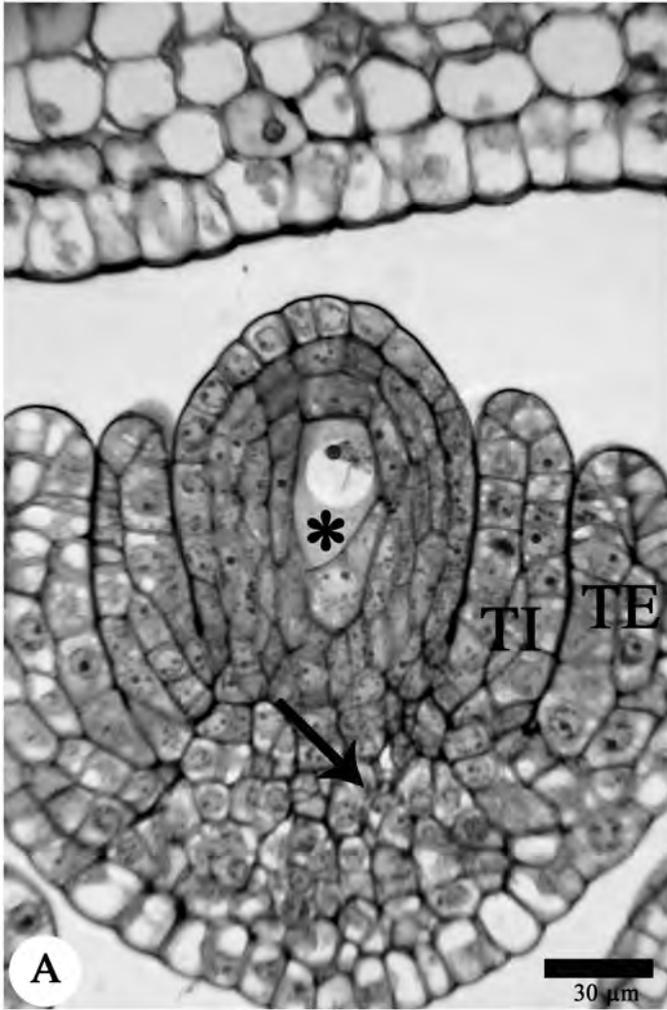


Figura 4.8 - Meiose de ginósporo em *Passiflora haematostigma*. (A) Célula mãe de ginósporos em metáfase I (detalhe) e divisão precursora do arilo (cabeça de seta) (B) Díade de ginósporos com a díade calazal dividindo (detalhe e seta). (C) Tétrade com ginósporos sendo o calazal funcional. (D) Tétrade de ginósporos com parede de calose transversal isolando o ginósporo funcional (seta branca).

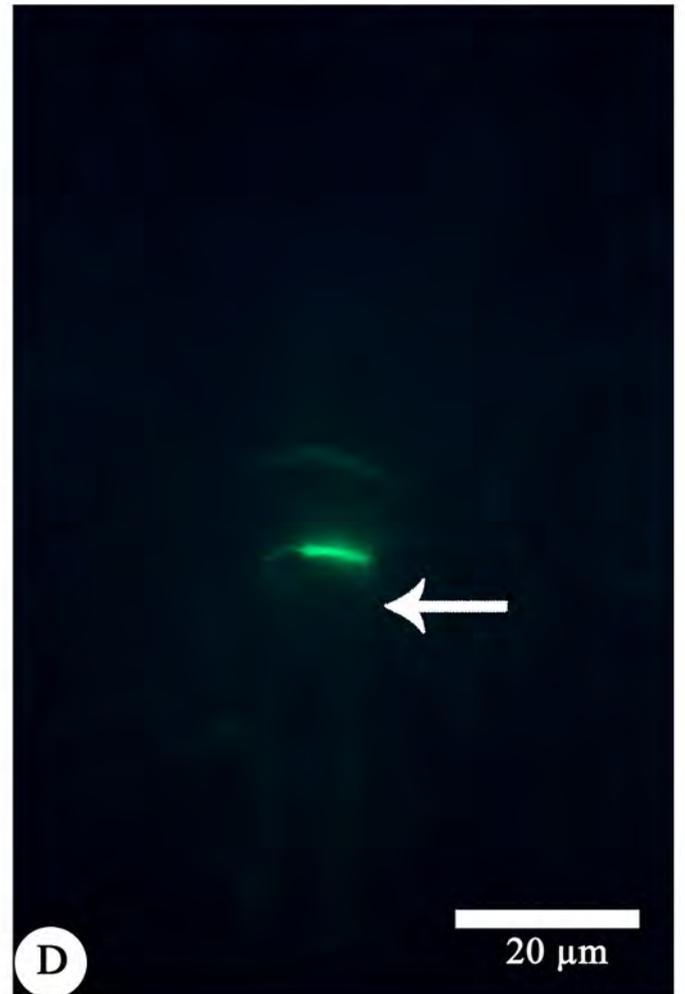
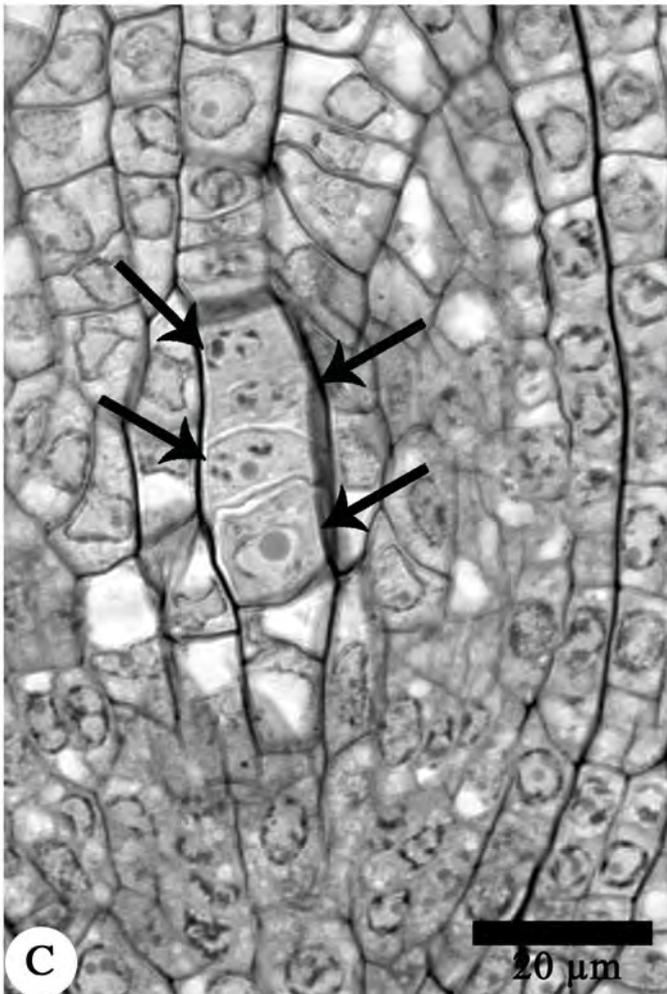
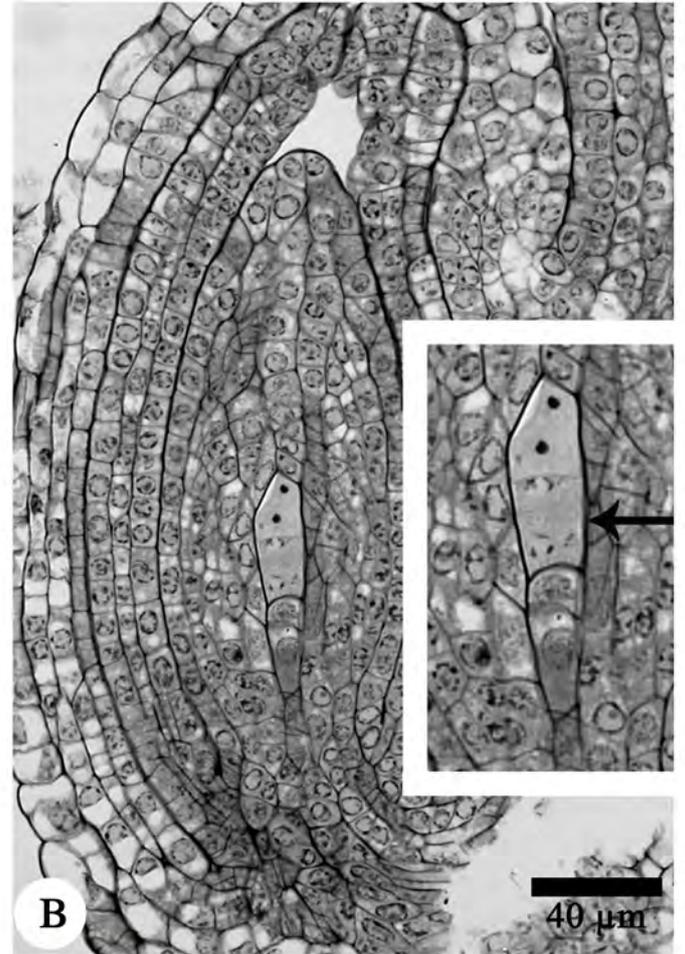
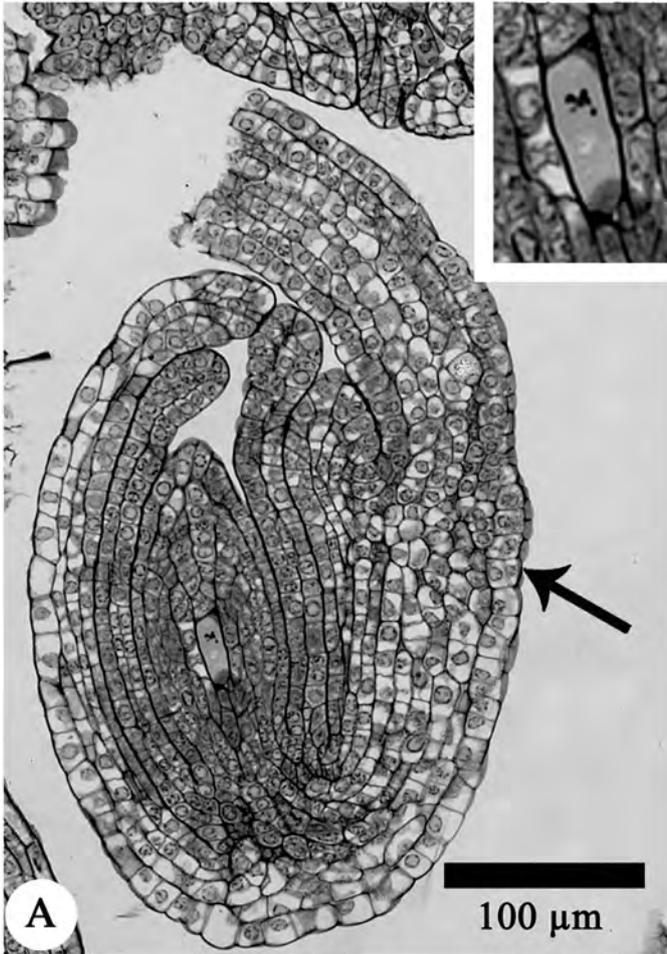


Figura 4.9 - Ginogametogênese de *P. elegans*. (A) Ginófito uninucleado (asterisco), e célula arquesporrial dividida, diferenciando-se como as demais do nucelo (seta preta). (B) Divisões periclinais na epiderme nucelar (seta branca). (C) Ginófito binucleado com tegumento interno delimitando a endóstoma. (D) Detalhe do ginófito binucleado. Legenda: (En) endóstoma; (Va) vacúolo.

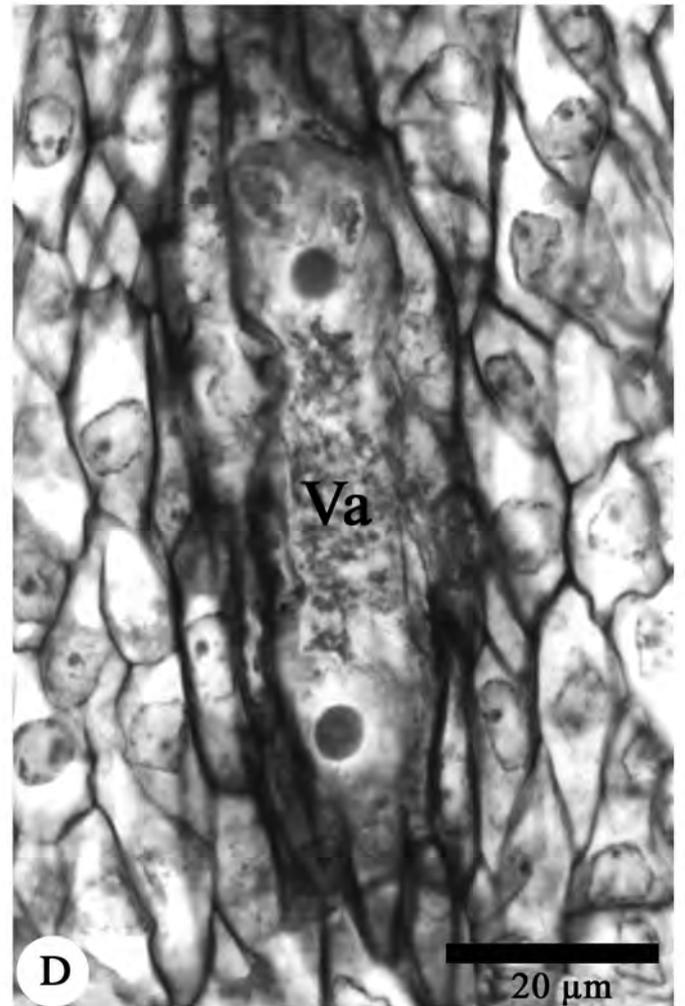
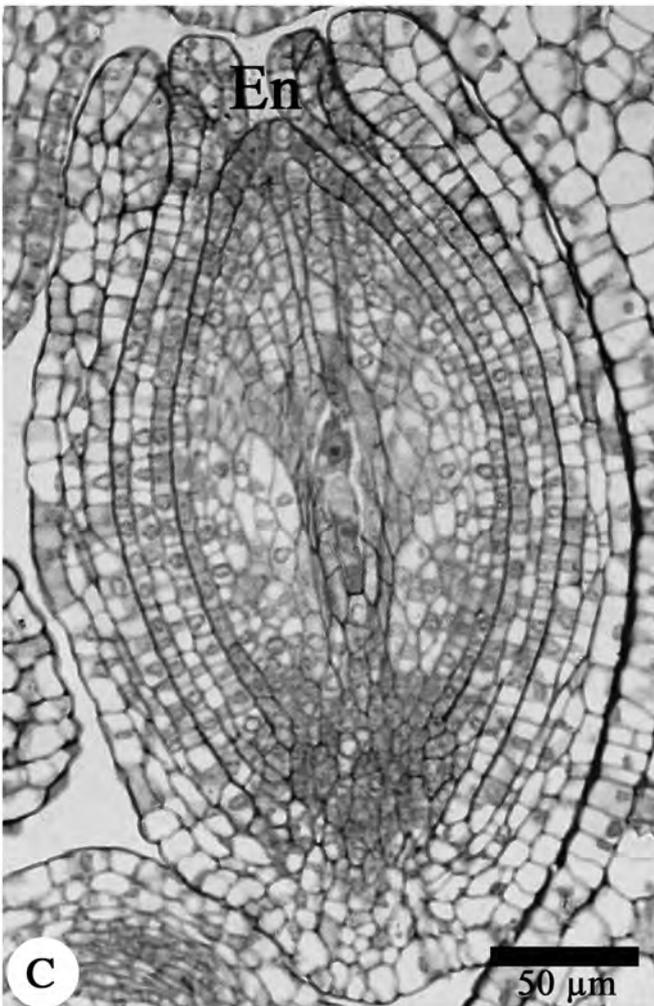
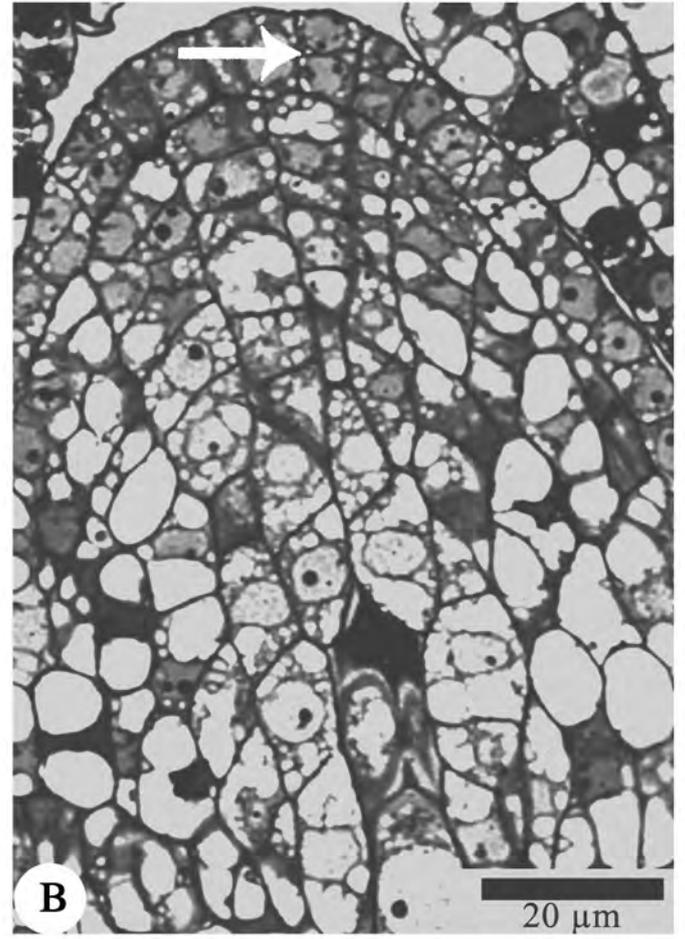
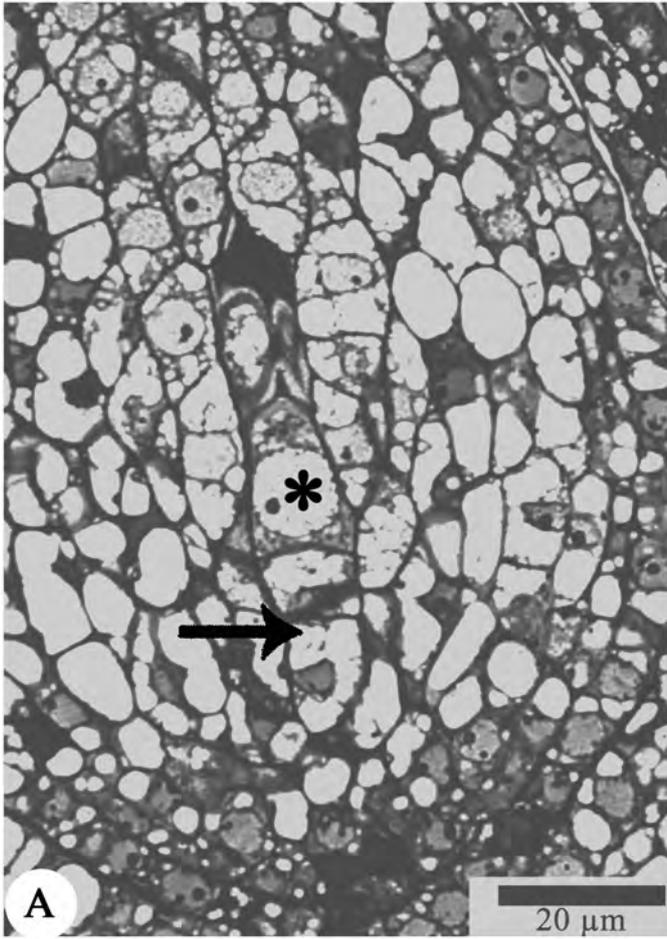


Figura 4.10 - Ginófito tetranucleado. (A) *P. elegans*. A figura mostra três dos quatro núcleos. (B) Detalhe com o quarto núcleo a mostra e epiderme nucelar dividindo (seta). (C) *P. haematostigma* com nucelo apresentando divisões periclinais epidérmicas mais pronunciadas (seta). (D) Região da hipóstase (Hi) e calaza (Ca) de *P. haematostigma*.
Legenda: (Ca) calaza; (Hi) hipóstase; (Va) vacúolo.

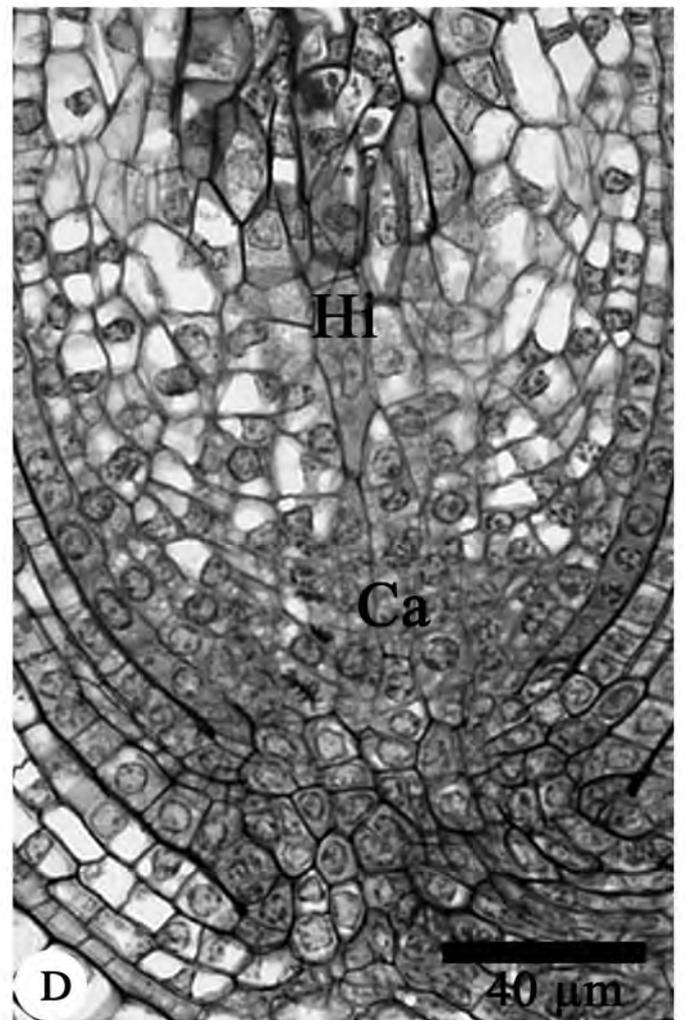
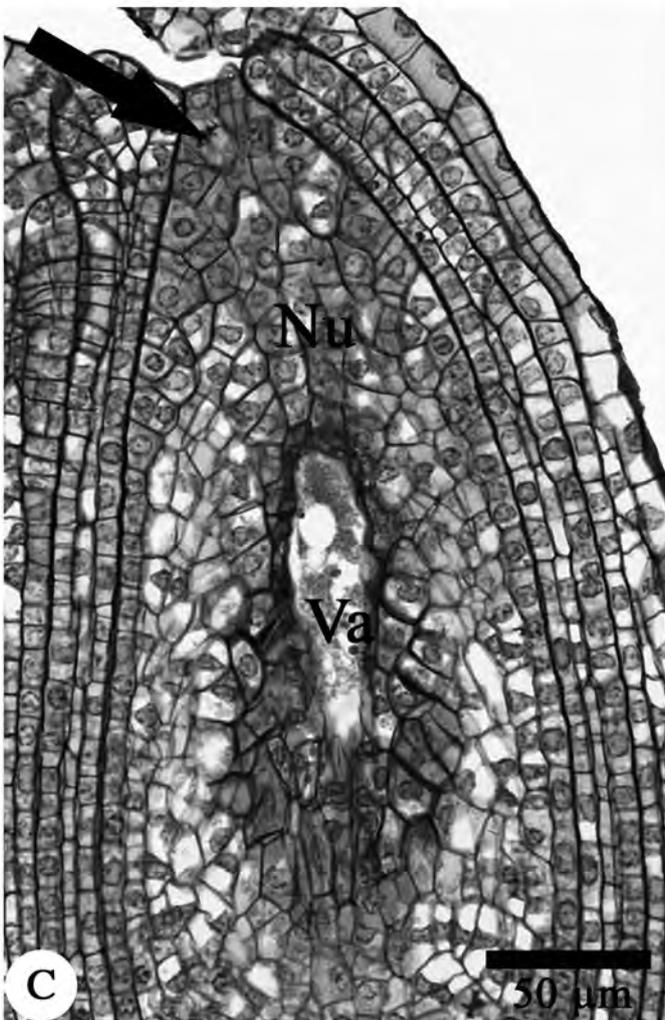
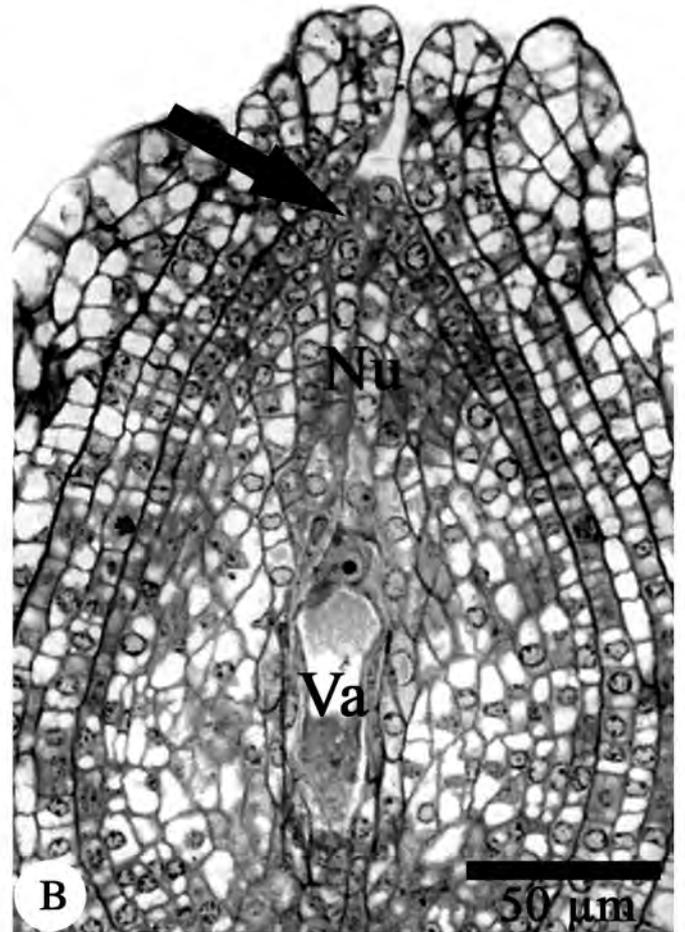
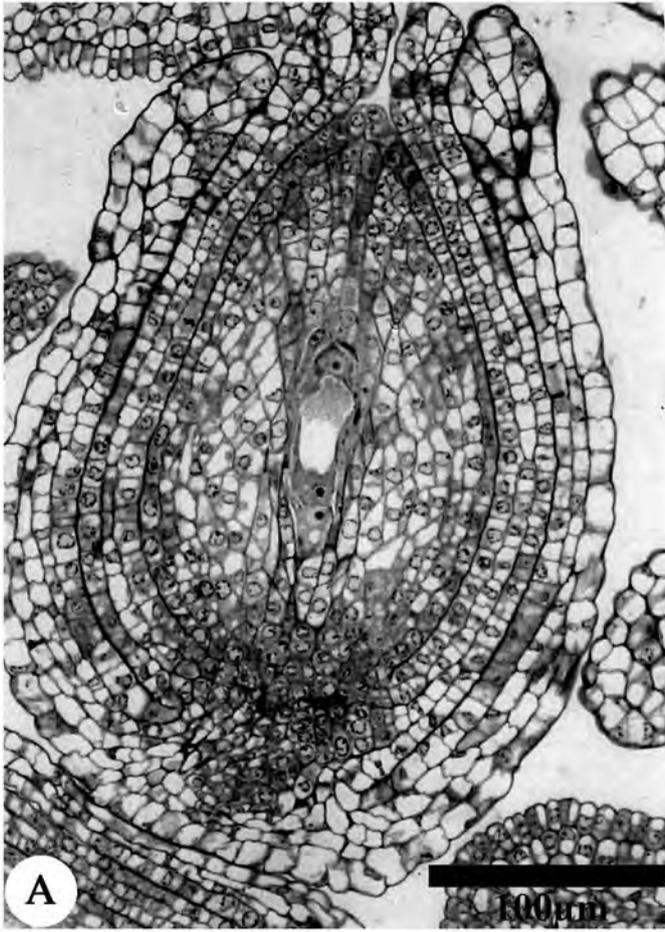


Figura 4.11 - Ginófito de *P. elegans*. (A) Aparelho oosférico com sinérgide e oosfera. (B) Sinérgides evidenciando o aparelho fibrilar. (C) Célula média com núcleos polares posicionados lateralmente na célula (seta). (D) Ginófito maduro com núcleo secundário polarizado (seta) e ao lado do núcleo da oosfera (cabeça de seta). (E) Nucelo maduro com conteúdo de amido (*). Legenda: (AF) aparelho fibrilar; (EN) epiderme nucelar; (Nu) nucelo; (Os) oosfera; (Si) sinérgides).

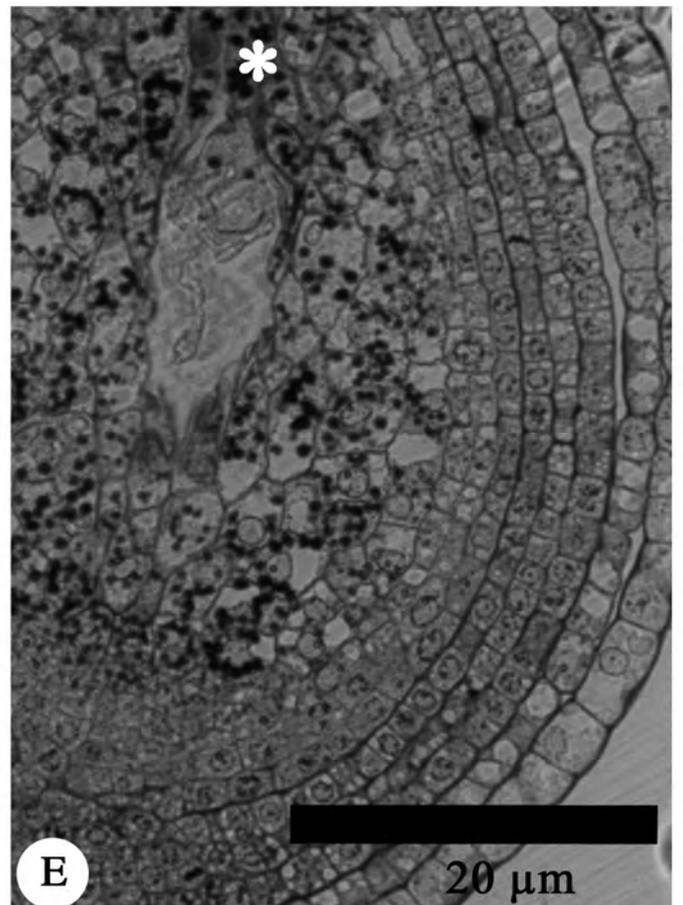
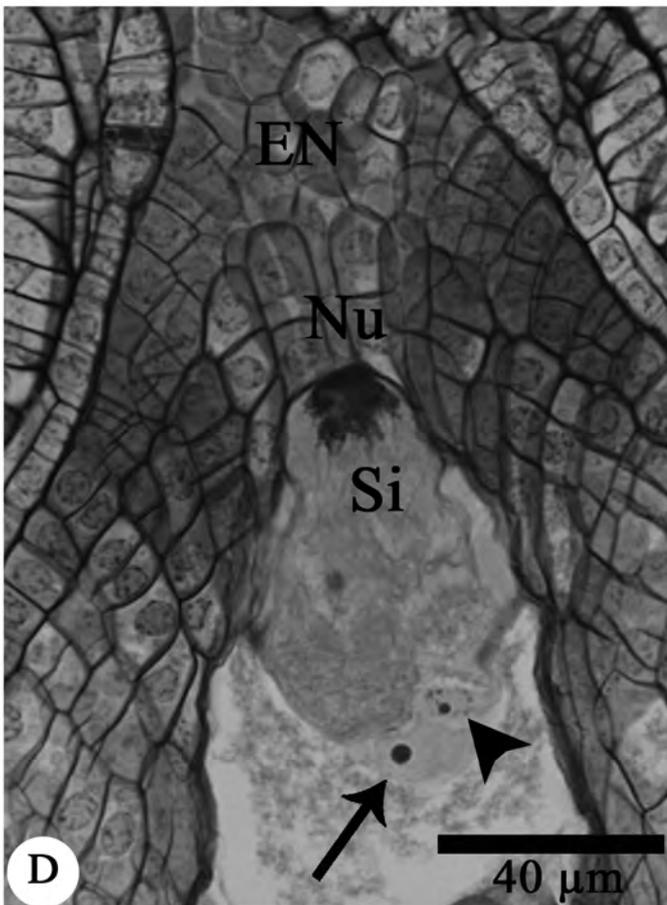
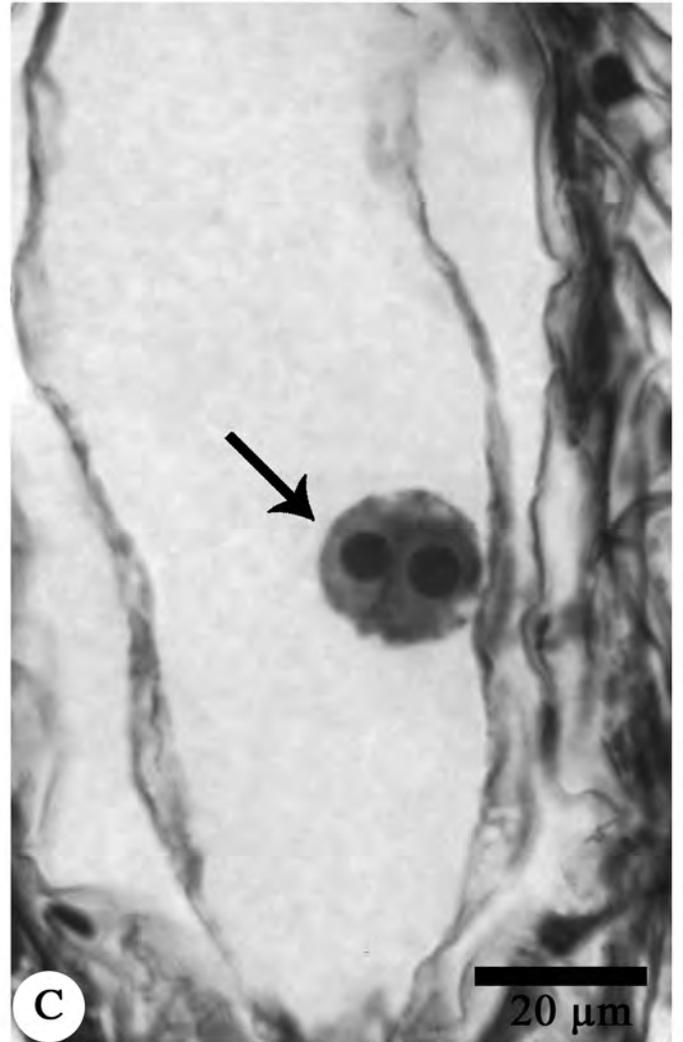
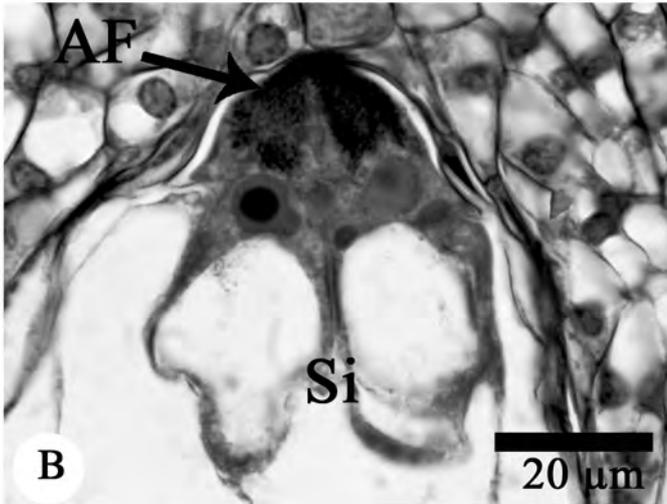
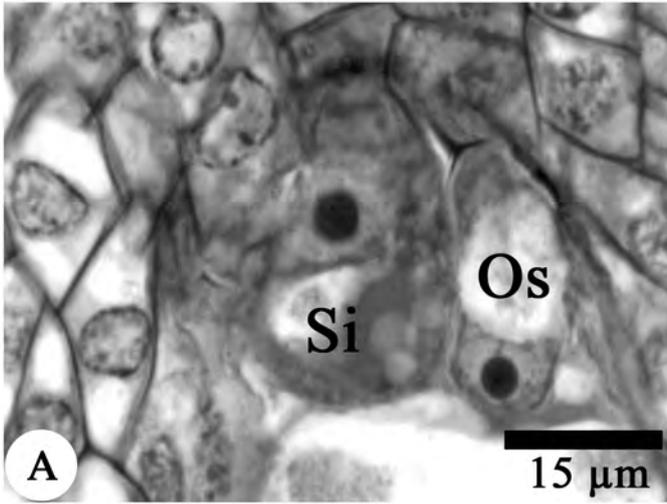


Figura 4.12 - Rudimento seminal. (A) Rudimento seminal de *P. elegans* com nucelo micrópila em zig-zag (seta) e arilo (*). (B) Detalhe do arilo (*). (C) Microscopia eletrônica de varredura do rudimento seminal fraturado evidenciando os dois tegumentos e nucelo. (D) Microscopia eletrônica de varredura do rudimento seminal de *P. elegans* com arilo (*). (E) Microscopia eletrônica de varredura do rudimento seminal de *P. haematostigma* com arilo (*). Legenda: (Nu) nucelo; (TE) tegumento externo; (TI) tegumento interno.

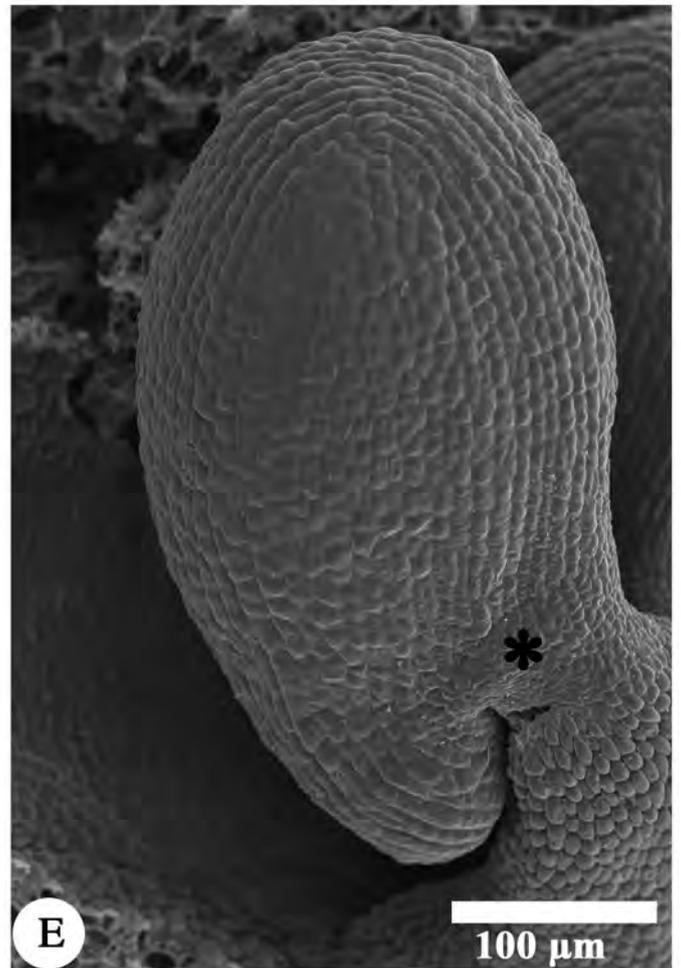
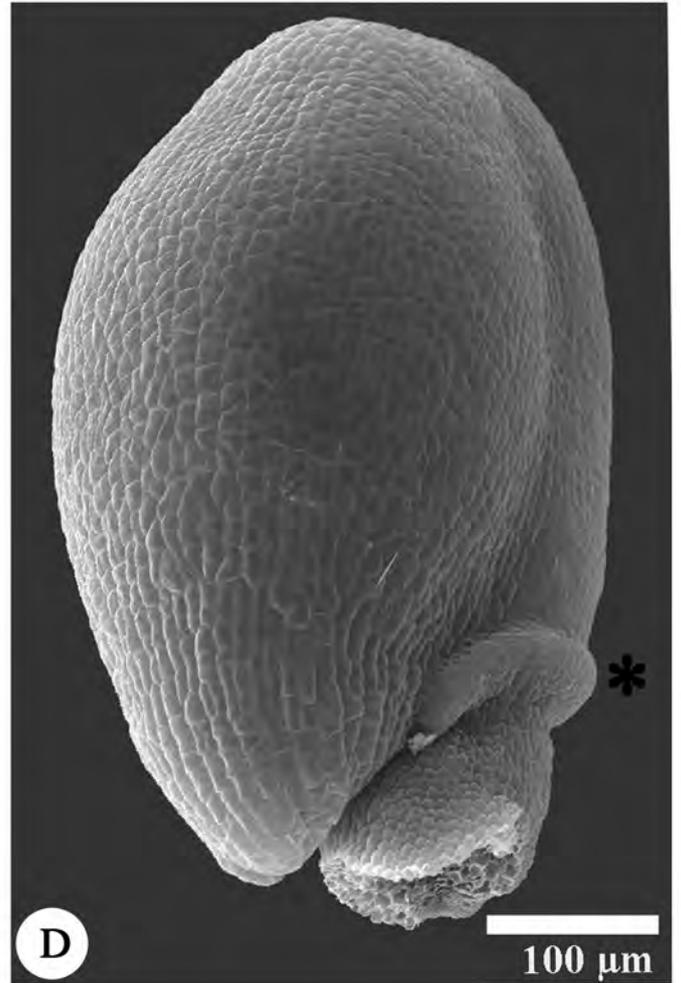
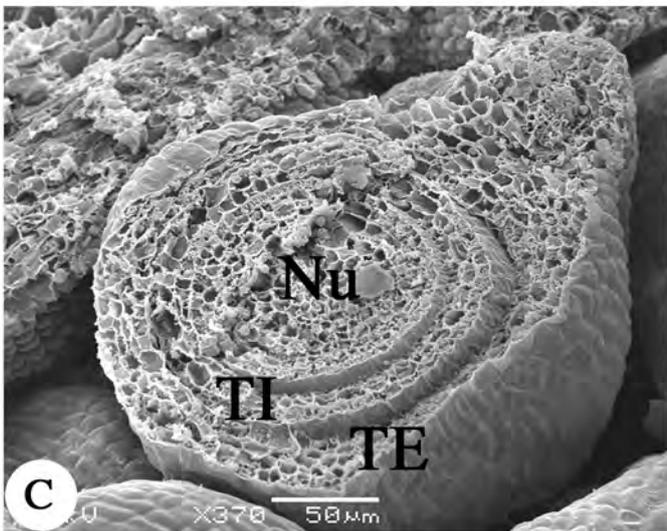
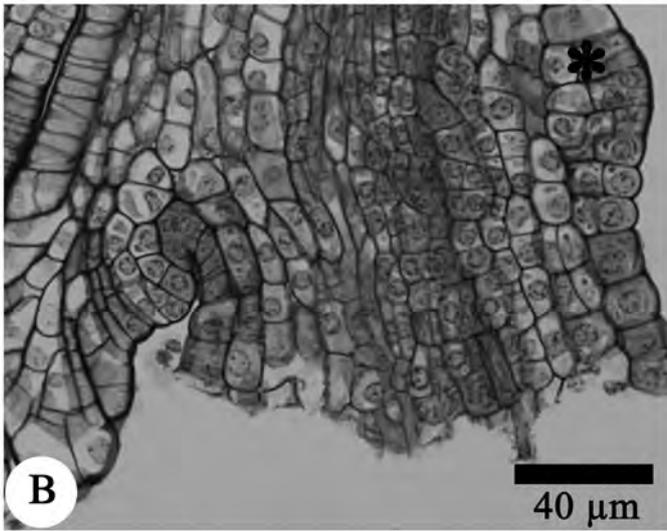


Figura 4.13 - Estratos parietais e a formação do androsporângio em *P. elegans*. (A) Divisões periclinais nas camadas subdérmicas (C2) (seta). (B) Formação da célula parietal primária (CPP) e célula arquesporial (CAr) (setas); CPP divide-se novamente e forma a célula parietal secundária externa (CPSE) e interna (CPSI) (setas); nos flancos do tecido arquesporial, divisões periclinais e anticlinais tanto na camada central, quanto subdérmica, contribuem no processo de expansão da região conectival (*). (C) CPSE divide-se e forma o endotécio (En) e camada média (CM), enquanto que a CPSI diferencia-se no tapete (Ta). (D) As camadas médias dividem-se formando dois a três estratos. Legenda: (C1) camada dérmica; (C2) camada subdérmica; (C3) camada central; (CAr) célula arquesporial; (CM) camada média; (CPP) célula parietal primária; (CPSE) camada parietal secundária externa; (CPSI) camada parietal secundária interna; (En) endotécio; (Ep) epiderme;(Tp) tapete.

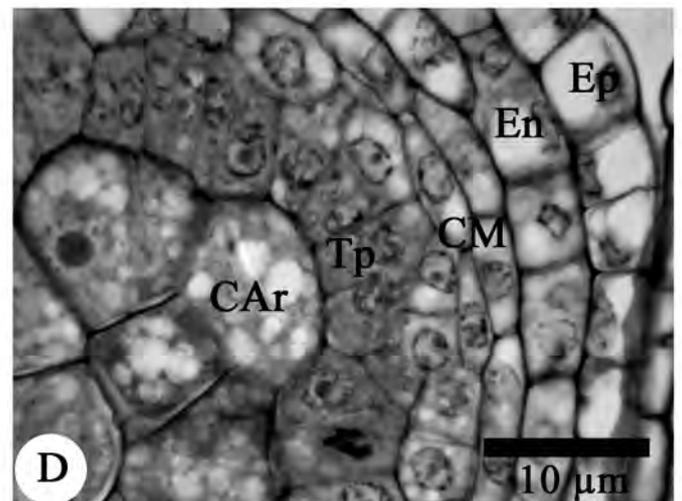
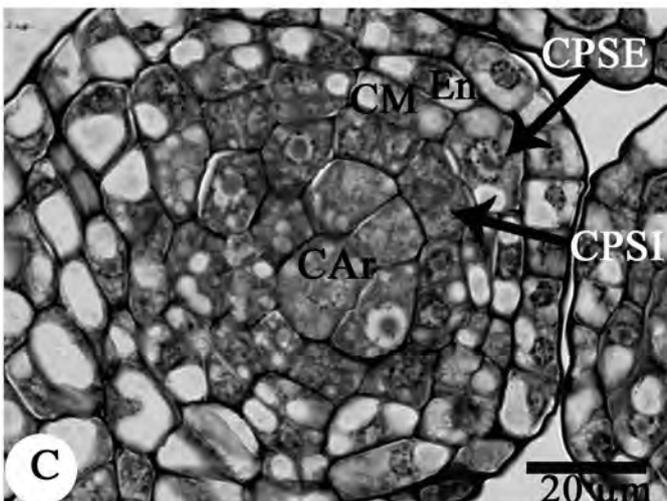
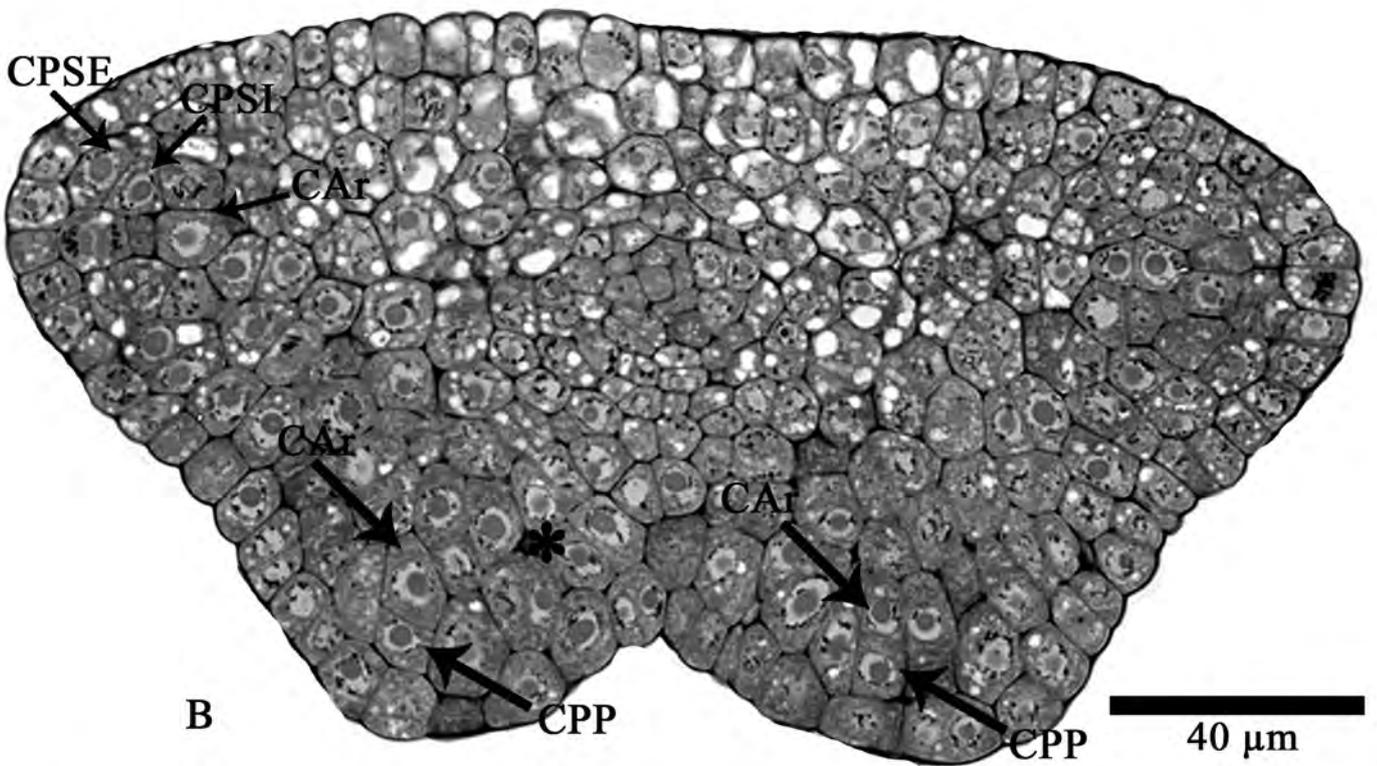
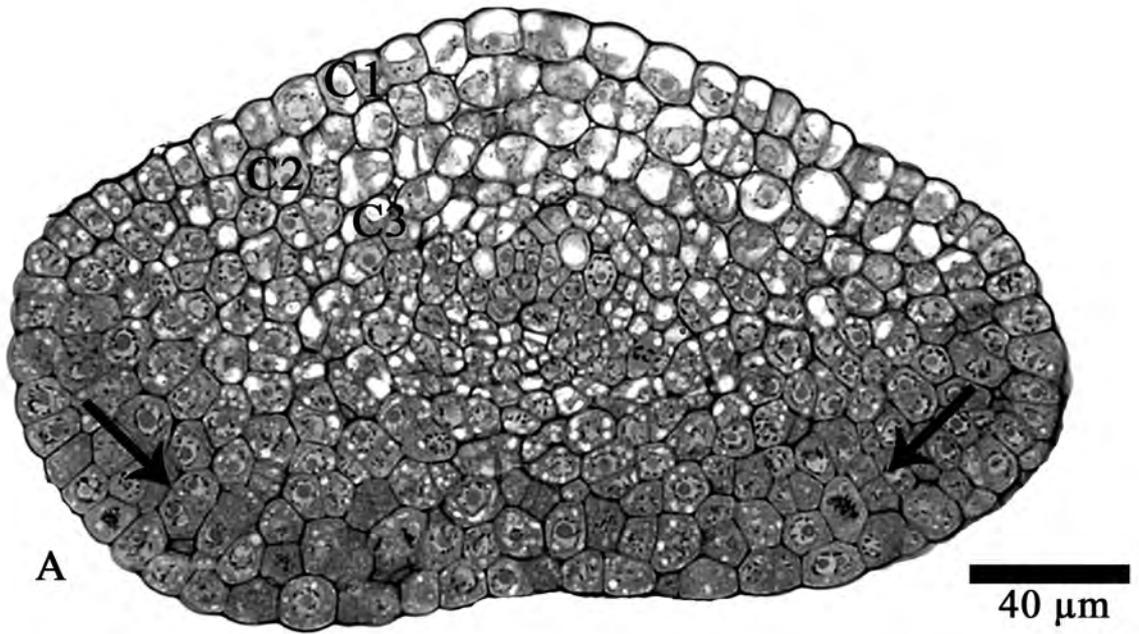


Figura 4.14 - Antera madura. (A) *P. elegans*. (B) *P. haematostigma*. Legenda: (Co) conectivo; (Fx) feixe vascular; (En) endotécio; (Lo) lóculo; (CEs) células estomiais; (Se) septo.

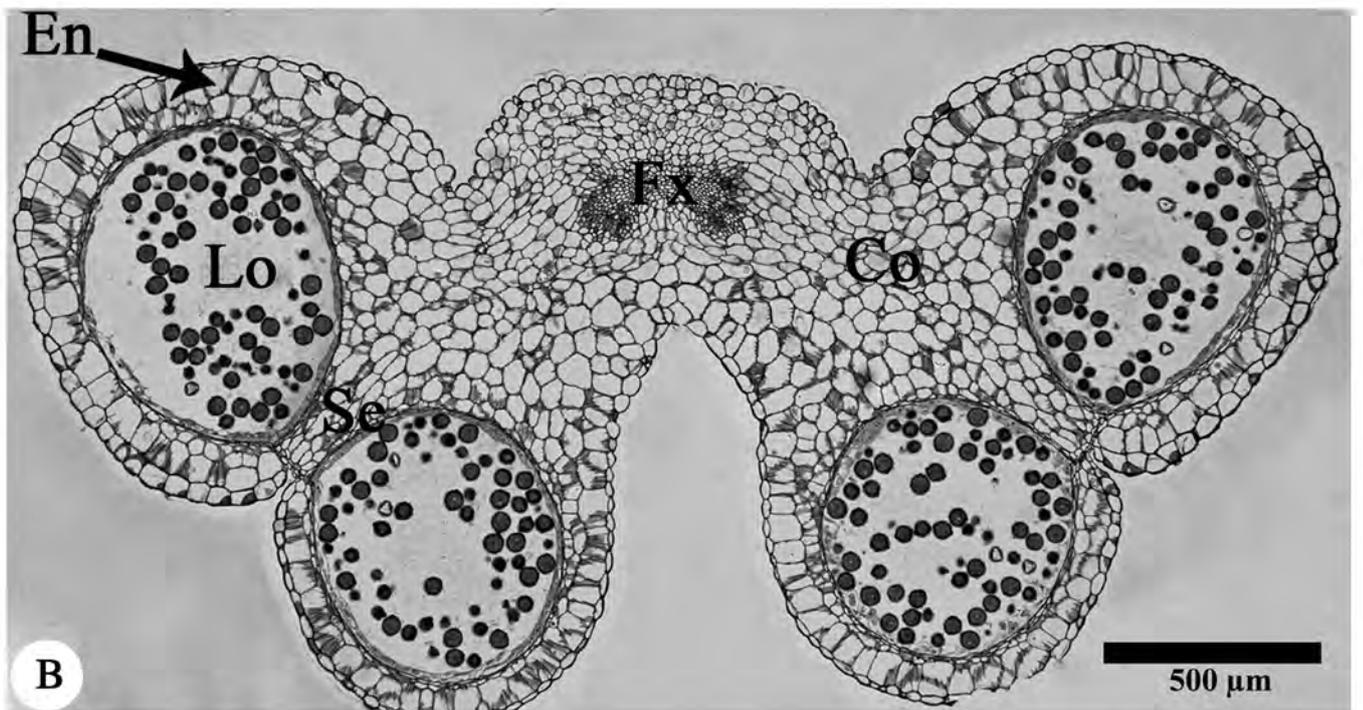
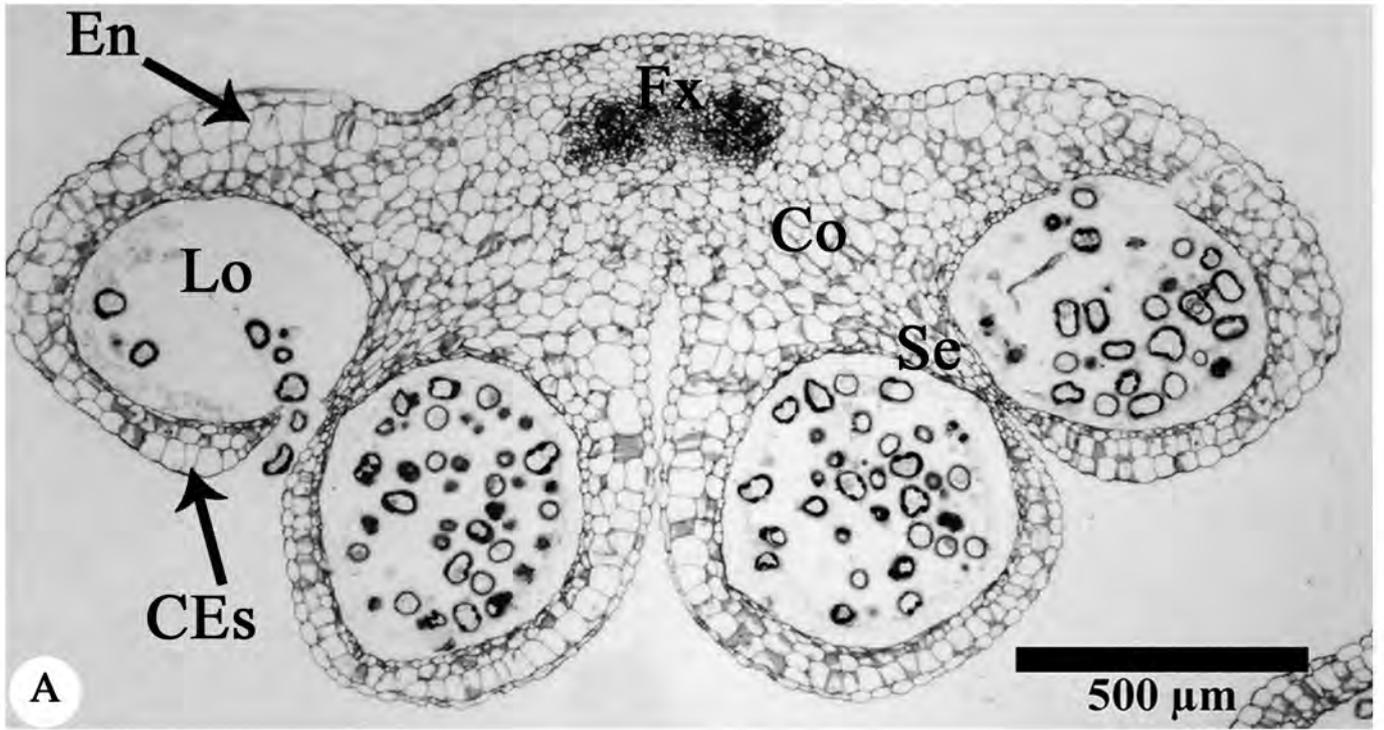


Figura 4.15 - Região estomial da antera madura. (A) Região estomial de *P. elegans*. (B) Região estomial de *P. elegans* com teste para amido. (C) Região estomial de *P. haematostigma* com teste para amido. Legenda: (En) endotécio; (Lo) lóculo; (CEs) células estomiais; (Se) septo.

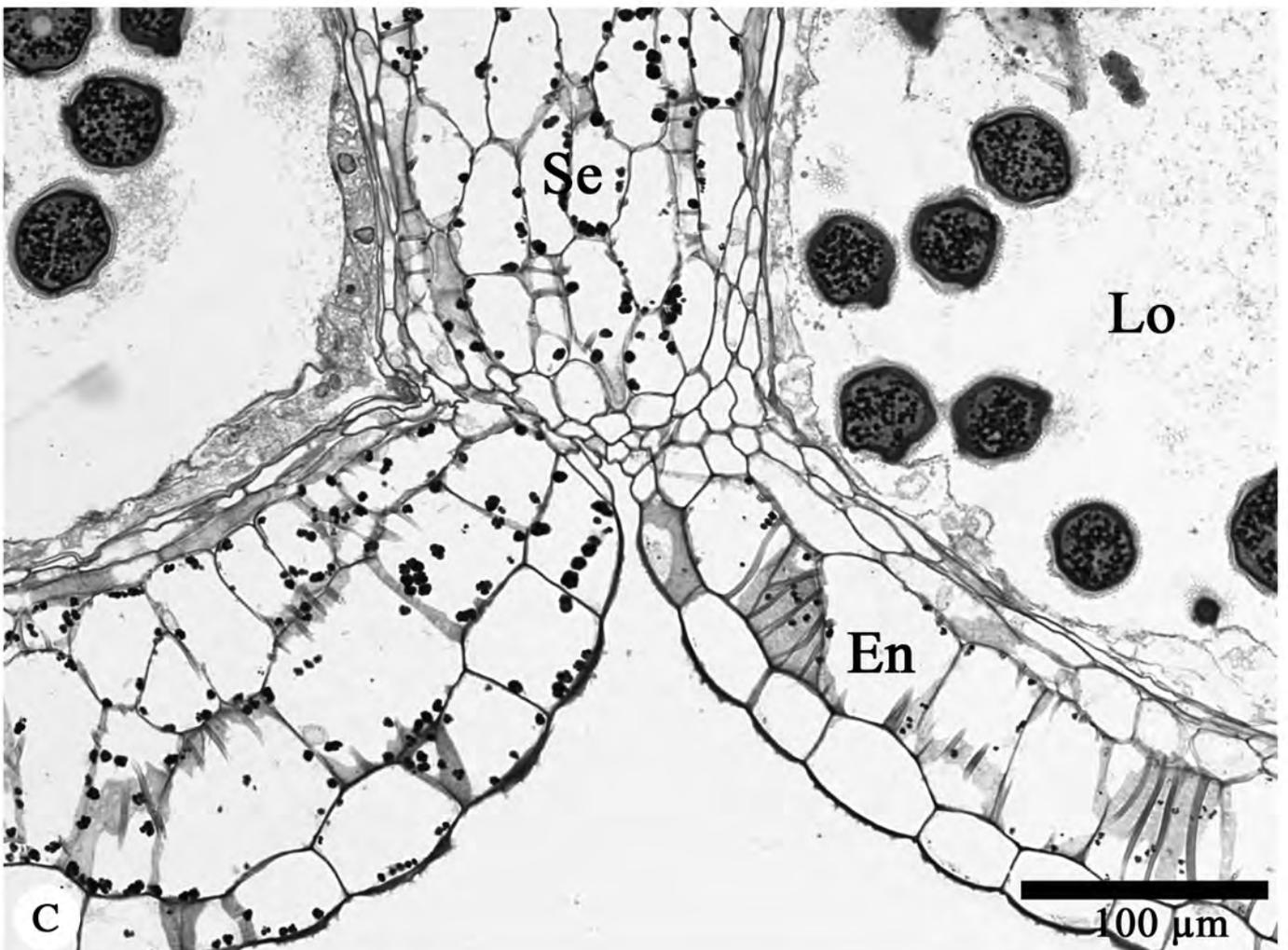
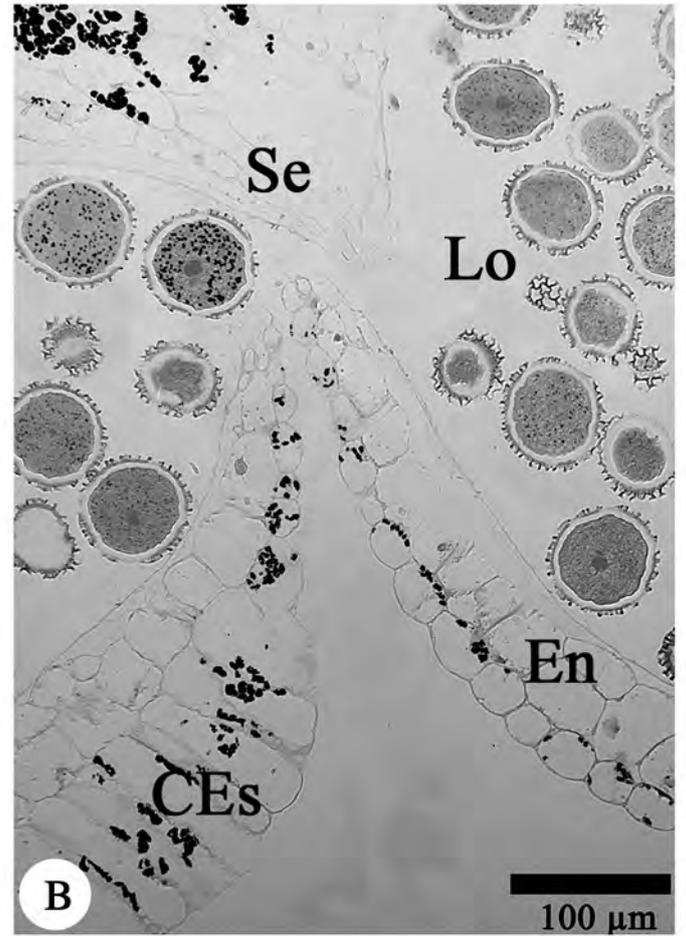
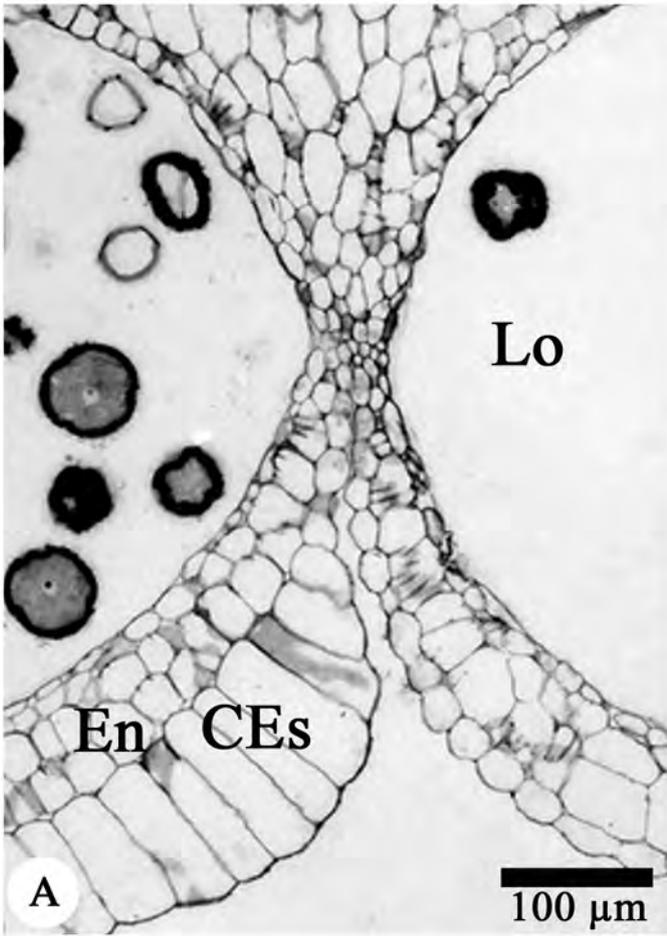


Figura 4.16 - Antera madura. (A) Endotécio com espessamentos em *P. elegans*. (B) Endotécio com espessamentos em *P. haematostigma* visto em contraste interferencial. (C) Espessamentos dissociados em *P. haematostigma* em forma de ‘U’ (cabeça de seta) e circular (*). (D-E) Idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio em *P. haematostigma* (seta). Legenda: (En) endotécio; (Lo) lóculo.

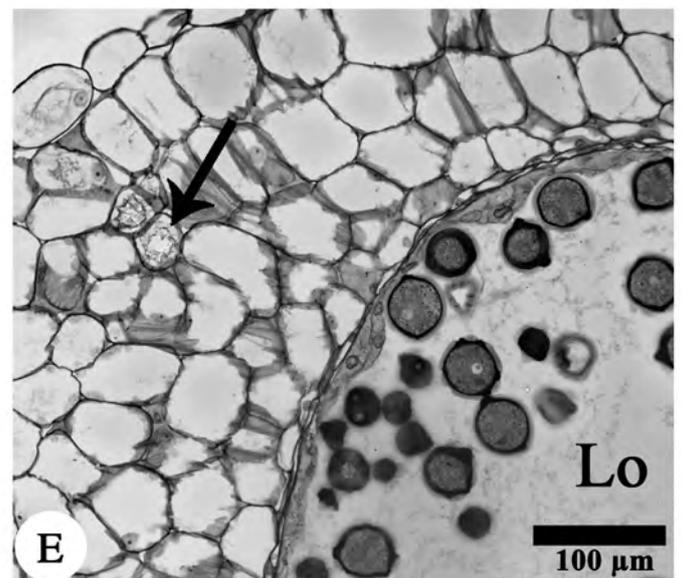
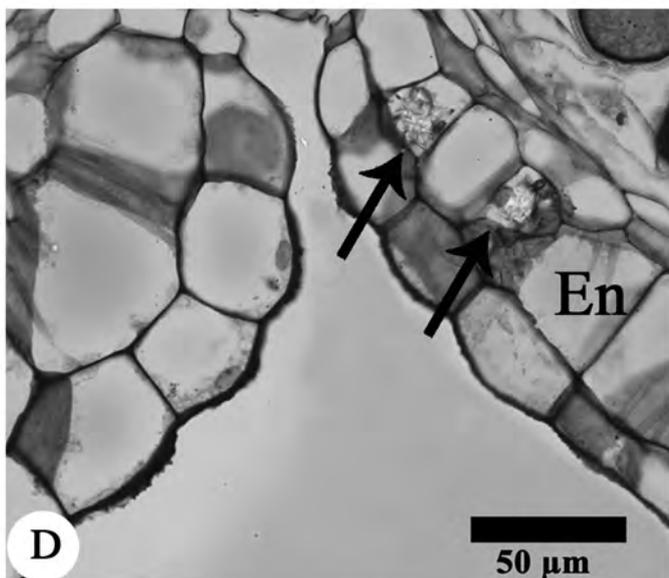
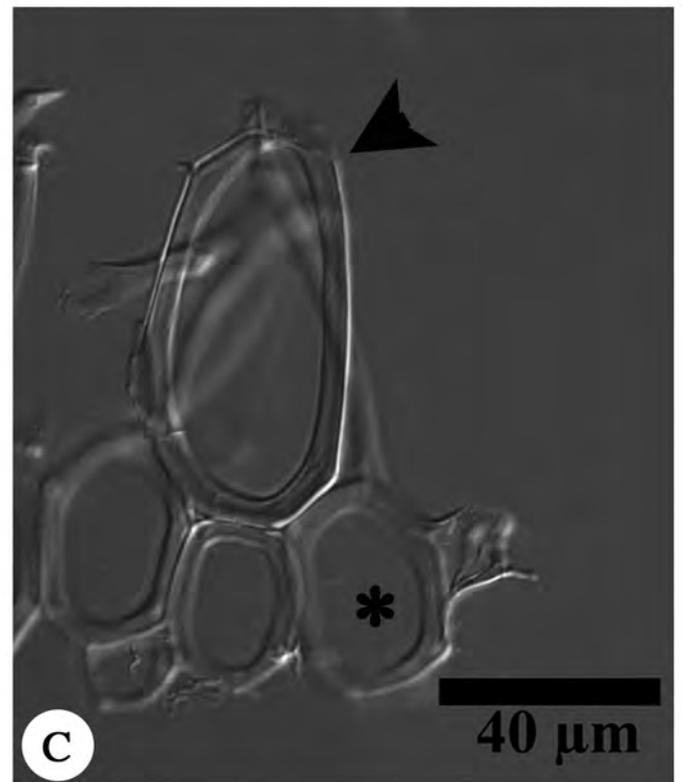
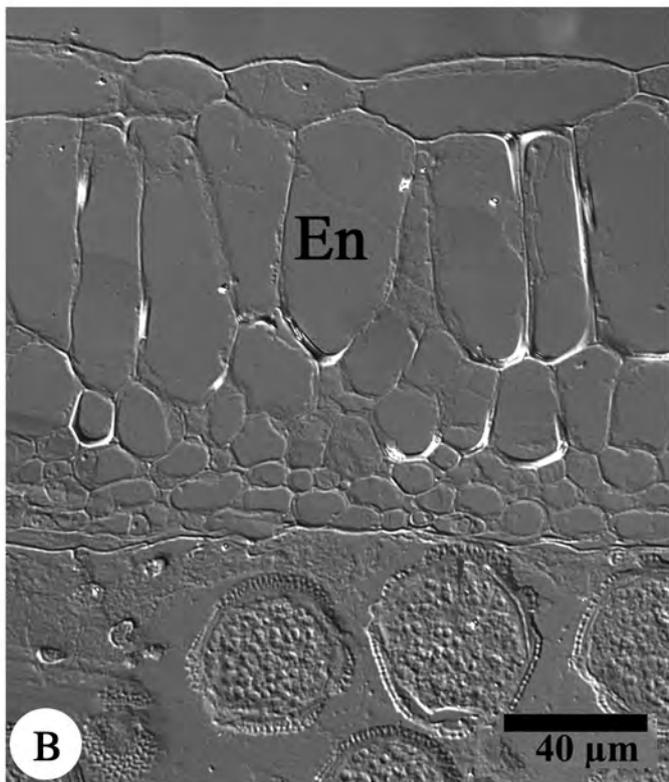
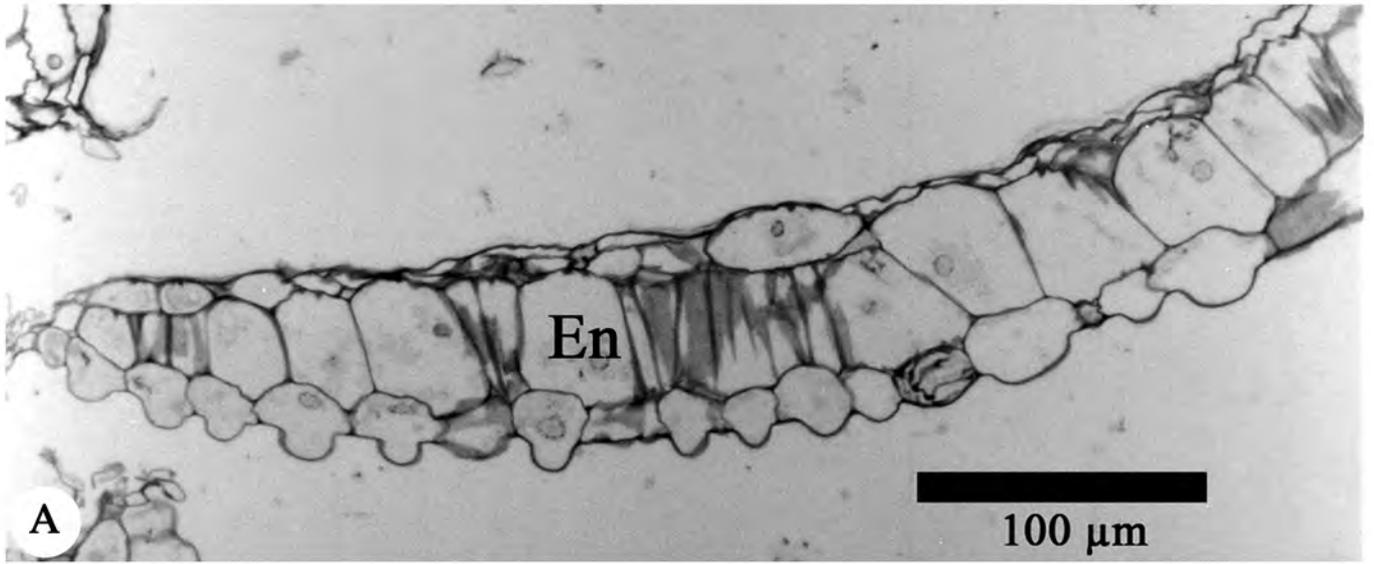


Figura 4.17 - Antera jovem de *P. elegans*. (A) Visão geral da antera tetrasporangiada. (B) Esporângio. (C) Esporângio com teste para celulose negativo para as paredes do tapete. (D) Detalhe dos estratos parietais com tapete binucleado e células arquesporais com conteúdos no citoplasma. Legenda: (CAr) células arquesporiais; (CM) camadas médias; (En) endotécio; (Ep) epiderme; (Ta) tapete.

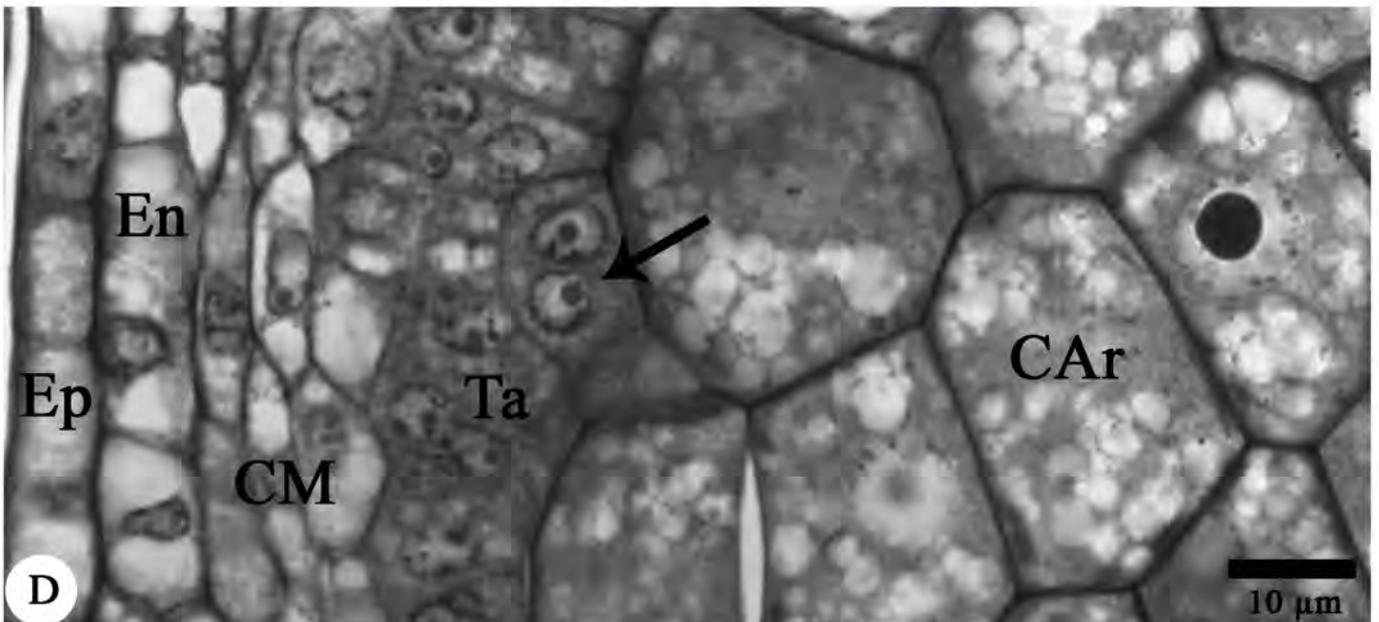
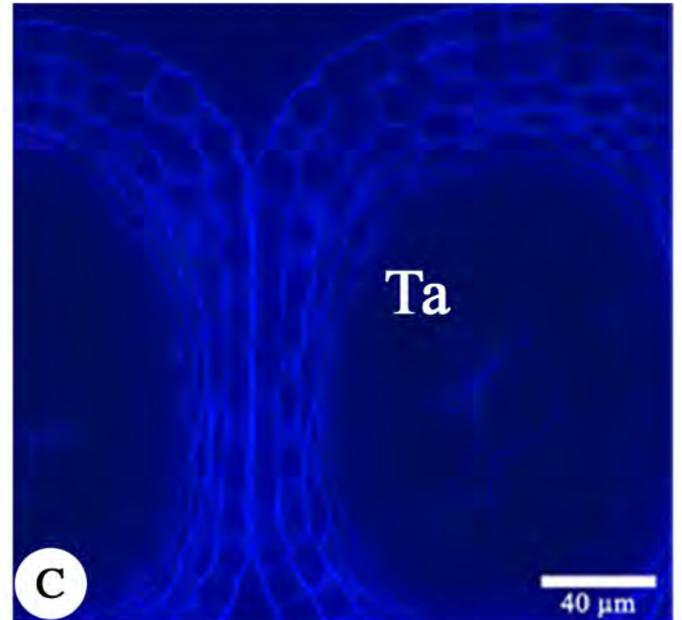
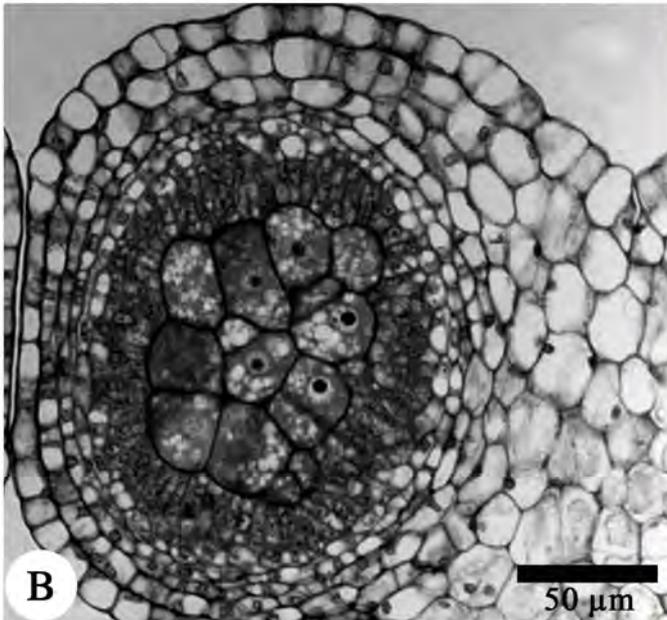
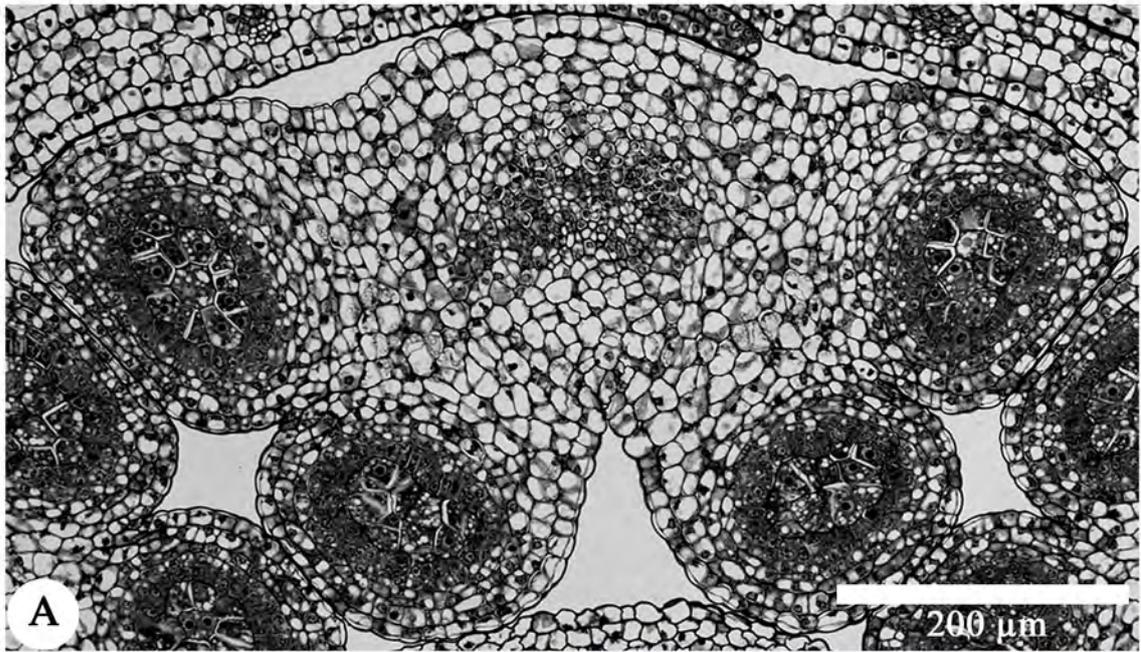


Figura 4.18 - Androsporogênese de *P. elegans*. (A-B) Células do tapete com vacúolo e células arquesporais com núcleo homogêneo. (B) Contraste interferencial. (C) Núcleos da célula do tapete em divisão e células-mãe de andrósporo em prófase I da meiose. (D) Parede de calose ao redor dos androsporócitos em prófase I. (E) Tétrade de andrósporos com parede de calose (F) Tétrade de andrósporos com canais citomíticos (seta).
Legenda: (CAr) células; (CMA) célula-mãe de andrósporo; (Ta) tapete. Legenda: (CAr) células arquesporais; (CMA) célula-mãe de andrósporos; (Ta) tapete.

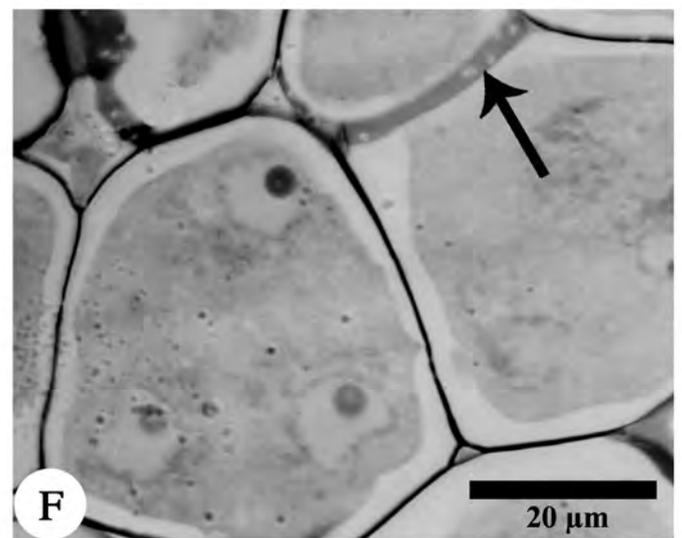
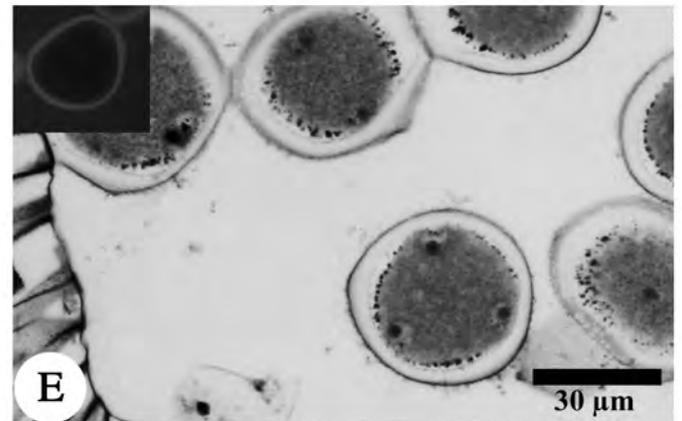
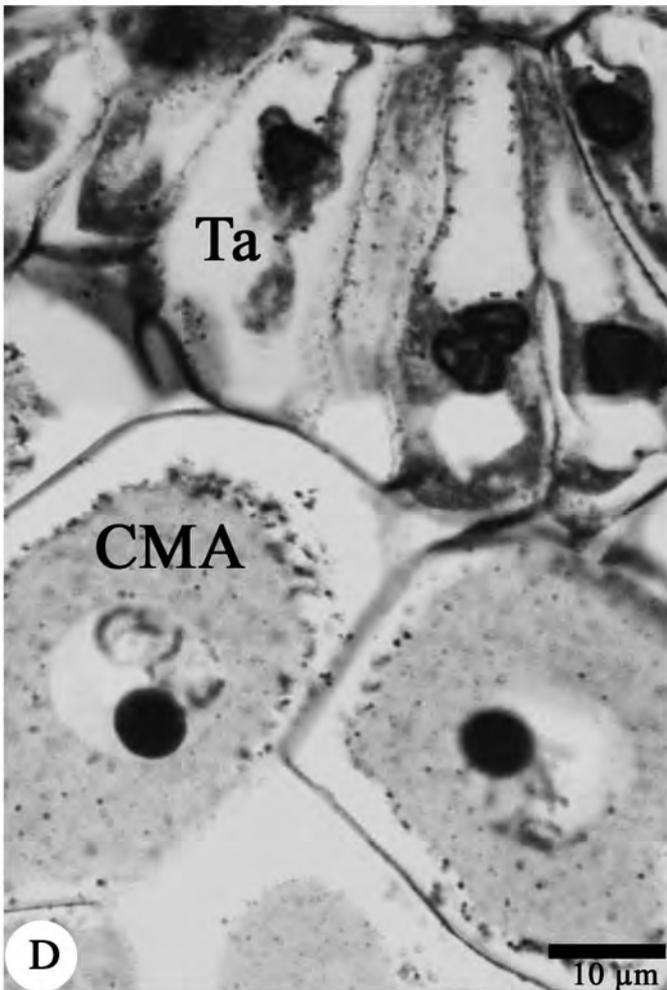
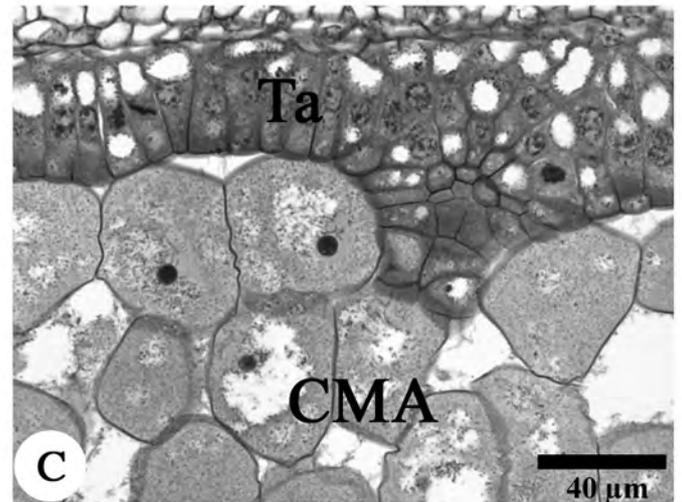
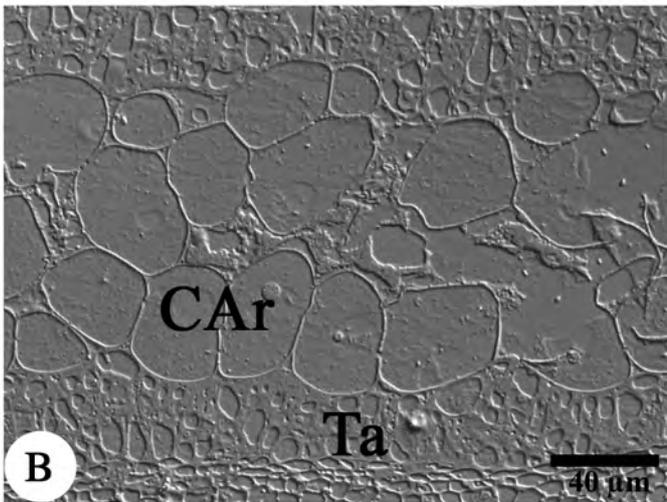
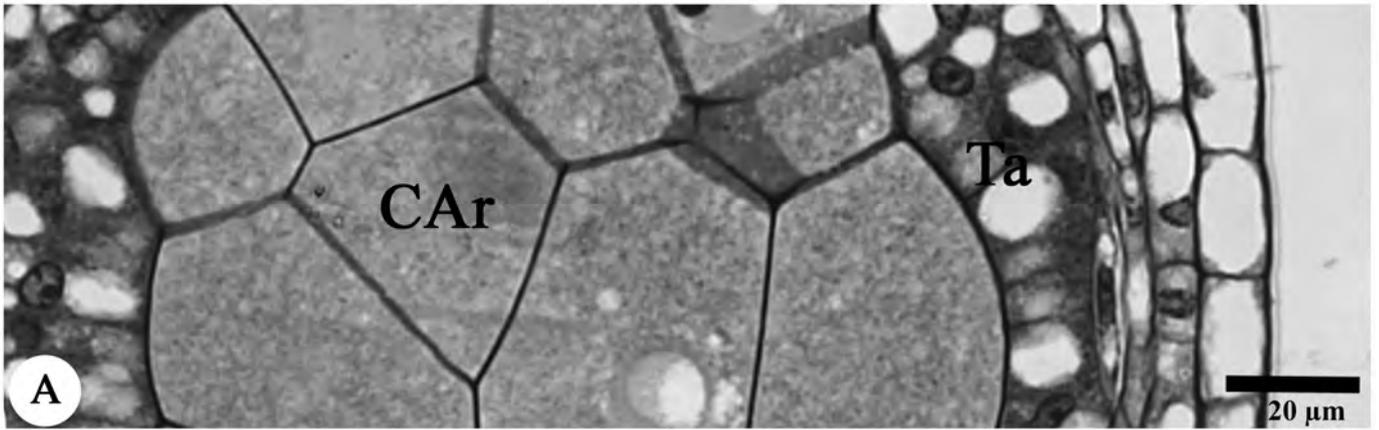


Figura 4.19 - Tétrade de andrósporos. (A) Tétrade em citocinese simultânea e corados com Azul de Toluidina. (B) Reação para calose. (C-D) Tétrades de disposição tetraédrica (seta) de *P. elegans*. (E) Tétrade com primexina (cabeça de seta) de *P. haematostigma*. (F) Tétrade com primexina com reação de PAS. (G) Reação para proteínas.

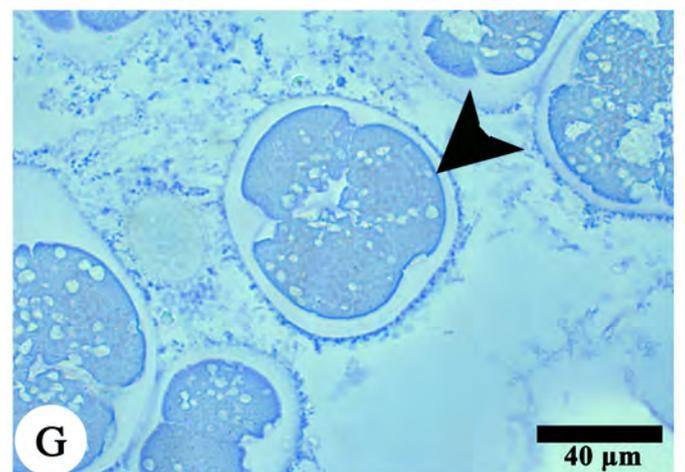
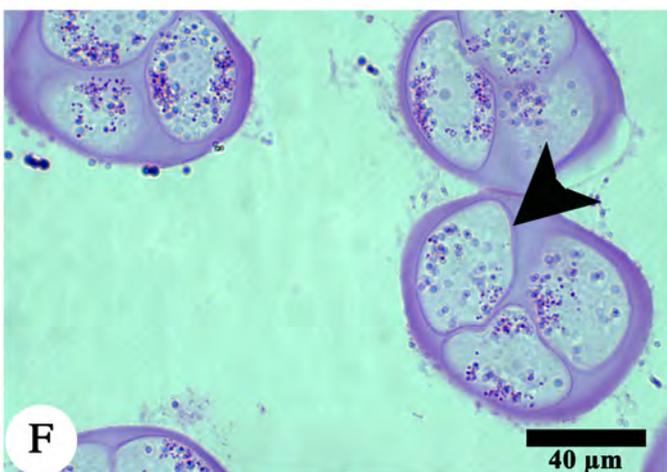
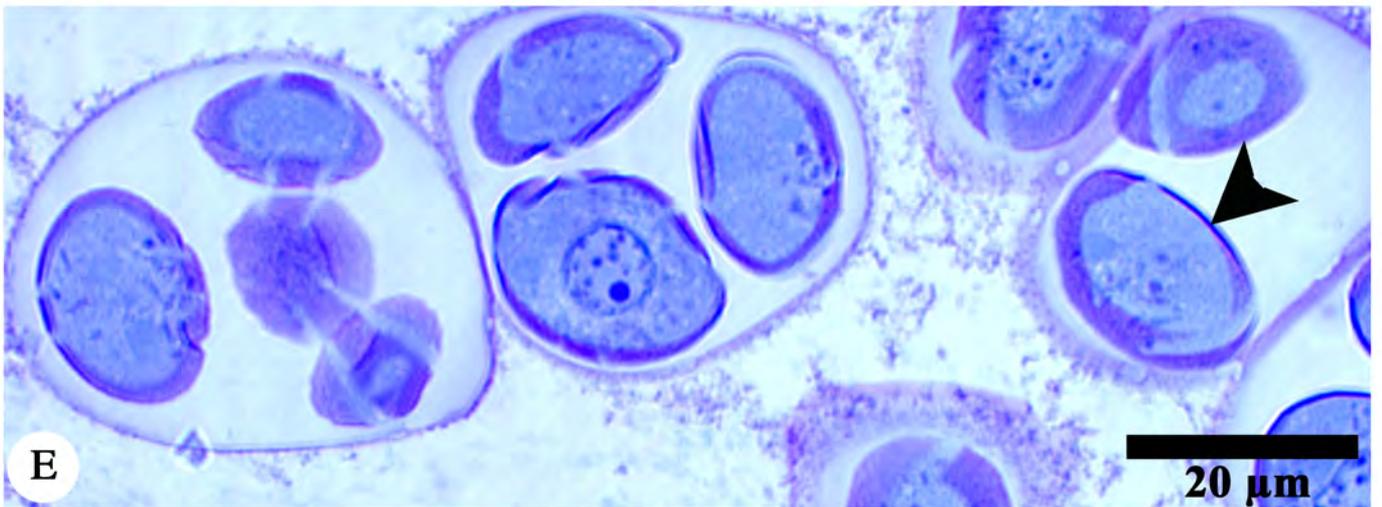
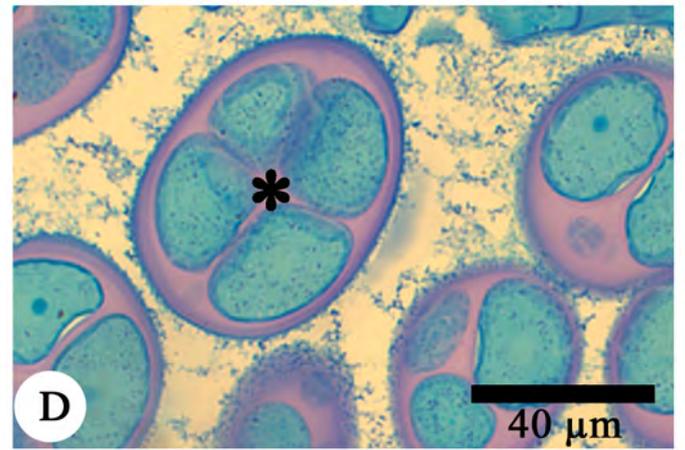
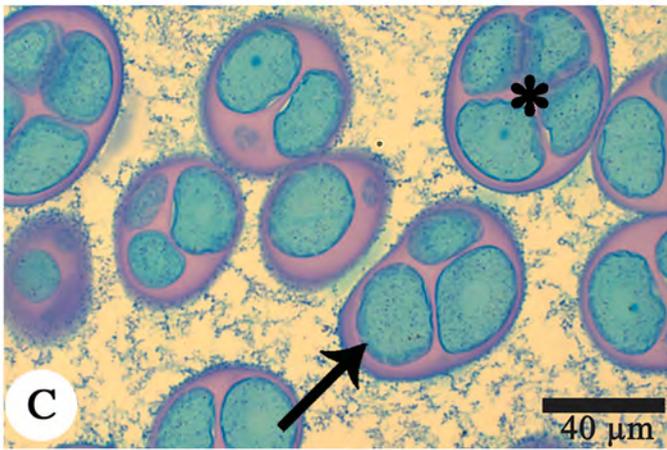
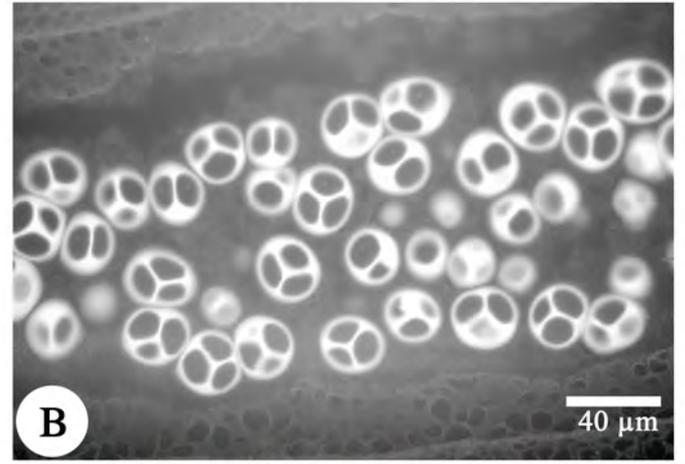
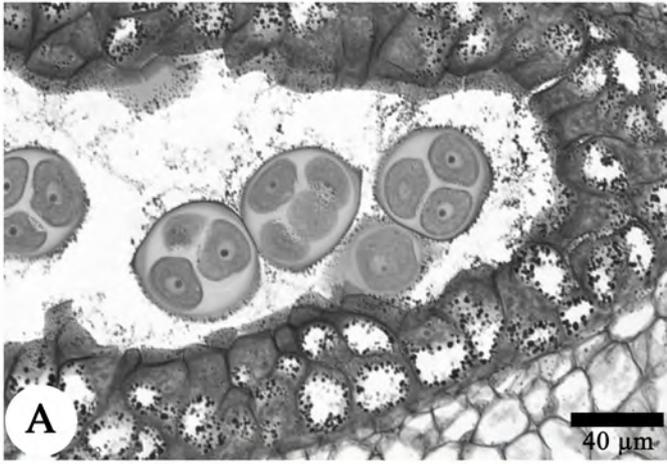


Figura 4.20 - Tétrade de andrósporos com exina. (A) Contraste interferencial., *P. elegans* (B) Reação para esporopolenina, *P. elegans*. (C) Andrósporos de *P. haematostigma*, momentos antes da dissociação da parede de calose. (D) Reação para esporopolenina. (E) Reação para calose (seta) em *P. haematostigma*.

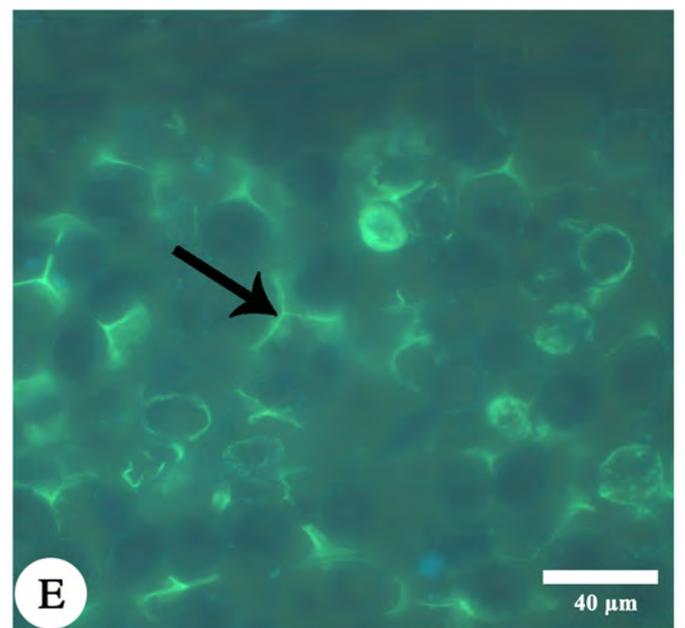
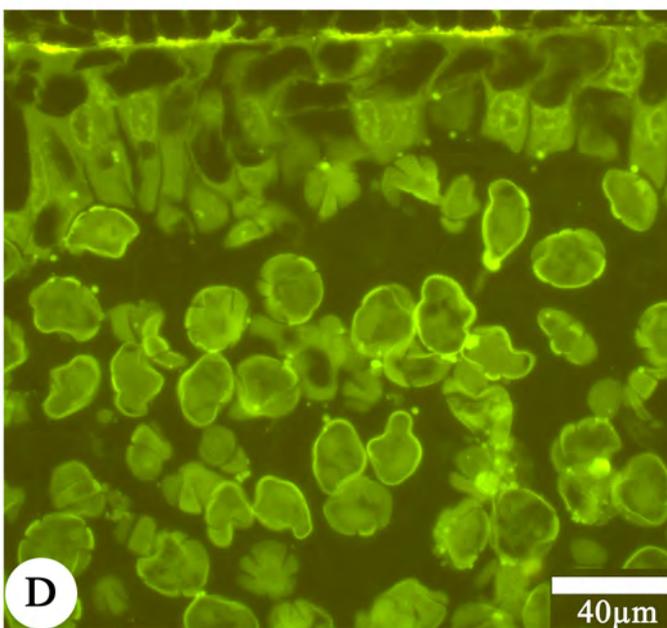
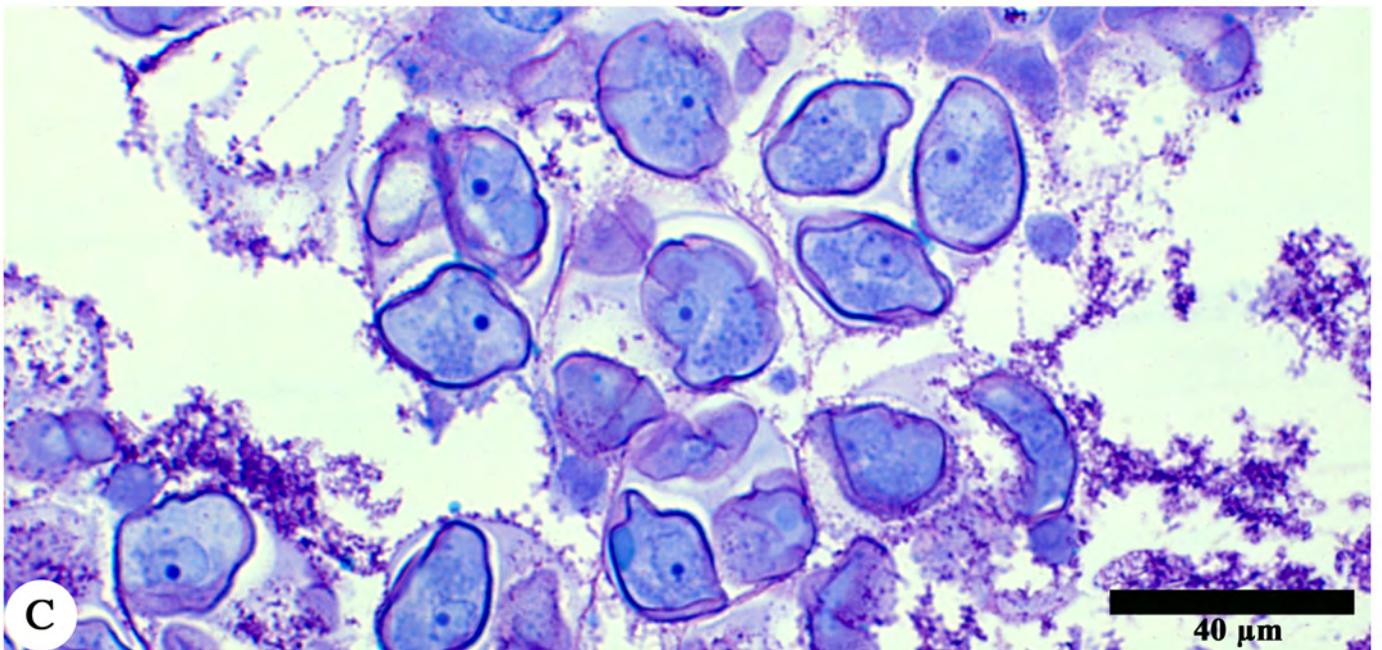
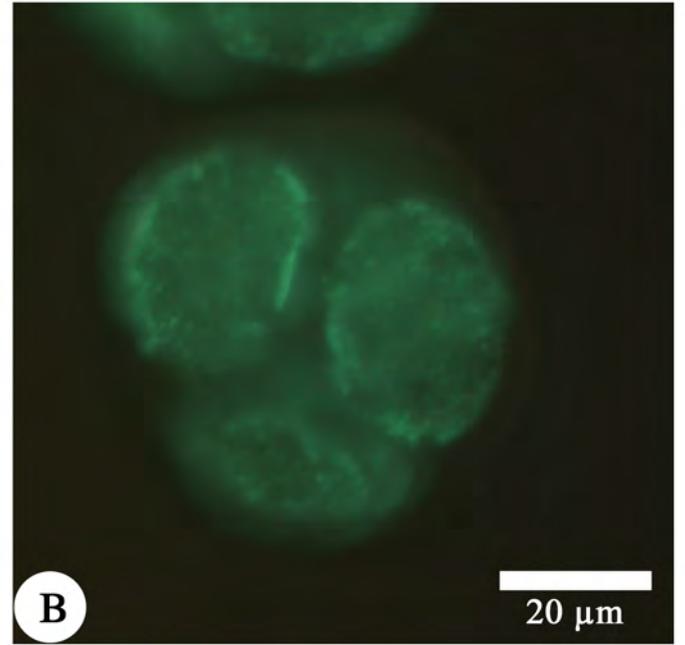
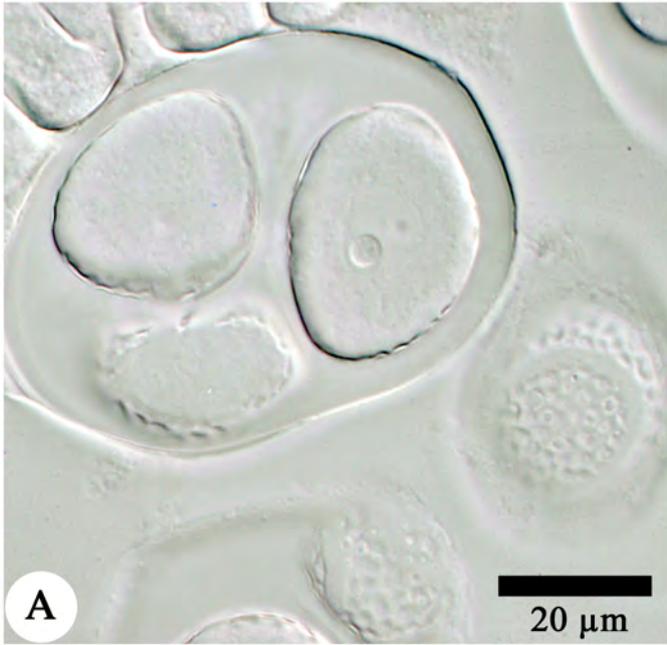


Figura 4.21 - Tapete e andrósporos de *P. elegans*. (A) Reação para parede de calose negativo para o tapete e autofluorescência da exina. (B) Andrósporos jovens com acúmulo péctico na região das aberturas (cabeça de seta) e (C) Teste para amido. (D) andrófito com vacúolo (*). (E) Seção tangencial do tapete evidenciando os núcleos poliplóides (seta) e formato irregular.

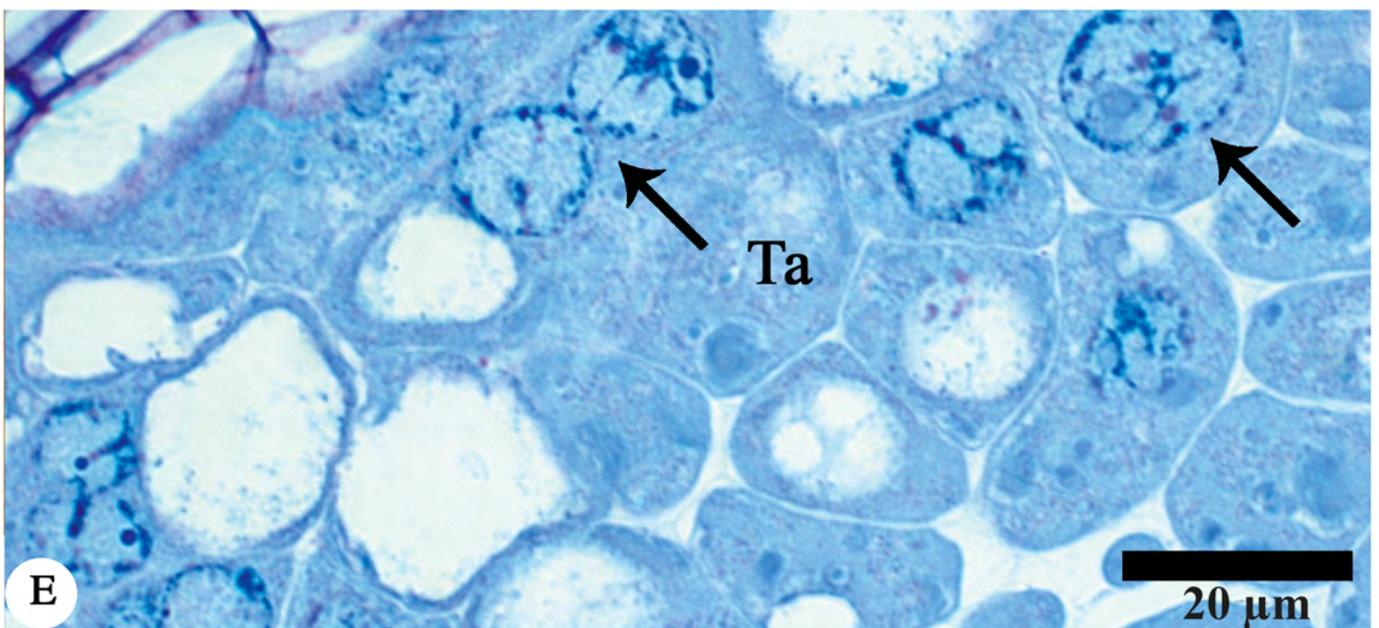
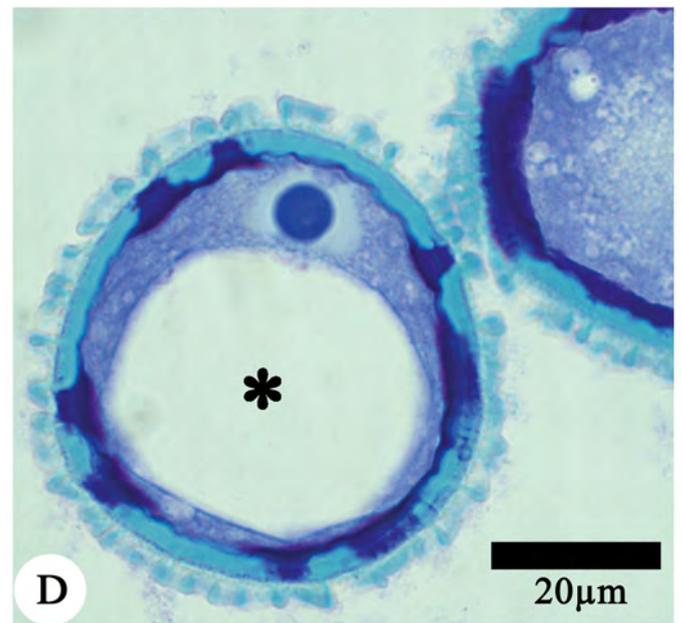
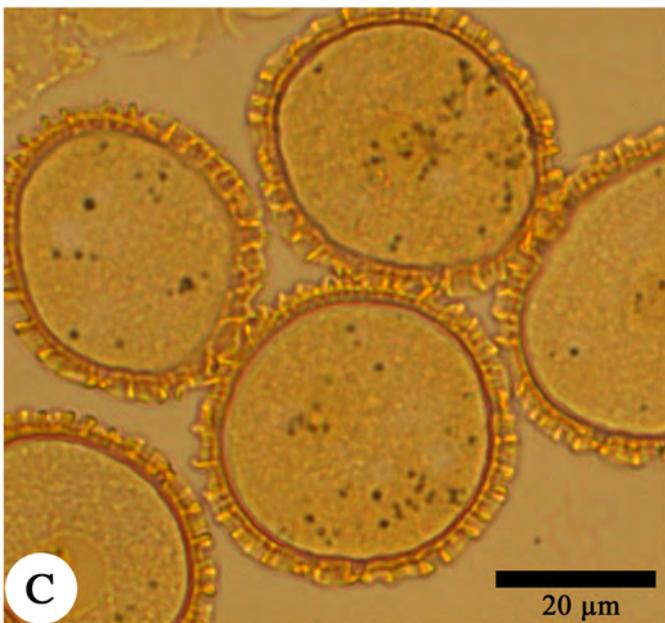
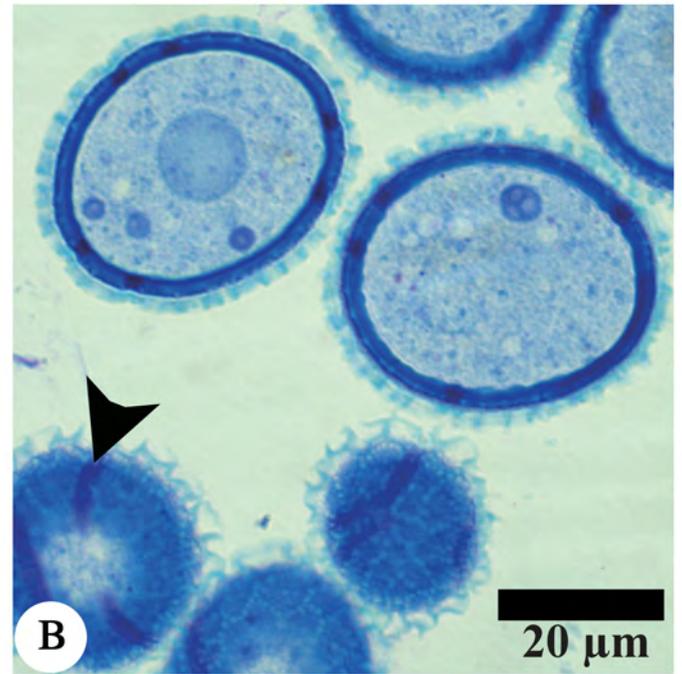
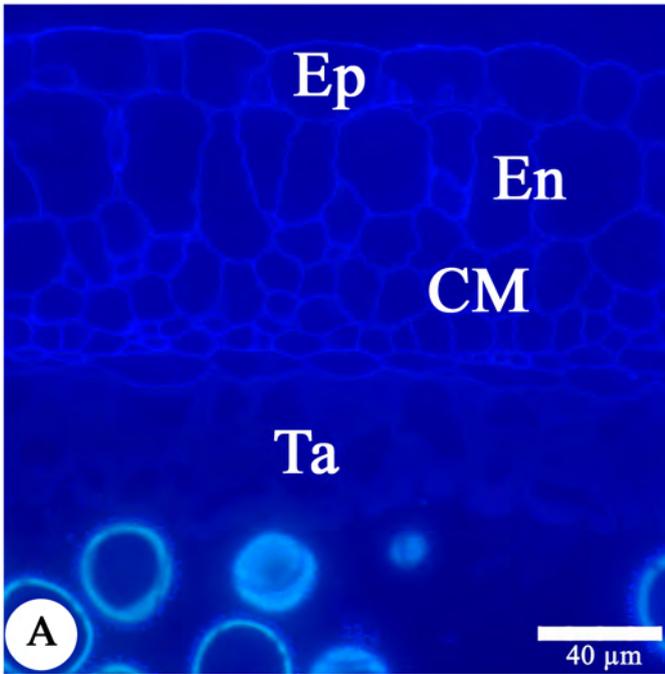


Figura 4.22 - Tapete e andrósporos de *P. haematostigma*. (A) Teste para parede de celulose e negativo para a parede das células do tapete e autofluorescência da exina dos andrósporos. (B) Andrósporos jovens com oncus da exina péctico. (C) Detalhe com oncus (cabeça de seta) (D-E) Andrófito com vacúolo (*). (E) detalhe. (F) Mitose do andrófito (seta). Legenda: (CM) camadas médias; (En) endotécio; (Ep) epiderme; (Ta) tapete.

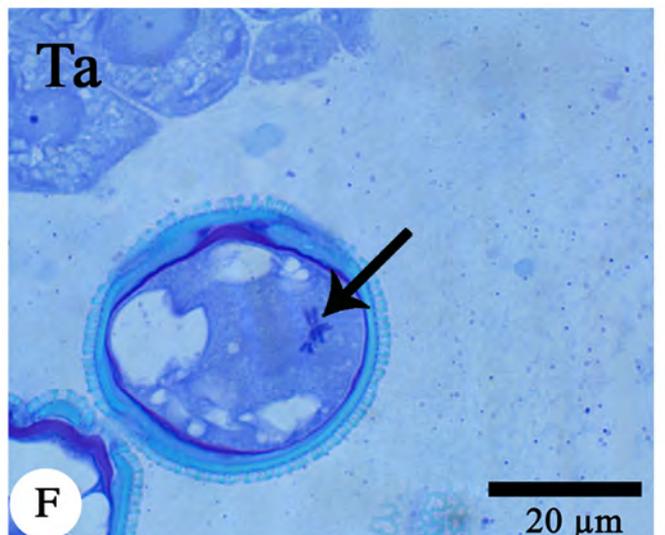
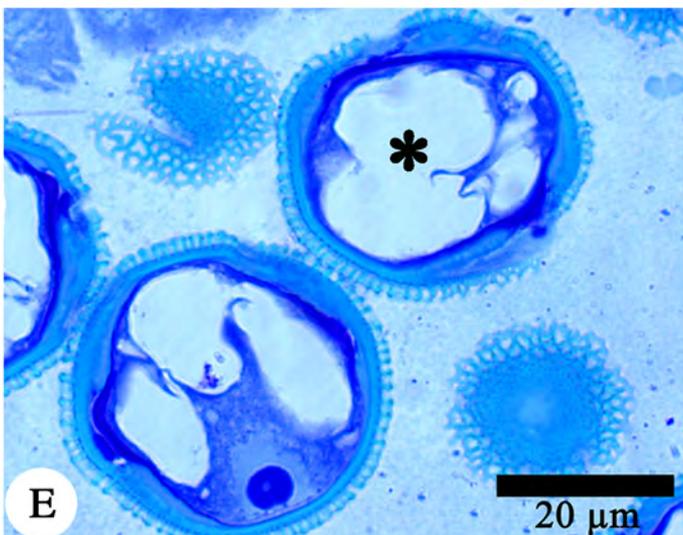
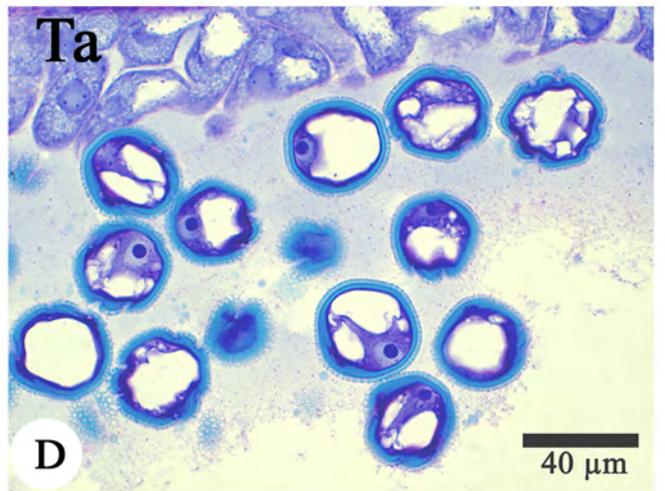
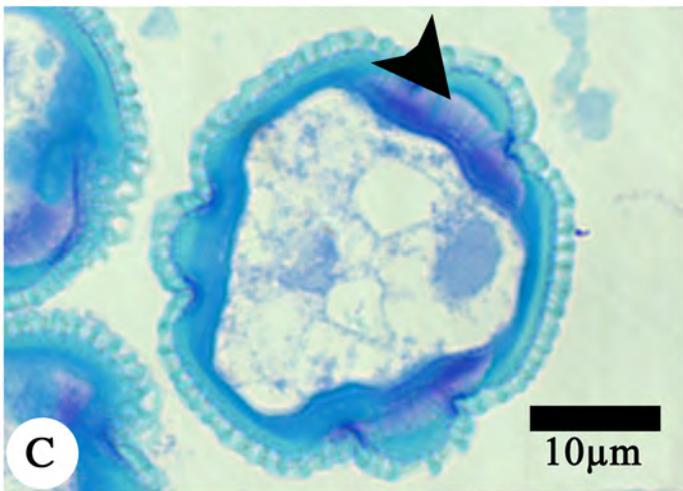
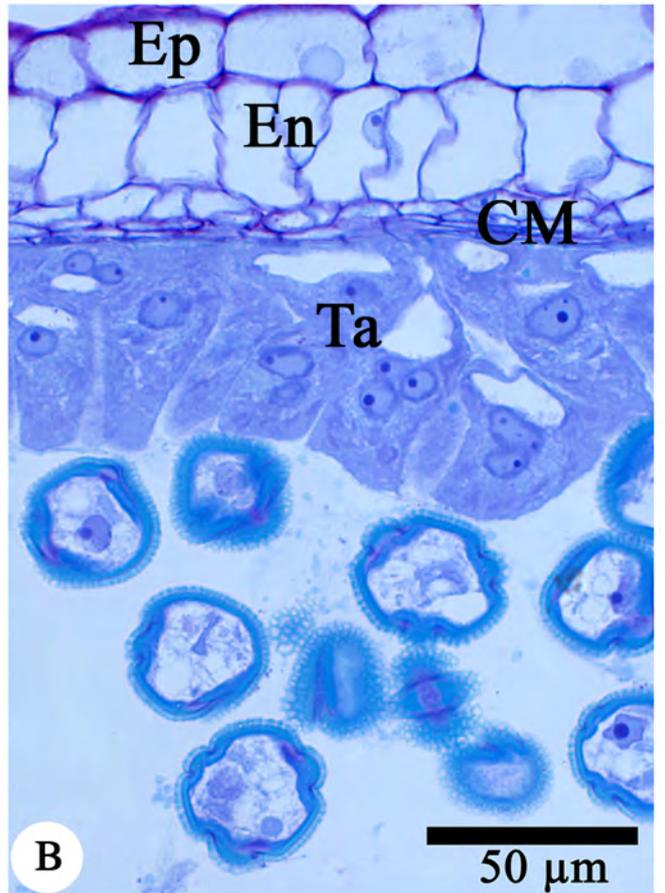
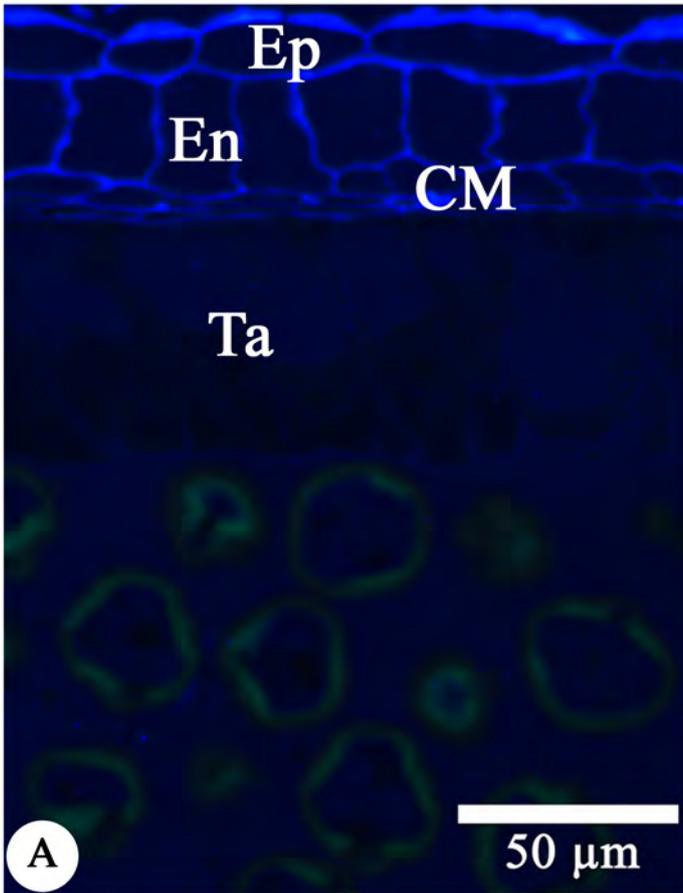


Figura 4.23 - Androgametogênese. (A-B) Célula generativa parietal e núcleo vegetativo central (A) *P. elegans*; (B) *P. haematostigma*. (C-D) Célula generativa englobada pela célula vegetativa (C) *P. elegans*; (D) *P. haematostigma* (D). (E-F) Pólen abortivo (*). (E) *P. elegans*; (F) *P. haematostigma*. Legenda: (CG) célula generativa; (NV) núcleo vegetativo.

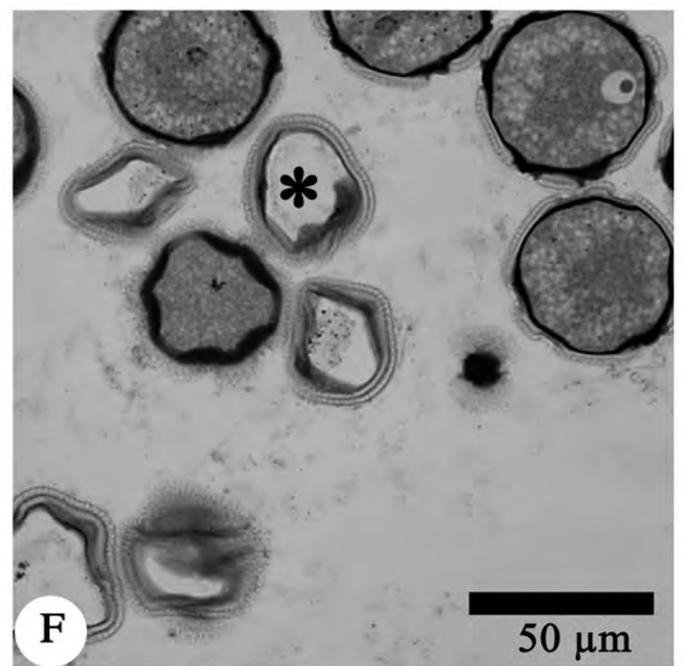
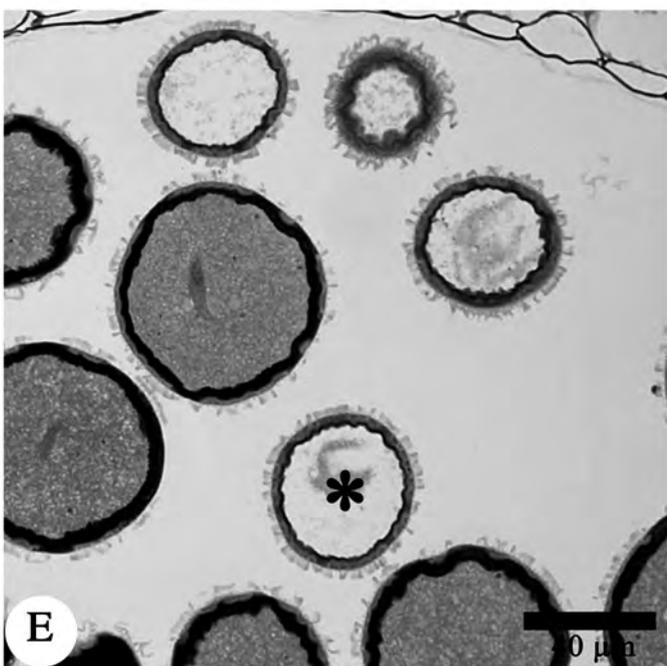
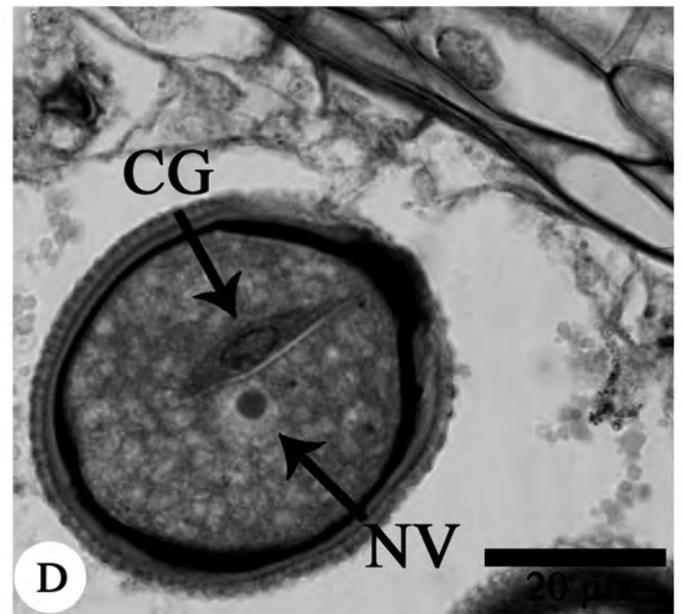
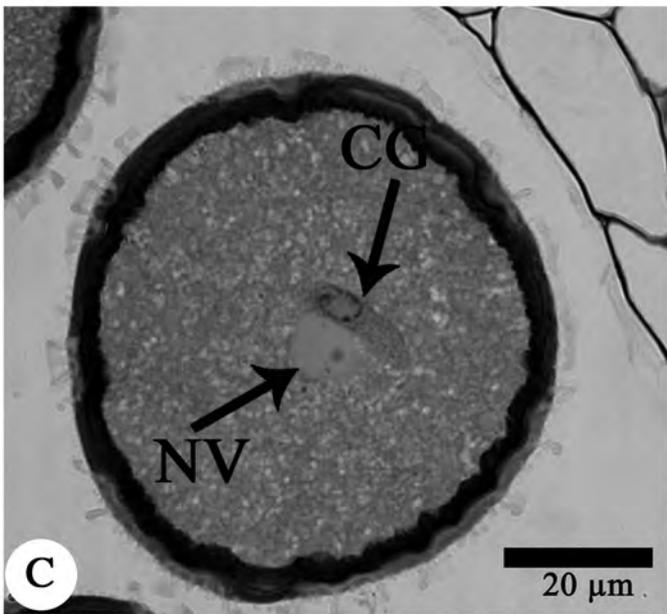
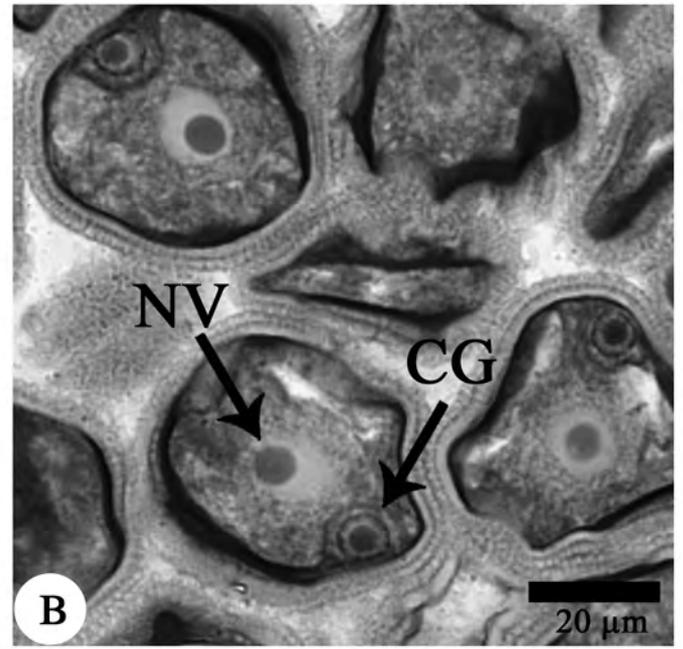
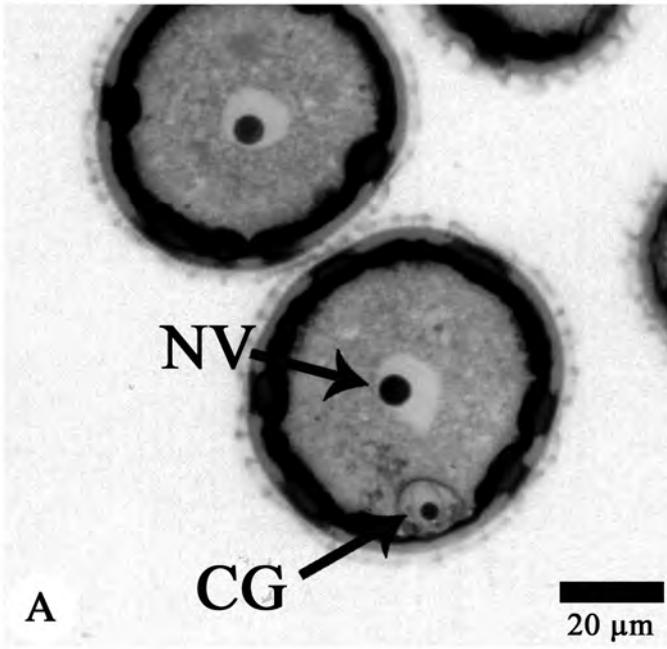


Figura 4.24 - Pólen maduro. (A) Reação para amido em *P. elegans*. (B) Pólen de *P. haematostigma* em contraste interferencial. (C-D) Pólen de *P. elegans* em reação de PAS. (E) Conteúdo lipídico sobre o pólen de *P. elegans* e (F) de *P. haematostigma*.

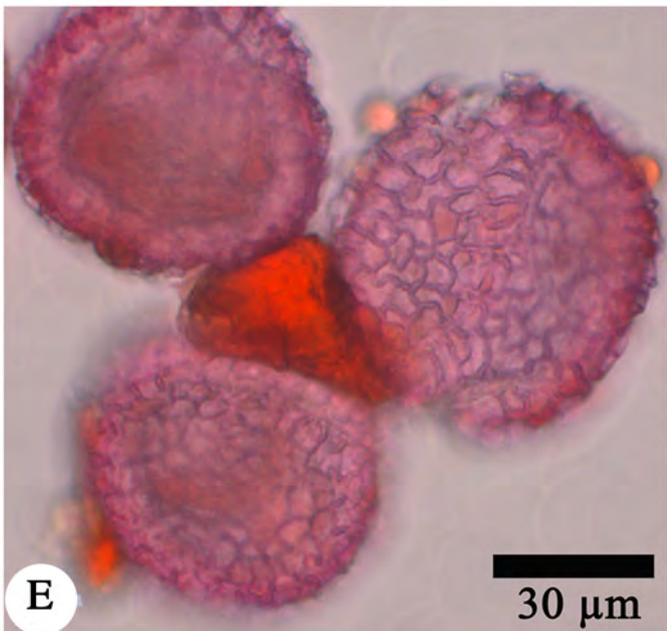
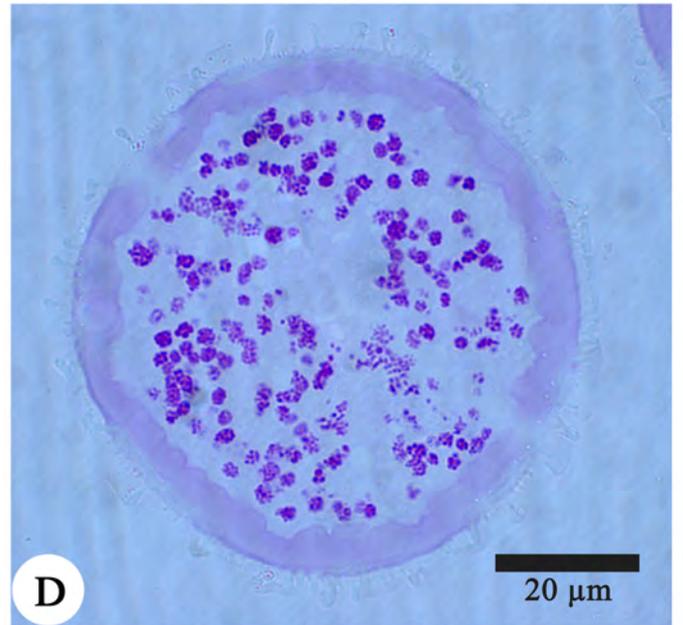
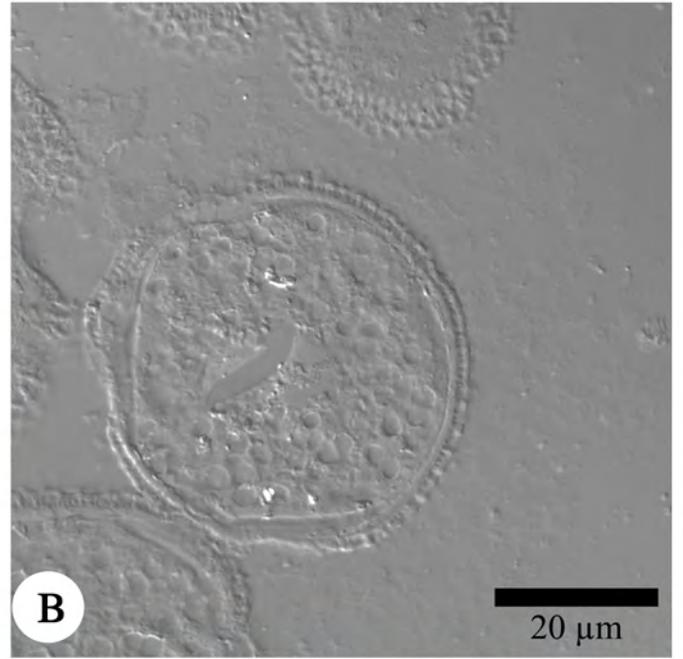
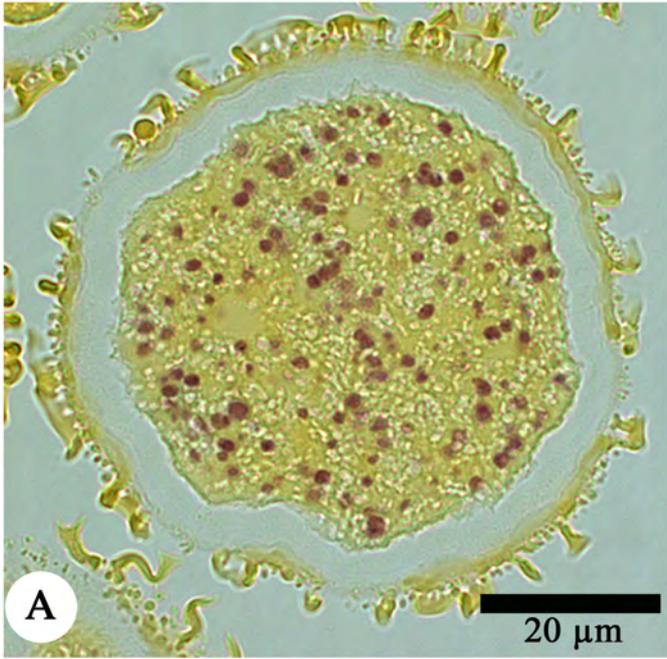


Figura 4.25 - Tapete. (A) Núcleos com diferentes condições de fusão em *P. elegans* e orbículos na cavidade locular (seta); (B-C) Tapete com grânulos no citoplasma (B) *P. haematostigma*; (C) *P. elegans*. (D) Membrana peritapetal em *P. haematostigma* (*) (E) Membrana peritapetal (*) de *P. elegans* e (F) de *P. haematostigma*. Legenda: (Ta) tapete.

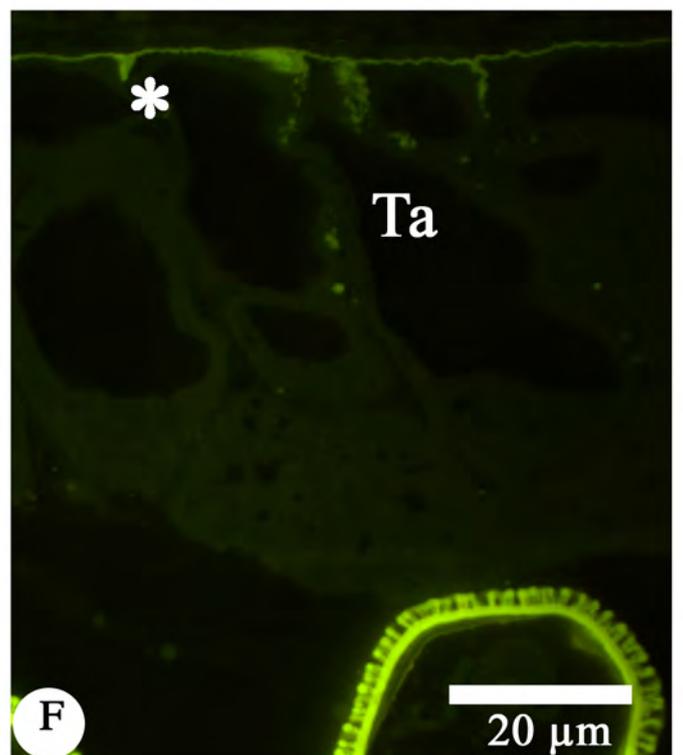
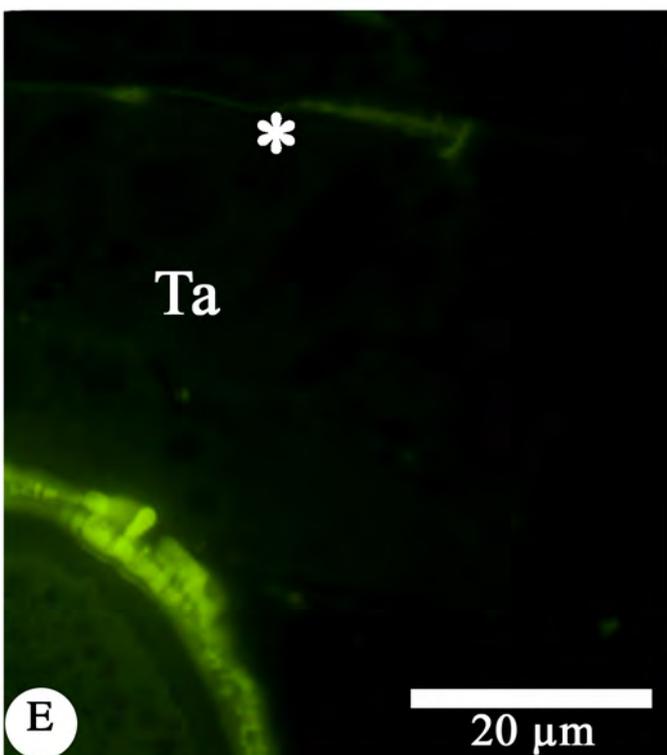
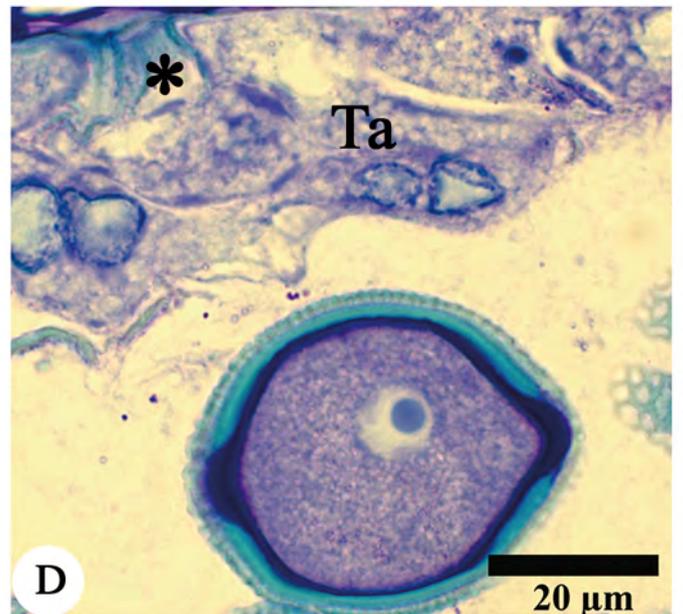
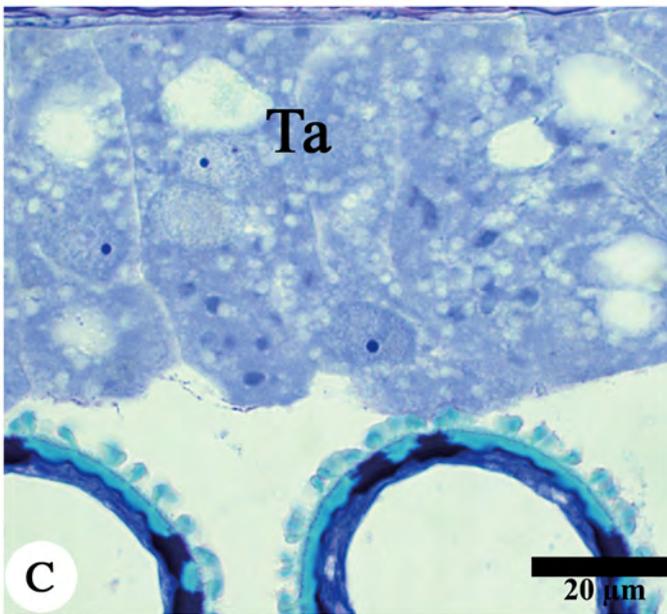
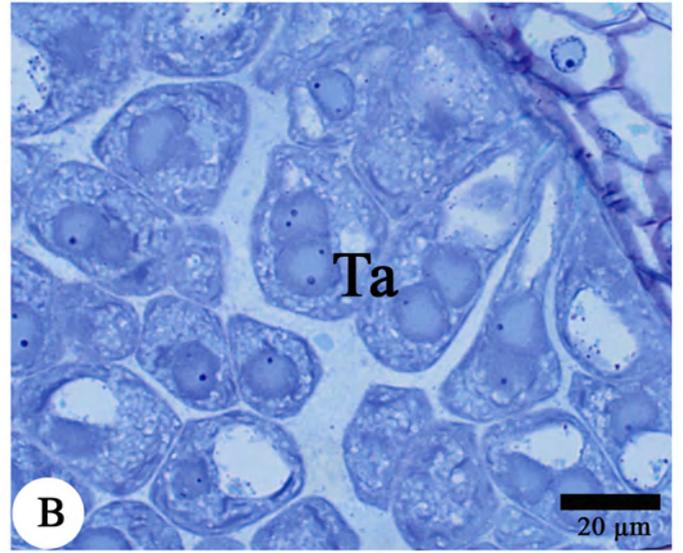
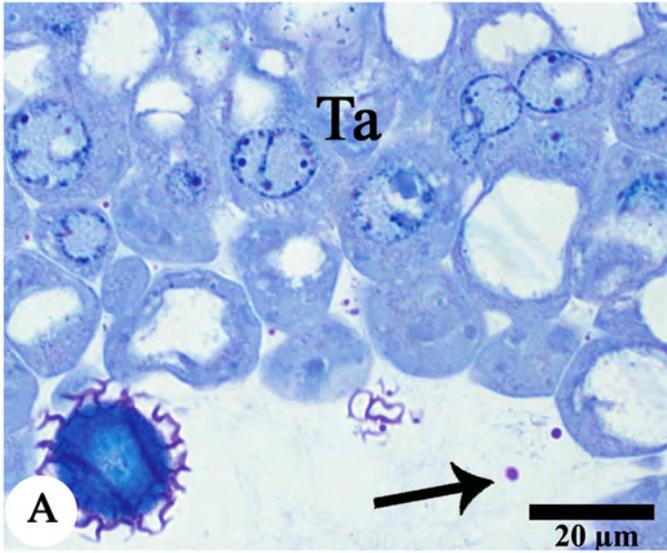


Figura 4.26 - Esporoderme *P. elegans*. (A) Coloração com Azul de Toluidina. (B) Distinção entre a ecto (vermelho) e endoexina (azul) com Azul de Astra e Fucsina. (C) Reação com Auramina O. (D) Coloração com Azul de Toluidina. (E) Reação com Azul de Alciano com a porção péctica do colpo em seção longitudinal (seta). (F) Estrato protéico da intina (cabeça de seta). (G) Reação positiva para celulose.

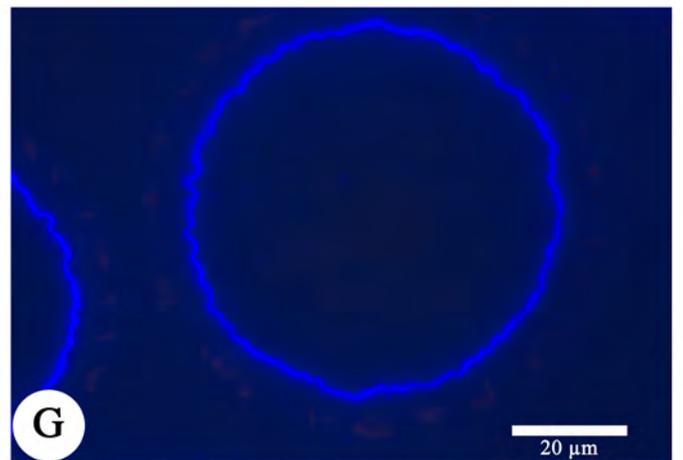
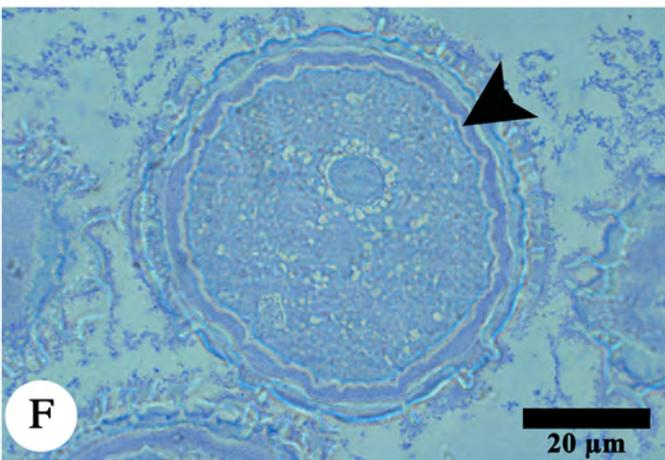
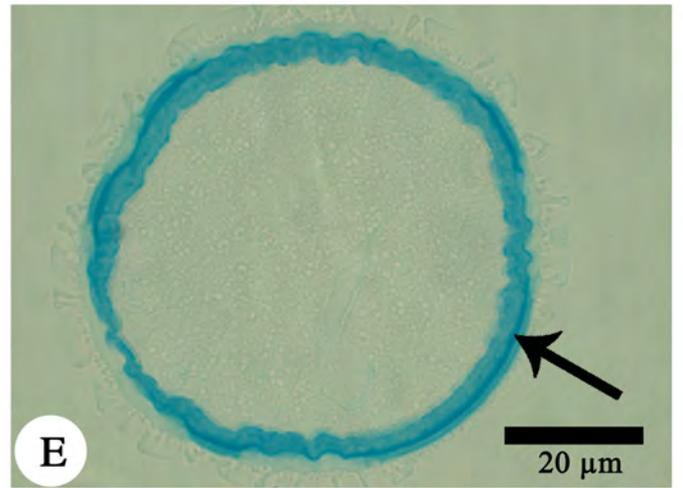
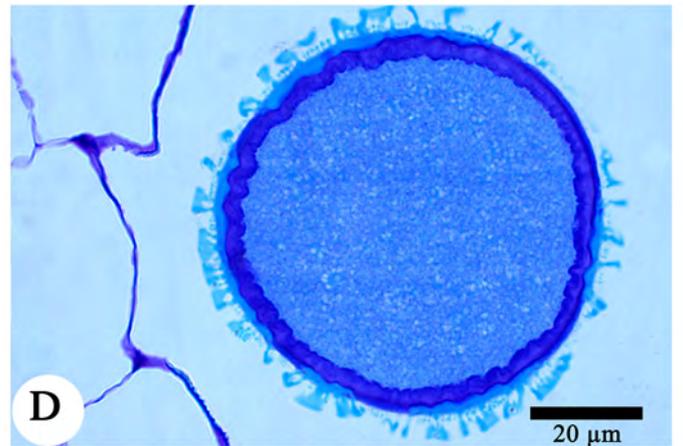
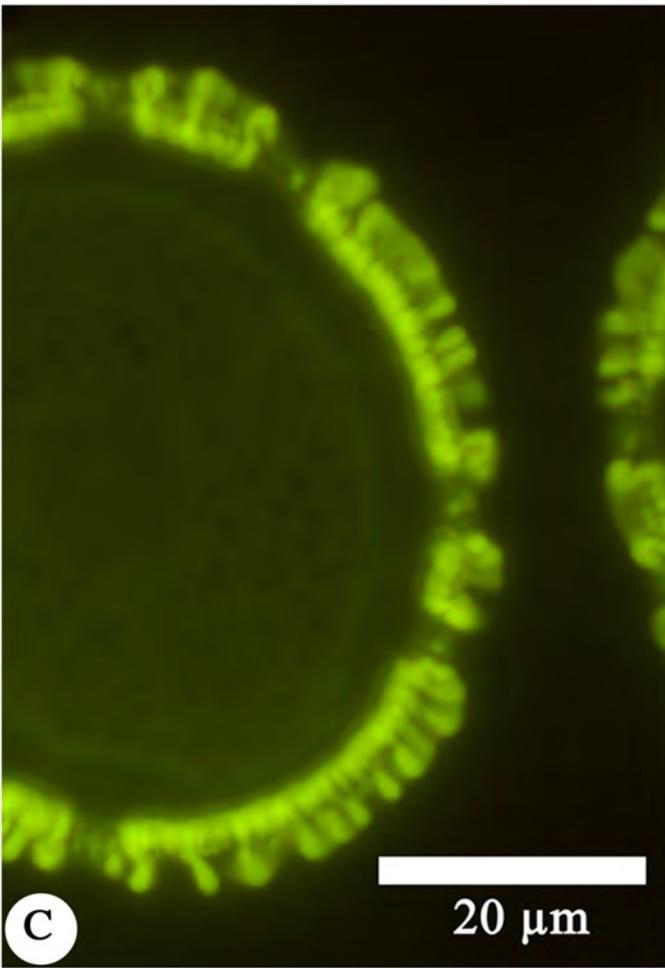
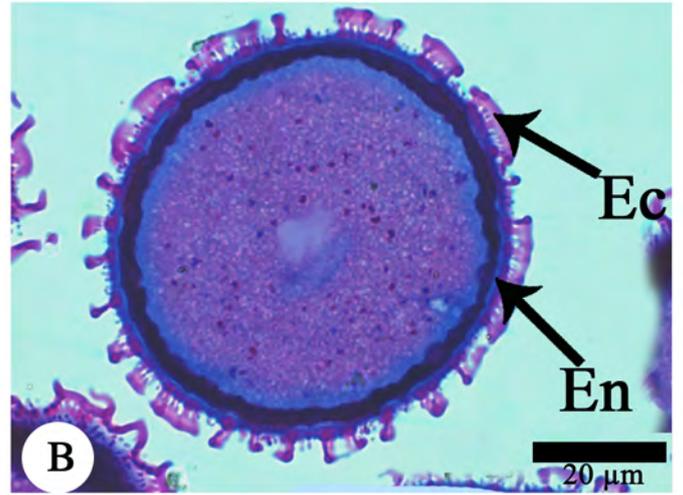
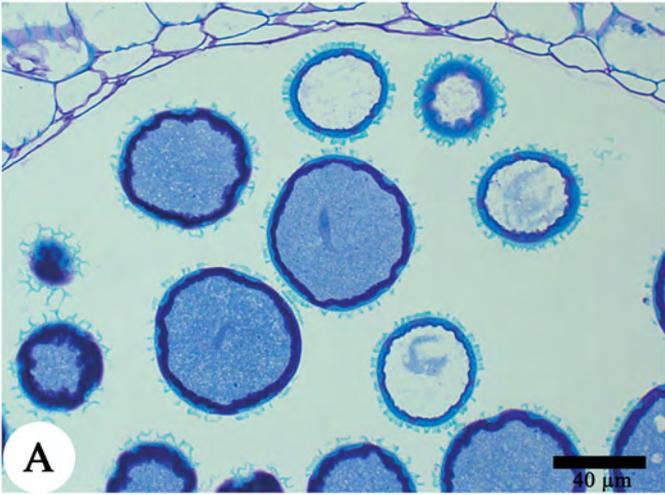


Figura 4.27 - Esporoderme de *P. elegans*. Colpo durante a fase de andrósporo vacuolado. (A-B) Coloração com Azul de Toluidina evidenciando dois estratos pécticos na exina (cabeça de seta) e na intina (seta). (C) Reação de PAS. (D) Coloração com Azul de Astra.

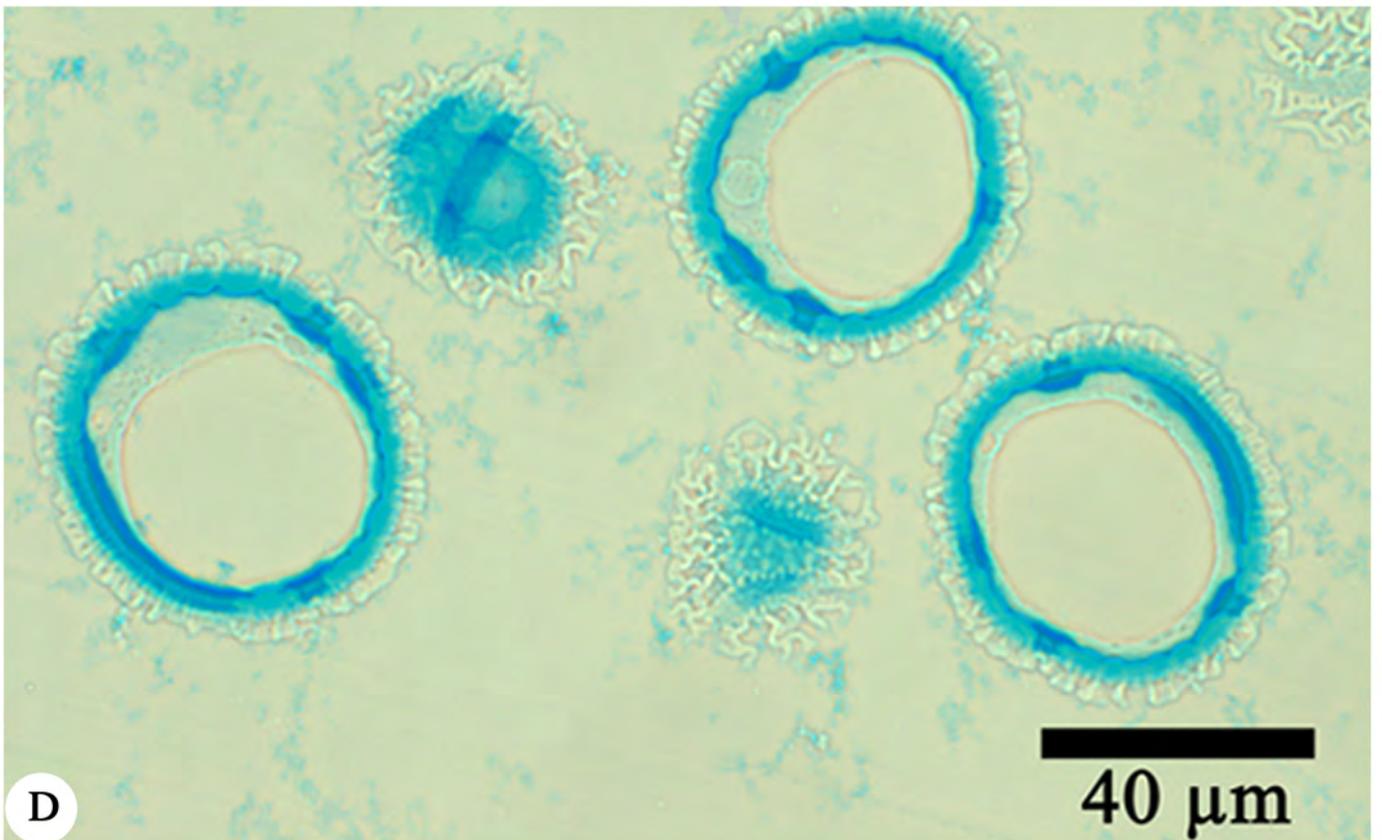
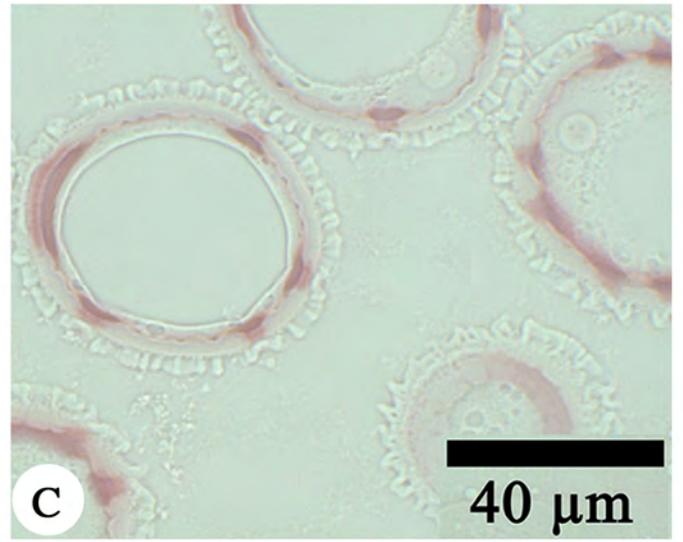
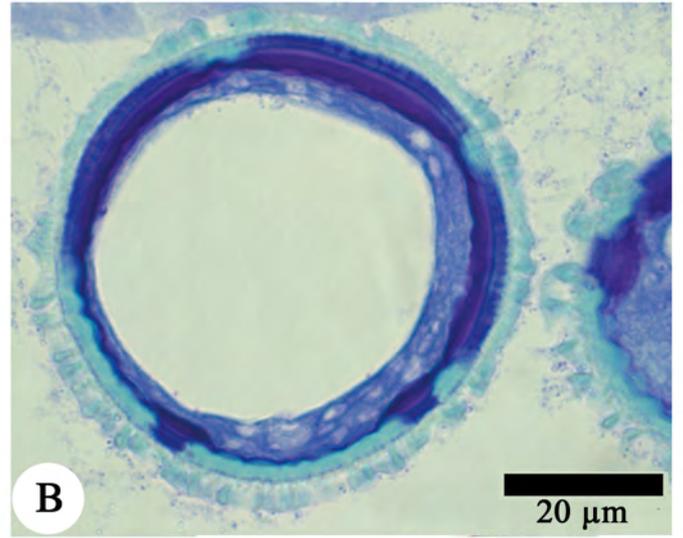
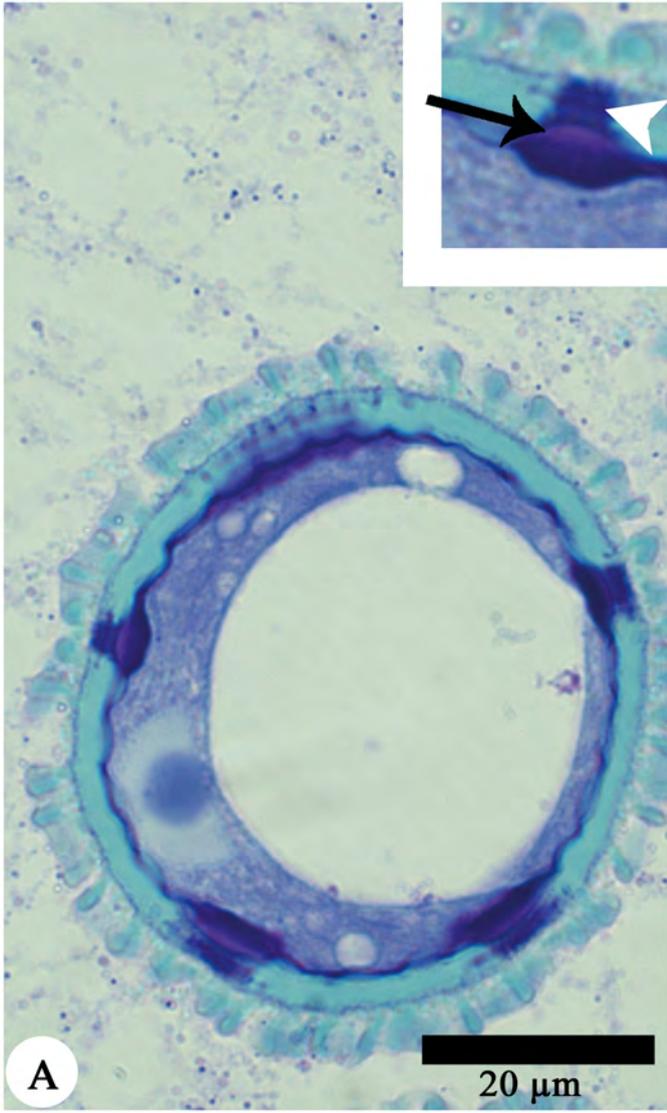


Figura 4.28 - Esporoderme *P. haematostigma*. (A-B) Distinção entre a ecto e endoexina na coloração com Azul de Astra e Fucsina (B) Detalhe. (C) Coloração com Azul de Toluidina e detalhe oncus da intina (seta). (D) Reação com Auramina O. (E) Reação com Azul de Alciano e oncus da intina (seta) e. (F) Estrato protéico da intina (cabeça de seta). (G) Reação positiva para celulose. Legenda: (Ec) ectexina; (En) endexina.

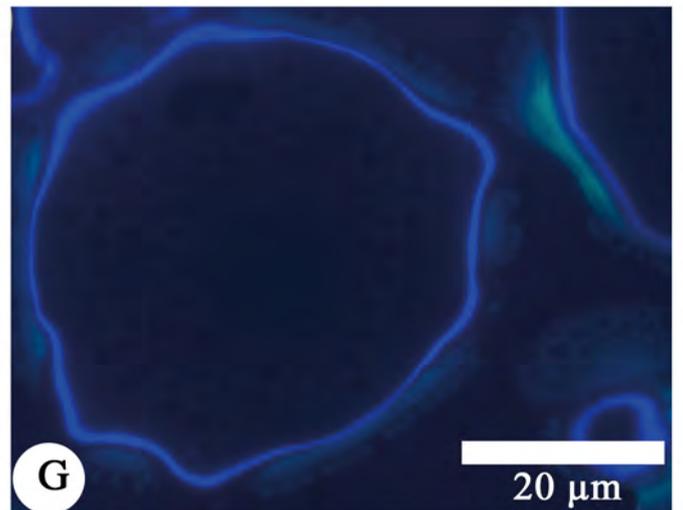
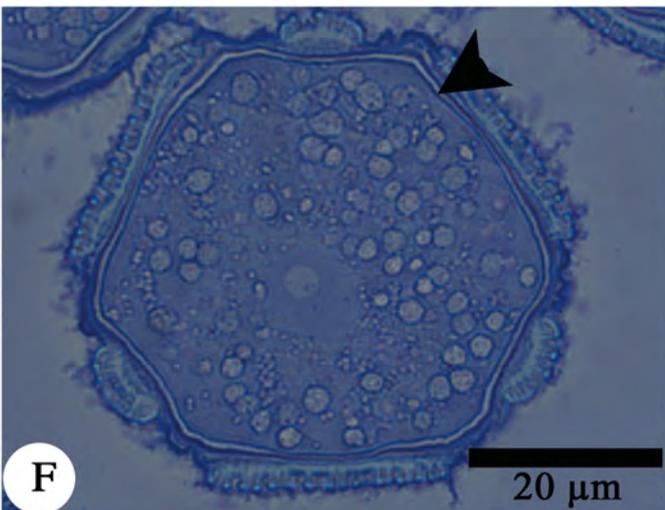
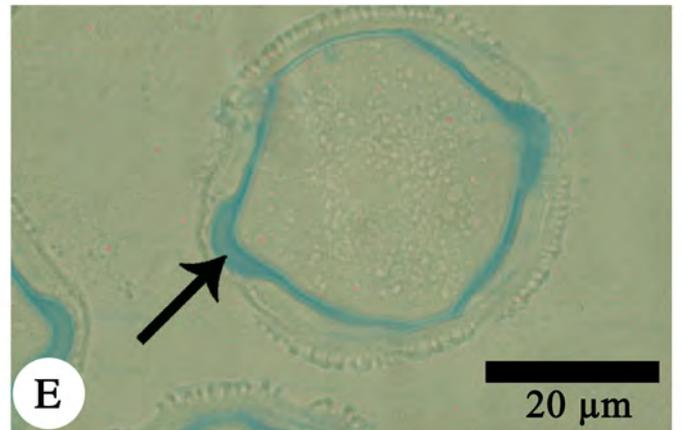
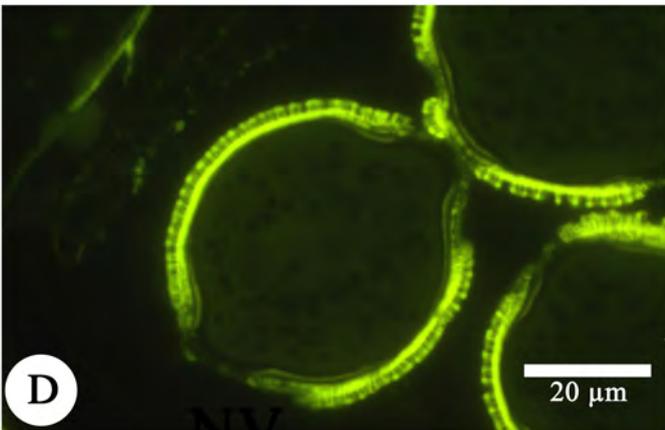
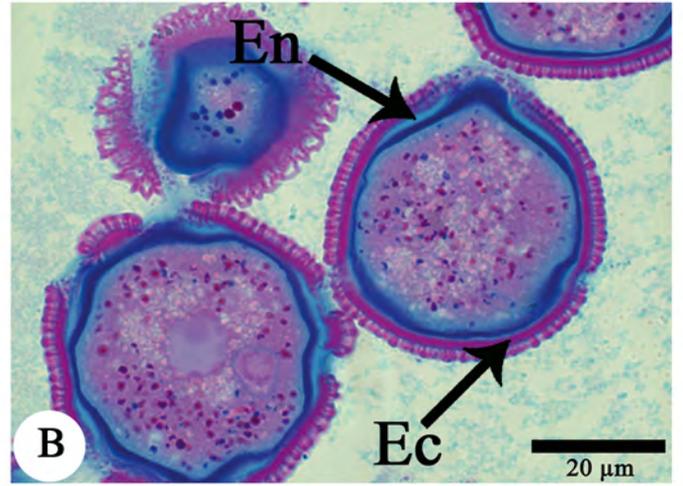
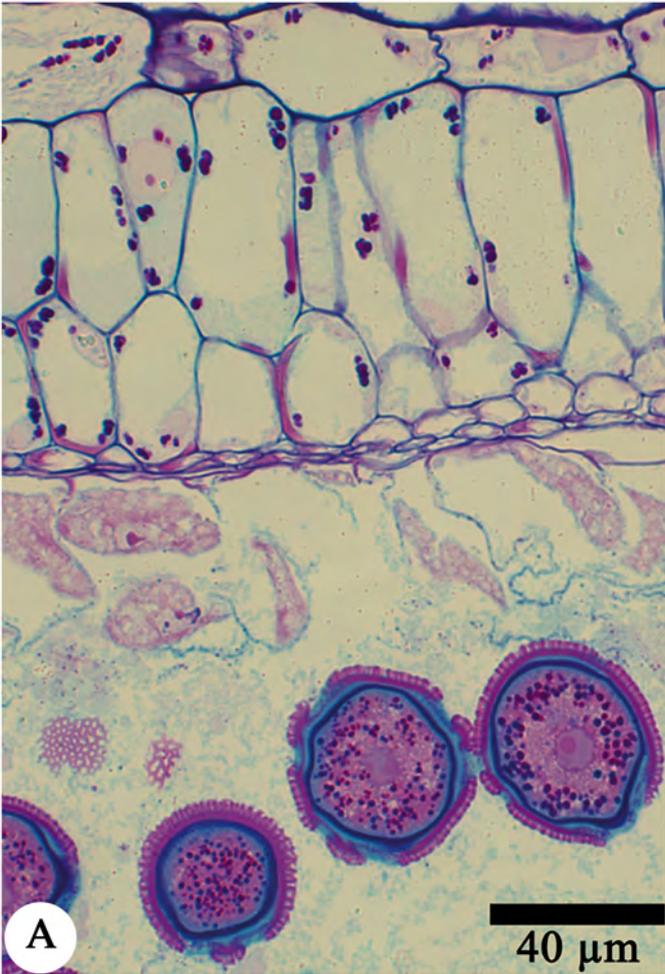


Figura 4.29 - Esporoderme de *P. elegans*. (A-B) Reação com Auramina em (A) corte transversal (B) aspecto externo da exina com colpos (seta). (C-D) Eletromicrografia do grão de pólen evidenciando a esporoderme. (D) Zona de transição entre endexina e intina (cabeça de seta) e intina com estrato eletrodenso intermediário. (*). (E) Microscopia eletrônica de varredura do pólen não acetolisado evidenciando a região dos colpos (seta). (F) Pólen acetolisado com rompimento na região dos colpos. Legenda: (Ec) ectexina; (En) endexina; (In) intina.

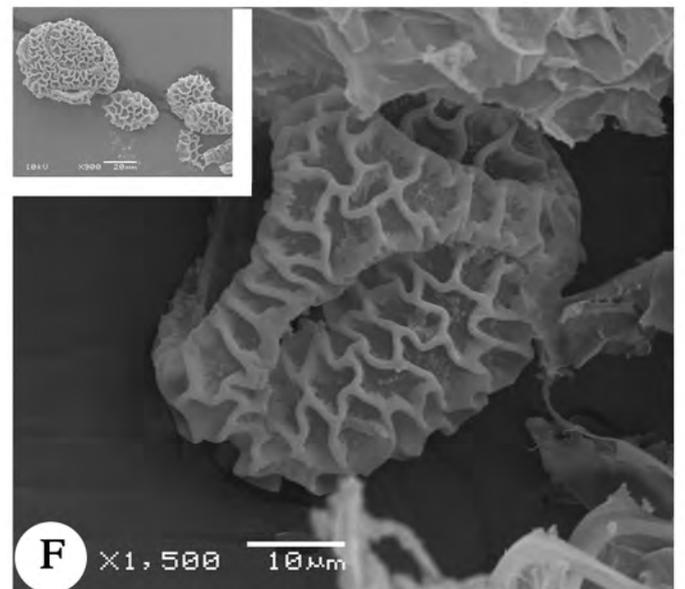
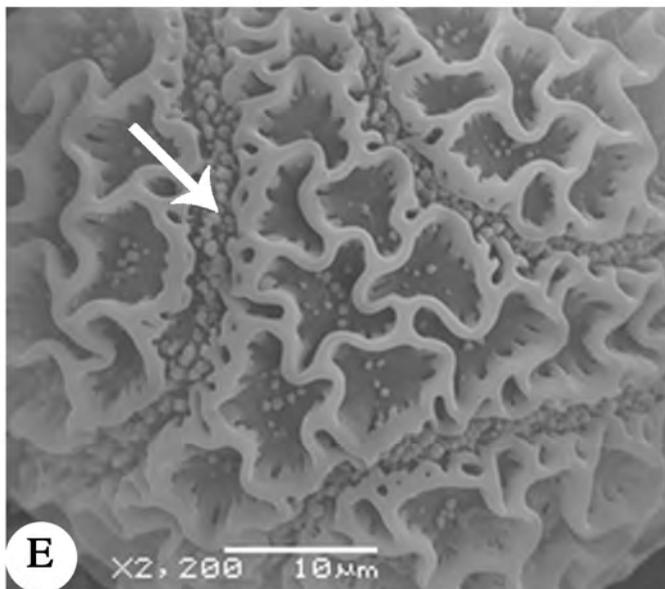
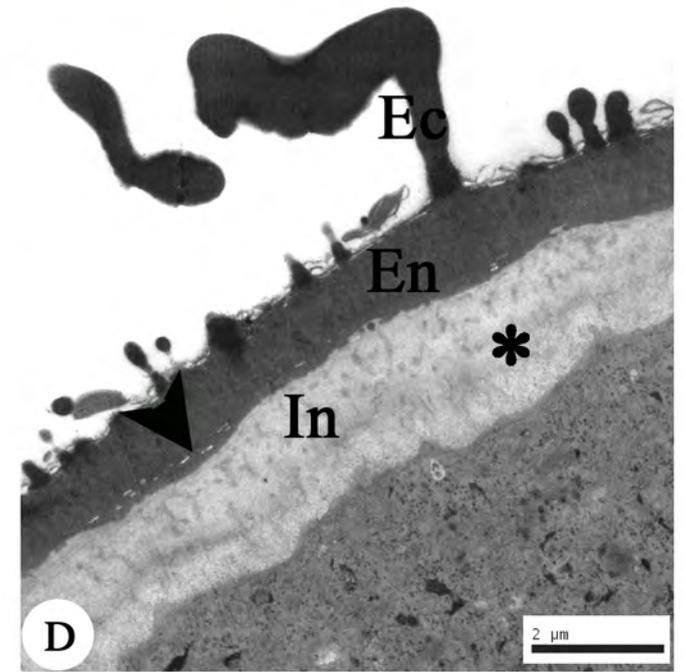
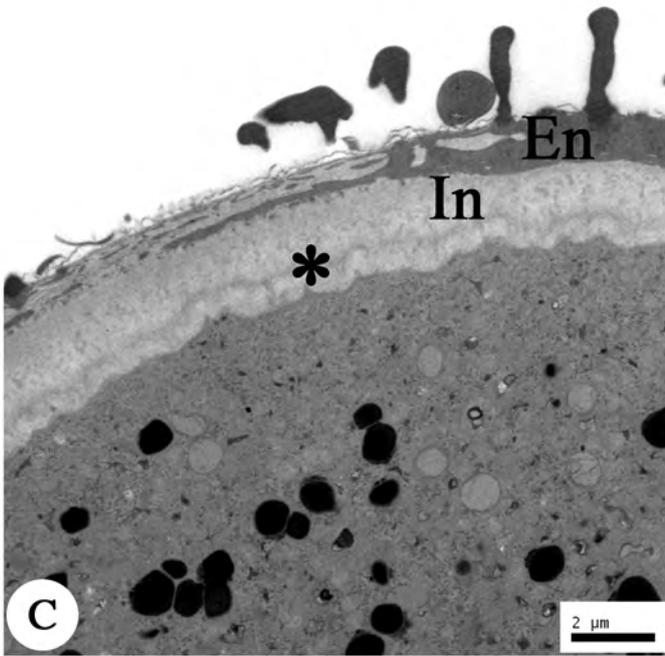
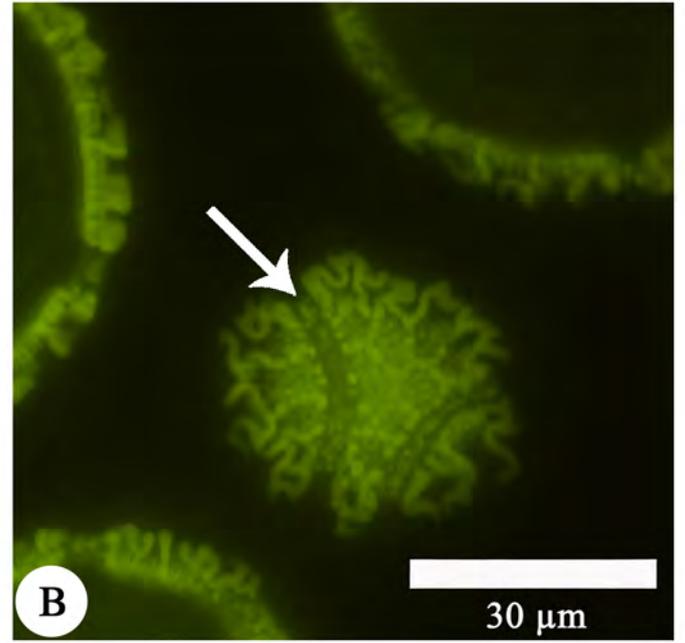
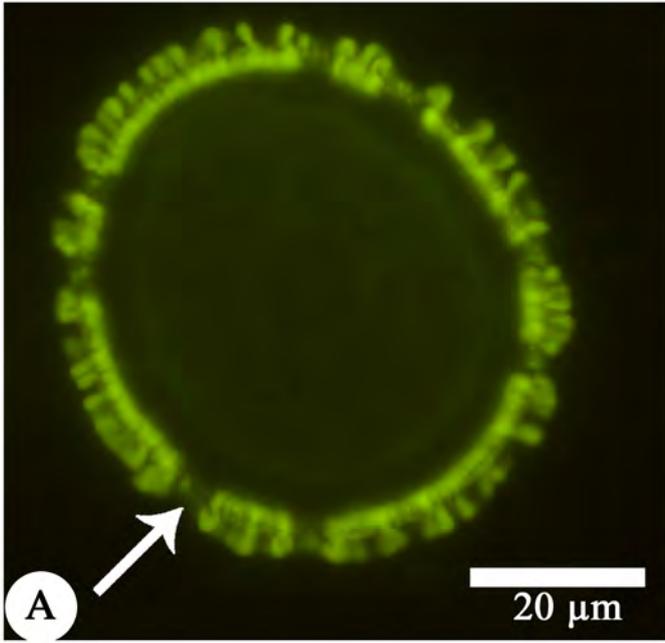


Figura 4.30 - Detalhe da esporoderme de *P. elegans*. (A) Eletromicrografia da abertura. (B) Detalhe da zona de transição entre endexina e intina (cabeça de seta). (C) Pólen corado com Azul de Astra e Fucsina Básica. Legenda: (Ec) ectexina; (En) endexina; (In) intina.

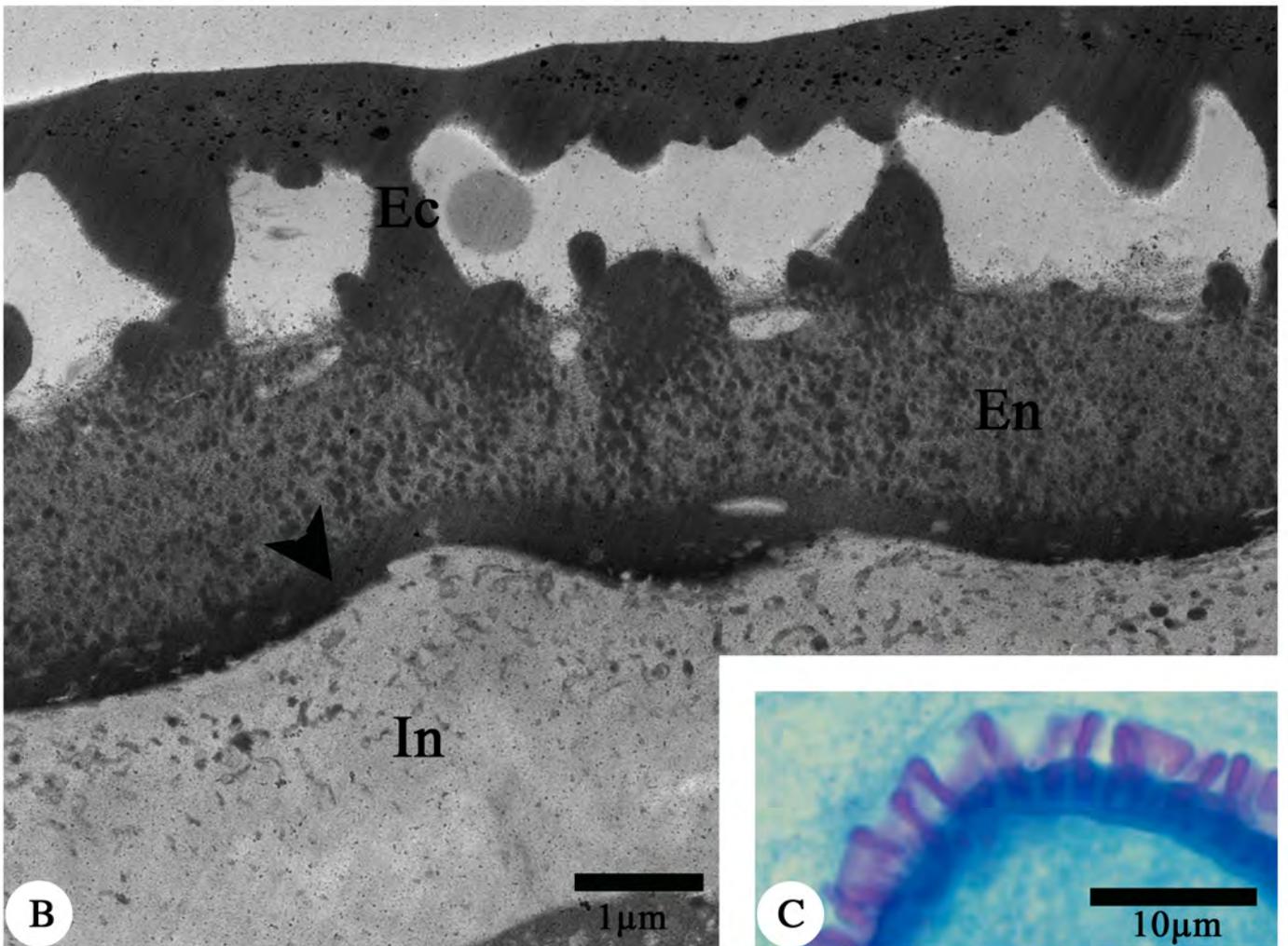
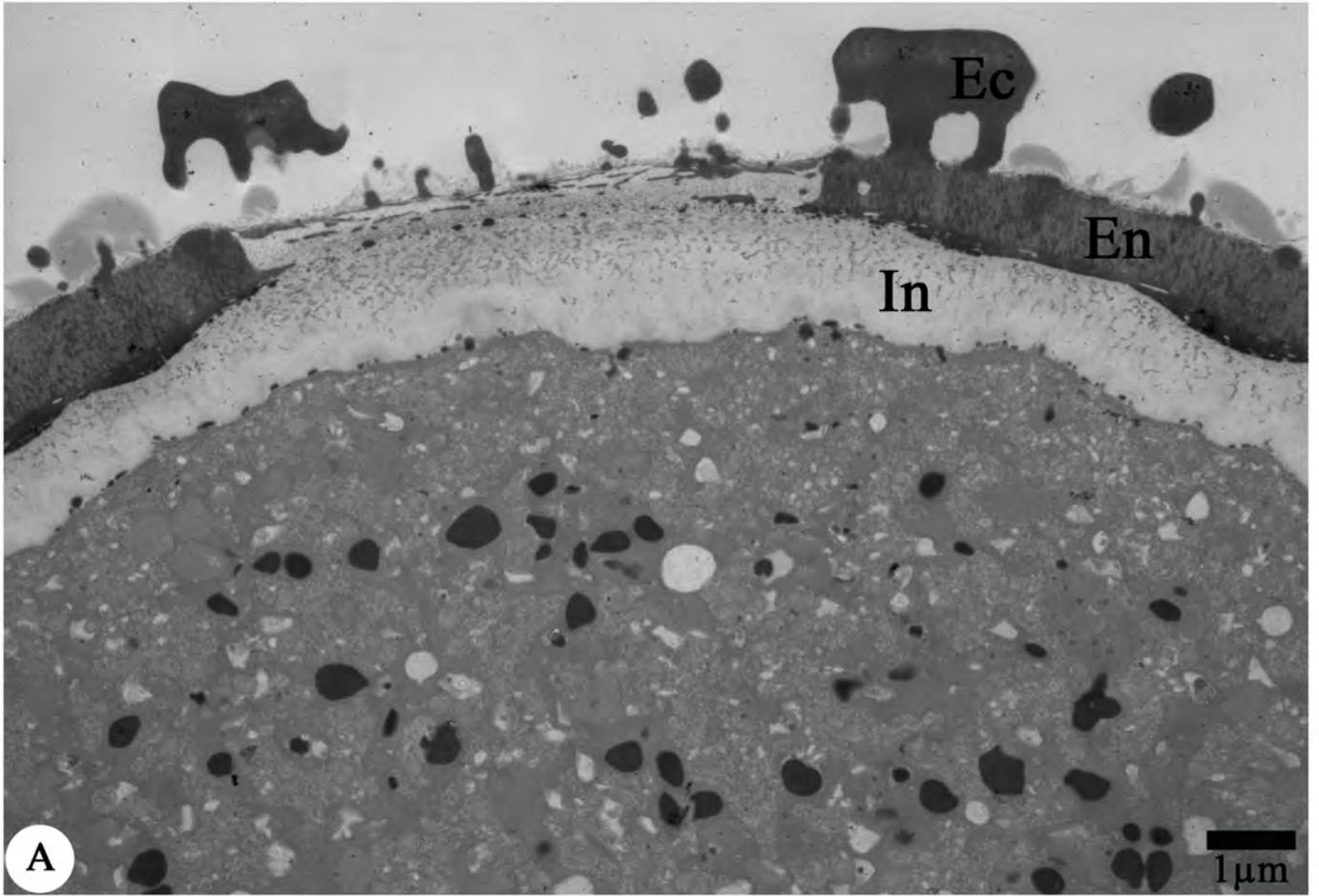


Figura 4.31 - Pólen maduro de *P. haematostigma*. (A) Reação com Auramina O. (B) Eletromicrografia de transmissão na região da endoabertura evidenciando a intina (seta). (C) Eletromicrografia do pólen na região intercolpo. (D) Pólen em vista equatorial evidenciando o poro (seta) e vista polar. (E) Pólen acetolisado em vista equatorial. Legenda: (Ec) ectexina; (En) endexina.

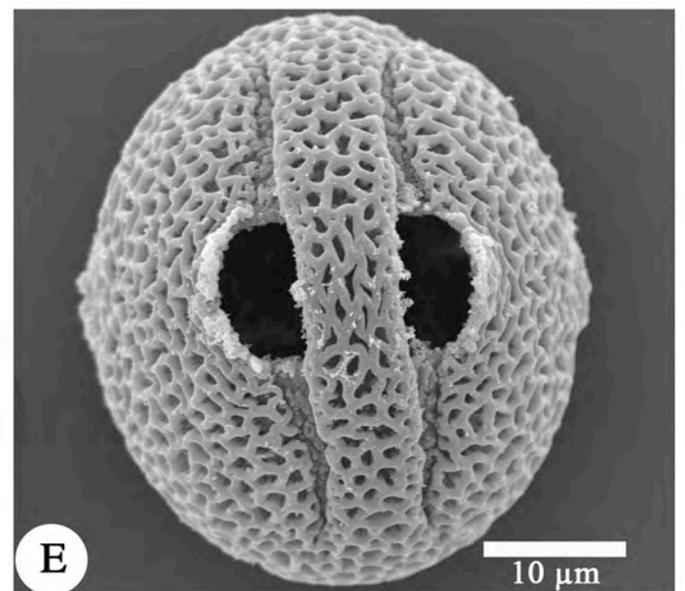
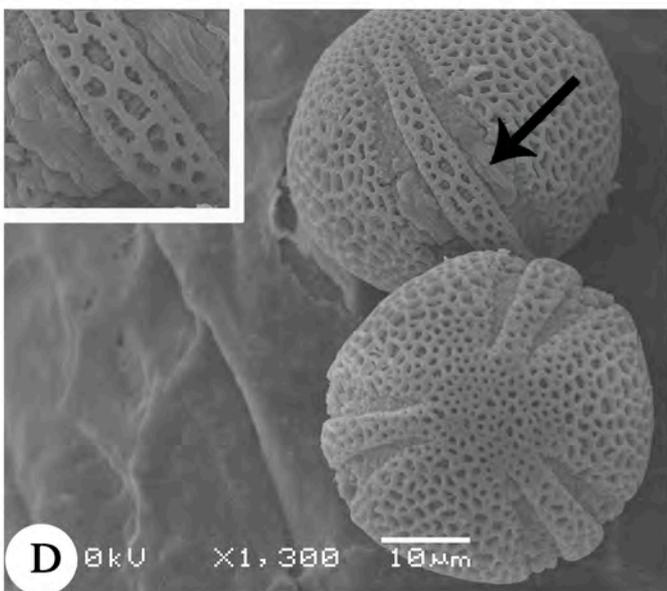
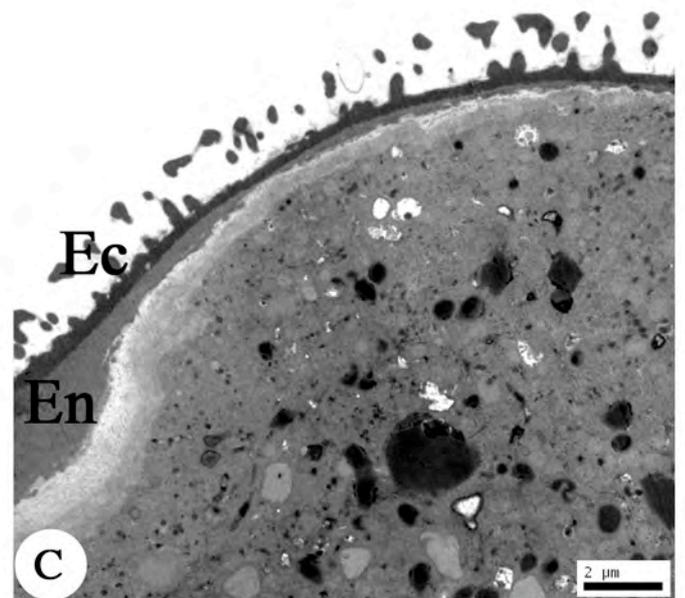
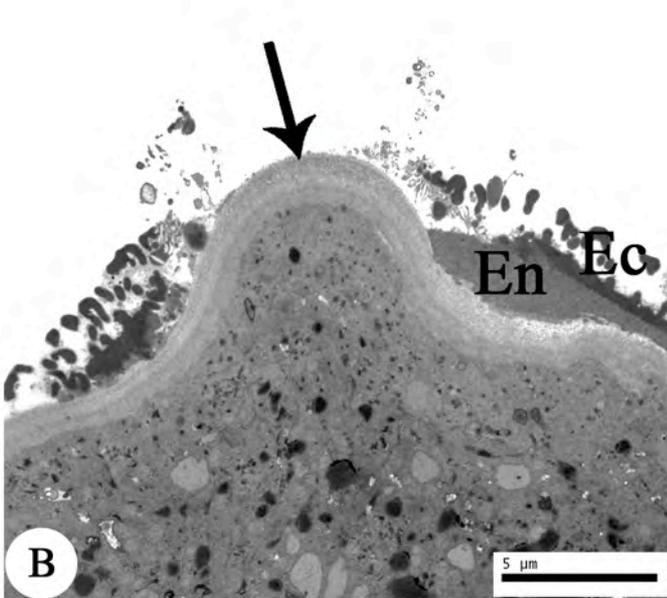
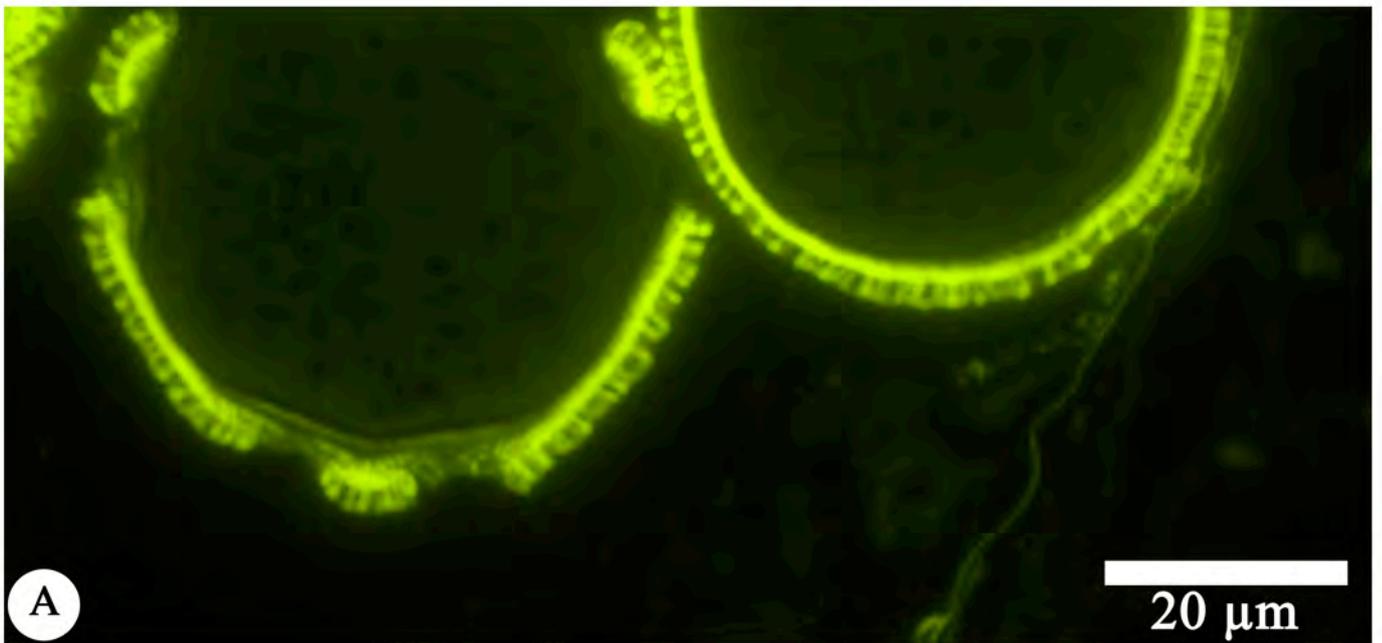


Figura 4.32 - Eletromicrografia da esporoderme madura. (A) *P. elegans*. (B) *P. haematostigma*. Legenda: (Ec) ectexina; (En) endexina ;(In) intina.

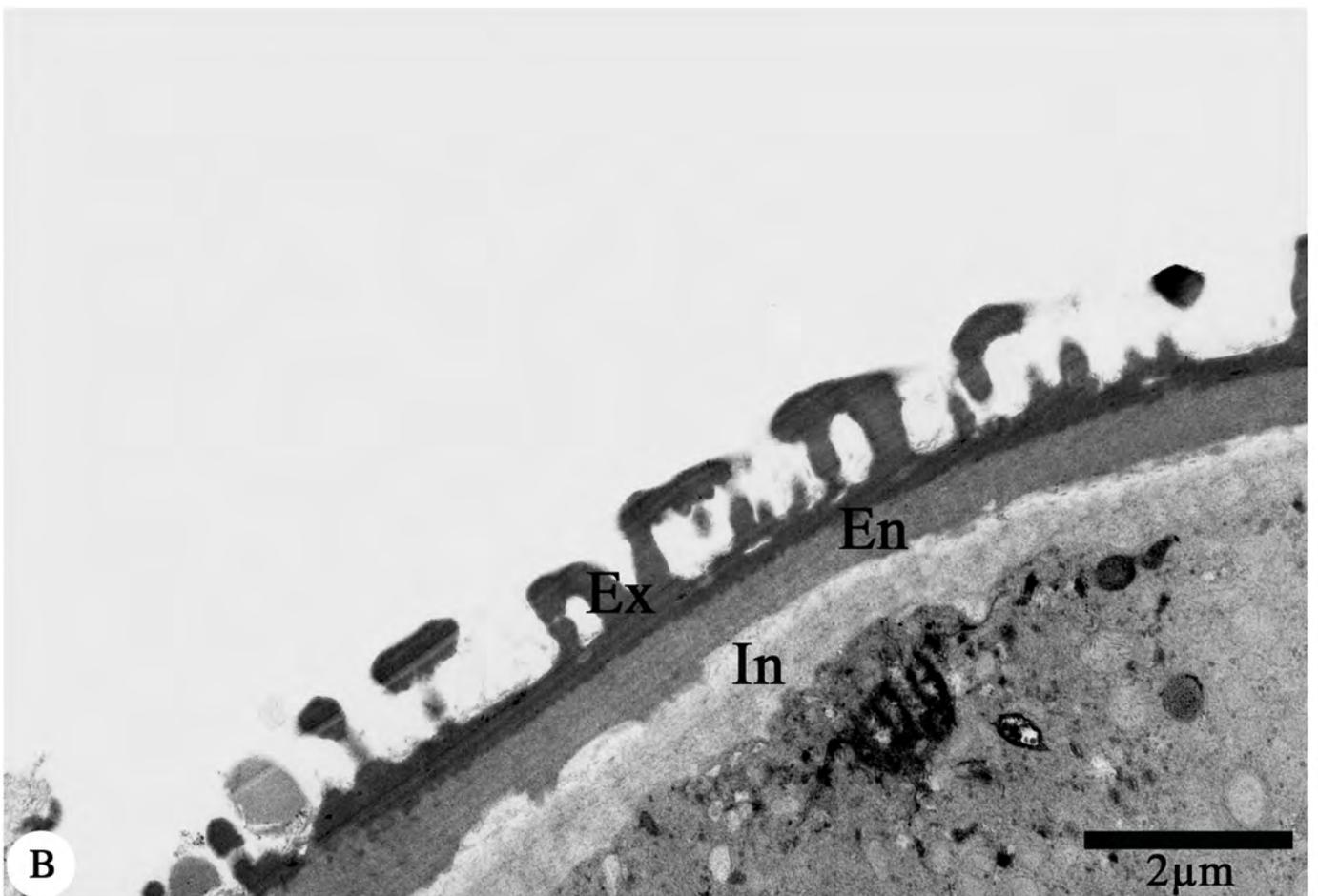
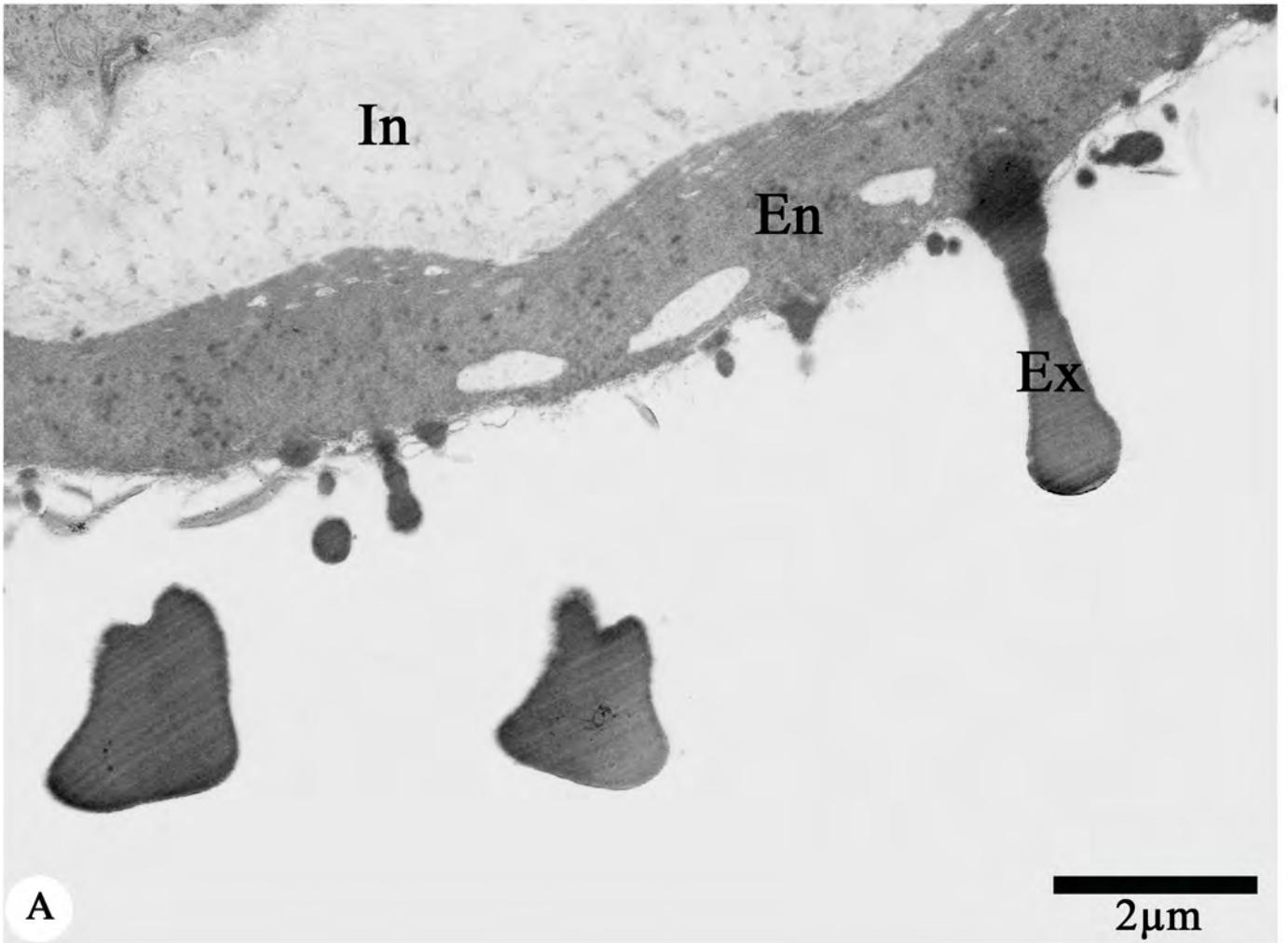


Figura 4.33 - Morfologia externa do pólen não acetolisados com microscopia eletrônica de varredura. (A) *P. elegans*. (B) Pólen com 8 colpos. (C) Detalhe. (D) Detalhe do retículo na região do colpo (*). (E-F) Pólen de *P. haematostigma* em vista polar e equatorial.

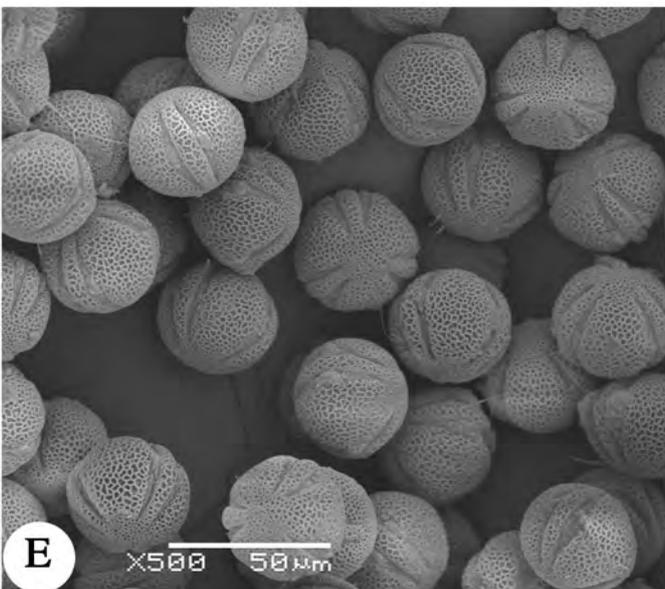
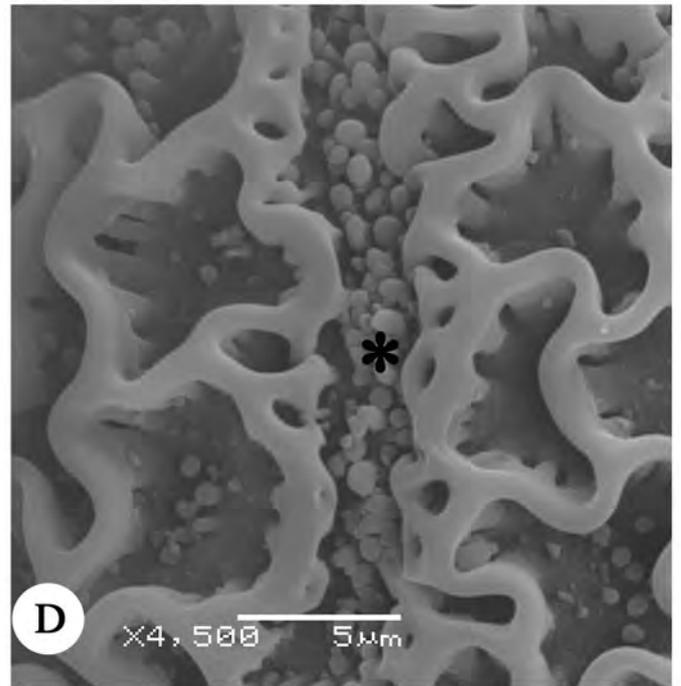
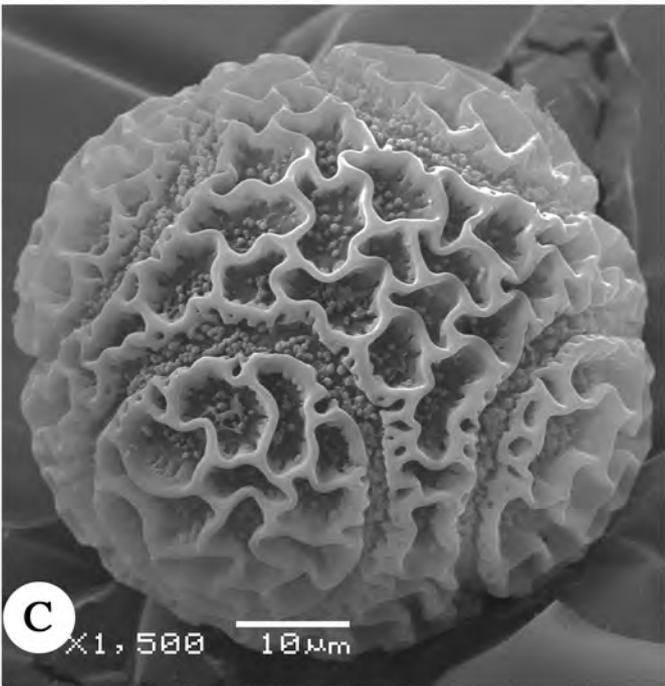
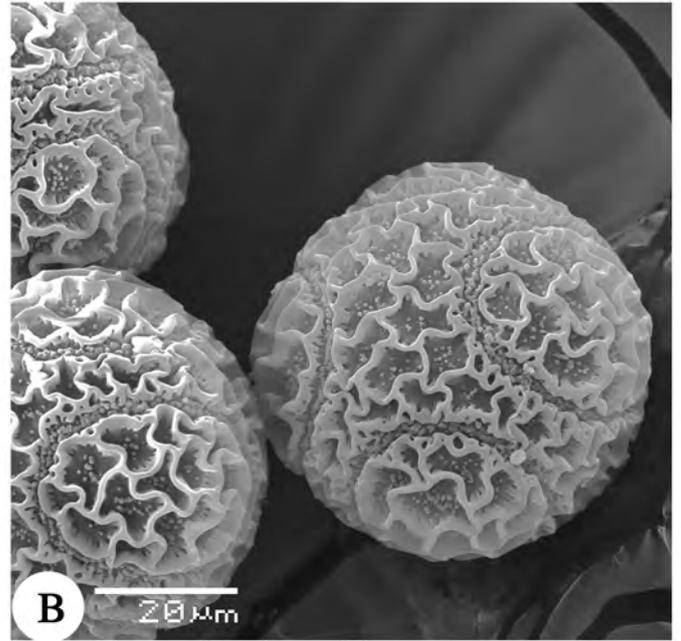
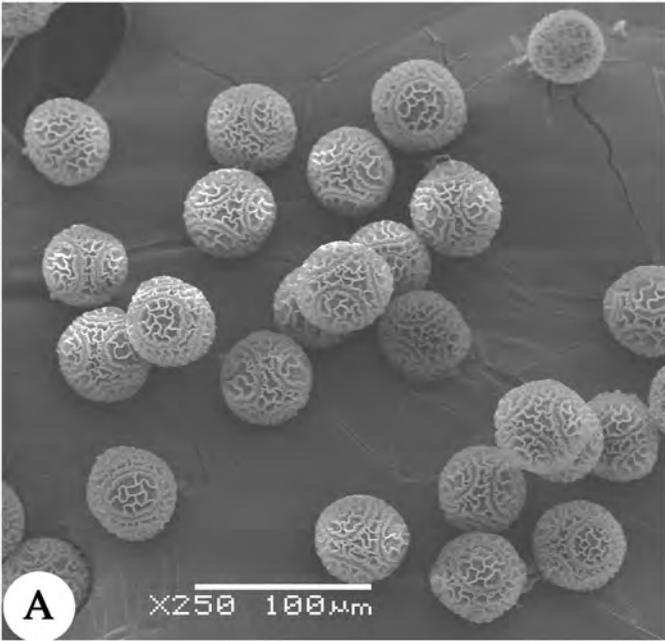


Figura 4.34 - Prófase I da meiose de *P. elegans*. (A) Fotomicrografia do androsporócito em contraste interferencial. (B-C) Androsporócito com citoplasma rico em plastídios (*) e mitocôndrias (seta) visto em microscopia eletrônica de transmissão (MET). (D-E) Mitocôndrias (seta) próximas à parede celular. (F) Canais citomíticos (*). Legenda: (N) núcleo; (Nu) nucléolo.

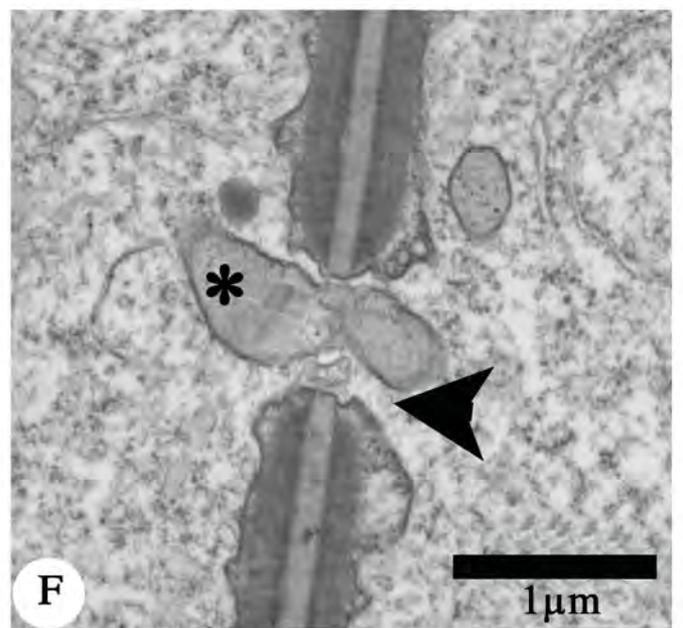
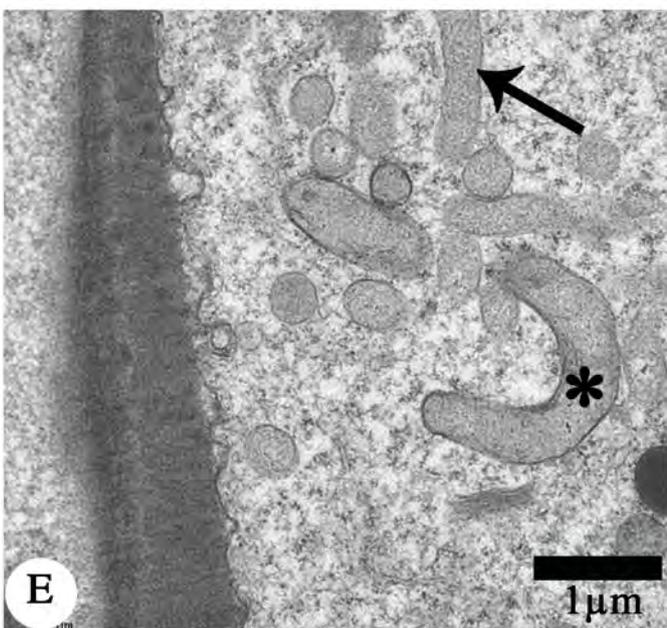
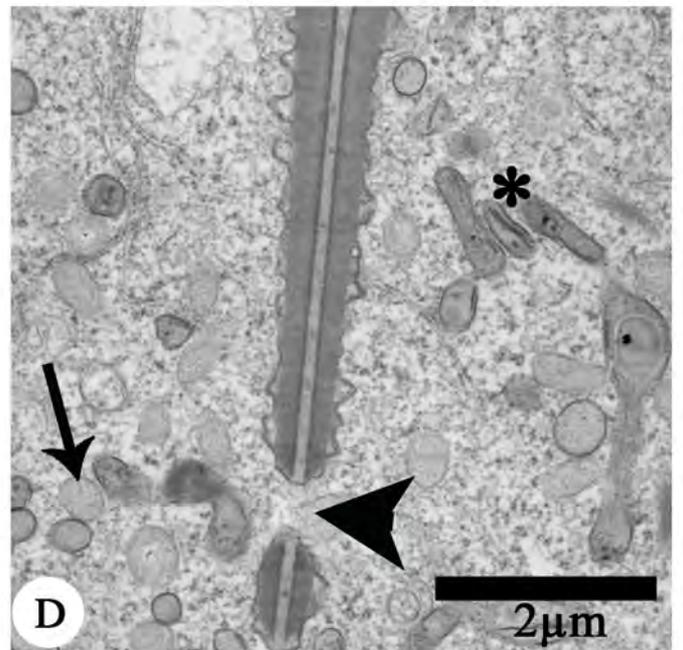
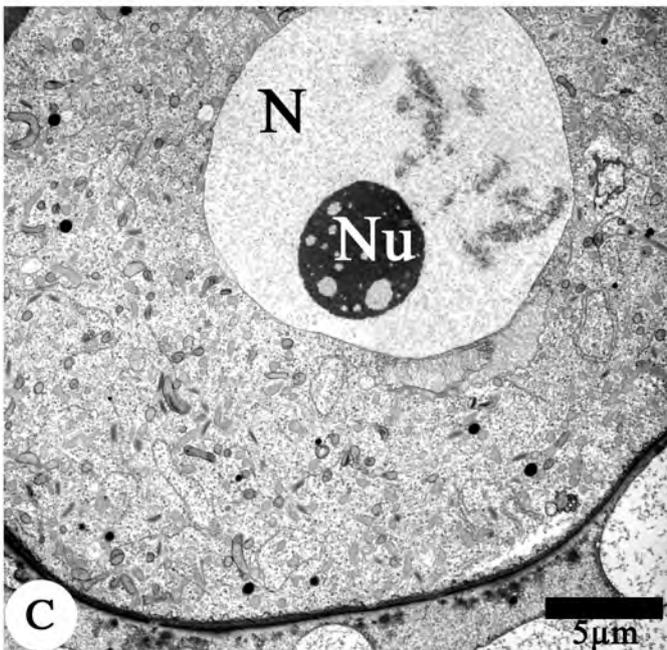
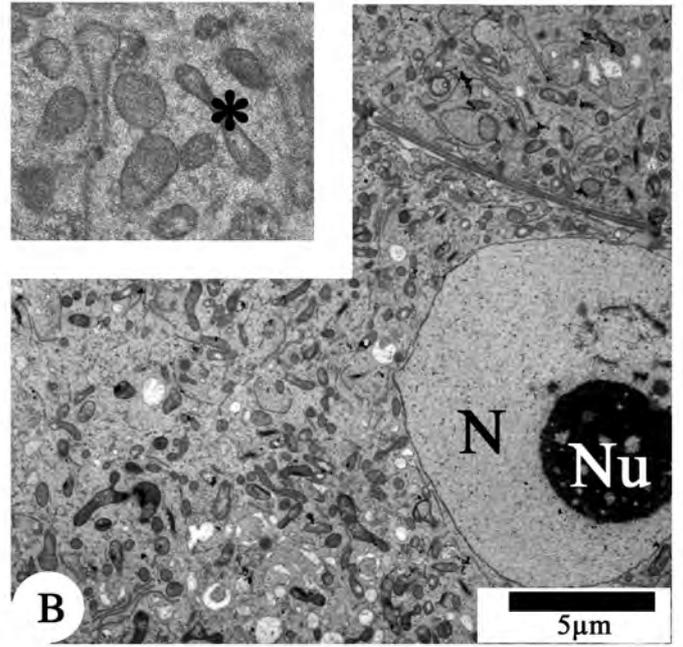
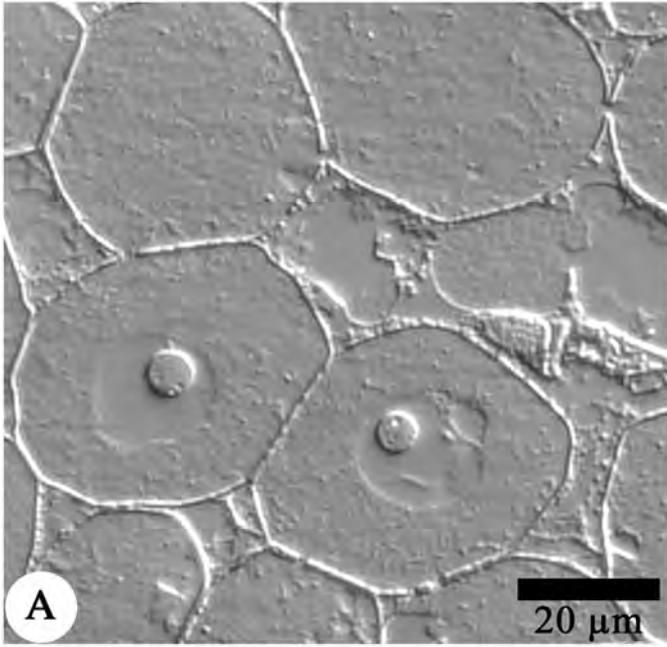


Figura 4.35 - Eletromicrografia do andrócito de *P. elegans*. Polarização de organelas junto à parede celular com predomínio de plastídios (*) e mitocôndrias (seta). Legenda: (N) núcleo; (Nu) nucléolo.



Figura 4.36 - Tétrade de andrósporos de *P. elegans*. (A) Fotomicrografia em contraste interferencial. (B) Eletromicrografia evidenciando inúmeros plastídios (*) e mitocôndrias (seta). (C-D) Detalhe. Legenda: (N) núcleo.

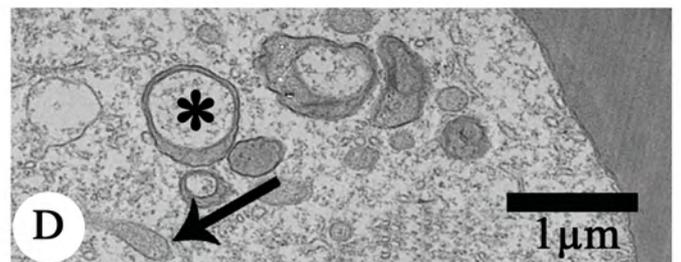
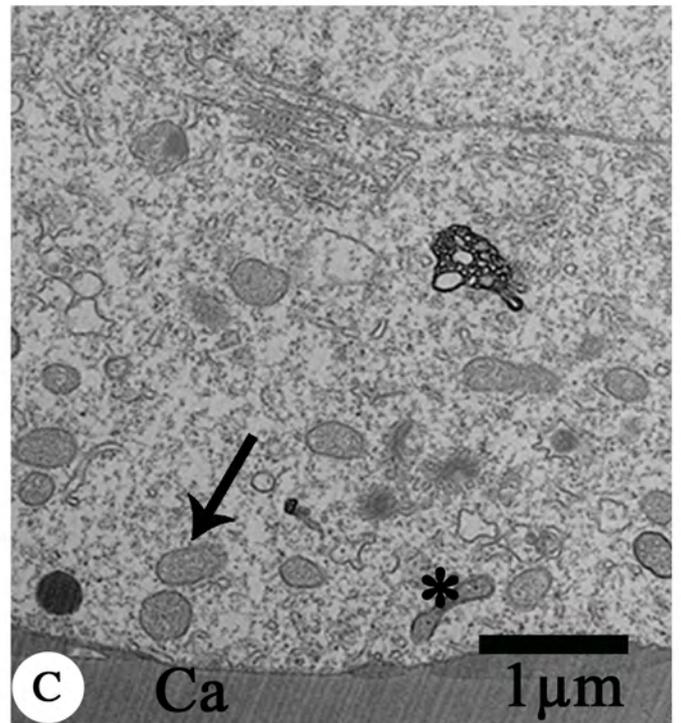
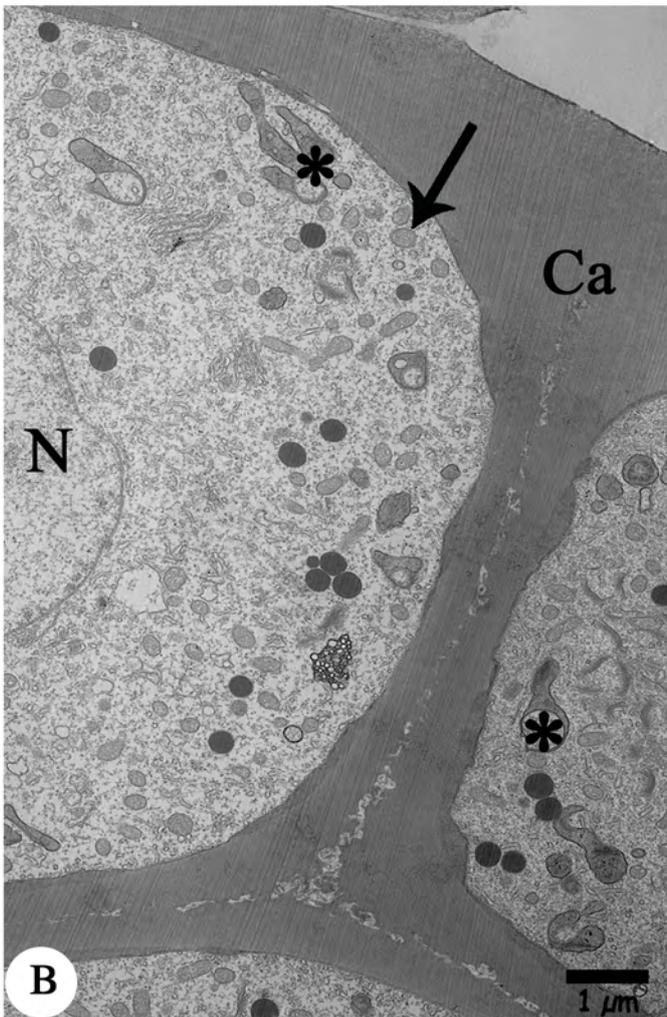


Figura 4.37 - Andróspero e andróspero vacuolado de *P. elegans*. (A) fotomicrografia do andróspero. (B) Eletromicrografia do andróspero contendo inúmeros plastídios (*) e mitocôndrias (seta) próximas ao núcleo. (C) Eletromicrografia do andróspero vacuolado. (D) Detalhe das mitocôndrias (seta) próximas ao núcleo. (E) Detalhe de plastídios (*) e mitocôndrias (seta). Legenda: (N) núcleo; (Nu) nucléolo.

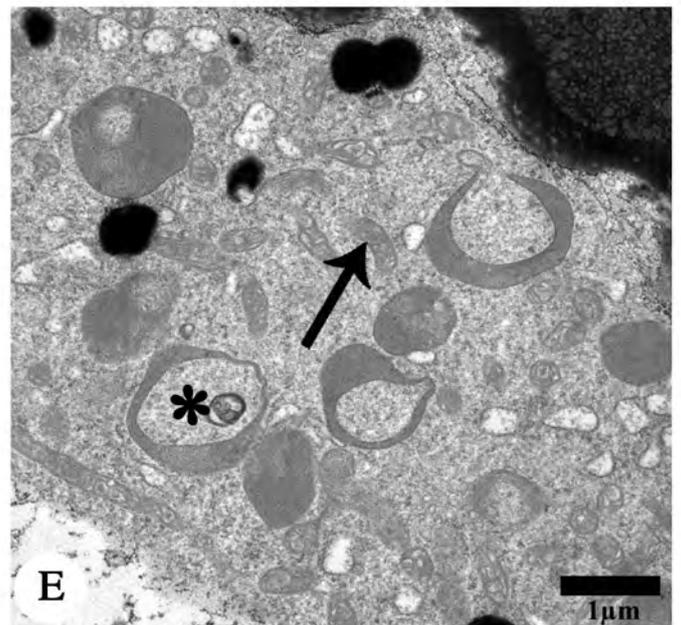
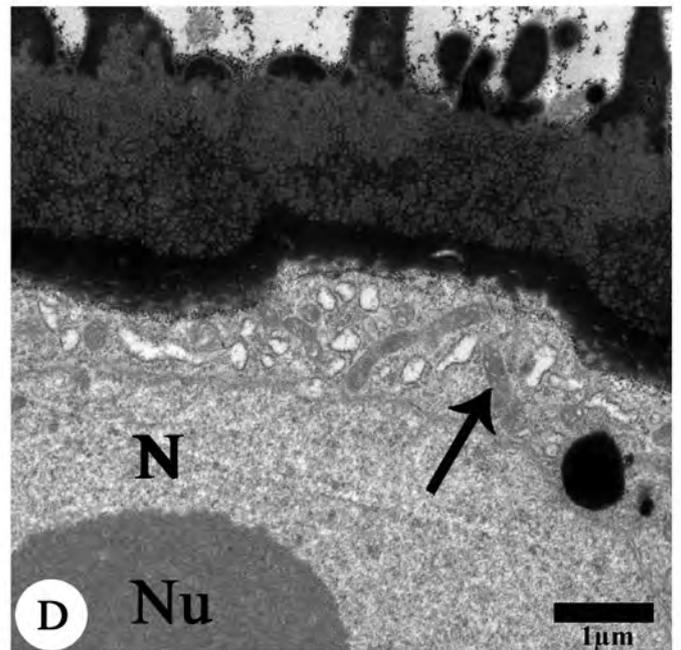
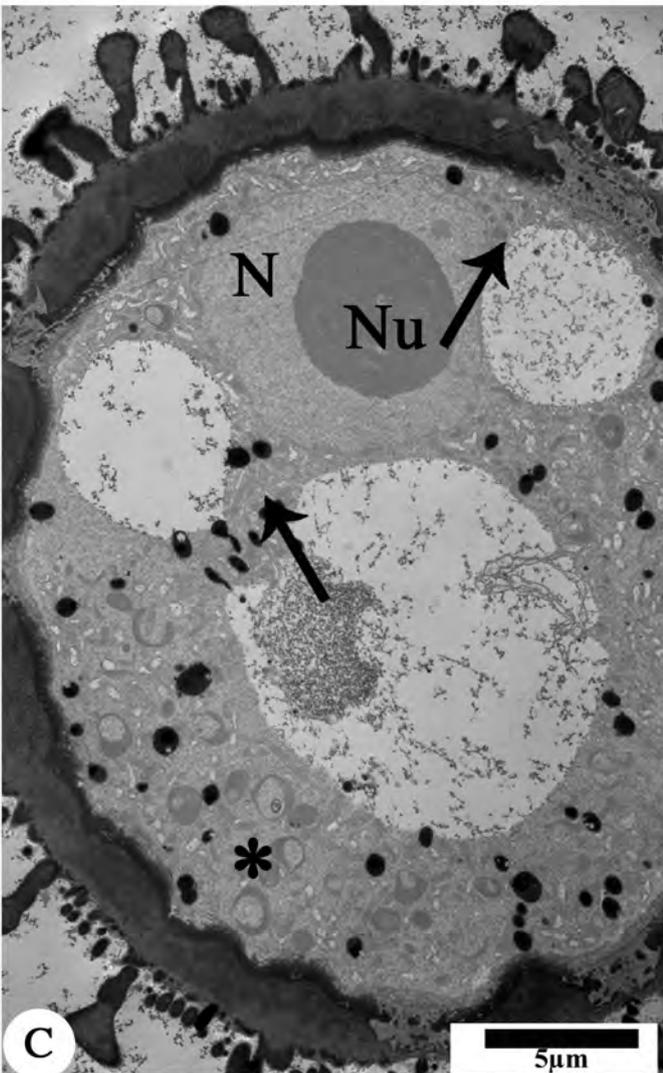
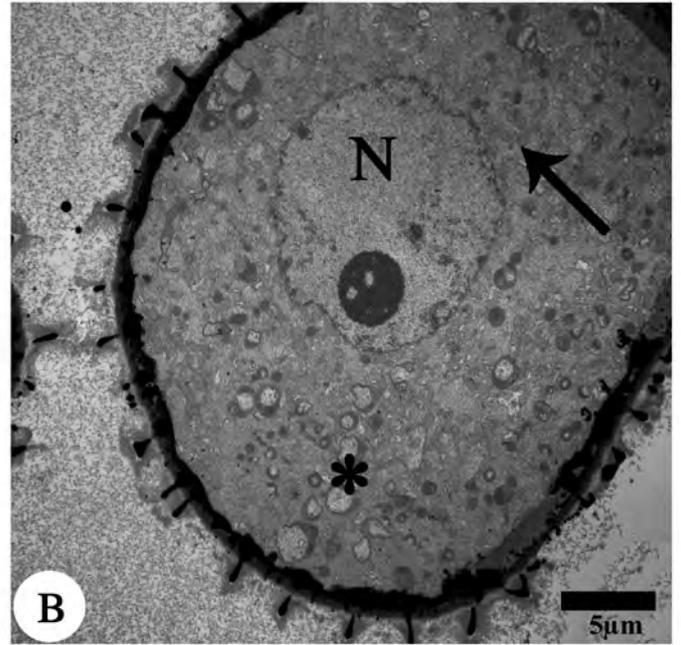


Figura 4.38 - Andróspero vacuolado de *P. elegans*. Inúmeros plastídios com plastoglóbulos pelo citoplasma (*) e mitocôndrias (seta) próximos ao núcleo. Legenda: (N) núcleo; (Nu) nucléolo; (Va) vacúolo.

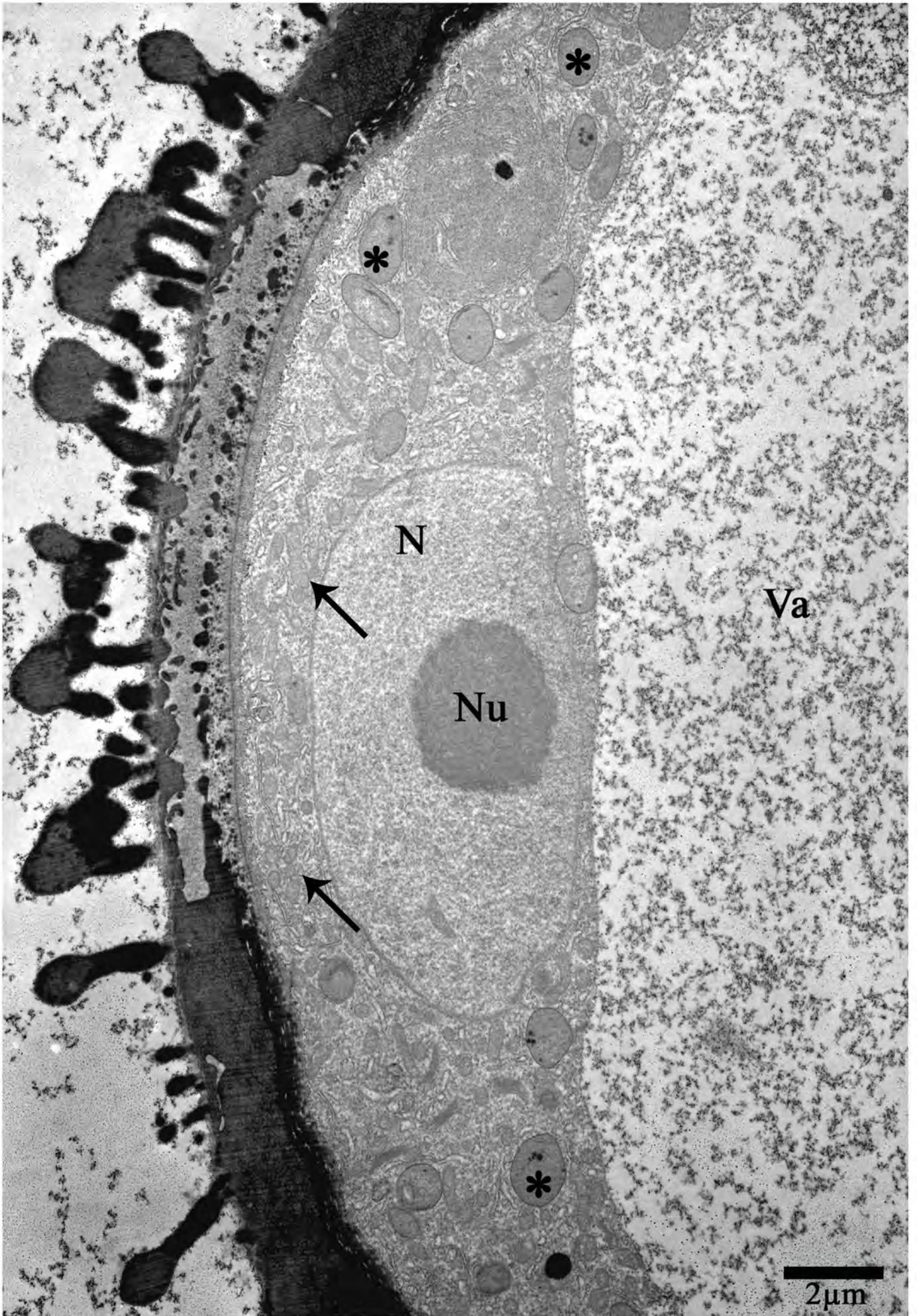


Figura 4.39 - Andrófito bicelular de *P. elegans*. (A) Parede péctica, contínua com a intina, ao redor da célula generativa. (B) Detalhe mostrando mitocôndrias (seta) no citoplasma da célula vegetativa. (C) Citoplasma da célula generativa com mitocôndrias (seta) e plastídios (*) próximos ao núcleo generativo. (D) detalhe do citoplasma generativo. Legenda: (NG) núcleo generativo; (NV) núcleo vegetativo.

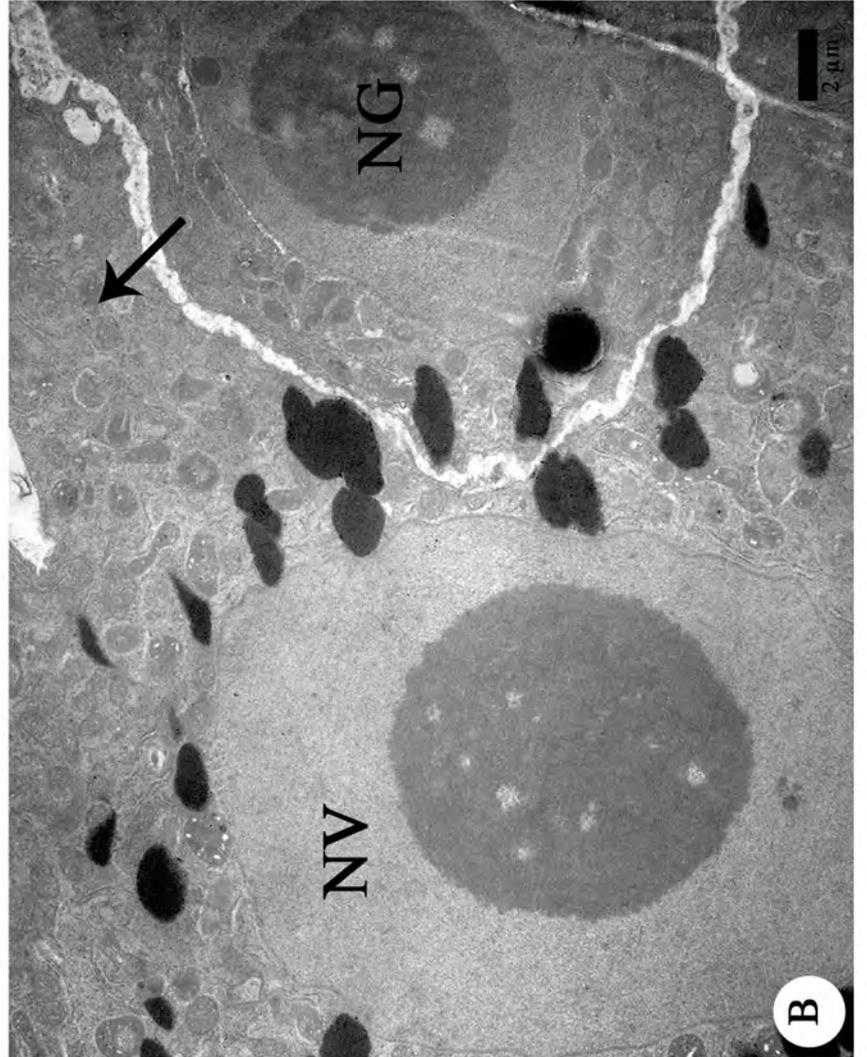
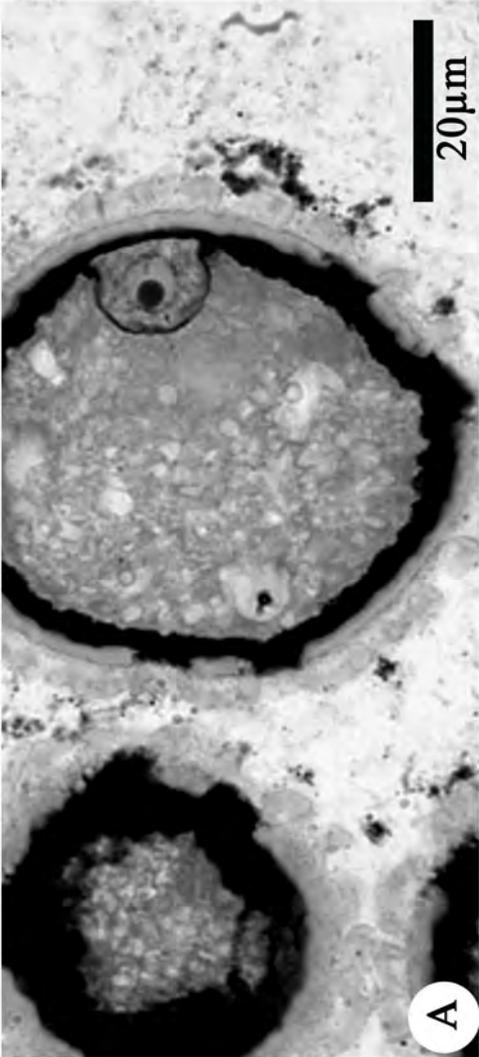
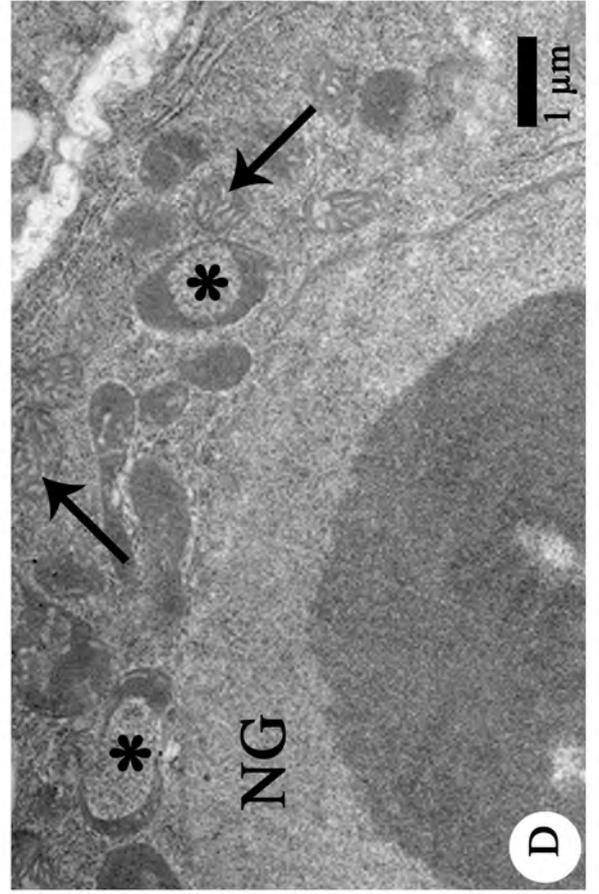
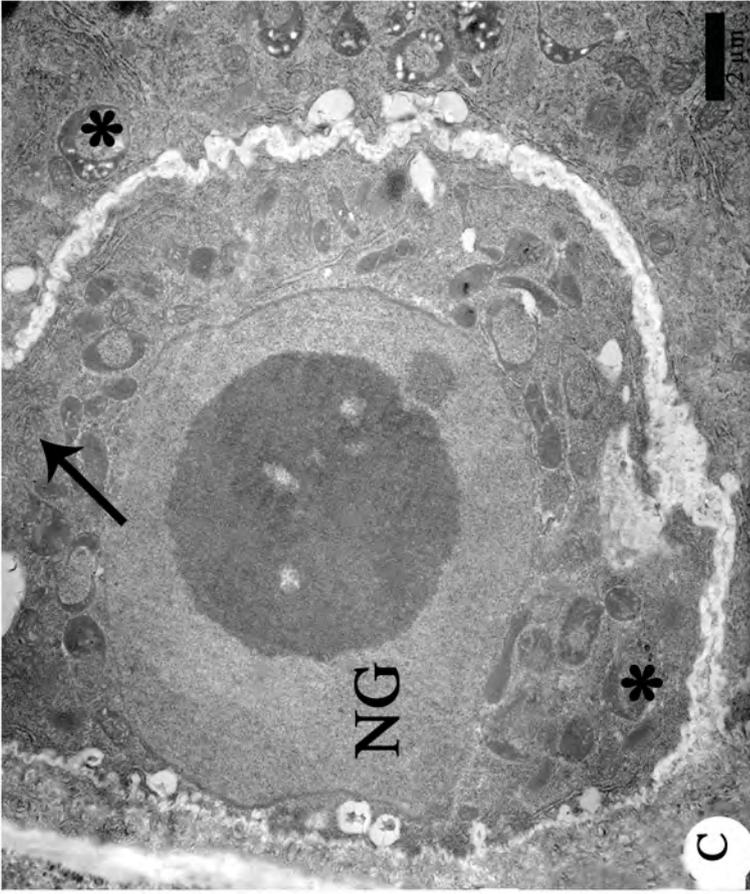


Figura 4.40 - Célula generativa. (A-B) eletromicrografia do pólen maduro de *P. haematostigma*. (B) detalhe do citoplasma contendo plastídios (*). (C) seção longitudinal da célula generativa de *P. suberosa* evidenciando a presença de plastídios (*). Legenda: (NG) núcleo generativo; (NV) núcleo vegetativo.

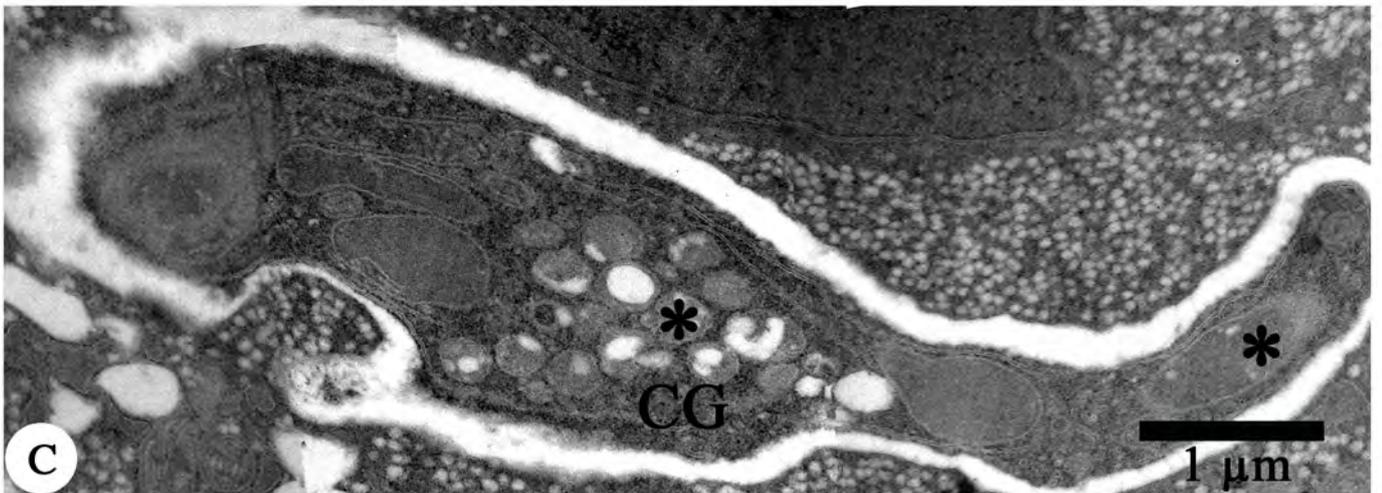
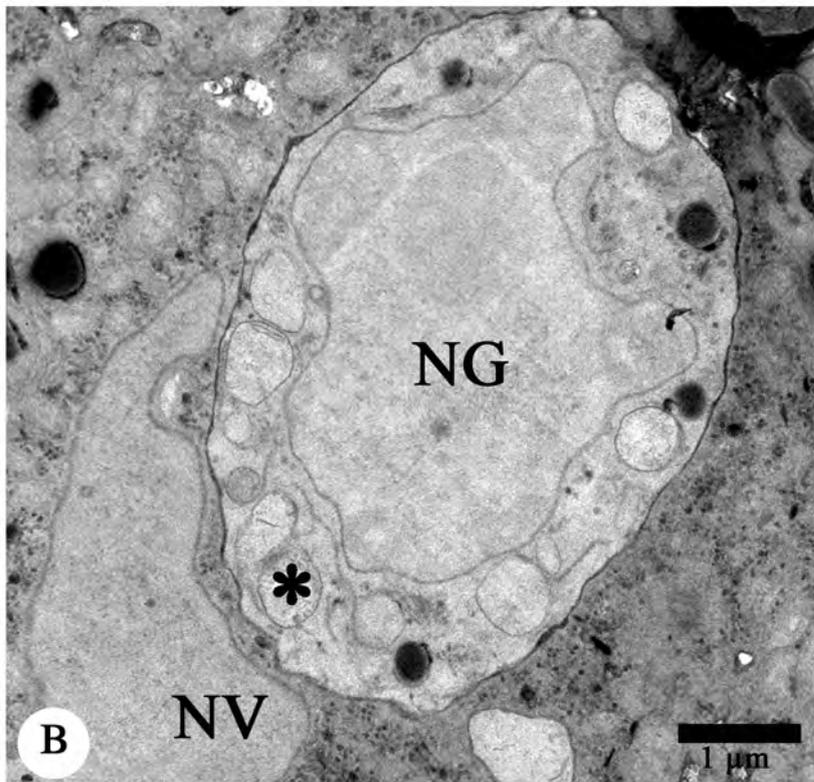
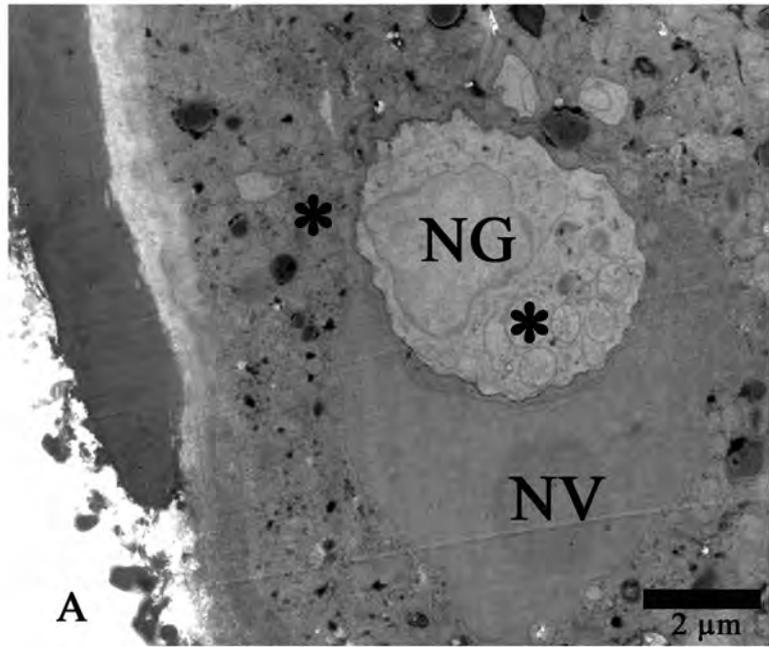
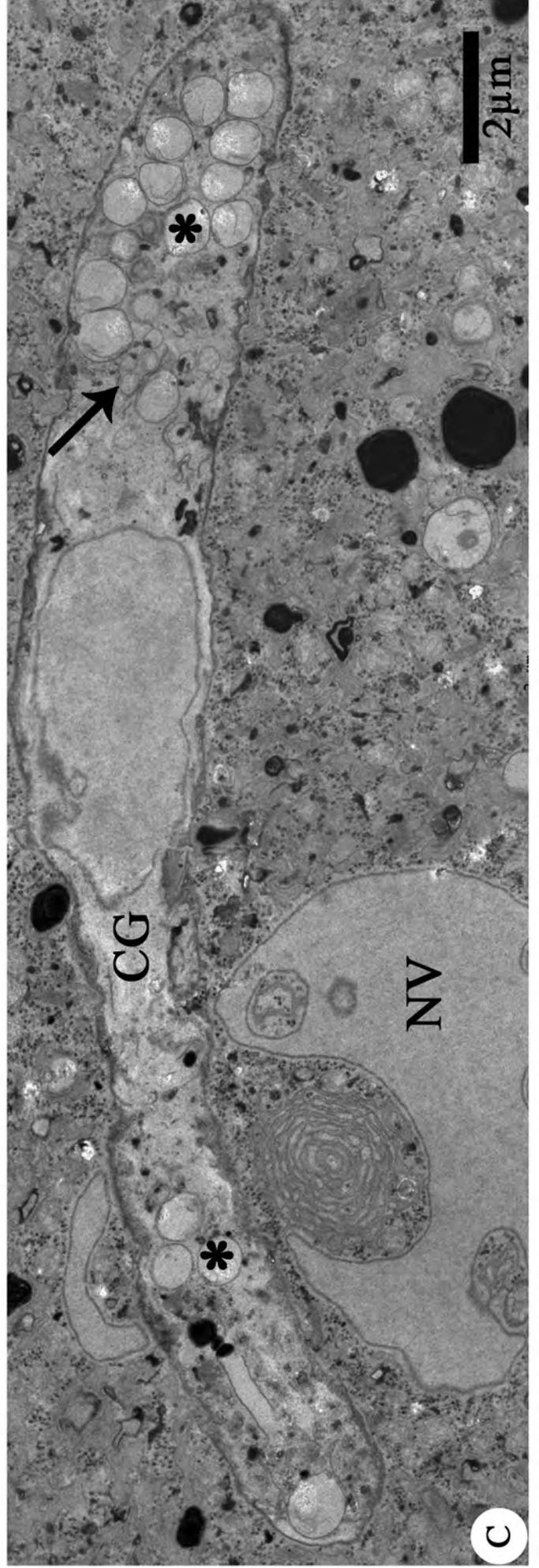
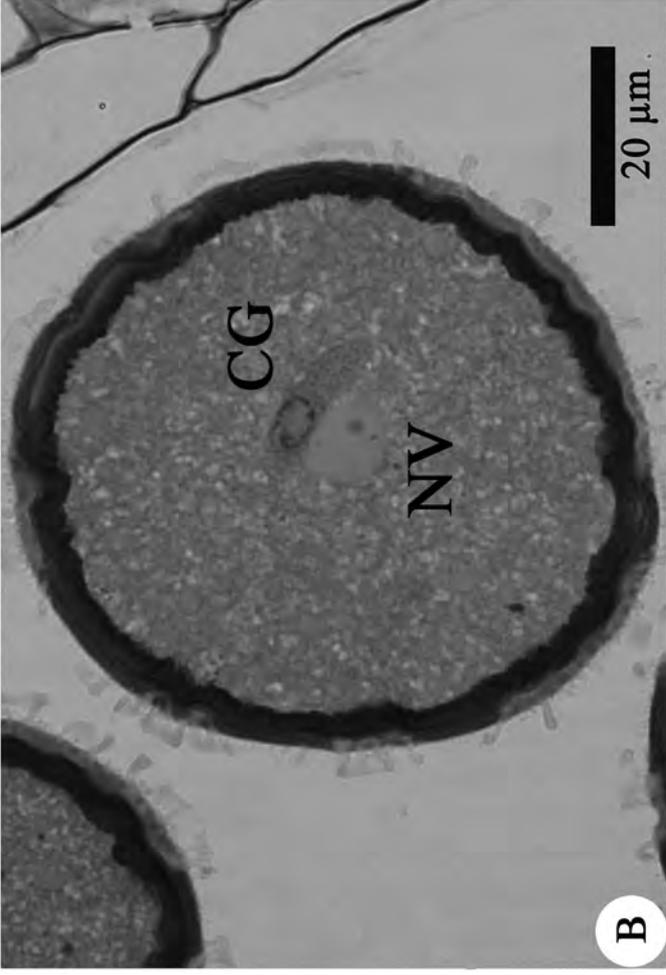
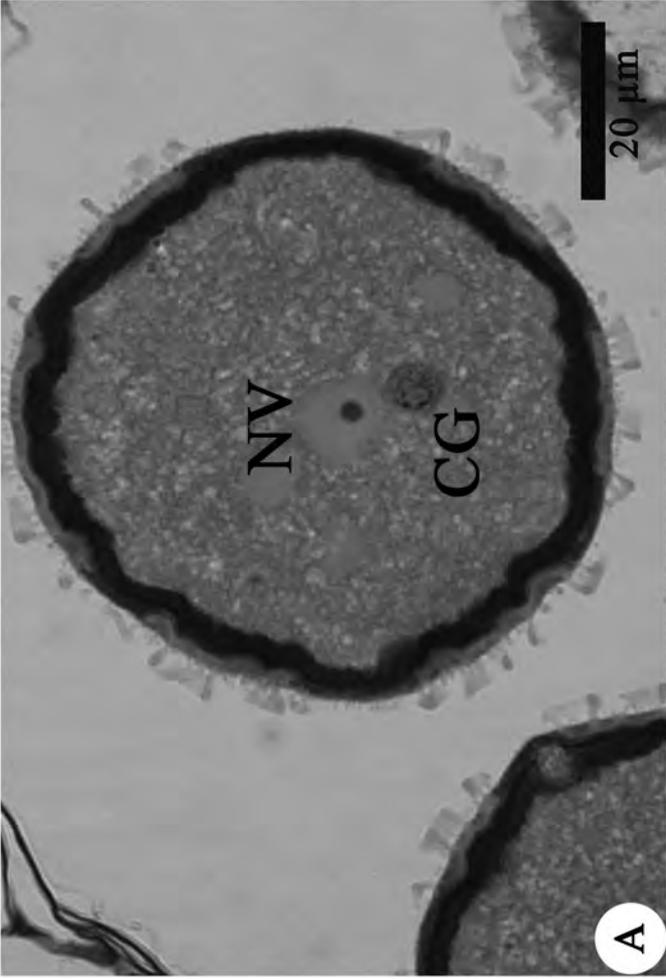


Figura 4.41 - Pólen maduro de *P. elegans*. (A) Célula generativa em seção transversal. (B) Formato falciforme da célula generativa. (C) Citoplasma da célula generativa madura com mitocôndrias próximas ao núcleo (seta) e inúmeros plastídios dispersos pelo citoplasma (*).



5 - Discussão

Gineceu

A presença de ovários tricarpelares, com um único lóculo e estiletes do tipo sólido, nas espécies analisadas está de acordo com as descrições de Puri (1947) para as espécies de *Passiflora*. O autor também relata a emergência dos rudimentos seminiais nas regiões próximas aos feixes vasculares ventrais fusionados.

O estilete do tipo sólido de *P. edulis* foi analisado por Souza *et al.* (2006) tanto em nível estrutural, quanto histoquímico, apresentando um tecido transmissor central com espaços intercelulares e conteúdos de polissacarídeos e lipídeos. Os conteúdos polissacarídicos também foram observados no presente trabalho, e possivelmente a sua deposição no meio extracelular tenha relação com a passagem do tubo polínico por esse espaço, como demonstrado por Braum (2008) em eventos de polinização de *P. elegans* e *P. suberosa*.

O estigma de espécies de Passifloraceae tem sido descrito de diversas maneiras em trabalhos anteriores: Puri (1947) descreve a anatomia da flor de espécies do gênero e considera os estigmas como estruturas grandes e maciças, mas comentários adicionais a respeito de sua estrutura não são mencionados. Raju (1956) classifica as mesmas estruturas como “projeções” facilitadoras na retenção dos grãos de pólen durante os eventos de polinização, e também como local de crescimento dos tubos polínicos durante a passagem em direção ao tecido transmissor. Heslop-Harrison & Shivanna (1977), em uma revisão sobre estigmas em angiospermas, classificam os presentes na família Passifloraceae como do tipo seco e portador de papilas unicelulares. Bernhard (1999), ao analisar a superfície estigmática de *Passiflora racemosa* e outros gêneros da família, bem como de *Adenia* (Flacourtiaceae). O autor classifica-as também como distintas papilas multicelulares e multisseriadas, com

ocorrência na maioria das espécies estudadas, exceto em *Adenia*. A mesma classificação é utilizada por Souza *et al.* (2006) na análise da espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, que consideram as estruturas originadas a partir da epiderme, apresentando células altamente vacuoladas e com paredes finas.

A superfície estigmática parece ser um bom caráter taxonômico para espécies de Passifloraceae, uma vez que Bernhard (1999) considera as estruturas encontradas no estigma comuns entre gêneros de Passifloraceae e pouco freqüente nas demais famílias de angiospermas.

As emergências estigmáticas encontradas na superfície do estigma de *Passiflora* apresentam semelhanças estruturais e ontogenéticas com coléteres (Paiva & Machado, 2006), e esses por sua vez, costumam estar associados com a secreção de compostos mucilaginosos. Thomas (1991) cita a sua ocorrência em cerca de 60 famílias de angiospermas, ocorrendo principalmente em estípulas e/ou sépalas. Em Passifloraceae é citada a ocorrência em superfícies foliares (Solereeder, 1908), enquanto que em Turneraceae são abundantes em partes jovens da planta, principalmente nas bordas de primórdios foliares e de estípulas (González, 1998).

Coléteres secretam material de natureza viscosa para a sua superfície externa (Thomas, 1991; González, 1998; Klein *et al.*, 2004; Paiva & Machado, 2006; Barreiro & Machado, 2007), diferente do observado no presente trabalho, no qual as emergências acumulam compostos de natureza péctica em suas paredes internas.

A superfície estigmática tem crucial importância nos eventos de polinização participando do reconhecimento do pólen, através da secreção de glicoproteínas para a superfície externa (Tilton *et al.*, 1984). Também foi observado em *P. edulis* o acúmulo de compostos de natureza péctica, principalmente ao longo das paredes periclinais internas

(Souza *et al.*, 2006), ocorrência similar evidenciada no presente trabalho, podendo estar relacionado com uma eficiente disponibilização de nutrientes para o tubo polínico durante a sua passagem, uma vez que permitem um acúmulo adicional de compostos, necessários ao tubo polínico após a germinação.

A estrutura trizonada da placenta e o desenvolvimento inicial dos rudimentos seminiais, a partir de divisões periclinais da camada central, também foi encontrado em diversas famílias vegetais, não relacionadas filogeneticamente a Passifloraceae e citada por outros autores (Bouman, 1984; Bittencourt & Mariath, 2002; De Toni & Mariath, 2003). Baseando-se nos presentes resultados com relação a ontogênese dos rudimentos seminiais tem-se:

- ❖ a projeção dos rudimentos seminiais a partir da placenta é semelhante ao encontrado por Dathan & Singh (1973) nas espécies *P. edulis*, *P. caerulea* e *Tacsonia molissima* (atualmente *P. molissima*), sendo essa uma característica comum dentro de Passifloraceae;

- ❖ a formação de ambos os tegumentos a partir da camada dérmica, em *P. elegans* e *P. haematostigma* é similar ao encontrado em *P. suberosa* (Silvério *et al.*, 2009). Detalhes da origem e formação dos tegumentos para espécies do gênero são escassos em trabalhos anteriores. Padhye & Deshpande (1960) e Singh (1962) relatam simplesmente o surgimento dos tegumentos, próximo a região apical do nucelo, mas sem referir a quais camadas celulares participam do processo.

A presença de um segundo tegumento é uma característica exclusiva das plantas com flores (Gasser *et al.*, 1998) e a condição bitegumentada é considerada primitiva dentro das angiospermas, sendo o número de tegumentos, bem como o modo de origem, características de grande valor taxonômico para a família (Warming 1878, Bouman 1971, Bouman & Calis

1977, Bouman 1984).

Dathan e Singh (1973) relatam que o surgimento dos tegumentos é simultâneo nas espécies de *Passiflora* observadas, mas não evidenciaram as divisões iniciais formadoras dos mesmos. Entretanto, essa generalização difere do observado nas espécies analisadas, uma vez que a formação do tegumento interno, sendo acompanhado na seqüência do desenvolvimento, pelo externo, é similar ao encontrado também em *P. suberosa* (Silvério *et al.*, 2009).

Ginosporângio e ginosporogênese

Padhye e Deshpande (1960) descrevem o arquespório para *P. foetida* como multicelular, formado a partir de duas a quatro células hipodérmicas, onde somente uma se diferencia em célula-mãe de ginósporos. No entanto, o arquespório geralmente é considerado como unicelular em *Passiflora* (Schnarf, 1931; Raju, 1956; Amela Garcia *et al.*, 2003). Na presente análise, a célula arquesporial divide-se mitoticamente antes de iniciar o processo meiótico, de maneira similar aos resultados observados por Singh (1962) e Silvério *et al.*, (2009) em *P. foetida* e *P. suberosa*, respectivamente. Pózner (2001) considera que divisões mitóticas no arquespório são raras em ginosporângios de angiospermas, com poucos casos ocorrendo em *Casuarina*, e em espécies de Malvaceae, Betulaceae e Fagaceae.

Não se pode afirmar ao certo que as variações citológicas observadas durante as fases iniciais de formação do ginosporângio em *Passiflora*, exerçam influencia nas etapas seguintes do desenvolvimento, uma vez que o gênero forma inúmeros rudimentos seminais com sacos embrionário completos.

Dessa forma, as variantes morfológicas demonstram a necessidade de análises adicionais para a família, com um número maior de espécies, a fim de se estabelecer um padrão para o grupo, bem como informações adicionais sobre a evolução do caráter da

família.

Tendo em vista o grande número de espécies de *Passiflora*, e dentre elas, a maior parte não conhecida em níveis embriológicos, essas variações no arquespório podem ser bons caracteres a ser investigados, visto ocorrer variações em grupos taxonômicos dentro da família, como demonstrado por Mariath & Cocucci (1997) em Rubiaceae.

A deposição de calose é um fenômeno comum durante a ginosporogênese em angiospermas e inicia-se comumente durante a profase I meiótica, desaparecendo durante as etapas seguintes da divisão (Rodkiewicz, 1970). Bouman (1984) considera a parede de calose uma característica primitiva, que atua diminuindo a permeabilidade da parede celular.

A separação entre citoplasmas durante a meiose costuma iniciar com a formação de uma parede pecto-celulósica, seguida pela deposição de calose. No presente trabalho, a parede de calose não foi observada em *P. elegans* nas fases analisadas, ocorrendo somente durante a fase de tétrade em *P. haematostigma*, ao longo das paredes transversais, isolando o ginósporo calazal viável. Essa variação pode ser decorrente de uma deposição de calose tardia, não deposita ainda nas fases analisadas em *P. elegans*. A ocorrência de tétrade de ginósporos lineares foram observados em outras espécies de *Passiflora* (Raju, 1956; Padhye & Deshpande, 1960; Amela Garcia, 2003) e possivelmente trata-se do padrão comum para o gênero *Passiflora*.

Associado ao desenvolvimento do ginófito, têm-se variações no esporângio, de forma que Maheshwari (1950) considera que o nucelo e seus conteúdos celulares, costumam ser consumidos durante as etapas de formação do mesmo. No presente trabalho, foi observado um acúmulo de material péctico nas células dos estratos parietais a partir da fase tetranucleada e provavelmente resultam de lise celular durante a gametogênese.

Bouman (1984) considera o nucelo, dentre outras características, como um órgão do

rudimento seminal, que contém tecidos de reserva. Dessa forma as grandes quantidades de amido detectadas no tecido nucelar durante a divisão meiótica em *P. elegans* poderiam estar relacionados com o suprimento para os eventos de divisão celular durante a meiose, e o conteúdo apresentado durante a antese, possivelmente esteja associado com o crescimento do tubo polínico, ou com o desenvolvimento do embrião esporofítico após a fecundação, como observado por Silvério *et al.* (2009) em *P. suberosa*..

A formação de um “capuz nucelar” é descrita em famílias relacionadas como Euphorbiaceae e Malpighiaceae (Bouman, 1984) bem como para Passifloraceae (Schnarf, 1931; Johri *et al.*, 1992). Batygina (2002) considera que o grau de desenvolvimento do “capuz nucelar” é um caráter espécie-específico, e confirmado na presente análise, visto que a proliferação da epiderme nucelar apresentou diferenças entre as espécies analisadas, sendo mais pronunciada em *P. haematostigma*. O fato de não ser observado em *P. suberosa* (Silvério *et al.*, 2009) sugere que esta estrutura pode ser um bom caráter taxonômico a ser analisado em rudimentos seminiais de *Passiflora*.

Ginogametogênese

A formação do ginófito nas espécies estudadas é do tipo *Polygonum* (Maheshwari 1950), coincide com o padrão descrito para outras espécies de Passifloraceae, como *P. adenophylla* (Cook, 1909), *P. foetida* (Raju, 1952); Padhye & Deshpande, 1960), *P. calcarata* (Raju, 1956), *P. edulis* (Souza *et al.*, 2002), *P. caerulea* (Amela Garcia *et al.*, 2003) e *P. suberosa* (Silvério *et al.*, 2009).

As antípodas são efêmeras nas espécies analisadas, e não alcançam a antese, de forma similar ao observado em outros trabalhos com espécies do gênero (Raju, 1952; 1956; Souza *et al.*, 2002; Amela Garcia *et al.*, 2003).

Souza *et al.* (2002) e Padhye & Deshpande (1960) observaram a presença de núcleos polares não-fusionados durante a fase de botão floral em espécies de *Passiflora*. No entanto, a formação do núcleo secundário ocorre próximo do período de antese, de modo similar ao encontrado em *P. caerulea* (Amela Garcia *et al.*, 2003) e em *P. suberosa* (Silvério *et al.*, 2009) onde os autores a descrevem como tardia, visto que tal processo ocorre pouco antes da fecundação.

O aparelho oosférico apresenta duas sinérgides proeminente e cada qual um aparelho fibrilar desenvolvido. Sinérgides são células altamente especializadas, e provavelmente participam do controle de fatores relacionados com a descarga e fusão dos gametas (Weterings and Russell, 2004), através da emissão de sinais químicos (Willemse & Went 1984; Huang & Russell, 1992; Higashiyama *et al.*, 2003; Punwani & Drews, 2008), bem como participando da condução dos núcleos espermáticos até os núcleos da oosfera e célula média, através de modificações de seu citoesqueleto (Huang & Russell, 1994; Huang & Sheridan, 1998; Fu *et al.*, 2000).

O aparelho oosférico é semelhante ao encontrado em espécies do gênero (Amela Garcia *et al.*, 2003; Silvério *et al.*, 2009). Amela García *et al.*, (2003) observaram diferenças no aparelho fibrilar, entre as sinérgides de *P. caerulea*, uma das quais apresentou maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso, e essa variação podem estar relacionadas com a emissão de sinais no direcionamento do tubo polínico.

Rudimento seminal maduro

Após a fecundação, os tegumentos diferenciam-se e passam a fazer parte do envoltório das sementes. A análise dos tegumentos e seus estratos celulares, tem grande importância em trabalhos taxonômicos, visto que as variações têm sido identificadas em

trabalhos com sementes de espécies do gênero *Passiflora* (Deginani, 2001, Pérez-Cortez *et al.*, 2002 e Pérez-Cortez *et al.*, 2005).

O rudimento seminal anátropo e bitegumentado, correspondem à maioria das descrições para o gênero (Schnarf, 1931, Johri, 1992), exceto em *P. calcarata*, classificado como ortótropo (Raju, 1956). A micrópila em zig-zag é similar à encontrada por Dathan & Singh (1973) e Silvério *et al.* (2009). No entanto, o tipo de formação da micrópila pode apresentar variações, como observado por Padhye & Deshpande (1960) em *P. foetida* onde os tegumentos apresentam outra conformação, devido a projeção diferenciada de suas extremidades.

Passifloraceae é caracterizadas por apresentar sementes ariladas, sendo o arilo uma estrutura rica em amido e lipídeos (Johri *et al.*, 1992) e de coloração atraente para animais (Boesewinkel & Bouman, 1984). O arilo é uma estrutura da semente cujo desenvolvimento ocorre principalmente após a fecundação como já observado em *P. suberosa* (Kloos & Bouman 1980) e em outras espécies do gênero (Raju 1952, 1956, Singh 1962, Dathan & Singh 1973) bem como em outras famílias não-relacionadas como Leguminosae (Rodríguez-Riaño, 2006). Segundo a classificação de Corner (1976), o termo arilo é utilizado para definir uma estrutura de origem funicular que envolve total ou parcialmente a semente, e no passado chegou a ser considerado como um terceiro tegumento que participava do envoltório de sementes (Maheshwari, 1950). Em *P. elegans* e *P. haematostigma*, o arilo inicia a sua formação no botão floral antes do início da meiose, através de divisões periclinais da epiderme funicular, antecedente ao início durante o evento meiótico observado em *P. suberosa* e *Turnera ulmifolia* por Kloos & Bouman (1980).

Androceu

Estratos parietais e a formação do androsporângio

Os androsporângios das espécies estudadas são similares ao descritos para as espécies do gênero (Padhye & Deshpande, 1960; Amela Garcia *et al.*, 2003), com variações no número final de camadas médias, e esse fato pode estar relacionado com o tamanho final da antera.

Por outro lado, a formação dos estratos parietais apresenta variações, de modo que o tipo Dicotiledôneo obtido no presente trabalho é similar ao observado em outras espécies do gênero por Amela Garcia *et al.* (2002), diferindo do tipo Básico encontrado por Tormes (2007) em *P. suberosa*. Cabe salientar que *P. suberosa*, detalhada por Tormes (2007), também participa do grupo de espécies analisadas por Amela Garcia *et al.* (2002), merecendo uma investigação mais detalhada da formação desses estratos, esclarecendo a ocorrência de diferentes tipos ontogenéticos numa mesma espécie.

Antera madura

A ocorrência de uma epiderme uniestratificada na antera madura é usual para as espécies de *Passiflora* estudadas, sendo comum também a ocorrência de células dilatadas próximas à região estomial (células estomiais) (Raju, 1956; Padhye & Deshpande, 1960; Souza & Pereira, 2000; Amela Garcia, 2002). A presença das células estomiais parece ser uma característica comum entre espécies do subgênero *Passiflora*, visto serem ausentes em *P. haematostigma*, e em *P. suberosa* (Tormes, 2007), dos subgêneros *Astrophea* e *Decaloba* respectivamente.

De acordo com Keijzer (1987; 1996), o processo de abertura das anteras, dá-se pela combinação entre a ação mecânica de expansão celular das células epidérmicas e endotécio,

com a lise enzimática da lamela média de células da região do septo.

Grande quantidade de amido foi encontrada nas células epidérmicas das espécies em estudo, de forma similar ao encontrado por Amela Garcia *et al.* (2002) para *P. caerulea*. A grande quantidade de amido nas células epidérmicas, bem como a presença de cristais de oxalato de cálcio em células do limite da região de abertura podem estar relacionadas com a ruptura do septo nas espécies analisadas, uma vez que a hidrólise do amido provoca alterações osmóticas no interior celular pela liberação de açúcares (Keijzer, 1987), enquanto que a presença de drusas pode estar relacionada com a retirada de íons Ca^{2+} de células da região do septo, como observado em *Capsicum annuum* por Horner & Wagner (1980). Segundo Franceschi & Horner (1980) uma das funções do cálcio em plantas é a ativação e/ou estabilização de certas enzimas e por ser essencial na formação da lamela média. Outra possível função atribuída a presença de drusas, seria a proteção contra predação de animais.

Um fato interessante é que em ambas as espécies, o acúmulo de amido é desigual entre os dois lados do septo, o que pode resultar em diferentes forças de tensão na região. Outro fato a ser destacado, é que a presença de cristais de cálcio foi observada somente em *P. haematostigma* e pode ter relação com a ausência de células estomiais na região do septo, como encontrado em *P. elegans*.

A presença de um endotécio com células de paredes espessadas é considerada comum entre as angiospermas, inclusive em plantas de ambiente aquático (Maheshwari, 1950) e a redução no número de camadas é considerada uma característica derivada por (Bhandari, 1984), visto ocorrerem várias camadas desse estrato em angiospermas basais. A presença de um único estrato celular nas espécies analisadas é similar ao encontrado em outras espécies do gênero (Padhye & Deshpande, 1960; Amela Garcia *et al.*, 2002; Tormes, 2007).

Amela Garcia *et al.*, (2002) citam a ocorrência dos espessamentos parietais das células do endotécio para seis espécies do gênero, mas sem classificar o padrão encontrado, da mesma forma como em *P. foetida* observada por Padhye & Deshpande (1960).

Os espessamentos, em forma de “U”, encontrados em ambas as espécies no presente trabalho, diferem dos espessamentos helicoidais encontrados por Tormes (2007) em *P. suberosa*, e assim como o tipo de formação da parede do esporângio, podem estar associados aos tamanhos das anteras e seus mecanismos de abertura que variam entre os subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*.

P. haematostigma também apresenta espessamentos parietais anelares em praticamente todas as células do conectivo da antera madura. A ocorrência destes espessamentos pode fornecer força mecânica adicional durante a fase de dessecação da antera, auxiliando no rompimento do septo. Essa característica pode desempenhar um papel importante durante a deiscência, visto que *P. haematostigma* apresenta anteras com cerca de 1 cm de comprimento na maturidade e são relativamente maiores que as encontradas em *P. elegans* que não ultrapassam cerca de 0,6 cm.

As camadas médias ocorrem internamente ao endotécio e são constituídas por duas ou três camadas de células que sofrem colapso a partir da fase de meiose de andrósporos (Maheshwari, 1950). Batygina (2002) sugere múltiplas funções as células da camada média, como a participação no estoque de substâncias como amido, transporte de assimilados, secreção de compostos envolvidos com a formação do “*pollenkitt*” e mecânico com participação no mecanismo de abertura da antera. Em *P. elegans*, as camadas médias sofrem colapso na antera madura, de modo similar ao encontrado em outras espécies da família (Amela Garcia *et al.*, 2002; Tormes, 2007). No entanto em *P. haematostigma*, as camadas médias persistem e adquirem espessamentos em suas paredes, possivelmente contribuindo

com o processo de deiscência da antera madura.

O tapete é dentre as camadas da parede do androsporângio, o estrato celular mais interno, circundando completamente o tecido arquesporrial e desempenhando importante papel no desenvolvimento do pólen devido ao seu posicionamento (Maheshwari, 1950). As espécies investigadas no presente trabalho apresentam tapete do tipo secretor, que segundo Pacini *et al.*, (1985) é considerado o tipo ancestral do qual todos os demais derivaram, enquanto que o tipo plasmodial é considerado derivado e de ocorrência em plantas com anteras pequenas.

Atribui-se ao tapete inúmeras funções durante o desenvolvimento do pólen, participando desde a meiose com a formação do fluído locular e secreção de calase, até a deiscência da antera com a síntese de precursores de esporopolenina e formação do “*pollenkitt*” ou trifino (Pacini *et al.*, 1985; Pacini, 1990), e problemas no tapete podem resultar em esterilidade polínica (Bhandari, 1984).

Durante a meiose, a influência do tapete sobre os meiócitos é limitada pela ocorrência das paredes de calose (Pacini *et al.*, 1985), o que favorece o metabolismo interno desse tecido, resultando em aumento do volume celular nesse período, com acúmulo de diferentes tipos de compostos de reserva que, posteriormente, são liberados no interior do lóculo (Bhandari, 1984).

A grande expansão do esporângio observada durante os eventos meióticos ocorre simultaneamente com o acúmulo de conteúdos na cavidade locular. Maheshwari (1950) considera que esses conteúdos são produzidos exclusivamente pelo tapete, o que justifica a presença de conteúdos similares em vacúolos das células tapetais observados durante a fase de tétrade. Clément *et al.*, (1998) relatam a presença de polissacarídeos neutros, pectinas e proteínas no lóculo de *Lilium*, sendo esses os compostos mais abundantes no lóculo até a fase de andrósporos livres, podendo estar relacionados com a nutrição dos mesmos, uma vez que a

esporoderme permite a passagem de compostos para o seu interior (Heslop-Harrison, 1968).

Em *P. elegans* e *P. haematostigma*, também foi observado o acúmulo de compostos de natureza péctica, tanto nos vacúolos das células do tapete, quanto no interior do lóculo entre as tétrades.

O transporte de compostos para o interior do lóculo, oriundos de tapete do tipo secretor, é facilitado pela dissolução das paredes anticlinais e periclinais internas das células tapetais durante a meiose do tecido esporogênico das anteras de angiospermas (Pacini *et al.*, 1985; Pacini, 1990) e resultados similares foram apresentados por Amela Garcia *et al.* (2002) para espécies do gênero *Passiflora*, nas quais as paredes celulares encontraram-se dissolvidas durante a fase de tetrade. Em ambas as espécies analisadas também obteve-se resultados semelhantes, uma vez que as células do tapete não apresentaram reação positiva para fibrilas de celulose em nenhuma das etapas analisadas.

O tapete do tipo secretor, presente em várias angiospermas, é caracterizado pelo desenvolvimento de estruturas de composição química semelhantes às da exina, denominados orbículos ou corpúsculos de Übisch (Bhandari, 1984). Os orbículos reagem de forma similar a exina aos diversos testes histoquímicos, e são resistentes a acetólise, o que demonstra constituição a partir de esporopolenina (Bhandari, 1984; Huysman *et al.*, 1998).

Atribui-se aos orbículos diversas funções como: atuar no transporte da esporopolenina; participar na prevenção contra osmose e colapso dos andrósporos durante o desenvolvimento; ou simplesmente atuar como subprodutos do metabolismo celular (Huysmans *et al.*, 1998). Essa última função parece não apresentar relação com a formação da exina, como sugerido por Hesse (1986) e Santos (2000), onde a ocorrência dos mesmos seria um resultado da síntese de esporopolenina pelas células do tapete.

Maheshwari (1950) considerou no passado, a presença dos orbículos como um

mecanismo de transporte da esporopolenina entre o tapete e a esporoderme do andrósporo em desenvolvimento, no entanto essa função nunca foi comprovada. A formação dos orbículos ocorre no meio extracelular, através da polimerização de pré-orbículos entre a membrana plasmática e a parede periclinal interna de células do tapete, a partir da fase de tetrade de andrósporos (Heslop-Harrison & Dickinson, 1969; Bhandari, 1984; Huysmans *et al.*, 1998).

A presença de orbículos foi demonstrada por Amela Garcia *et al.*, (2002) em seis espécies do gênero e confirmada também nas espécies do presente trabalho, a partir da fase de andrósporos jovens. No entanto, a sua produção pode ter iniciado anteriormente, uma vez que a membrana peritapetal já apresentava intensa impregnação de esporopolenina.

A deposição de pequenos orbículos sobre a membrana peritapetal em espécies do gênero foi observada primeiramente por Amela Garcia *et al.* (2002) e pode ocorrer também nas espécies em estudo, uma vez que foram observados em ambas as espécies.

Simultaneamente à produção dos orbículos, ocorre o acúmulo de precursores de esporopolenina entre a parede periclinal externa do tapete e a lamela média formando a membrana peritapetal e essa camada persiste após a dissolução do tapete e é acetólise-resistente (Bhandari, 1984).

A membrana peritapetal funciona como um envoltório (saco polínico) ao longo da cavidade do esporângio, e possivelmente atue na prevenção da perda d'água, contribuindo no modo de deposição do pollenkitt sobre a exina (Heslop-Harrison, 1969). Keijzer (1987) também sugere sua importância durante a dispersão do pólen, devido a pouca afinidade entre a esporopolenina e o pollenkitt depositado sobre os grãos.

Na maturidade da antera, as células do tapete entram em colapso liberando os conteúdos de seus protoplastos na cavidade locular (Hesse, 1981; Pacini & Franchi, 1991). De acordo com Pacini & Franchi (1991), baseando-se nas propriedades físico-químicas, esses

conteúdos podem ser de três tipos principais: pollenkitt, com o predomínio de compostos hidrofóbicos, principalmente lípidios e carotenóides; trifino, com uma mistura de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas; e viscínios, que são fluidos de alta viscosidade, e todos os produtos estão envolvidos com a sinalização do pólen ou adesão sobre o corpo de polinizadores. Pacini & Hesse (2007) consideram o pollenkitt como o adesivo mais comum encontrado sobre o pólen de angiospermas e lhe atribuem inúmeras funções relacionadas com a adesão e reconhecimento na superfície do estigma.

Nas espécies estudadas, conteúdos de natureza lipídica e protéica foram encontrados sobre a exina do pólen, em anteras maduras não processadas e esmagadas, e possivelmente oriundos do tapete. Esses conteúdos são importantes nas reações de reconhecimento pelo estigma, e possivelmente estejam associados com a reação de autoincompatibilidade esporofítica observada em espécies do gênero (Rêgo *et al.*, 1999, 2000; Braum, 2008).

As células tapetais podem permanecer uninucleadas, ou como na maior parte dos casos, tornam-se multinucleadas, sendo essa uma característica de valor taxonômico entre as famílias de angiospermas. A ocorrência de células poliplóides é comum em plantas que apresentam tapete do tipo secretor, de forma que esse aumento permite um maior ganho nas atividades transcricionais (D'Amato, 1984).

Os trabalhos de Raju (1956) e Padhye & Deshpande (1960) relatam a ocorrência de células binucleadas em *P. calcarata* e *P. foetida*, respectivamente, enquanto que o número de núcleos varia de dois a vários nas espécies analisadas por Amela Garcia *et al.*, (2002). A ocorrência de dois ou mais núcleos também foi observada no presente trabalho, no entanto não foi possível a determinação exata do número de núcleos das células do tapete, pois a análise foi realizada a partir de material seccionado. Pode-se afirmar, entretanto, que as células tapetais das espécies analisadas são poliplóides, demonstrado pelos diferentes graus de fusão

nuclear, condição esta que poderia estar relacionada com um aumento na demanda metabólica, resultando no acúmulo de compostos observado no citoplasma durante a fase de pólen binucleado.

Algumas morfologias nucleares encontradas são similares às do tipo “sticky” de divisão proposto por Maheshwari (1950), no qual ocorre falhas na separação entre os cromossomos após a anáfase, e persiste nos demais estágios resultando núcleos em formato de halteres.

Androsporogênese

Embora trabalhos anteriores envolvendo a embriologia tenham sido realizados (Cook, 1909; Raju, 1952, 1956; Padhye & Deshpande, 1960), poucas informações foram acumuladas sobre a androsporogênese e androgametogênese de espécies do gênero (Souza & Pereira, 2000; Amela Garcia *et al.*, 2003).

As células do tecido arquesporial diferenciam-se em células-mãe de andrósporos e iniciam o processo meiótico, que segundo Bhandari (1984), é o mais importante evento durante o ciclo de vida das plantas, por marcar o final da geração esporofítica, dando início a geração gametofítica.

Uma parede de calose é depositada ao redor dos meiócitos durante a meiose interrompendo a comunicação com os demais tecidos da antera, mas sem romper o contato entre os próprios meiócitos (Bhandari, 1984). A comunicação entre meiócitos de um mesmo esporângio ocorre através de canais citomíticos que permitem a ocorrência de plasmodesmos (Heslop-Harrison, 1968; Bhandari, 1984; Dickinson, 1987). Amela Garcia *et al.* (2002) observaram a presença exclusiva de tétrades tetraédricas em espécies de *Passiflora*, similar ao encontrado em *P. elegans* e *P. haematostigma*.

O tipo de citocinese simultânea foi considerada anteriormente como o mais derivado angiospermas (Davis, 1966). No entanto, trabalhos mais recentes com grupos mais abrangentes de plantas, incluindo angiospermas basais e gimnospermas, têm demonstrado que trata-se de um caráter plesiomórfico em angiospermas (Furness *et al.*, 2002). O tipo simultâneo, observado no presente trabalho, ocorre de forma similar em outras espécies do gênero (Souza & Pereira, 2000; Amela Garcia *et al.*, 2002), onde a separação dos citoplasmas ocorre somente após a fase tetranucleada.

Associada à meiose, tem-se a reorganização do citoplasma e a transição da fase diplóide para a haplóide, e o genoma gametofítico pode se expressar sem a interferência de tecidos do esporófito (Shivanna, 2003). Outras evidências indicam também a importância da parede de calose, essencial para a deposição da futura exina (Fitzgerald *et al.*, 1994; Gabarayeva & Hemsley, 2006), e problemas na sua formação resultam na má formação da exina e conseqüente aborto do pólen (Mascarenhas, 1970; Dong *et al.*, 2005; Blackmore *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008).

É durante a fase de tétrade de andrósporos também, que ocorre o estabelecimento das aberturas nos grãos de pólen em angiospermas. Nessa etapa, tem-se a participação do citoesqueleto no controle e orientação dos microtúbulos, e alterações em sua estrutura levam a alterações na formação da parede do pólen (Heslop-Harrison, 1971; Sheldon & Dickinson, 1983; Dickinson & Sheldon, 1986; Furness *et al.*, 2002; Ressayre *et al.*, 2005; Blackmore *et al.*, 2007).

A primexina é a primeira parede a ser formada durante a fase de tétrade de andrósporos (Blackmore & Barnes, 1987), através da deposição de um glicocálice com acúmulo de material polissacarídico de natureza fibrilar entre a membrana plasmática e a parede de calose (Heslop-Harrison, 1968). Essa deposição é seguida pelo acúmulo de

precursores de esporopolelina em locais específicos associados com a primexina (Heslop-Harrison, 1968). A primexina desempenha papel importante também nas regiões das futuras aberturas, pela não-deposição da mesma, nesses locais determinados (Heslop-Harrison, 1968; Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997), similar ao observado no presente trabalho, onde as regiões das futuras aberturas permanecem sem deposição.

Androgametogênese

A vacuolação dos andrósporos marca o início da geração gametofítica em angiospermas. Um grande vacúolo é formado no citoplasma, que associado com a flexibilidade da exina ainda incompleta, permite a expansão do andrófito ainda jovem (Shivanna, 2003).

No presente trabalho, a divisão do núcleo ocorreu após a formação de um grande vacúolo central, sendo acompanhado pela migração do núcleo para a porção periférica da célula. Essas alterações no citoplasma são coordenadas pelo citoesqueleto, e são acompanhadas da polarização de organelas que irão fazer parte do citoplasma da célula generativa (Schröder, 1985; Hagemann & Schröder, 1989; Tanaka, 1993; Mogensen, 1996).

Após o englobamento da célula generativa, o nucléolo da célula vegetativa aumenta em tamanho, e associado ao surgimento de vacúolos nucleolares, sugerem alta atividade metabólica no citoplasma desta célula (Bittencourt, 1996), e passam a acumular compostos de reserva em seu interior (Dickinson, 1987). No presente estudo, observam-se condições nucleares semelhantes, bem como o acúmulo de compostos na forma de amido, proteínas e lipídios, ocorrendo os primeiros em maior quantidade no interior do citoplasma vegetativo. A reserva na forma de lipídios também podem ocorrer (Piffanelly *et al.*, 1998; Rodríguez-García *et al.*, 2003). No entanto foram observados somente nas preparações com fixação secundária

em tetróxido de ósmio, pois eram extraídos durante as séries alcoólicas no processamento para microscopia ótica.

As espécies estudadas apresentaram dois ciclos amilolíticos, de maneira similar ao encontrado por Santos & Mariath (1999) em *Ilex paraguariensis*. O primeiro ciclo ocorre durante a fase de andrósporo, com um pequeno acúmulo de amido que é consumido antes da vacuolação. O segundo e com maior acúmulo, ocorre durante a gametogênese, após o englobamento da célula generativa com todo amido hidrolisado durante as etapas de maturação do pólen.

No presente trabalho, o pólen maduro apresentou variações com relação ao consumo do amido, com a ocorrência de grão de pólen com e sem conteúdos durante a antese. No exemplo dos grãos onde a hidrólise do amido foi total, percebeu-se também uma maior disponibilidade de polissacarídeos dissolvidos no citoplasma, evidenciando uma nítida mobilização da reserva polissacarídica, provavelmente para a forma de frutanos e sacarose, como relatado por Pacini (2000), dentre as diferentes formas de transformação do amido no pólen maduro. Esse mesmo autor relata que esses compostos participam do controle osmótico do citoplasma através da polimerização/despolimerização e da proteção de membranas durante a fase de dispersão do pólen.

Informações sobre os conteúdos e tipos de reserva encontrados em grãos de pólen, bem como os conteúdos do “*polenkitt*” sobre a parede, têm importância como fonte de alimento para insetos coletores de pólen (Roulston & Cane, 2000).

Esporoderme

Exina

A parede do pólen é considerada como o mais complexo sistema de paredes das

plantas (Shivanna, 2003; Blackmore *et al.*, 2007) e apresenta de uma forma geral, uma estrutura composta por várias camadas com propriedades físicas e químicas distintas (Nepi & Franchi, 2000; Blackmore *et al.*, 2007).

O principal componente da exina é a esporopolenina (Heslop-Harrison, 1971; Gabarayeva & Hensley, 2006) e ela por sua vez, é constituída por uma mistura de unidades fundamentais de fenil propanóides, na forma de ácido p-coumárico e carotenóides (Scott, 1994) que conferem-lhe grande resistência a degradação química. A esporopolenina é o único componente da esporoderme resistente ao método de acetólise desenvolvido por Erdtman (1960) e confere à parede do pólen, uma combinação de força e resistência ao ataque químico e biológico (Scott *et al.*, 2004).

A formação da esporopolenina inicia-se durante a fase de tétrade com calose, através de precursores sintetizados pelos andrósporos que polimerizam-se em regiões demarcadas pela deposição da primexina, sendo acompanhado, na seqüência, com contribuição de conteúdos liberados por células do tapete, na forma de pró-orbículos (Heslop-Harrison, 1963, 1968; Gabarayeva & El-Ghazaly, 1997; Gabarayeva & Hemsley, 2006; Blackmore *et al.*, 2007).

A determinação do padrão escultural da superfície do pólen é controlado pelo andrófito como demonstrado por Sheldon & Dickinson (1983) com a contribuição de compostos oriundos do tapete após liberação no fluído locular (Scott *et al.*, 2004). A contribuição do tapete na formação da esporoderme parece ser indispensável na finalização estrutural da parede, como demonstrado por Wang *et al.* (2003) onde problemas no transporte dos orbículos, por proteínas do esporófito, resultam na má formação da esporoderme e conseqüente colapso do pólen.

A primexina é o primeiro componente da esporoderme, acumulado entre a membrana

plasmática e a parede de calose dos andrósporos, com constituição química composta principalmente de mucopolissacarídeos e glicoproteínas (Rowley & Dahl, 1977), de modo semelhante ao encontrado no presente trabalho, uma vez que reagiu positivamente aos testes de pectinas e proteínas.

A sua deposição ocorre ao longo das regiões intercolpos, sendo interrompida pela não deposição nas futuras zonas de abertura. Santos (2000) observou durante a ontogênese da esporoderme em *Ilex paraguariensis*, a não deposição de primexina na região das futuras zonas de abertura em um primeiro momento, espessando-se posteriormente, e determinando a formação do oncus da exina, antes da completa dissolução da calose. A não deposição da primexina na região das aberturas, também foi observada no presente trabalho e após a dissolução da parede de calose a presença do oncus da exina pode ser observado em *P. haematostigma*, pelo acúmulo de material péctico. Em *P. elegans*, o estrato mais externo da exina permanece embebido em material péctico durante toda o desenvolvimento do pólen.

Após a liberação no interior do esporângio, a fina exina alcança o espessamento final até a fase de andrósporo vacuolado, com possível contribuição de pró-orbículos liberados pelo tapete. Além disso, são observados orbículos dispersos pelo interior do lóculo e uma membrana peritapetal envolve a cavidade locular, similar ao descrito em *P. caerulea* (Amela Garcia *et al.*, 2002).

As terminologias morfológicas utilizadas na denominação dos estratos da exina apresentam variações dependendo do autor. Erdtman (1952) classifica-as baseando-se principalmente em suas posições e estrutura, sendo a camada mais externa, composta por teto e báculas denominada sexina, enquanto que a mais interna e contínua, denominada nexina, apresenta duas camadas. A mais externa é a nexina-1, onde estão inseridas as báculas, enquanto que a mais interna é a nexina-2, em contato direto com a intina.

Outra classificação, e adotada no presente trabalho, é baseada na ultraestrutura do pólen de *Zea mays*, onde Skvarla & Larson (1966) levam em consideração as similaridades químicas entre as camadas. Dessa forma, a porção externa da exina é denominada ectexina, e encontra-se constituída por teto, columelas e camada basal, enquanto que a camada mais interna é denominada endexina.

A ectexina é a porção ornamentada da exina, sendo constituída pelo teto, báculas e camada basal. A sua deposição inicia-se ainda durante a fase de tetrade de andrósporos a partir de regiões diferenciadas da primexina, denominadas probáculas. A camada basal forma-se primeiramente e constitui a base para as probáculas ao longo das regiões intercolpos (Dickinson & Heslop-Harrison, 1968; Dickinson, 1970, Santos, 2000).

A ectexina, em ambas as espécies, apresentou um teto com porções descontínuas que lhe conferem um aspecto reticulado quando observados externamente. A análise do teto e conseqüente tipo de retículo encontrado sobre a superfície dos grãos de pólen são importantes nos estudos palinológicos, uma vez que são regiões resistentes ao método de acetólise. Em *P. elegans* o teto apresenta menos porções contínuas, o que lhe confere um retículo com aspecto frouxo, onde as báculas são vistas facilmente nas porções sem teto, diferentemente do encontrado em *P. haematostigma*, que apresenta o retículo mais denso e com báculas de difícil visualização.

Mais internamente tem-se a endexina, camada essa depositada pelo próprio andrósporo, normalmente após a dissolução da parede de calose (Dickinson & Heslop-Harrison, 1968; Santos, 2000). A sua deposição pode ocorrer após a formação da camada basal (nexina 1), sendo simultânea a deposição da intina (Dickinson & Heslop-Harrison, 1968) ou simultânea a formação da camada basal (Santos, 2000).

Os estratos da exina podem apresentar composição química diferenciada, sendo

possível a sua identificação com o uso de diferentes colorações (Knox, 1984). A esporopolenina cora-se de verde com Azul de Toluidina O, evidenciando a presença de compostos de natureza fenólica (Feder & O'Brien, 1968), além de ser autofluorescente e ter afinidade por corantes básicos, de forma que Nepi & Franchi (2000) sugerem que uma simples coloração com Fucsina básica é suficiente para a detecção de diferenças entre ecto- e endexina.

De fato, no presente trabalho a coloração combinada de Fucsina básica, com Azul de Astra revelaram a presença de uma camada basal (nexina 1) contínua em *P. haematostigma* e ausente em *P. elegans*, estando as báculos inseridas diretamente na endexina nesta última.

A ectexina apresentou também uma reação mais intensa com Auramina O, quando comparada com endexina, o que provavelmente demonstra um maior acúmulo de compostos de natureza lipídica nesse estrato. No caso da espécie *P. elegans*, que não apresenta camada basal, percebe-se nitidamente a inserção das báculos, com maior fluorescência, diretamente na endexina (nexina 2), já completamente formada durante a fase de andrósporo vacuolado.

A análise ultraestrutural confirmou a ausência da camada basal em *P. elegans* e presença em *P. haematostigma*. No entanto, ambas diferem da exina de *P. caerulea* demonstrada por Larson (1966). Esse autor revela a ocorrência de uma região intermediária, na qual a ecto- e a endexina encontram-se embebidas em uma região com gradiente de contrastação intermediário entre as duas porções. Nesse caso, a camada basal da ectexina não forma um estrato distinto da endexina.

A endexina é o estrato mais interno da exina, encontra-se em contato direto com a intina e segundo Knox (1984) parece ser o mais variável de todos, em estrutura e composição química. No presente trabalho, a endexina diferenciou-se das demais pela presença de pectinas. A análise ultraestrutural revelou ainda que a endexina apresenta pequenas

perfurações em *P. elegans*, próximas a região limite entre as duas camadas, onde ocorre o acúmulo de materiais similares a intina. Resultados similares foram encontrados em *P. caerulea* por Larson (1966) e *P. coccinea* por Carreira (1977).

Larson (1966) destaca que uma transição gradual entre a exina e a intina deve ser investigada com cuidado, uma vez que apresenta forte potencial sistemático dentro do gênero, e que não é restrito a *Passiflora*, ocorrendo em inúmeras outras espécies não-relacionadas sistematicamente.

Intina

A intina é o estrato mais interno da esporoderme e costuma ser fina na região entre as aberturas, tornando-se mais espessa sob as aberturas (Heslop-Harrisson & Heslop-Harrisson, 1991). A sua composição química é similar a encontrada nas paredes primárias de células vegetais (Nepi & Franchi, 2000) consistindo principalmente de celulose, pectinas e hemiceluloses. Devido a sua composição química, são consumidos com o método de acetólise e normalmente não são analisados durante os trabalhos palinológicos.

A intina inicia a sua formação a partir da fase de andrósporos, sendo produzida exclusivamente pelo citoplasma da célula haplóide com importante função no processo de germinação do tubo polínico através das regiões de abertura (Knox, 1984).

Heslop-Harrisson (1991) classifica a intina como portadora de três estratos principais, baseado principalmente nas funções de participação no mecanismo de germinação, estocagem de proteínas e enzimas envolvidas na interação com o estigma e formação da parede do tubo polínico.

O estrato mais externo é, predominantemente, composto por material de natureza péctica e costuma ser mais espesso nas região das aberturas (Knox, 1984; Heslop-Harrisson &

Heslop-Harrisson, 1991; Santos, 2000). Knox sugere a presença de inúmeros polissacarídeos de parede nessa região, o que foi confirmado no presente trabalho, corando-se de púrpura com Azul de Toluidina e reagindo também com Azul de Astra, Azul de Alcão e PAS. Cabe ressaltar que *P. haematostigma* apresenta maior dilatação na região central do colporo, distinguível através de microscopia eletrônica, e possivelmente desempenhando papel importante durante o processo de germinação do tubo polínico, permitindo uma maior turgescência.

O estrato intermediário é predominantemente protéico, e participa das reações de reconhecimento inter- e intraespecíficos durante a polinização (Knox, 1984), coordenando o sistema de auto-incompatibilidade gametofítico, uma vez que suas proteínas são produzidas pelo andrófita (Knox & Heslop-Harrisson, 1970; Knox, 1984; Heslop-Harrisson & Heslop-Harrisson, 1991).

A presença de um estrato contendo proteínas foi evidenciado em ambas as espécies, e pode estar associado com os mecanismos de reconhecimento do pólen, visto que o gênero apresenta casos de autocompatibilidade e autoincompatibilidade (Acioli, 1999, 2003; Braum, 2008), podendo a última ser tanto esporofítica quanto gametofítica (Rêgo *et al.*, 1999, 2000).

A presença de um estrato celulósico interno foi evidenciada em ambas as espécies após o englobamento da célula generativa e os resultados obtidos para a estratificação da esporoderme são similares aos encontrados por Tormes (2007) em *P. suberosa*, exceto pela presença da camada celulósica. No entanto, a autora considera a sua ausência como não-definitiva, podendo estar associada a problemas técnicos durante a análise.

A ultraestrutura da parede do pólen tem demonstrado características peculiares a cada espécie, sendo possível a ocorrência de variações adicionais. A análise de um número maior de espécies poderia fornecer novos estados de variação do caráter esporoderme para o

gênero e, possivelmente, indícios sobre a evolução da esporoderme neste grupo de plantas.

Morfologia externa do pólen

Erdtman (1952) classifica o pólen para Passifloraceae como possuindo 3 a 12 colporos, fusionados dois a dois na região dos pólos, formando um colpóide. Esse mesmo autor considera as características encontradas semelhantes a famílias como Cucurbitaceae, Turneraceae, e alguns gêneros de Flacourtiaceae, famílias classificadas por Cronquist (1988) para a Ordem Violales.

Presting (1965) analisou o grão de pólen de 153 espécies da família e apresentou um estudo aprofundado sobre a evolução do sistema de aberturas para a família, na qual os diversos tipos polínicos derivaram a partir de um provável pólen tri- ou tetracolporado, de colpo longo e estreito. Este pólen “original”, que ocorre em algumas espécies do gênero *Adenia*, é semelhante a morfologia do pólen de Flacourtiaceae.

O autor chama a região delimitada pelos colpos fusionados de pontopérculos, e a porção equatorial entre os pontopérculo e polar de mesocolpos e apocolpios, respectivamente.

Dessa forma *P. elegans* apresenta pontopérculos circulares, de número variável que podem desprender-se do mesocolpo. O mesocolpo por sua vez é largo e encontra-se fusionado aos apocolpios em ambos os pólos. Enquanto que *P. haematostigma*, não apresenta fusão dos colporos na região polar, de forma que o pontopérculos e mesocolpo encontram-se fusionados nas regiões dos apocolpios (pólos).

Com relação ao tipo de retículo e conformação da exina, Presting (1965) propõem dois tipos básicos. As espécies com retículo do tipo-1 apresentam diâmetro de lume menor que 5 μ m, enquanto que as espécies do tipo-2 apresentam diâmetro de lume maior que 7 μ m, e sempre com báculas visíveis. Dessa forma, levando-se em contas essas características, a

espécie *P. haematostigma* pertenceria ao tipo-1, mais comum em espécies do subgênero *Astrophea*, enquanto que *P. elegans* pertenceria ao tipo-2.

Araújo & Santos (2004) também separam em grupos o pólen de algumas espécies, baseando nos tipos de aberturas e de retículo. Dessa forma, as características polínicas para a espécie *P. elegans* são semelhantes ao tipo-1, onde os grãos de pólen apresentam pontopérculos tri a multirradiados, exina reticulada e heteromórficos. Essa morfologia polínica é semelhante a encontrada em espécies do subgênero *Passiflora*, enquanto que as características para *P. haematostigma* coincidem com as do tipo-2 no qual os grãos de pólen contêm pontopérculos trirradiados e exina do tipo microrreticulada. Cabe ressaltar que a única espécie que as autoras descrevem é *P. ramnifolia*, também do subgênero *Astrophea*.

As características encontradas na exina em *P. elegans* e *P. haematostigma*, quando comparadas com as disponíveis com outras espécies do gênero, evidenciam uma provável variação na estrutura da parede do pólen, inclusive ao nível da intina, perdida durante a acetólise. Essas variações parecem ser importantes pois podem ser utilizadas como caráter taxonômico, como relatado por Larson (1966) e concordam com o proposto por Barrios *et al.*, (2005), onde as variações no tamanho do pólen, tipo de aberturas, estruturas de exina e tipo de retículo apresentadas pelo gênero, podem estar relacionadas com os números cromossômicos básicos e com a poliploidia de algumas espécies, uma vez que podem existir outros números básicos de cromossomos em *Passiflora*, como sugerida por Melo *et al.* (2001).

Quanto à polinização, a presença de uma exina reticulada pode exercer um papel importante na interação do pólen com insetos, permitindo uma maior atração eletrostática entre o corpo do polinizador e a superfície do grão de pólen como sugerido por Corbet *et al.* (1982).

Trabalhos sobre biologia floral para o gênero *Passiflora* relatam a ocorrência de

diferentes polinizadores para o gênero (Varassin *et al.*, 2001). No entanto, insetos do grupo dos Himenópteros são considerados como os seus principais polinizadores (Koschnitzke & Sazima, 1997; Amela Garcia & Hoc, 1998) e a associação entre a forma reticulada do grão e a presença do “*pollenkitt*” poderiam participar da aderência dos grãos de pólen ao corpo do polinizador.

Dinâmica de plastídios e mitocôndrias

A herança extranuclear apresenta características não-mendelianas como as apresentadas pelo núcleo. Plastídios e mitocôndrias foram um dia procariontes de vida livre, e passaram a viver dentro da célula eucariótica transferindo parte de seu material genético ao núcleo, o que resultou na dependência de controles oriundos do genoma nuclear (Huang *et al.*, 2003; Timmis *et al.*, 2004).

A compreensão no modo de transmissão organelar dentro do gênero *Passiflora* é considerado por Muschner *et al.* (2006), característica importante na interpretação de dados sobre o fluxo de genes do citoplasma, visto ser um conteúdo genético adicional ao nuclear.

A célula generativa é precursora na formação dos gametas masculinos em angiospermas e a presença de plastídios, e seu respectivo genoma, é pré-requisito nos casos de transmissão organelar do tipo paterna.

O modo de herança plastidial materno é considerado o mais comum em plantas, e possivelmente o modo paterno e biparental tenham evoluído inúmeras vezes, de forma distinta, em resposta a diversas pressões de seleção (Sears, 1980).

No curso da evolução, as células espermáticas das plantas com sementes perderam a habilidade e a necessidade de produzir um flagelo (Russell, 2003) e a redução dos conteúdos citoplasmáticos parece estar relacionada com adaptações facilitadoras dos movimentos e/ou

translocação durante o crescimento do tubo polínico (Sears, 1980; Whatley, 1982; Mogensen, 1986).

O potencial biparental para transmissão de plastídios para Passifloraceae foi primeiramente demonstrado em níveis citológicos por Corriveau & Coleman (1988), e confirmado posteriormente em níveis moleculares por Muschner *et al.* (2003, 2006) e Hansen *et al.* (2007). Muschner *et al.* (2003, 2006) identificaram dois modos de herança plastidial, um materno e relacionado com o subgênero *Decaloba* e outro paterno relacionado com o subgênero *Passiflora*, enquanto que a herança genética para mitocôndrias manteve-se restritamente materna.

A exclusão de organelas pode ocorrer durante os eventos de divisão celular na formação do pólen e células espermáticas (Mogensen, 1996; Hagemann & Schröder, 1989), ou também pela degradação de seu material genético (Mogensen, 1996). Nos casos em que a exclusão plastidial ocorre em níveis citológicos, Hagemann & Schröder (1989) classificam em quatro tipos principais, relacionados com as fases em que ocorrem:

- ❖ o primeiro ocorre antes da formação do pólen, e a célula generativa não recebe plastídios em seu citoplasma (tipo *Lycopersicum*);

- ❖ o segundo as células generativas contêm plastídios, entretanto eles desaparecem durante a diferenciação da célula generativa, ou das células espermáticas, e não são transmitidos (tipo *Solanum*);

- ❖ o terceiro tipo as células espermáticas contêm plastídios, entretanto eles são eliminados durante a fecundação (tipo *Triticum*);

- ❖ e o quarto tipo ocorre quando os núcleos espermáticos contêm os plastídios, que são transmitidos ao zigoto durante a fecundação, resultando em herança do tipo biparental (tipo *Pelargonium*), sendo possivelmente este o tipo encontrado nas espécies do subgênero

Passiflora, que apresentam evidências genéticas para o modo de transmissão plastidial paterno.

No presente trabalho, foi observado durante a fase de andrósporo vacuolado, uma grande quantidade de organelas próximas ao núcleo. Essas organelas podem participar na formação do citoesqueleto e retenção de plastídios e mitocôndrias durante a separação dos citoplasmas na formação da célula generativa. A presença dessas organelas na célula generativa das espécies analisadas, descarta a exclusão do tipo *Lycopersicum* para o gênero, uma vez que os plastídios e mitocôndrias foram numerosos nas etapas analisadas.

As mitocôndrias permanecem durante as etapas de maturação do pólen, e possivelmente são degradadas em etapas posteriores, uma vez que a herança mitocondrial do gênero é materna (Muschner, 2003, 2006). Nagata *et al.* (1999) relatam que plastídios e mitocôndrias podem apresentar decréscimos em seus conteúdos de DNA após a formação da célula generativa. Os decréscimos são coordenados de maneira independente e estão relacionados com o modo de herança organelar da espécies.

Em *Passiflora*, a presença de organelas no citoplasma na célula generativa foi descrita por Amela Garcia *et al.* (2002) para a espécie *P. caerulea*. Os autores consideram somente a presença de mitocôndrias, e enfatizam a ausência de plastídios no interior do citoplasma generativo. No entanto, ao comparar as organelas encontradas pelos referidos autores, com as do presente trabalho, acreditou-se tratar de plastídios e não de mitocôndrias como descrito, uma vez que as organelas apresentam formatos e tamanhos semelhantes aos encontrados nas organelas presente no pólen maduro em *P. elegans*. Esse fato reforçaria os indícios de herança paterna para plastídios de espécies do subgênero *Passiflora*.

A ocorrência de plastídios na célula generativa das espécies *P. suberosa* e *P. haematostigma* são as primeiras informações ultraestruturais para espécies dos subgêneros

Decaloba e *Astrophea*, respectivamente, e ambas espécies apresentam potencial de herança organelar paterna ou biparental.

No entanto, se considerar a herança plastidial do tipo materna para espécies do subgênero *Decaloba* como proposto por Muschner *et al.* (2003, 2006), o modo de exclusão dos plastídios permanece não resolvido com os dados obtidos no presente trabalho, e a eliminação das organelas deve ocorrer posteriormente à formação do pólen (Sears, 1980; Whatley, 1982; Hagemann & Schröder, 1989; Mogensen, 1996), caracterizado como do tipo *Solanum* de Hagemann & Schröder (1989).

Como exemplo, a exclusão pode ocorrer durante a divisão das células espermáticas, visto que Russell (1984) demonstrou alta polarização nas organelas presentes nos dois citoplasmas espermáticos em *Plumbago zeylanica*, no qual os plastídios ocorrem tipicamente em uma célula espermática, mas não na outra. Nessas plantas, a célula espermática associada ao núcleo vegetativo contém inúmeras mitocôndrias, enquanto que a outra célula espermática contém pouca mitocôndrias e inúmeros plastídios. A dupla fecundação ocorre de forma preferencial, onde a célula espermática com plastídios funde-se com a oosfera, formando o zigoto e embrião, enquanto que a outra célula espermática com mais mitocôndrias funde-se com a célula central e forma o endosperma. Essa característica ocorre em cerca de 95% dos casos observados e é uma forte evidência que as células espermáticas do andrófito estão condicionadas a fundir-se preferencialmente com uma dada célula espermática do ginófito durante a fecundação.

A presença de plastídios na célula generativa da espécie *P. haematostigma* é a primeira informação para o subgênero *Astrophea*, e tendo em vista não existirem indícios a respeito do modo de herança organelar para o grupo, o modo de transmissão paterno ou biparental para plastídios não pode ser excluído para o subgênero.

O modo de herança organelar parece ser semelhante entre famílias relacionadas da ordem Malpighiales (APG II, 2003) visto que a herança plastidial paterna também foi demonstrada para Turneraceae, em níveis moleculares (Shore *et al.*, 1994; Shore & Triassi, 1998, Zhang *et al.*, 2003), e estruturais (Ji *et al.*, 2004). O trabalho de Ji *et al.* (2004) merece destaque, já que plastídios e mitocôndrias ocorrem no citoplasma da célula generativa e também nas células espermáticas. No entanto, através da marcação para DNA, percebe-se que somente os plastídios apresentam material genético e, possivelmente, os decréscimos do genoma mitocondrial estejam relacionados com a própria degradação, como citado por Nagata *et al.* (1999).

A análise ultraestrutural das células espermáticas e da oosfera durante a fecundação seria de grande importância na elucidação do processo, onde plastídios levados pelo tubo polínico podem apresentar diferenças no tamanho e formato, daqueles encontrados no citoplasma da oosfera, como demonstrado por Russell (1980), em *Plumbago zeylanica*.

É possível que Passifloraceae e Turneraceae compartilhem um ancestral com modo de herança organelar em comum, com mecanismos de transferência de genoma extranuclear semelhantes e a análise com outros gêneros de Passifloraceae, bem como com outras famílias relacionadas da mesma ordem, forneceriam informações complementares ao fluxo de organelas citoplasmáticas e ao modo de evolução do grupo.

6 - Considerações finais

Pode-se afirmar, que de uma forma geral que as características embriológicas das espécies estudadas, apresentam relação com as descritas para a família até então. No entanto, algumas observações merecem destaque:

❖ o estigma apresenta emergências estigmáticas, e não papilas como relatado

anteriormente;

❖ o arquespório apresenta variações que antecedem o evento meiótico nos rudimentos seminais;

❖ a deposição da parede de calose ocorre somente durante fase de tétrade de ginósporos;

❖ os estratos parietais do nucelo são parcialmente consumidos durante a diferenciação do ginófito;

❖ o tipo de formação dos estratos parietais da antera apresenta variações entre espécies do gênero e merece análises adicionais;

❖ o sequestro de cálcio na formação de cristais de oxalato de cálcio possivelmente favoreçam o processo de deiscência de anteras grandes como *P. haematostigma*.

❖ as espécies apresentam dois ciclos amilolíticos durante a formação do pólen;

❖ a morfologia e estrutura do pólen são distintas entre as duas espécies analisadas, porém similares entre espécies de um mesmo subgênero;

❖ o grau de modificação das camadas da esporoderme, assim como o “capuz nucelar” parecem ser espécie-específico;

❖ as espécies analisadas apresentaram plastídios e mitocôndrias no citoplasma da célula generativa;

❖ o potencial para herança plastidial do tipo paterna para espécies do subgênero *Passiflora*, foi confirmada com evidências citológicas.

❖ a herança plastidial do tipo materna, e o tipo de exclusão plastidial, para espécies do subgênero *Decaloba*, não foram comprovadas;

❖ o subgênero *Astropheia* apresenta potencial para herança plastidial do tipo paterno ou biparental;

7 - Referências bibliográficas

- Acioli, M. F. 1999. **Estudo Preliminar da Biologia Floral de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae)**. Monografia (Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado). Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil: 23 p.
- Acioli, M. F. 2003. **Ecologia da Polinização de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil: 69 p.
- Amela Garcia, M. T. & Hoc, P. S. 1998. Biologia Floral de *Passiflora foetida* (Passifloraceae). **Revista de Biologia Tropical** 46(2): 191-202.
- Amela Garcia, M. T. A., 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 Garcia, M. T. A., Galati, B. G., & Anton, A. M. 2003. Development and ultrastructure of the megagametophyte in *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 142: 73-81.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399-436.
- Araújo, R. C. M. S. & Santos, F. A. 2004. Palinologia de espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) da Chapada Diamantina. Bahia, Brasil. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas** 4(1-2): 37-42.
- Barreiro, D. P. & Machado, S. R. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K.

- Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Botânica** **30**(3): 387-399.
- Barrios, L. A., Caetano, C. M., Cardoso, C. I., d'Eeckenbrugge, G. C., Arrovage, J. A. & Olaya, C. A. 2005. Caracterización del polen de especies de los géneros *Passiflora* y *Dilkea*. **Acta Agronómica** **54**(3): 1-6.
- Batygina, T. B. 2002. **Embryology of flowering plants, terminology and concepts I: Generative organs of flowers**. Enfield, Science Publishers. 422p.
- 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. **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. p.53-121.
- Bittencourt Jr., N. S. & Mariath, J. E. A. 2002. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development. **Revista Brasileira de Botânica** **25**(1): 103-115.
- Bittencourt, N. S. 2006. Microsporogênese e etapas da ontogenia do gametófito masculino de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Acta Botanica Brasilica** **9**(2): 9-23.
- Blackmore, S., Wortley, A. H., Skvarla, J. J. & Rowley, R. R. 2007. Pollen wall development in flowering plants. **New Phytologist** **174**: 483-498.
- Boesewinkel, F. D. & Bouman, B. F. 1984. The Seed: Structure. In: Johri, B. M. 1984. **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. p.567-610.
- Bouman, F. & Callis, J. I. M. 1977. Integumentary shifting - A third way to unitegmy. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft** **90**: 15-28.
- Bouman, F. 1971. The application of tegumentary studies to taxonomic and phylogenetic

- problems. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft** **84**(3-4): 169-177.
- Bouman, F. 1984. The Ovule. In: Johri, B. M. **Embryology of Angiosperms**. Berlin, Springer-Verlag. p.647-696.
- Bozzola, J. J. & Russel, L. D. 1998. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. Boston, Jones & Bartlett Publishers. 670p.
- Braum, A, F. 2008. **Morfologia, anatomia e imunocitoquímica da interação entre pólen e estigma em duas espécies de *Passiflora* (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 116p.
- Bray, D. F., Wagenaar, E. B. 1978. A double staining technique for improved contrast of thin sections from Spurr-embedded tissue. **Canadian Journal of Botany** **56**: 129-132.
- Carreira L. M. M. 1977. Aspectos da ultra-estrutura do pólen de *Passiflora coccinea* Aubl. (Passifloraceae). **Acta Amazonica** **7**(3): 329-332.
- Cervi, 1997, A. C. 1997. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** **45**: 1-92.
- Cook, M. T. 1909. Notes on the embryo-sac of *Passiflora adenophylla*. **Bulletin Torrey Botanical Club** **36**: 273-275.
- Corbet, S. A., Beament, J., Eisikowitch, D. 1982. Are eletrostatic forces involved in pollen trasnsfer? **Plant Cell and Environment** **5**: 125-129.
- Corriveau, J. L. & Coleman, A. W. 1998. Rapid screening method to detect potentiel biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. **American Journal of Botany** **75**(10): 1443-1458.
- Cronquist, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press. 1262p.
- D'Amato, F. 1984. The Ovule. In: Johri, B. M. 1984. **Embryology of Angiosperms**. Berlin

Heidelberg, Spring-Verlag. p.519-566.

Dathan, A. S. R., Singh, D. 1973. Development and structure in *Tacsonia* Juss and *Passiflora* L. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences B 39**: 172–179.

Dathan, A. S. R. & Singh, D. 1973 Structure and development of ovule and seed in *Flacourtia indica* (Burn. f.) Merrill. **The Proceedings of the Indian Academy of Sciences 39**: 172-179.

Davis, O. L. 1966. **Systematic Embryology of the Angiosperms**. New York. John Wiley & Sons. 528p.

De Toni, K. L. G. & Mariath, J. E. A. 2003. Desenvolvimento do rudimento seminal em *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (Rubiaceae – Rubioideae – Spermaceae). **Revista Brasileira de Botânica 27**(1): 185-192.

Deginani, N. B. 2001. Las espécies argentinas do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana 39**(1-2): 43-129.

Dhawan, K., Dhawan, S. & Sharma, A. 2004. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology 94**: 1-23.

Dickinson, H. G. & Heslp-Harrisson, J. 1968. Common mode of deposition for the sporopollenin of sexine and nexine. **Nature 220**: 926-927.

Dickinson, H. G. & Sheldon, J. M. 1986. The generation of patterning at the plasma membrane of the young microspore of *Lilium*. In: Blackmore, S. & Ferguson, I. K. (eds.). **Pollen and Spores: Form and Function**. London, Academic Press. p. 1-17.

Dickinson, H. G. 1970. Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. **Cytobiologie 1**: 79-109.

Dickinson, H. G. 1987. The physiology and biochemistry of meiosis in the anther. **Intenational Review of Cytology 107**: 79-109.

- Doyle, J. 1953. Gynospore or megaspore. A Restatement. **Annals of Botany** **17**: 465-476.
- Erdtman, G. 1952. **Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms**. Waltham, The Chronica Botanica Co. 539p.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. **Svensk Botanisk Tidskrift** **54**: 561-564.
- Feder, N. & O'Brien, T. P. (1968). Plant Microtechnique, Some Principles and New Methods. **American Journal of Botany** **55**: 123-142.
- Feuillet, C. & MacDougal, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** **13**(2): 34-38.
- Feuillet, C. & MacDougal, J. M. 2007. Passifloraceae. In: Kubitzki, K. (ed.). **The families and genera of vascular plants**. v. IX. Berlin. Springer. p. 270-281.
- Fitzgerald, M. A., Barnes, S. H., Blackmore, S., Calder, D. M. & Knox, R. B. 1994. Exine formation in the pollinium of *Dendrobium*. **Protoplasma** **179**: 121-130.
- Franceschi, V. R. & Horner, H. T. Jr. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. **The Botanical Review** **46**: 361-427.
- Fu, Y., Yuan, M., Huang, B., Yang, H., Zee, S & O'Brien, T. P. 2000. Changes in actin organization in the living egg apparatus of *Torenia fournieri* during fertilization. **Sexual Plant Reproduction** **12**: 315-322.
- Furness, C. A., Rudall, P. J. & Sampson, F. B. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. **International Journal of Plant Science** **163**(2): 235-260.
- Gabarayeva, N. & El-Ghazaly, G. 1997. Sporoderm development in *Nymphaea mexicana* (Nymphaeaceae). **Plant Systematics and Evolution** **204**: 1-19.
- Gabarayeva, N. & Hemsley, A. L. 2006. Merging concepts: The role of self-assembly in the development of pollen wall structure. **Review of Paleobotany & Palynology** **138**: 121-139.

- Gasser, C. S., J., Broadhest, & Hauser, B. A. 1998. Genetic analysis of ovule development. **Annual Review in Plant Molecular Biology** **49**: 1–24.
- Gerrits, P. O. & Smid, L. 1983. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** **132**: 81-85.
- González, A. M. 1998. Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **128**: 215–228.
- Hageman, R. & Schröder, R. B. 1989. The cytological basis of the plastids inheritance in Angiosperms. **Protoplasma** **152**: 57-64.
- Hanaichi, T., Sato, T., Iwamoto, T., Malavasiyamashiro, J., Hoshiro, M. & Mizuno, N. 1986. A stable lead by modification of Sato method. **Journal of Electron Microscopy** **35**(3): 304-306.
- Hansen, A. K., Escobar, L. K. Gilbert, L. E. & Jansen, R. K. 2007. Paternal, maternal. and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): Implications for phylogenetic studies. **American Journal of Botany** **94**(1): 42-46.
- 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.
- Heslop-Harrison J, & Heslop-Harrison Y. 1969. *Cannabis sativa* L. In: Evans LT. The Induction of Flowering . Macmillan. p. 205-226.
- Heslop-Harrison, J. & Dickinson, H. G. 1969. Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*. **Planta** **84**: 199-214.
- 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, J. 1968. Pollen-wall development. **Science** **161**: 230-237.

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, Y. & Shivanna, K. R. 1977. The receptive surface of Angiosperm stigma. **Annals of Botany** **41**: 1233-1258.

Hesse, M. 1981. The fine structure of exine in relation to the stickiness of angiosperm pollen. **Review of Paleobotany and Palynology** **35**: 81-92

Higashiyama, T., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. 2003. Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. **Current Opinion in Plant Biology** **6**: 36-41

Horner, H.T. Jr. & Wagner, B. L. 1980. The association of druse crystals with the developing stomium of *Capsicum annuum* [sweet pepper] (Solanaceae) anthers. **American Journal of Botany** **67**(9): 1347-1360

Huang, B. & Sheridan, W. F. 1998. Actin coronas normal and indeterminate gametophyte embryo sacs of maize. **Sexual Plant Reproduction** **11**: 257-264.

Huang, B. Q. & Russell, S. D. 1992. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. **Sexual Plant Reproduction** **5**: 151-155.

Huang, B. Q. & Russell, S. D. 1994. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. **Planta** **194**: 200-214.

Huang, C. Y., Ayliffe, M. A., Timmis, J. N. 2003. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. **Nature** **442**: 72-76.

Huysmans, S., El-Ghazaly, & Smets, S. 1998. Orbicules in Angiosperms: Morphology, function, distribution, and relation with tapetum types. **The Botanical Review** **64**(3): 240-272.

- IBGE 2003. **Produção Agrícola Municipal e Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. São Paulo.
- Ji, X., Zhang, Q., Liu, Y. & Sodmergen. 2004. Presence of plastid and absence of mitochondrial DNA in male reproductive cells as evidence for cytoplasmic inheritance in *Turnera* and *Zantedeschia aethiopica*. **Protoplasma** **224**: 211-216.
- Johri, B. M., Ambegaokar, K. B., Srivastava, P. S. 1992. **Comparative Embryology of Angiosperms**. v1. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 614p.
- Kang, J., Zhang, G., Bonnema, G., Fang, Z. & Wang, X. 2008. Global analysis of gene expression in flower buds of *Ms-cdl Brassica oleracea* conferring male sterility by using an *Arabidopsis* microarray. **Plant Molecular Biology** **66**(1-2): 177-192.
- 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.
- Keijzer, C. J., Leferenik-Ten Klooster, H. B. & Reinders, M. C. 1996. The Mechanics of the Grass Flower: Anther Dehiscence and Pollen Shedding in Maize. **Annals of Botany** **78**: 15-21.
- Killip, E. P. 1938. **The american species of Passifloraceae**. Chicago, Field Museum Natural History Botanical Series 19. 613p.
- Klein, D. E, Gomes, V. M., Silva-Neto, S. J. & Cunha, M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). **Annals of Botany** **94**(5): 733-740.
- Kloos A. & Bouman, F. 1980. Case studies in aril development *Passiflora suberosa* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft** **55**: 49-66.
- Knox, R. B. 1984. The Pollen Grain. In: Johri, B. M. 1984. **Embryology of Angiosperms**. Berlin, Spring-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.
- Koehler-Santos, P., Lorenze-Lemke, A. P., Muschner, V. C., Bonatto, S. L., Salzano, F. M., Freitas, L. B. 2006b. Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society** **88**: 611-630.
- Koehler-Santos, P., Lorenze-Lemke, A. P., Salzano, F. M., Freitas, L. B. 2006a. Ecological-evolutionary relationships in *Passiflora alata* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** **66**: 809-816.
- Koschnitzke, C. & Sazima, M. 1997. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica** **20**(2): 119-126.
- Krosnick, S. E. & Freudenstein, J. V. 2005. Monophyly and floral character homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection Disemma). **Systematic Botany** **30**(1): 139-152.
- Larson, D. A. 1966. On the significance of the detailed structure of *Passiflora caerulea* exines. **The Botanical Gazette** **127**: 40-48.
- Lillie, R. D. 1965. **Histopathologic Technic and Practical Histochemistry**. New York, McGraw-Hill. 751p.
- MacDougal, J. & Feuillet, C. 2004. Systematics. In: Ulmer, T. & MacDougal, J. M. ***Passiflora: Passionflowers of the World***. Portland, Timber Press. 430p.
- Maheshwari, P. 1950. **An introduction to the embryology of Angiosperms**. New York, McGraw-Hill. 453p.
- Mariath, J. E. A. & Cocucci, A. E. 1997. The ovules of *Relbunium hypocarpium* in the context of the Rubiaceae. **Kurtziana** **25**: 141-150.
- Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence.

Stain Technology **34**: 125-128.

Mascarenhas, J. P. 1975. The Biochemistry of Angiosperm Pollen Development. **Botanical Review** **41**(3): 259-314.

Melo, N. F., Cervi, A. C. & M. Guerra. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution** **226**(1-2): 69-84.

Mogensen, H. L. 1996. The Hows and Whys of Cytoplasmic Inheritance in Seed Plants. **American Journal of Botany** **83**: 383-404.

Mondin, C. A. 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. **Pesquisas-Botânica** **51**: 147-150.

Muschner, V. C., Lorenz-Lemke, A. P., Vecchia, A. M., Bonatto, S. L., Salzano, F. M. & Freitas, L. B. 2006. Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. **Genetica** **128**: 449-453.

Muschner, V. C., Lorenz, A. P., Cervi, A. C., Bonatto, S. L., Souza-Chies, T. T., Salzano, F. M. & Freitas, L. B. 2003. A First Molecular Phylogenetic Analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** **90**(8): 1229-1238.

Nagata, N., Saito, C., Sakai, A., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. 1999. The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. **Planta** **209**: 53-65.

Nepi, M. & Franchi, G. G. 2000. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. **Plant Systematics and Evolution** **222**(1-4): 45-62.

O'Brien, T. P. & McCully, M. E. 1981. **The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods**. Melbourne, Termacarphi Pty Ltd. 345p.

Pacini, E. & Franchi, G. G. 1991. Diversification and evolution of the tapetum. In: Blackmore, S. & Barnes, S.H. (eds.) **Pollen and Spores: Patterns of Diversification**.

- Oxford, Clarendon Press. p. 301-316.
- Pacini, E. & Hesse, M. 2007. Pollenkitt - its composition, forms and functions. **Flora** **200**: 399-415.
- Pacini, E. 1990. Tapetum and microspore function. In: Blackmore, S. & Knox, R. B. (eds.) **Microspores: evolution and ontogeny**. London, Academic Press. p.213-237.
- Pacini, E. 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentatio on **Plant Systematics and Evolution** **222**: 12-43,
- Pacini, E., Franchi, G. G. & Hesse, M. 1985. The tapetum: Its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. **Plant Systematics and Evolution** **149**(3-4): 155-185.
- Pacini, E., Franchi, G. G. & Ripaccioli, M. 1999. Ripe structure and histochemistry of some gymnosperms. **Plant Systematics and Evolution** **217**: 81-99.
- Padhye, M. D., & Deshpande, B. G. 1960. The male and female gametophytes of *Passiflora foetida* L. **Proceedings of the Indian Academy of Science B** **52**: 124–130.
- Paiva, E. A. S. & Machado, S. R. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. **Brazilian Journal of Biology** **66**(1B): 301-308.
- Pérez, J. O. 2007. **Study of the diversity of genus *Passiflora* L. (Passifloraceae) and its distribution in Colombia**. Tese de Doutorado. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. Montpellier, France. 295p.
- Pérez, J. O., d'Eeckenbrugge, G. C., Restrepo, M, Jarvis, A., Salazar, M. & Caetano, C. 2007. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. **Biota Colombiana** **8**(1): 1-45.
- Piffanelli, P. & Murphy, D. J. 1998. Novel organelles and targeting mechanisms in the anther tapetum. **Trends in Plant Sciences** **3**(7): 250-253.

- Pózner, R. 2001. Approach to the early sporangial development in angiosperms considering meiosis control and cellular differentiation. **Plant Systematic and Evolution** **230**: 25-42.
- Presting D. 1965. Zur morphologie der Pollenkörner der Passifloraceen. **Pollen et Spores** **7**: 193–245.
- Punt, W., Hoen, P. P., Blackmore, S., Nilsson, S., Le Thomas, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Paleobotany and Palynology** **143**(1-2): 1-81.
- Punwani, J. A. & Drews, G. N. 2008. Development and function of the synergid cell. **Sexual Plant Reproduction** **21**: 7-15.
- Puri, V., 1947. Studies in floral anatomy VI. Vascular anatomy of the flower of certain species of the Passifloraceae. **American Journal of Botany** **34**: 562-573.
- Raju, M. V. S. 1952. Embryology of the Passifloraceae. **Current Science** **10**: 288-289.
- 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.
- Rêgo, M. M. R. , Bruckner, C. H., Silva, E. A. M., Finger, F. L., Siqueira D. L. & Fernandes, A. A. 1999. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. **Theoretical and Applied Genetics** **98**(3-4): 564-568.
- Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Bruckner, C. H., Da Silva, E. A. M., Finger F. L. & Pereira, K. J. C. 2000. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. **Theoretical and Applied Genetics** **101**(5-6): 685-689.
- Ressayre, A., Dreyer, L., Triki-Teurtroy. S., Forchioni, A. & Nadot, S. 2005. Post-ost-meiotic cytokinesis and pollen aperture pattern ontogeny: comparison of development in four species differing in aperture pattern. **American Journal of Botany** **92**(4): 576-583.

- Rodiewicz, B. 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. **Planta** **93**: 39-47.
- Rodríguez-García, M. I., M'rani-Alaoiu, M & Fernández, M. C. 2003. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma** **221**: 237-244.
- Rodríguez-Riaño, T., Valtueña, F. J. & Ortega-Olivencia, A. 2006. Megasporogenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae). **Annals of Botany** **98**(4): 777-791.
- Roland, J. C. e 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.
- Rouston, T. H. & Cane, J. H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. **Plant Systematic and Evolution** **222**: 187-209.
- Rowley, J. R. & Dahl, A. O. 1977. Pollen development in *Artemisia vulgaris* with special reference to glycocalyx material. **Pollen et Spores** **19**: 169-284.
- Russell, S. D. 1980. Participation of male cytoplasm during gamete fusion in an angiosperm, *Plumbago zeylanica*. **Science** **210**(4466): 200-201.
- Russell, S. D. 1984. Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*. II: Quantitative cytology and three-dimensional organization. **Planta** **162**: 385-391.
- Russell, S. D. 2003. Plant sexuality, cell expression and preferential fertilization. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** **38** (3-4): 349-356.
- Sacco, J. C. 1962. Passifloraceae. In: Flora ilustrada do Rio Grande do Sul. **Boletín do Instituto de Ciências Naturais** **12**: 7-29.
- Sacco, J. C. 1980. Passifloraceae. In: Reitz, R. (ed.) **Flora ilustrada Catarinense**. Itajaí,

Herbário Barbosa Rodrigues. 130 p.

Santos, R. P. & Mariath, J. E. A. 1999. Storage substances in the androgametogenesis and nature pollen grain of *Ilex paraguariensis* St.Hil. (Aquifoliaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **22**(2): 125-131.

Santos, R. P. 2000. **Ontogenia da esporoderme em *Ilex paraguariensis* A. ST. Hil. (Aquifoliaceae)**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 160p.

Sass, J. E. 1951. **Botanical microtechnique**. 2^a ed. Ames. Iowa. The Iowa State College Press. 391p.

Schnarf, K. 1931. **Vergleichende Embryologie der Angiospermen**. Berlin, Borntraeger. 354p.

Scott, R. J. 1994. Pollen exine: the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: Scott, R. J. & Stead, A. D. (eds). **Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction**. Cambridge, Cambridge University Press. p.49-81.

Scott, R. J., Spielman, & Dickinson, H. G. 2004. Stamen, structure and function. **The Plant Cell** **16**: 46-60.

Sears, B. B. 1980. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom. **Plasmid** **4**: 233–255.

Sheldon, J. M. & Dickinson, H. G. 1983. Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi*. **Journal of Cell Science** **63**: 191-208.

Shivanna, K. R. 2003. **Pollen biology and biotechnology**. Enfield, NH Science Publishers. 301p.

Shore, J. S., McQueen, K. L., Little, S. H. 1994. Inheritance of plastid DNA in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). **American Journal of Botany** **81**: 1636–1639.

- Shore, J. S., Triassi, M. 1998. Paternally biased cpDNA inheritance in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **American Journal of Botany** **85**: 328–332.
- Silvério, A., Tormes, S. B., Mariath, J. E. A. 2009. Gynosporogenesis and gynogametogenesis of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Botânica** **7**(1): 15-22.
- Singh, D. 1962. The structure and development of ovule and seed of *Passiflora foetida*. **Agra University Journal of Research** **11**: 99–111.
- Skvarla, J. J. & Larson, D. A. 1966. Fine structure studies of *Zea mays* pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny. **American Journal of Botany** **53**(10): 1112-1125.
- Southworth, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** **21**(1): 73-80.
- Souza-Chies, T. T., Yockteng, R., Nadot, S. 2005. Systématique moléculaire comparée en France et au Brésil du genre *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Cahiers d'études et de recherches francophones/ Agricultures** **14**(2): 209-215.
- 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** **25**: 471-475.
- Souza, M. M. & Pereira, T. N. S. P. 2000. Development of pollen grain in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** **23**(2): 469-473.
- Souza, M. M., Pereira, T. M. S., Hoffmann, M., Melo, E. J. T. & Louro, R. P. 2002. Embryo sac development in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** **23**: 469-473.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Dias, A. J. B., Ribeiro B. F. & Viana, A. P. 2006. Structural, histochemical and cytochemical characteristics of the stigma and style in *Passiflora*

- edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). **Brazilian Archives and Biotechnology** **49**(1): 93-98.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Dias, A. J. B., Ribeiro, B. F. & Viana, A. P. 2006. Structural, histochemical and cytochemical characteristics of the stigma and style in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** **49**: 93-98.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research** **26**: 31-34.
- Tanaka, I. 1993. Development of male gametes in flowering plants. **Journal of Plant Research** **106**: 55-63.
- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. **Annals of Botany** **68**: 287-305.
- Tilton, V. R., Wilcox, L. W. & Palmer, R. G. 1984. Postfertilization wall formation and function in the central cell of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae). **The Botanical Gazette** **145**: 334-339.
- Timmis, J. M., Ayliffe, M., Huang, C. Y., Martin, W. 2004. Endosymbiotic gene transfer organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. **Nature Review Genetics** **5**: 123-135.
- Tormes, S. B. F. A. 2007. **Esporogênese e Gametogênese de *P. suberosa* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 46p.
- Ulmer, T., MacDougal, J. M. 2004. ***Passiflora*. Passionflowers of the world.** Portland, Timber Press. 430p.
- Varassin, I. G., Trigo, J. R. & Sazima, M. 2001. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in

- south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **136**: 139-152.
- Wang, A., XIA, Q., Xie, W., Datla, R. & Selvaraj, G. 2003. The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **100**(24): 14487-14492.
- Warming, E. 1878. De l'ovule. **Ann. Sci. Nat. Bot.** **5**: 177-266.
- Weber, M. 1992. The formation of pollenkit in *Apium nodiflorum* (Apiaceae). **Annals of Botany** **70**: 573-577.
- Weterings K, & Russell, S. D. 2004. Experimental analysis of the fertilization process. **Plant Cell** **16**: S107–S118
- Whatley, J. M. 1982. Ultrastructure of plastid inheritance: Green algae to angiosperms. **Biological Reviews** **57**(4): 527-569.
- Willemse, M. T. M. & Van Went, J. L. 1984. The female gametophyte. *In* **Embryology of Angiosperms** (B.M. Johri, ed.). Berlin, Springer-Verlag. p.159-196.
- Zhang, Q., Yang, L. & Sodmergen. 2003. Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 Angiosperm species. **Plant and Cell Physiology** **44**(9): 941-951.