



Juliana Foresti Milani

**Ontogenia de frutos e sementes de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae –
Subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. Seção *Xerogona* (Raf.) Killip)**

Campinas
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA FORESTI MILANI

**“Ontogenia de frutos e sementes de espécies de *Passiflora*
(Passifloraceae – Subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. Seção *Xerogona*
(Raf.) Killip)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata
Juliana Foresti Milani

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Milani, Juliana Foresti, 1984-
M589o Ontogenia de frutos e sementes de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae - subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. seção *Xerogona* (Raf.) Killip) / Juliana Foresti Milani. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sandra Maria Carmello Guerreiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Malpighiales. 2. Passifloraceae. 3. Ontogenia. 4. Frutas – Desenvolvimento. 5. Sementes – Desenvolvimento. 6. Deiscência (Botânica). I. Carmello-Guerreiro, Sandra Maria, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ontogeny of fruits and seeds of *Passiflora* species (Passifloraceae - subgenus *Decaloba* (DC.) Rchb. section *Xerogona* (Raf.) Killip)

Palavras-chave em inglês:

Malpighiales

Passifloraceae

Ontogeny

Fruit - Development

Seeds - Development

Dehiscence (Botany)

Área de concentração: Biologia Vegetal

Títuloção: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Sandra Maria Carmello Guerreiro [Orientador]

Michael Alvim Milward de Azevedo

Letícia Silva Souto

Simone de Pádua Teixeira

Juliana Lischka Sampaio Mayer

Data de defesa: 27-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 27 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Michaela Alvim Milward de Azevedo



Assinatura

Profa. Dra. Letícia Silva Souto



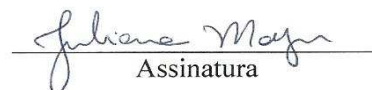
Assinatura

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Profa. Dra. Priscila Andressa Cortez

Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Stechhahn Lacchia

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

Assinatura

RESUMO

A morfologia externa e interna dos frutos e sementes de Passifloraceae Juss. ex Roussel é pouco conhecida ou até desconhecida para muitas espécies. Estudos morfoanatômicos de frutos e sementes têm grande importância já que os mesmos exibem pequena plasticidade fenotípica. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo elucidar a ontogenia do fruto e da semente de quatro espécies de *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. superseção *Decaloba* (DC.) J.M. Macdougall & Feuilleterie seção *Xerogona* (Raf.) Killip que apresentam frutos do tipo cápsula, condição incomum na família. Para tanto, o material vegetal foi coletado e processado segundo técnicas convencionais em microscopia de luz e eletrônica, além da aplicação de técnica específica (TUNEL) para detecção de morte celular programada no estágio de deiscência do fruto. Foram estabelecidos estádios de desenvolvimento para os frutos e as sementes: Estádio I: Ovário e óvulo; Estádio II - fruto e semente em início de desenvolvimento: frequentes divisões celulares; Estádio III - fruto e semente jovens: alongamento celular; Estádio IV - fruto e semente maduros: diferenciação celular e deiscência do fruto. Nos estádios II a IV do fruto, o epicarpo e o endocarpo são uniestratificados e as maiores modificações decorrentes do desenvolvimento do fruto ocorrem no mesocarpo. Ao longo do desenvolvimento aumentam os espaços intercelulares a partir do endocarpo em direção ao epicarpo. Não há a formação de uma linha de deiscência. Os espaços intercelulares ocorrem devido à morte celular programada formando lacunas que acabam por romper o pericarpo. Os testes histoquímicos indicaram a presença de idioblastos contendo compostos fenólicos e proteínas no tecido fundamental do ovário e no mesocarpo.

As sementes das espécies estudadas são bitegumentadas. A testa é constituída de duas camadas: exotesta e endotesta. O tégmen é composto por três camadas: exotégmen, mesotégmen e endotégmen. No início do desenvolvimento da semente observou-se o arilo de origem funicular, formado por células parenquimáticas e idioblastos contendo compostos fenólicos e amido. O desenvolvimento dos tegumentos da semente se dá pelo alongamento diferencial das células do exotégmen e da endotesta. Esse processo resulta na ruminação do endosperma. Na semente madura o tegumento externo formará a sarcotesta. Neste estágio, o exotégmen constitui a camada mecânica formada por macroesclereídes em paliçada, representando a esclerotesta. As informações encontradas no presente estudo revelam que as características morfoanatômicas de fruto e semente são bastante conservadas e unificadoras na seção. Diante do exposto, destaca-se a importância de novos estudos abrangendo mais espécies e abordando a evolução de caracteres e a inclusão de outros novos para facilitar a elucidação das relações infragenéricas de *Passiflora* que tem sido ampliada graças à cooperação de estudos morfoanatômicos e genéticos.

Palavras-chave: Malpighiales, Passifloraceae *sensu stricto*, desenvolvimento, cápsula carnosa deiscente, semente ruminada.

ABSTRACT

External and internal morphology of Passifloraceae Juss. ex Roussel fruits and seeds is little known or even unknown for many species. Morphological and anatomical studies of fruits and seeds have great importance since they exhibit little phenotypic plasticity. In this context, this study aimed to elucidate the fruit and seed ontogeny of four species of *Passiflora* L. *Decaloba* (DC.) Rchb. subgenus *Decaloba* (DC.) J.M. Macdougall & Feulliet supersection *Xerogona* (Raf.) Killip section that present capsule type of fruit, unusual condition in the family. For this, the plant material were collected and processed according to conventional techniques for light and electron microscopy; specific technique (TUNEL) were also applied to detect programmed cell death in the stage of fruit dehiscence. Four developmental stages were established: Stage I: Ovary and ovule; Stage II - fruit and seed in early development: frequent cell divisions; Stage III - young fruit and young seed: cell elongation; Stage IV - mature fruit and mature seed: cell differentiation and fruit dehiscence. In the stages II to IV of the fruit, epicarp and endocarp are unistratified and major changes from the development of the fruit occurs on mesocarp. During the development, the intercellular spaces increase from the endocarp towards the epicarp. There is no line of dehiscence. The intercellular spaces occur due to programmed cell death forming gaps that breaks the pericarp. Histochemical test indicated the presence of phenolic compounds and idioblasts containing proteins in fundamental tissue of ovary and mesocarp. The seeds of all species were bitegmic. The testa consists of two layers: exotesta and endotesta. The tegmen is composed of three layers: exotegmen, mesotegmen and endotegmen. At the beginning of seed development, aryl of

funicular origin, formed by parenchyma cells that may containing phenolic compounds and starch, was observed. The development of the integument of the seed occurs by differential cell elongation of exotegmen and endostesta. This process results in a ruminated endosperm. In the mature seed, the outer integument forms the sarcotesta. At this stage, the exotegmen is the mechanical layer formed by macrosclereids in palisade, representing esclerotesta. Information found in this study reveals that morphoanatomical characteristics of fruit and seed are quite conserved and unified in the section. Given that, we highlight the importance of further studies including more species and addressing the evolution of characters and adding new ones to facilitate the elucidation of infrageneric relationships in *Passiflora* which has been expanded due to the cooperation of morpho-anatomical and genetic studies.

Keywords: Malpighiales, Passifloraceae *sensu stricto*, development, dehiscent fleshy capsule, ruminated seed.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – Histórico	1
1.2 – Taxonomia de Passifloraceae	2
1.3 – Gênero Passiflora	8
1.4 – Subgênero Decaloba	9
1.5 – Seção Xerogona	11
1.6 – Espécies estudadas	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO GERAL	15
4. FORMATO DA TESE	16
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
Capítulo 1: Anatomia de frutos do tipo cápsula em espécies do gênero <i>Passiflora</i>, seção <i>Xerogona</i> com ênfase no mecanismo de abertura desses frutos	27
RESUMO	27
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Material Vegetal	29
Microscopia de luz	31
Testes histoquímicos	31
Teste imunocitoquímico (TUNEL)	31

RESULTADOS	32
Morfologia do ovário	32
Morfologia do fruto	33
Anatomia do ovário	34
Ontogenia do fruto tipo cápsula	39
Anatomia do fruto maduro	40
DISCUSSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
 Capítulo 2: Morfo-anatomia da semente e ontogenia dos tegumentos em espécies do gênero <i>Passiflora</i>, seção <i>Xerogona</i> (Passifloraceae)	61
RESUMO	61
ABSTRACT	61
INTRODUÇÃO	62
MATERIAL E MÉTODOS	63
Material vegetal	63
Estudo anatômico	64
Testes histoquímicos	64
Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	65
RESULTADOS	65
Morfologia da semente	65
Anatomia do óvulo	68
Ontogenia dos tegumentos	68
Histoquímica	75
DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

DEDICATÓRIA

À minha família que sempre me apoiou
nas minhas escolhas, principalmente
ao meu avô Dorth e ao meu tio João!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado nos momentos de dificuldade e por ter iluminado meus passos e meu caminho nessa jornada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas (Processo nº 2010/01779-3 e 2011/18234-2).

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, especialmente ao Laboratório de Anatomia por toda infraestrutura e suporte para a realização do meu doutorado.

À Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro pela orientação nesse trabalho e pela oportunidade de trabalharmos juntas.

À Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues (Departamento de Botânica - UNESP Botucatu) pela prontidão em me auxiliar sempre que precisei.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal da UNICAMP pela convivência, ensinamentos e prestatividade durante todos esses anos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, ao Laboratório de Insetos do Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu) e ao Laboratório de Botânica da USP (Ribeirão Preto) por permitir o acesso às suas instalações.

À profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Gloria, profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues e Dra. Cristiana Noronha Bignami pela participação no meu exame de qualificação o que possibilitou o aperfeiçoamento da minha tese.

À profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira, profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues e profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer por participarem da minha pré banca e fazer uma avaliação prévia do trabalho. Obrigada pelas ótimas sugestões nessa reta final.

À profa. Dra. Michaelle Alvim Milward de Azevedo, profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira, profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer e profa. Dra. Letícia Silva Souto por participarem como membros da banca contribuindo com análises e discussão do trabalho. Aos suplentes, agradeço pela leitura da tese.

Aos técnicos Sebastião Henrique Militão Jr. (Laboratório de Anatomia – UNICAMP) e Adriane Cristina Sarti Sprogis (Laboratório de Microscopia - UNICAMP), à Ana Silvia Garcia e Elton Luiz Scudeler (Laboratório de Insetos – UNESP Botucatu) pela assistência técnica na preparação e processamento do material.

À secretária Maria Roseli de Melo pela dedicação e paciência para esclarecer todas minhas dúvidas.

Aos meus colegas do departamento pelo companherismo nos corredores e nas disciplinas cursadas. Em especial aos meus amigos do Laboratório de Anatomia: Bárbara, Carolina, Cristina, Diego, Edimar, Elisabeth, Emília, Marcelo e Rafael. Obrigada por toda ajuda, conversas e convivência diária. Ao Gu e Marcelinho, agradeço pelo auxílio com as informações do Herbário. Ao Edi agradeço toda ajuda com a confecção das exsiccatas.

À Bárbara e Marcelo por me hospederem em seu apartamento todas as vezes que precisei voltar para Campinas. Vocês são ótimos anfitriões.

Aos amigos do laboratório de Botânica da USP de Ribeirão Preto do qual eu nunca vou deixar de fazer parte. Agradeço Ana Paula, Camila, Cristina, Edimárcio, Giseli, João

Paulo, Liana, Marina, Thais e Viviane por estarem sempre de braços abertos para me receber. À Giseli e Camila pelo apoio, companhia e aventuras nas idas até Botucatu.

À minha querida companheira Tatiane Braz que dividiu comigo todas as emoções alegres e tristes deste doutorado. Agradeço por você ter feito parte da nossa humilde residência. Todas nossas histórias ficarão para sempre guardadas no meu coração.

À Ana Paula, Gabriela, Jacira, Joanna, Karina, Nívea e Patrícia pelos dois anos de convivência na nossa república e por me acolherem quando cheguei em Campinas.

Aos amigos de Ribeirão (Ana Paula Araki, Bruna Cury, Patricia Silva, Fabrícia Santello, Marcela Marques e Vanessa Borges) e de São Paulo (Gi Mancini e Renata Flores) que souberam compreender minha ausência e foram meu alicerce para que eu conseguisse continuar forte nesse último ano que foi tão difícil para mim.

E por fim, mas não menos importante, à minha família que esteve ao meu lado durante toda essa caminhada.

Ao meu avô Dorth (*in memorian*) e ao meu tio João (*in memorian*) que foram os meus maiores incentivadores. Sei que vocês estão olhando por mim, mas sentirei falta do abraço de vocês quando eu concluir essa etapa.

Aos meus avós Camillo, Zilda e Rosa por serem um exemplo de generosidade e sabedoria e por saber que estou na oração de vocês.

Aos meus tios e tias, especialmente Valéria, Regina e Rosângela que sempre me apoiaram em todas as decisões importantes da minha vida. Aos meus primos e primas que torcem pelo meu sucesso.

E finalmente, aos meus pais Silvio e Rachel e ao meu irmão Matheus que são a base da minha vida. Agradeço pelo carinho, paciência, cumplicidade, respeito e principalmente pelo amor e confiança que vocês depositaram em mim. Amo vocês!

Todos aqui citados foram fundamentais para a realização desse sonho! Agradeço de coração a cada um de vocês que fez parte dessa conquista. Muito obrigada!

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Histórico

Embora espécies do gênero *Passiflora* L. e da família Passifloraceae Juss. ex Roussel já tivessem registro na África e na Ásia, apenas com a descoberta da América a ciência veio a tomar contato com o grupo (Kugler & King 2004). Os primeiros relatos de espécies de maracujá foram registrados no século XVI e XVII por ocasião da expansão Européia no Novo Mundo. Inicialmente, o maracujá, cujo significado do nome indígena é alimento em forma de cuia, era conhecido como *granadillas*, pelo fato de seu fruto ser semelhante a *Punica granatum* L. (romã). Mais tarde recebeu o nome de passionária ou flor da paixão (*flor de la pasion*), pela semelhança da flor com os instrumentos da paixão de Cristo e originando, dessa forma, o nome da família e do gênero (Sousa 1971; Ruggiero 1987; Cervi 1997).

O nome *Passiflora* foi utilizado pela primeira vez por Cesi em 1651 (Kugler & King 2004), mas a efetiva publicação do nome é creditada a Linnaeus (1753) quando foram definidas as regras básicas dos sistemas de classificação, sendo publicadas 24 espécies para o gênero, entre as quais sete ocorrentes no Brasil.

Roemer (1846) foi um botânico cuja obra é pouco conhecida, entretanto, que trabalhou intensamente com Passifloraceae e elevou o número de espécies descritas para 225. O britânico Masters (1872), através da Flora Brasiliensis, foi responsável pelo avanço inicial para a taxonomia dessa família tendo publicado 82 espécies brasileiras.

Outra grande contribuição à taxonomia dessa família é devida a Harms (1894, 1925) que dividiu o gênero *Passiflora* em seções, subseções e/ou séries. Porém, a maior

contribuição para a taxonomia na América ainda é devida a Killip (1938) que, além de descrever várias espécies, estudou todas as conhecidas até a ocasião e propôs um sistema de classificação largamente utilizado.

1.2 – Taxonomia de Passifloraceae

A família Passifloraceae foi durante muito tempo, considerada como integrante da ordem Parietales, próxima às famílias Malesherbiaceae, Turneraceae e Flacourtiaceae (Wettstein 1935). Mais adiante, baseando-se em evidências morfológicas e tendo a placentação parietal como caráter delimitante, Cronquist (1981) considerou a família como membro da ordem Violales, próxima a Flacourtiaceae, Violaceae, Scyphostegiaceae, Turneraceae, Achriaceae e Malesherbiaceae. Atualmente, com a incorporação de dados moleculares nas análises filogenéticas, Passifloraceae passou a integrar a ordem Malpighiales (APGIII 2009) que contém aproximadamente 16.000 espécies distribuídas em 42 famílias (Wurdack & Davis 2009) e apresentam notável diversidade morfológica e ecológica (Xi *et al.* 2012).

Passifloraceae *sensu lato* contém atualmente três famílias: Passifloraceae *sensu stricto*, Turneraceae e Malesherbiaceae (APG III 2009). Essas famílias eram tradicionalmente tratadas como separadas, mas intimamente relacionadas - Fig. 1 - (Cronquist 1981; Takhtajan 1997). Hoje em dia, as relações entre os táxons infra-familiares estão bem definidas e estudos moleculares recentes, suportam Passifloraceae *s.l.* como um grupo claramente monofilético (Muschner *et al.* 2003; Soltis *et al.* 2007) bem como as três famílias incluídas nesse grupo (Tokuoka 2012).

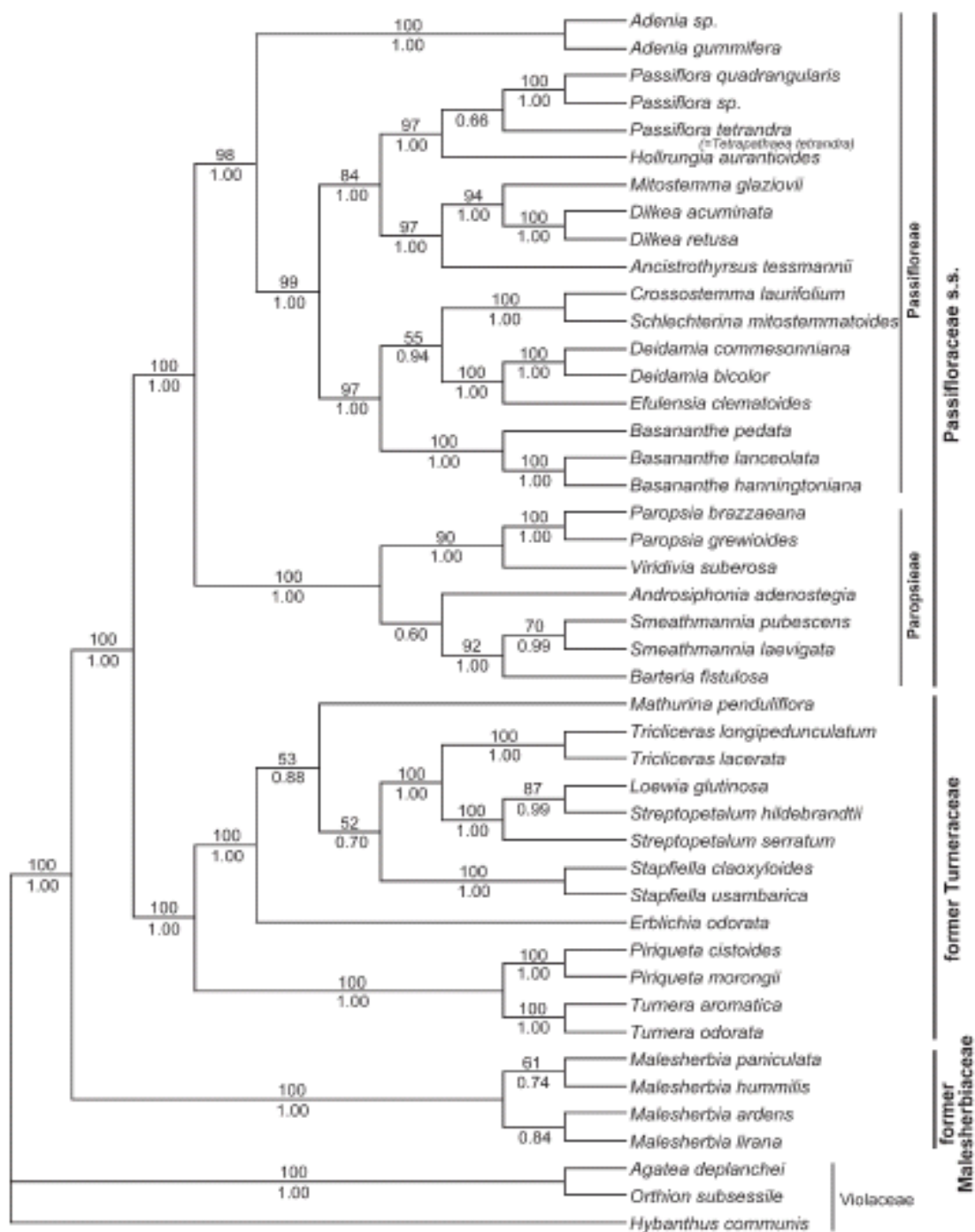


Figura 1: Árvore filogenética baseada nas seqüências dos marcadores *rbcL*, *atpB*, *matK*, e 18S segundo Tokuoka (2012).

Passifloraceae s.s. é composta por 17 gêneros e 700-750 espécies (Feuillet & MacDougal 2007). Turneraceae contém dez gêneros com cerca de 200 espécies (Arbo 2007) e Malesherbiaceae apresenta apenas um gênero – *Malesherbia* - com 24 espécies (Kubitzki 2007). Tendo em vista abordagens recentes que tratam essas três famílias como separadas (Tokuoka 2012; Xi *et al.* 2012), este trabalho teve como objeto de estudo representantes de Passifloraceae s.s. cuja distribuição é tropical e subtropical e destaca-se por apresentar importância ornamental já que contém espécies com flores coloridas, vistosas e perfumadas (Cervi 1997; Dornelas *et al.* 2006a). Além disso, os frutos comestíveis e as propriedades farmacológicas de algumas espécies conferem ao grupo importância agrícola (Khanh *et al.* 2006).

Passifloraceae s.s. está dividida em duas tribos, *Paropsieae* DC. e *Passifloreae* DC. (Escobar 1988; Cervi 1997; Cervi 2006). As espécies da tribo *Paropsieae* são pequenos arbustos enquanto as de *Passifloreae* apresentam hábito escandente, gavinhas axilares e flores especializadas (Judd *et al.* 2009). O trabalho de Tokuoka (2012) apoia ambas as tribos como monofiléticas e revela que cada uma delas está bem caracterizada por dados moleculares e morfológicos, mas as homologias entre estes caracteres morfológicos devem ser melhor investigadas por comparação com Turneraceae e Malesherbiaceae.

Cervi (1997) descreveu a tribo *Paropsieae*, sendo composta por seis gêneros e a tribo *Passifloreae* por 14 gêneros, conforme apresentado na tabela 1 enquanto Tokuoka (2012) considerou Passifloreae com aproximadamente 12 gêneros.

Tabela 1: Gêneros pertencentes as duas tribos de Passifloraceae s.s., segundo Cervi (1997).

Tribo <i>Paropsieae</i>	Tribo <i>Passifloreae</i>	
<i>Androsphonia</i> Stapf	<i>Adenia</i> Forssk	<i>Hollurngia</i> K. Schum.
<i>Barteria</i> Hook. f.	<i>Ancistrothyrsus</i> Harms	<i>Mitostemma</i> Mast.
<i>Paropsia</i> Noronha ex Thouars	<i>Basananthe</i> Peyr.	<i>Passiflora</i> L.
<i>Paropsiopsis</i> Engl.	<i>Crossostemma</i> Planch. ex Hook.	<i>Schelecterina</i> Harms
<i>Smeathmannia</i> Sol. ex R. BR.	<i>Deidamia</i> E. A. Noronha ex Thouars	<i>Tetrapathaea</i> (DC.) Rchb.
<i>Viridivia</i> J. H. Hemsl. e Verdc.	<i>Dilkea</i> Mast.	<i>Tetrastylis</i> Barb. Rodr.
	<i>Efulensia</i> C. H. Wright	<i>Tryphostemma</i> Harv

A taxonomia do gênero foi baseada por muito tempo no arranjo proposto por Killip (1938) que, revisando Passifloraceae s.s., dividiu *Passiflora* em 22 subgêneros e numerosas seções e séries. Feuillet & MacDougal (2003) simplificaram a classificação, com base em caracteres morfológicos e ecológicos, dividindo o gênero *Passiflora* em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast e *Passiflora* L. com flores e frutos grandes e *Decaloba* (DC.) Rchb e *Deidamioides* (Harms) Killip com flores e frutos pequenos (Fig. 2). Trabalhos recentes de sistemática filogenética, utilizando marcadores moleculares, corroboram total ou parcialmente esta classificação infragenérica (Muschner *et al.* 2003; Yockteng & Nadot 2004).

Em análise posterior e abrangendo 104 espécies distribuídas em 19 dos 22 subgêneros propostos por Killip (1938), Muschner (2005) reafirma os resultados obtidos por Feuillet & MacDougal (2003), com três dos subgêneros - *Decaloba*, *Astrophea* e *Passiflora* - formando grupos monofiléticos. Contudo, *Deidamioides* não se confirmou monofilético e

propôs-se sua divisão em dois subgêneros, *Deidamioides* e *Tryphostemmatoides* (Harms) Killip (Muschner *et al.* 2012).

Krosnick *et al.* (2013) confirmam os dados de Feuillet & MacDougal (2003) e reconhecem o subgênero *Tetrapathea* (DC). P.S. Green, aumentando o número de subgêneros para cinco.

Souza-Chies *et al.* (2005) avaliando marcadores moleculares nucleares e plastidiais, apresentam *Astrophea* como irmão de *Decaloba*, porém com baixo suporte e a não resolução da relação entre o subgênero *Passiflora* e os demais. No trabalho de Hansen *et al.* (2006) a relação entre os subgêneros permanece não resolvida e é variável conforme o método e o marcador utilizado.

Um aspecto complicador na compreensão da história evolutiva do gênero *Passiflora* é a geração de populações híbridas através de livre-intercruzamento entre espécies de mesmo gênero (Dornelas *et al.* 2006b). Por isso, esforços para determinação da filogenia de *Passiflora* têm sido aplicados recentemente, em modernos métodos filogenéticos, como seqüenciamento de DNA (Yockteng & Nadot 2004; Lorenz-Lemke *et al.* 2005).

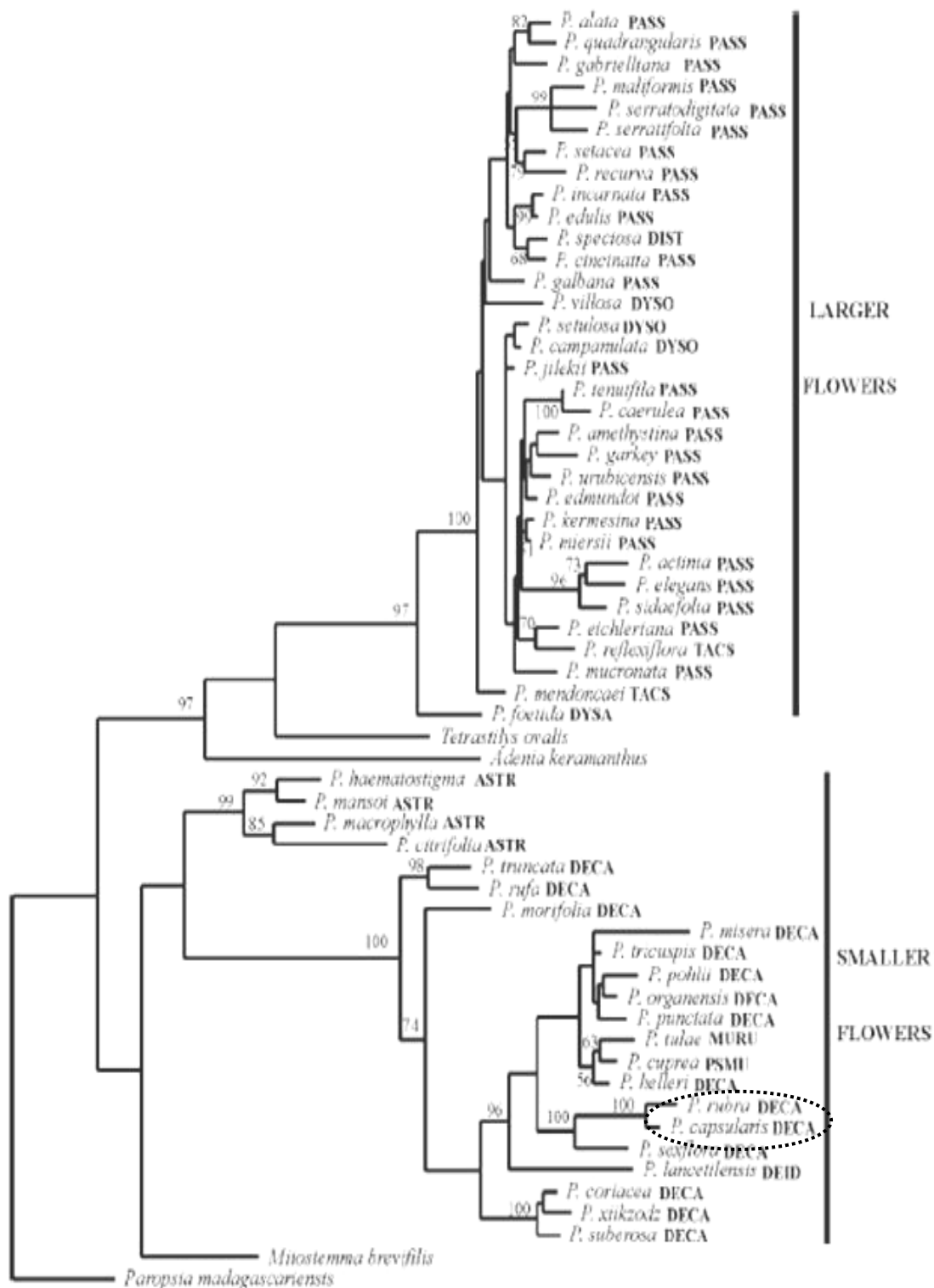


Figura 2: Árvore filogenética baseada nas seqüências dos marcadores ITS e trnL-F segundo Muschner *et al.* (2003). Duas das espécies estudadas em destaque.

1.3 – Gênero *Passiflora*

No Brasil são encontrados quatro gêneros de Passifloraceae: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (Cervi *et al.* 2010), o maior da família contando com mais de 560 espécies (Krosnick *et al.* 2013).

Devido à representatividade e à complexidade taxonômica da família, no que se refere aos subgêneros, secções e séries, o estudo do gênero *Passiflora* torna-se interessante, dada a sugestiva estrutura de suas flores. Da mesma forma, a sua dispersão no ambiente trópico e seu potencial econômico reforçam o interesse em estudar tal grupo (Cervi 1997).

Os representantes desse gênero têm hábito arbóreo, arbustivo ou escandente, possuem disco nectarífero na base do hipanto, apresentam corona com filamentos distribuídos de uma a seis fileiras e as folhas são alternas, geralmente simples e de morfologia bastante variável (Judd *et al.* 2009).

As flores apresentam variação de tamanho e de cores e atraem uma ampla gama de polinizadores: desde abelhas e vespas, mariposas e borboletas, até vertebrados como morcegos e pássaros (Zamberlan 2007). A maior parte dessa diversidade floral pode ter surgido como resultado de interações com polinizadores (MacDougal & Feuillet 2004).

Os frutos possuem lóculo único com três carpelos e placentação parietal, sendo a maioria do tipo baga, com poucas a muitas sementes, cada uma delas recoberta por uma estrutura carnosa (Ulmer & MacDougal 2004). A natureza dos frutos está intimamente relacionada ao mecanismo de dispersão para cada espécie, sendo que as sementes de quase todas são dispersas por animais, principalmente por pássaros e mamíferos (Ulmer & MacDougal 2004).

Para auxiliar na dispersão, a semente possui diferentes atrativos, como o tamanho, o brilho, o contraste de cores, o odor e os materiais nutritivos que estão normalmente presentes em tecidos carnosos como na superfície da semente (sarcotesta) e em um apêndice especial: o arilo (Werker 1997).

As sementes de *Passiflora* são mais ou menos comprimidas; podendo ser alveoladas, foveoladas, reticuladas ou sulcadas transversalmente (Cervi 1997). O tegumento que envolve a semente é formado por camadas de células pouco volumosas que rapidamente se degradam quando expostas ao ambiente, evidenciando as ornamentações da testa, isto é, a esclerotesta. O tamanho e a escultura da esclerotesta são considerados bons caracteres taxonômicos em *Passiflora* (Ulmer & MacDougal 2004).

1.4 – Subgênero *Decaloba*

As principais características diagnósticas que circunscrevem este subgênero são: a presença ou ausência de glândulas peciolares; os tipos de inflorescências; o número de séries de filamentos da corona e a forma do ápice dos referidos filamentos; as características do pólen; os tipos de frutos e a ornamentação da testa da semente (Milward-de-Azevedo *et al.* 2012).

O subgênero *Decaloba* engloba mais de 200 espécies de porte pequeno e hábito escandente, flores pequenas, similares na forma e coloração (Killip 1938; Ulmer & MacDougal 2004). Os frutos podem ser pequenas bagas, que variam em coloração, com poucas sementes dispersas por pássaros ou frutos que se abrem quando maduros expondo

sementes que caem no chão e provavelmente são dispersas por formigas (Ulmer & MacDougal 2004).

Este subgênero é dividido em oito superseções e cinco seções (MacDougal & Feuillet 2004), conforme descrito abaixo:

- Superseção *Pterosperma* Gilbert & MacDougal
- Superseção *Hahniopathanthus* (Harms) MacDougal & Feuillet
- Superseção *Disemma* (Labill.) MacDougal & Feuillet

Seção *Octandranthus* Harms

Seção *Disemma* (Labill.) MacDougal & Feuillet

Seção *Hollrungiella* Harms

- Superseção *Multiflora* (Small) MacDougal & Feuillet
- Superseção *Auriculata* MacDougal & Feuillet
- Superseção *Cieca* (Medic.) MacDougal & Feuillet
- Superseção *Bryonioides* (Harms) MacDougal & Feuillet
- Superseção *Decaloba* (DC.) MacDougal & Feuillet

Seção *Decaloba* DC.

Seção *Xerogona* (Raf.) Killip

No Brasil, o subgênero *Decaloba* é representado por 20 táxons (19 espécies e uma subespécie) pertencentes a cinco superseções. Dentre elas, destaca-se a superseção *Decaloba* na qual estão incluídas as seções *Decaloba* e *Xerogona* (Milward-de-Azevedo *et al.* 2012).

1.5 – Seção *Xerogona*

A seção inclui 13 espécies (Ulmer & MacDougal 2004) sendo caracterizada pela ausência de ocelos sobre as lâminas das folhas, pela ausência de brácteas e por apresentar frutos capsulares, uma exceção no gênero.

Recentemente foi incluída na seção *Xerogona* uma nova espécie, *Passiflora cervii* Milward-de-Azevedo, que era classificada como uma variação de *P. capsularis*, devido à semelhança morfológica entre as duas. A separação foi baseada em apenas três caracteres morfológicos: forma do grão de pólen; filamentos da corona e número de lobos da folha (Milward-de-Azevedo 2008). Essa carência de características distintivas entre as espécies pode gerar dúvidas sobre suas circunscrições e prejudicar a taxonomia da seção.

Uma vez que a descrição de caracteres é importante para a delimitação de grupos e faltam informações acerca da anatomia de frutos e sementes em *Passiflora*, nota-se a importância do estudo de indivíduos pertencentes a essa seção a fim de gerar dados que possam servir como ferramenta para outros trabalhos relacionados.

1.6 – Espécies estudadas

Foram selecionadas quatro espécies pertencentes à seção *Xerogona*. São elas: *Passiflora capsularis* L., *P. citrina* MacDougal, *P. cervii* Milward-de-Azevedo e *P. rubra* L..

Passiflora capsularis (Fig. 3a) e *P. rubra* (Fig. 3b) têm flores em forma de disco e provavelmente, são polinizadas por insetos (Ulmer & MacDougal 2004). *Passiflora capsularis* é notável pelas flores brancas e, segundo informações da literatura, pode ser polinizada por mariposas (Koschnitzke & Sazima 1997). *Passiflora rubra* possui flores muito semelhantes às

de *P. capsularis*, mas a superfície abaxial de suas sépalas possui veios avermelhados e a coroa apresenta leve pigmentação avermelhada na base, enquanto que em *P. capsularis*, as sépalas têm a superfície abaxial toda esverdeada e a coroa inteira branca (Ulmer & MacDougal 2004; Scorza 2011).

Passiflora capsularis está distribuída em muitas partes da América do Sul e Central enquanto *P. rubra* é encontrada no Caribe, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Brasil, ocorrendo tanto próximo ao nível do mar quanto em altitudes maiores que 2200 metros (Ulmer & MacDougal 2004). Além da distribuição geográfica diferente, os frutos também podem diferenciar claramente as duas espécies, sendo verdes ou arroxeados em *Passiflora capsularis*, dependendo da variedade, e avermelhados em *P. rubra* (Ulmer & MacDougal 2004; Scorza 2011).

Passiflora citrina (Fig. 3c) possui flores tubulares amarelas que são provavelmente polinizadas por beija-flores (MacDougal 1989; Ulmer & MacDougal 2004). Encontra-se distribuída do leste da Guatemala a Honduras central, crescendo em elevações de 600-1500 metros (Ulmer & MacDougal 2004). O longo androginóforo e o tubo floral conspícuo não são usuais em espécies do subgênero *Decaloba*.

Passiflora cervii (Fig. 3d, 3e) se restringe ao Brasil, ocorrendo nos estados de Minas Gerais e São Paulo; na região sul do país em áreas de Floresta Ombrófila Densa, Savana e vegetação influenciada por ambientes marinhos, geralmente em formações secundárias, estradas e formações florestais abertas. Caracteriza-se principalmente pela ausência de glândulas peciolares, flores em forma de disco com uma série de filamentos liguliformes com

ápices dilatados-achatados, fruto cápsula esverdeado muito semelhante ao de *P. capsularis* e testa da semente sulcada transversalmente (Milward-de-Azevedo *et al.* 2012).

Um estudo filogenético recente (Milward-de-Azevedo *et al.* 2014) indica que as flores em forma de disco como as de *P. capsularis*, *P. cervii* e *P. rubra* são plesiomórficas e o movimento do androginóforo nestas espécies é ineficaz para evitar a autopolinização (Scorza 2011). As flores tubulares seriam apomórficas e teriam surgido como um escape à polinização por insetos, como resposta à pressão de seleção de outros agentes polinizadores, como os beija-flores (MacDougal 1989).

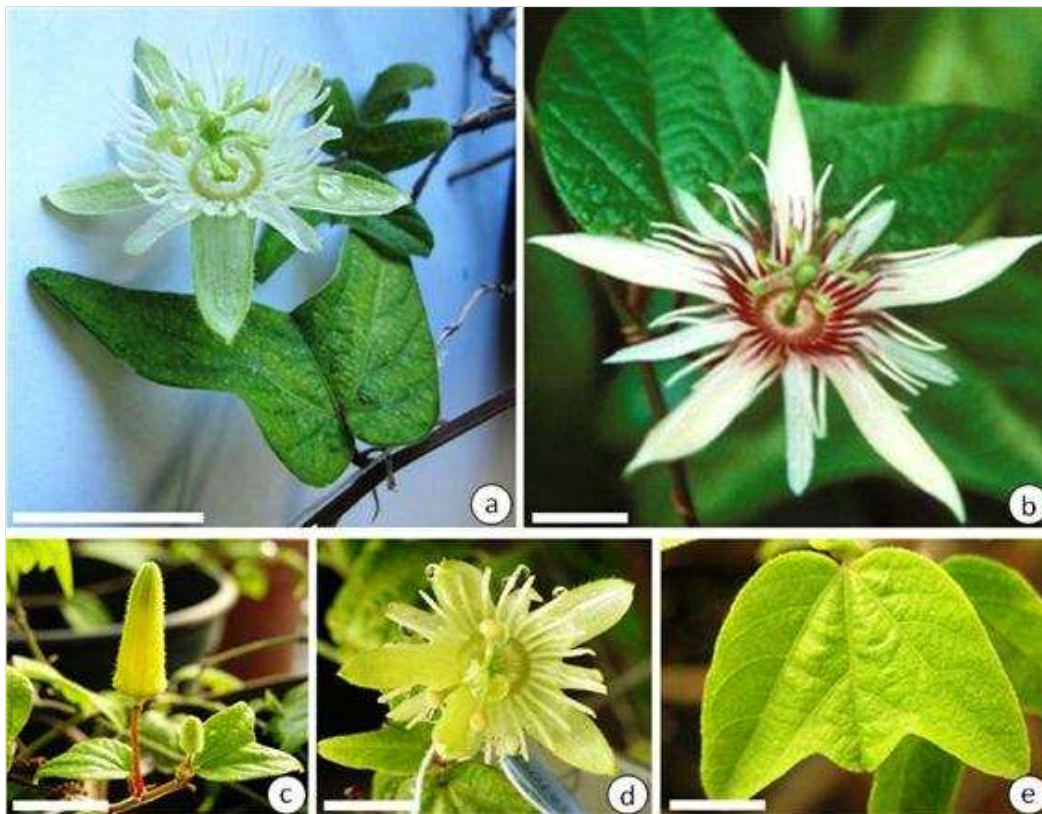


Figura 3: Aspecto morfológico das flores das espécies de *Passiflora* da seção *Xerogona*. Flores em forma de disco em *P. capsularis* (a), *P. rubra* (b) e *P. cervii* (d). Botões em diferentes fases de desenvolvimento de *P. citrina* (c). Detalhe de uma folha trilobada de *P. cervii* (e) que a distingue de *P. capsularis*. Escalas: a = 2 cm; b,c,d,e = 1 cm.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA

Há na literatura poucos trabalhos de anatomia e desenvolvimento de órgãos reprodutivos em Passifloraceae. Dentre eles destacam-se: anatomia floral em espécies de *Passiflora* (Puri 1947); ontogenia e vascularização de gavinhas e estípulas em *Passiflora foetida* (Shah & Dave 1970); anatomia foliar de *P. capsularis*, *P. campanulata* (Meruvia *et al.* 1993) e *P. actinia* (Kurtz *et al.* 2003); desenvolvimento floral em Passifloraceae (Bernhard 1999); microesporogênese e microgametogênese no gênero *Passiflora* (García *et al.* 2002); anatomia comparada da antera de espécies de *Passiflora* (Dettke 2009); ginoesporogênese e ginogametogênese de *P. suberosa* (Silvério *et al.* 2009), desenvolvimento da coroa (Aizza 2010), formação de superfície estigmática em *P. elegans* (Silvério & Mariath 2010), movimento do androginóforo em espécies da seção *Xerogona* (Scorza & Dornelas 2014) e estrutura do pólen em espécies de *Passiflora* (Silvério & Mariath 2014).

Devido à escassez de estudos anatômicos em Passifloraceae, a morfologia externa e interna dos frutos e sementes é pouquíssima conhecida ou até desconhecida para muitas espécies. No entanto, a compreensão do gênero *Passiflora* tem sido ampliada graças à cooperação de estudos morfoanatômicos e genéticos (Dornelas *et al.* 2006a, 2006b). O projeto de marcadores de seqüências expressas (Expressed Sequence Tags) de espécies de *Passiflora* nomeado Passioma-FAPESP (05/57097-0) realizado sob a coordenação do Dr. Marcelo C. Dornelas em 2005 identificou genes preferencialmente expressos durante o desenvolvimento reprodutivo e potencialmente envolvidos no desenvolvimento da flor e do fruto de espécies de *Passiflora* (*P. edulis* e *P. suberosa*).

Ainda que o estudo só tenha incluído espécies de *Passiflora* que apresentam fruto tipo baga, esses resultados nos impulsionaram a estudar os caracteres morfoanatômicos dos frutos e sementes de algumas espécies de *Passiflora* visando a contribuir com informações que possam ser usadas em futuras associações acerca dos genes envolvidos no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos no grupo.

Embora características anatômicas de frutos e de sementes têm sido negligenciadas em estudos sistemáticos, elas podem ter uma grande importância em trabalhos taxonômicos (Hutchinson 1969), devido à pequena plasticidade fenotípica que exibem (Von Teichman & Van Wyk 1991). Neste contexto, destaca-se a relevância da obtenção de informações anatômicas de frutos e sementes em espécies do gênero *Passiflora* a fim de esclarecer algumas lacunas no que diz respeito ao seu desenvolvimento.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi elucidar a ontogenia do fruto e da semente de quatro espécies do gênero *Passiflora*, subgênero *Decaloba*, suoverseção *Decaloba*, seção *Xerogona* que apresentam frutos do tipo cápsula, condição incomum na família, buscando descrever o processo de desenvolvimento dos mesmos e analisar o mecanismo de deiscência desse tipo de fruto.

Para tal, foram estabelecidos como objetivos específicos:

- Caracterizar as células e tecidos que compõem a parede do fruto e do ovário, bem como verificar sua função;
- Analisar o mecanismo de deiscência do fruto tipo cápsula;

- Descrever os tipos celulares que compõem a semente e sua função;
- Analisar o processo de desenvolvimento dos tegumentos da semente;
- Verificar se há alguma substância de reserva nas células e tecidos que constituem o fruto e a semente a fim de examinar se essas substâncias participam do processo de desenvolvimento.

4. FORMATO DA TESE

Os resultados obtidos durante a execução deste trabalho foram reunidos em dois capítulos intitulados:

Capítulo 1: Anatomia de frutos do tipo cápsula em espécies do gênero *Passiflora*, seção *Xerogona* com ênfase no mecanismo de abertura desses frutos

Capítulo 2: Morfo-anatomia da semente e ontogenia dos tegumentos em espécies do gênero *Passiflora*, seção *Xerogona* (Passifloraceae)

Cada um dos capítulos representa um artigo que será submetido à revista Acta Botanica Brasilica e estão formatados segundo as normas do periódico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZZA, I.C.B. 2010. **Desenvolvimento da corona em flores do gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**. 58p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

APG III. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 161: 105-121.

ARBO, M.M. 2007 Turneraceae. *In*: KUBITZKI, K. (Ed) The families genera of vascular plants. **Springer Berlin Heidelberg** 9: 458-466.

BERNHARD, A. 1999. Flower structure, development, and systematics in Passifloraceae and in *Abatia* (Flacourtiaceae) **International Journal of Plant Science** 160: 135-150.

CERVI, A.C. 1997. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **FontQueria** 45: 1-92.

CERVI, A.C. 2006. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem** 16: 1-5.

CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BERNACCI, L.C. 2010. Passifloraceae. *In*: FORZZA, R.C. *et al.* (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, p. 1432-1436.

CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia Univ. Press, New York. 1262p.

DETTKE, G.A. 2009. **Anatomia comparada da antera de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul.** 118p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

DORNELAS, M.C.; TSAI, S.M.; RODRIGUEZ, A.P.M. 2006a. Expressed sequence tags of genes involved in the flowering process of *Passiflora* spp. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology** (I): 483-488.

DORNELAS, M.C.; FONSECA, T.C.; RODRIGUEZ, A.P.M. 2006b. Brazilian passionflowers and novel passionate tropical flowering gems. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology** (IV): 630-640.

ESCOBAR, L.K. 1988. Passifloraceae. *In*: PINTO, P.; LOZANO, G. [eds.]. **Flora de Colombia**. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. v. 10, p. 1-138.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** 13: 34-38.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2007. Passifloraceae. Kubitzki, K. (Ed.) The families and genera of vascular plants. **Springer Berlin Heidelberg** 9: 270-281.

GARCÍA, 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.

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: 138-150.

HARMS, H. Passifloraceae. 1894. *In*: ENGLER, A.; PRANTL, K. **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**. 2. ed. Leipzig: Wilhelm Engelmann, p. 69-94.

HARMS, H. Passifloraceae. 1925. *In*: ENGLER, A.; PRANTL, K. **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**. 2. ed. Leipzig: Wilhelm Engelmann, p. 470-507.

HUTCHINSON, J. 1969. **Evolution and phylogeny of flowering plants**. London, Academic Press. 717p.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre, ArtMed. 632p.

KHANH, T.D.; CHUNHG, I.M.; TAWATA, I.; XUAN, T.D. 2006. Weed suppression by *Passiflora edulis* and its potential allelochemicals. **European Weed Research Society** 46: 296-303.

KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. Botanical Series. Chicago. **Field Museum of Natural History** 19: 20-87.

KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. 1997. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica** 20: 119-126.

KROSNIK, S.E.; PORTER-UTLEY, K.E.; MACDOUGAL, J.M.; JØRGENSEN, P.M.; MCDADE, L.A. 2013. New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic relationships and morphological synapomorphies. **Systematic Botany** 38 (3): 692-713.

KUBITZKI, K. 2007. Malesherbiaceae. *In*: KUBITZKI, K. (Ed) The families genera of vascular plants. **Springer Berlin Heidelberg** 9: 247-249.

KUGLER, E.E.; KING, L.A. 2004. A brief history of the passionflower. *In*: ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora: passionflowers of the World**. Portland Oregon: Timber Press. p. 15-26.

KURTZ, S.M.T.F.; SANTOS, C.A.M.; DUARTE, M.R.; SATO, M.E.O. 2003. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. **Acta Farmacéutica Bonaerense** 22 (2): 105-112.

LINNAEUS, C. 1753. **Species plantarum**. Paris: Impensis Laurentii Salvii, v.2, p. 955-960.

LORENZ-LEMKE, A.P.; MUSCHNER, V.C.; BONATTO, S.L.; CERVI, A.C.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. **Annals of Botany** 95: 799-806.

MACDOUGAL, J.M. 1989. *Passiflora citrina*, a new species in section *Xerogona*, (Passifloraceae), from Mesoamerica. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 76: 354-356.

MACDOUGAL, J.M.; FEUILLET, C. 2004. Systematics. *In*: ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. (ed.) **Passiflora: passionflowers of the world**. Portland Oregon: Timber Press. p. 27-31.

MASTERS, M.T. 1872. Passifloraceae. *In*: MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G; URBAN, I. (Ed.). **Flora Brasiliensis** 13 (1): 527-628.

MERUVIA, M.Y.L.; PALACIOS, V.; CERVI, A.C. 1993. Anatomia foliar de *Passiflora capsularis* L. (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense** 22: 31-44.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A. 2008. Three new species of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae) from Brazil. **Brittonia** 60 (4): 310-317.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BAUMGRATZ, J.F.A.; GONCALVES-ESTEVEES, V. 2012. A taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae) in Brazil. **Phytotaxa** 53: 1-68.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; FREITAS, L.B.; KINOSHITA, L.S. 2014. Taxonomy and evolutionary relationships of *Passiflora* subg. *Decaloba* supersect. *Decaloba* sect. *Xerogona* (Passifloraceae): contributions of palynological, morphological and molecular studies. **Acta Botanica Brasilica** 28(3): 301-308.

MUSCHNER, V.C. 2005. **Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. 162p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

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: 1229-1238.

MUSCHNER, V.C.; ZAMBERLAN, P.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. 2012. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** 35 (4): 1036-1043.

PURI, V. 1947. Studies in floral anatomy. IV Vascular anatomy of the flower of certain species of the Passifloraceae. **American Journal of Botany** 34: 562-573.

ROEMER, M.J. 1846. Passifloraceae. *In*: ROEMER, M.J. **Familiarum Naturalium Synopses Monographicae**, v. 2, p. 125-207.

RUGGIERO, C. 1987. **Cultura do Maracujazeiro**. Editora Legis Summa: Ribeirão Preto. 250 p.

SHAH, J.J.; DAVE, Y.S. 1970. Tendrils of *Passiflora foetida*: histogenesis and morphology. **American Journal of Botany** 57: 786-793.

SCORZA, L.C.T. 2011. **Caracterização do movimento do androginóforo de flores do gênero *Passiflora*, Seção *Xerogona* (Passifloraceae)**. 78p. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

SCORZA, L.C.T.; DORNELAS, M.C. 2014. Rapid touch-stimulated movement in the androgynophore of *Passiflora* flowers (subgen. *Decaloba*; Sect. *Xerogona*). An adaptation to enhance cross-pollination? **Plant Signaling & Behavior** 9: e27932.

SILVÉRIO, A.; TORMES, S.B.F.A.; MARIATH, J.E.A. 2009. O processo da ginosporogênese e ginogametogênese de *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociência** 7 (1): 15-22.

SILVÉRIO, A.; MARIATH, J.E.A. 2010. The formation of the stigmatic surface in *Passiflora elegans* (Passifloraceae). **Rodriguésia** 61: 569-574.

SILVÉRIO, A.; MARIATH, J.E.A. 2014. Comparative structure of the pollen in species of *Passiflora*: insights from the pollen wall and cytoplasm contents. **Plant Systematics and Evolution** 300 (2): 347-358.

SOLTIS, D.E.; GITZENDANNER, M.A.; SOLTIS, P.S. 2007. A 567-taxon data set for Angiosperms: the challenges posed by Bayesian analyses of large data sets. **International Journal of Plant Science** 168: 137-157.

SOUSA, G.S. 1971. **Tratado descritivo do Brasil: em 1587**. 4. ed. São Paulo: Cia Ed. Nacional e EDUSP. 389p.

SOUZA-CHIES, T.T.; YOCKTENG, R.; NADOT, S. 2005. Systématique moléculaire compare en France et au Brésil du genre *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Cahiers Agricultures** 14: 209-215.

TAKHTAJAN, A. 1997. **Diversity and classification of flowering plants**. Columbia Univ. Press, New York. 643p.

TOKUOKA, T. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research** 125: 489-497.

ULMER, T.; MACDOUGAL J.M. 2004. **Passiflora: passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, Cambridge. 430p.

VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A.E. 1991. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachycalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society** 105: 211-237.

WERKER, E. 1980. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. **Israel Journal of Botany** 29: 22-44.

WETTSTEIN, R. 1935. **Handbuch der systematischen Botanik**. Ed. Germ. Review article General article, Anatomy, v. 2, 1152p.

WURDACK , K.J.; DAVIS, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany** 96 (8): 1551-1570.

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

XI, Z.; RUHFEL, B.R.; SCHAEFER, H.; AMORIM, A.M.; SUGUMARAN, M.; WURDACK, K.J.; ENDRESS, P.K.; MATTHEWS, M.L.; STEVENS, P.F.; MATHEWS, S.; DAVIS, C.C. 2012. Phylogenomics and a posteriori data partitioning resolve the Cretaceous angiosperm radiation Malpighiales. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109 (43): 17519-17524.

ZAMBERLAN, P.M. 2007. **Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas**. 105p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

CAPÍTULO 1

Anatomia de frutos do tipo cápsula em espécies do gênero *Passiflora*, seção *Xerogona* com ênfase no mecanismo de abertura desses frutos

Milani, J.F.; Vilarta, M.R.; Carmello-Guerreiro, S.M.

RESUMO

Apesar da grande diversidade de espécies em Passifloraceae, quase não há estudos que abordem a morfologia externa e interna dos frutos no gênero *Passiflora*. Com o objetivo de compreender a estrutura morfo-anatômica de espécies deste gênero, este trabalho descreveu o desenvolvimento do fruto tipo cápsula de quatro espécies de *Passiflora*, subgênero *Decaloba*, superseção *Decaloba*, seção *Xerogona*. O material foi coletado e processado segundo técnicas convencionais em microscopia de luz, histoquímica, além da aplicação de técnica específica para detecção de morte celular programada. Os resultados apontam que a parede do ovário das espécies estudadas apresenta epiderme externa e interna uniestratificadas. O tecido fundamental ovariano compõe-se de 15-40 camadas de células parenquimáticas onde estão dispersos feixes vasculares e idioblastos. O pericarpo está dividido em três regiões. O epicarpo e o endocarpo são uniestratificados. No mesocarpo, foram observadas camadas de células parenquimáticas compactas próximas ao epicarpo e espaços intercelulares próximos ao endocarpo. A ontogenia do fruto cápsula indica que ocorre morte celular programada e a abertura do fruto acontece de dentro para fora. As informações obtidas mostraram que as características anatômicas do fruto são bastante conservadas.

Palavras-chave: ontogenia, cápsula carnosa deiscente, morte celular.

ABSTRACT

Despite the great diversity of species in Passifloraceae, there are almost no studies that address the external and internal morphology of *Passiflora* fruit. With the aim of understanding the morpho-anatomical structure of species of this genus, this paper described the development of the fruit capsule of four species of *Passiflora*, *Decaloba* subgenus, *Decaloba* supersection, *Xerogona* section. The material was collected and processed according to conventional techniques in light microscopy, histochemistry, besides the application of specific technique to detection of programmed cell death. The results indicate that ovary wall of the species presents uniestratified outer and inner epidermis.

Fundamental ovarian tissue consists of 15-40 layers of parenchyma cells where vascular bundles and idioblasts are scattered. Pericarp is divided into three regions. The epicarp and the endocarp are uni-stratified. In the mesocarp, layers of compact parenchyma cells near the epicarp and intercellular spaces near the endocarp were observed. Ontogeny of the capsule fruit indicates that programmed cell death occurs and the opening of the fruit occurs from the inside to outside. The information obtained showed that the anatomical characteristics of the fruit are quite conserved.

Keywords: ontogeny, dehiscent fleshy capsule, cell death.

INTRODUÇÃO

Os frutos são produto final de alterações morfológicas e estruturais nos carpelos, formados após a fertilização (Roth 1977; Cutler *et al.* 2008). Na literatura botânica é comum o registro de denominação de frutos baseada apenas na análise morfológica, sem levar em consideração a estrutura o pericarpo. Isso tem gerado classificações incorretas. A análise estrutural ontogênica de frutos, que considera o desenvolvimento do ovário até o fruto maduro, tem se tornado ferramenta indispensável na sua classificação (Souza 2003).

Além de prejudicar a classificação dos tipos de frutos, a grande escassez de estudos de ontogenia de frutos e sementes em angiospermas tem dificultado a classificação das estruturas que envolvem as sementes (Souza *et al.* 2005). Considerando-se que frutos e sementes exibem pequena plasticidade fenotípica, em um mesmo grupo taxonômico, destaca-se a importância de ampliar as informações morfológicas e anatômicas como subsídios para trabalhos taxonômicos, ecológicos e filogenéticos (Martins & Oliveira 2001).

De acordo com a origem, a deiscência e a consistência do pericarpo, podem-se distinguir os tipos de frutos. As bagas consistem em frutos indeiscentes, com pericarpo carnoso normalmente parenquimático. Já as cápsulas são frutos deiscentes com pericarpo seco ou carnoso derivadas de um ovário com mais de um carpelo (Roth 1977; Spjut 1994).

Para Passifloraceae *s.s.* não se tem informações sobre evolução dos frutos tipo baga e cápsula. Dentro de outras famílias, análise filogenéticas sugerem que bagas e cápsulas evoluíram várias vezes de forma independente dentro de grandes táxons como Melastomataceae (Clausing *et al.* 2000), Rubiaceae (Bremer & Eriksson 1992; Bremer *et al.* 1995), Solanaceae (Knapp 2002) e em algumas famílias de monocotiledôneas (Givnish *et al.* 2005). Embora comum, mudanças evolutivas repetidas

entre esses dois tipos básicos de frutos têm sido pouco exploradas em nível anatômico. Diferenças superficiais na morfologia dos frutos podem dificultar o reconhecimento de homologias estruturais que poderiam ser usadas para distinguir espécies. Igualmente, semelhanças superficiais como a deiscência do fruto, podem encobrir as diferenças estruturais que indicam falta de homologia (Pabón-Mora & Litt 2011).

O gênero *Passiflora* L. é composto por aproximadamente 560 espécies (Krosnick *et al.* 2013) sendo o maior e mais representativo dentro da família (Feuillet & MacDougal 2007). Pode ser dividido em cinco subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Decaloba* (DC.) Rchb., *Dedamoides* (Harms) Killip, *Passiflora* L. e *Tetrapatheia* (DC). P.S. Green (Krosnick *et al.* 2013).

No subgênero *Decaloba* são encontrados dois tipos de frutos: carnosos do tipo baga, que variam em coloração de púrpura a azul, ou de amarelo a vermelho, com poucas sementes dispersas por pássaros; e frutos tipo cápsula com seis ângulos que se abrem quando maduros expondo as sementes cobertas por arilos secos e sem odor que caem no chão e provavelmente são dispersas por formigas (Ulmer & MacDougal 2004). (Dornelas *et al.* 2006b). Este subgênero está dividido em superseções e seções. Pertencente à superseção *Decaloba*, a seção *Xerogona* é caracterizada por apresentar espécies com frutos capsulares, o que constitui uma exceção em Passifloraceae, cujos frutos comumente são do tipo baga.

Tendo em vista que detalhadas análises anatômicas e de desenvolvimento são fundamentais para uma melhor compreensão das características que definem um tipo específico de fruto e provaram ser úteis na identificação de caracteres taxonômicos de diagnóstico em vários grupos de plantas (Oganezova 1990; Pak *et al.* 2001; Liu *et al.* 2003, 2010), este trabalho pretendeu elucidar a ontogenia do fruto de quatro espécies de *Passiflora*, subgênero *Decaloba*, superseção *Decaloba*, seção *Xerogona* que apresentam frutos do tipo cápsula, condição incomum na família, buscando analisar o mecanismo de deiscência desse tipo de fruto.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material utilizado foi proveniente de plantas cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas - SP. Foram coletados botões

florais, flores em antese e frutos de *Passiflora capsularis*, *P. cervii*, *P. citrina* e *P. rubra* em diferentes estádios de desenvolvimento. O material testemunha está depositado no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) – Tabela 1.

Tabela 1: Espécies de Passifloraceae selecionadas para o presente estudo

Espécie	Coletor	Número
<i>Passiflora capsularis</i> L.	M. Dornelas 15	UEC 153239
<i>Passiflora citrina</i> MacDougal	M. Dornelas 9	UEC153234
<i>Passiflora cervii</i> Milward-de-Azevedo	J.F.Milani 1	UEC181376
<i>Passiflora rubra</i> L.	M. Dornelas 18	UEC 154643

As flores das espécies da seção *Xerogona* foram autopolinizadas e observadas durante aproximadamente 40 dias, sendo que a coleta foi realizada de acordo com os seguintes critérios:

1) Ovários de botões florais e flores em antese foram selecionados conforme a variação no seu comprimento (Tabela 2);

2) Frutos foram escolhidos de acordo com o tempo de desenvolvimento em dias. Estádios de desenvolvimento foram estabelecidos a partir da data de polinização artificial e a predominância de eventos de divisão, alongamento e maturação celular.

Tabela 2: Medidas dos intervalos de comprimento dos botões florais coletados das espécies de *Passiflora* estudadas.

Espécies	Comprimento do botão floral
<i>Passiflora capsularis</i>	0,3 – 0,6 cm
<i>Passiflora cervii</i>	0,6 – 1,6 cm
<i>Passiflora citrina</i>	0,4 – 0,8 cm
<i>Passiflora rubra</i>	0,5 cm*

* Todos os botões de *P. rubra* apresentaram o mesmo tamanho.

A descrição morfológica da flor e do fruto foi feita por observações diretas e em estereomicroscópio. A documentação deste estudo foi por fotos digitais realizadas em estereomicroscópio Leica modelo MSV266 com o aumento em escala demonstrativa.

Microscopia de luz

As amostras coletadas foram fixadas em FAA (Formaldeído, Ácido Acético, etanol 50%; 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940) ou em FNT - Formalina Neutra Tamponada - por 48 horas (Lillie 1965), desidratadas em série etanólica e estocadas em etanol 70%. Para as análises anatômicas o material foi incluído em resina plástica (Historesin® Leica) de acordo com a técnica de Gerrits & Smid (1983) seguindo as recomendações do fabricante. Após a inclusão, os materiais foram seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo manual com navalha descartável de tungstênio, na espessura de 6 µm a 8µm. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e as imagens obtidas com câmera digital (Olympus DP71) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BX51).

Testes histoquímicos

Secções de material embocado em resina foram tratadas com: Sudan IV (Pearse 1980) para detecção de lipídios totais; Lugol (Berlyn & Miksche 1976) para amido; Cloreto de Ferro III 10% (Johansen 1940) para compostos fenólicos; PAS (McManus 1948) para polissacarídeos totais; Vermelho de Rutênio (Johansen 1940) para substâncias pécicas; Acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969); Reagente de Nadi para óleos essenciais e óleo resina (David & Carde 1964) e Xylidine Ponceau (Mello & Vidal 1980) para proteínas. Os resultados foram registrados por meio de imagens capturadas com câmera digital (Olympus DP71) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BX51).

Teste imunocitoquímico (TUNEL)

A técnica do TUNEL proposta por Gavrielli *et al.* (1992) para detectar morte celular programada foi aplicada em amostras de frutos maduros de *Passiflora capsularis* e *P. citrina*. Uma vez que as quatro espécies estudadas são muito semelhantes, apenas duas foram selecionadas para aplicação desse teste. Para tal, amostras foram fixadas em FAA 50, desidratadas em série etanólica, embebidas em soluções de etanol + xilol (3:1, 2:1; 1:1) e em xilol puro (I e II). Em seguida, permaneceram por 24 horas em solução saturada de xilol + parafina (EMD) em estufa a 37°C. Posteriormente, o material permaneceu em parafina (I e II) e foi incluído em parafina pura (Sass 1951).

Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo rotativo e os cortes com cerca de 8µm de espessura foram aderidos às lâminas silanizadas (Starfrost® Knittel) sendo as fitas distentidas com água destilada em placa aquecedora. As lâminas permaneceram em estufa a 60°C overnight para desparafinização e em seguida, passaram pela série de xilol (I, II e III). A seguir, procedeu-se a hidratação dos cortes passando o material em série etanólica decrescente (98%, 80%, 70%). Em seguida, as amostras foram submetidas ao protocolo do KIT (Oncogene – Frag-EL, cód. KIA-33) para detecção de morte celular que se inicia com a passagem das lâminas com os cortes em tampão TBS (tris-buffered saline) pH 7,6 por 5 minutos.

Para o processo de permeabilização das células, as lâminas foram incubadas por 20 minutos com proteinase K 1:100 em tampão TRIS (tris-hidroximetilaminometano) pH 8,0 e lavadas com tampão TBS pH 7,6. Posteriormente, os cortes foram deixados por 20 minutos em tampão TBS pH 7,6 com peróxido de hidrogênio 3%. Procedeu-se a incubação dos cortes no tampão de equilíbrio Tdt Equilibration Buffer por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram encubados por 90 minutos com a enzima Tdt (dextrorribonucleotidil transferase terminal) em estufa a 37°C. Depois desse tempo, os cortes foram lavados com tampão TBS pH 7,6 e a reação bloqueada com o tampão de bloqueio por 10 minutos. Em cada corte, foi adicionada uma gota do revelador DAB com tempo de reação de 3 minutos. Em seguida, pingou-se uma gota de contra-corante (verde metila). Depois de 3 minutos, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em série etanólica e em série de xilol. As lâminas foram montadas utilizando-se Permout como meio de montagem. Para o controle positivo foram utilizadas lâminas fornecidas no kit.

Esperou-se que o material genético das células em processo de morte celular corasse de marrom. Os resultados foram registrados por meio de imagens capturadas com câmera digital (Olympus DP71) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BX51).

RESULTADOS

Morfologia do ovário

As espécies da seção *Xerogona* apresentam ovário súpero com três carpelos sendo um único lóculo com muitos óvulos. O ovário tem formato obovado-hexagonal em *Passiflora capsularis*, *P. cervii* e *P. rubra* e oblongo em *P. citrina* (Fig. 1). A coloração varia sendo verde-amarelado em *P.*

cervii e *P. capsularis* (Fig. 1a), esverdeada em *P. citrina* (Fig. 1b) e vermelho-arroxeadado em *P. rubra* (Fig. 1c). Todas as espécies apresentam 5-6 costelas e ovário piloso.



Figura 1: Visão geral do pistilo de espécies de *Passiflora*. a. *P. capsularis*. b. *P. citrina*. c. *P. rubra* com ovário muito piloso. Escalas: a = 2 mm; b,c = 1 mm.

Morfologia do fruto

Os frutos das espécies estudadas são cápsulas carnosas (Fig. 2,3). O formato e a coloração variam de acordo com a espécie, sendo obovado-fusiforme e esverdeado em *Passiflora capsularis* (Fig. 2a); ovóide e avermelhado em *P. rubra* (Fig. 2b) fusiforme e verde claro em *P. citrina* (Fig. 2c). Os frutos de *P. cervii* são mais arredondados/ovóides de coloração esverdeada (Figura 3). A coloração do fruto em *P. capsularis* no início de seu desenvolvimento é geralmente verde e quando maduro, aparecem tons amarelos na região das costelas.

Frutos maduros de todas as espécies estudadas com 32 a 38 dias de desenvolvimento se abrem por fendas na região localizada entre as costelas (Fig. 2a). Estas fendas se formam na porção distal, originando valvas que permanecem unidas na base, de forma que a cápsula fica suspensa, com sua abertura voltada para baixo, liberando, assim, as sementes.

Anatomia do ovário

As características anatômicas são muito semelhantes entre as espécies e serão descritas em conjunto. Para efeito de comparação as informações de cada espécie foram sintetizadas na tabela 2 e representadas pelas figuras 4-6.

As espécies da seção *Xerogona* estudadas apresentam ovário com epiderme externa e epiderme interna uniestratificadas compostas por células justapostas que apresentam núcleo conspícuo. A epiderme externa apresenta tricomas tectores enquanto a epiderme interna é desprovida destes apêndices em toda a sua extensão (Fig. 4)

O tecido fundamental ovariano compõe-se de 15-40 camadas de células parenquimáticas. Destas, as camadas subepidérmicas possuem células pequenas, compactas, com núcleo denso e parede espessa. Já nas camadas subjacentes as células são maiores à medida que se aproximam da epiderme interna (Fig. 4). Dispersos neste tecido estão feixes vasculares laterais, dorsais e ventrais do tipo colateral, constituindo a vascularização do carpelo (Fig. 5). Idioblastos contendo compostos fenólicos (Fig. 6) e idioblastos associados ao floema dos feixes vasculares contendo proteínas (Fig. 6) também foram observados distribuídos pelo tecido fundamental.



Figura 2: Frutos tipo cápsula de espécies de *Passiflora* da seção *Xerogona* em diferentes estádios de desenvolvimento. a. *P. capsularis*. Notar as fendas (setas) localizadas entre as costelas por onde os frutos se abrem. b. *P. rubra*. c. *P. citrina*. Escalas: a = 2 cm; b = 0,5 cm; c = 0,25 cm.



Figura 3: Diferença no formato dos frutos tipo cápsula de *Passiflora capsularis* (a) e *P. cervii* (b). Material fixado. Notar que o fruto é mais arredondado em *P. cervii*. Escalas = 5cm.

Tabela 2: Características anatômicas do ovário das cinco espécies da seção *Xerogona* do presente estudo.

Tecido Espécie	Epiderme externa	Tecido fundamental	Epiderme interna
<i>Passiflora capsularis</i> (Fig. 4a)	Uniestratificada com estômatos e tricomas tectores unicelulares	- Camadas de células parenquimáticas: 3-8 subepidérmicas; arranjo frouxo das células próximo à epiderme interna	Uniestratificada com estômatos
<i>Passiflora cervii</i>	Uniestratificada com estômatos e tricomas tectores unicelulares	- Camadas de células parenquimáticas: 3-8 subepidérmicas; arranjo frouxo das células próximo à epiderme interna	Uniestratificada com estômatos
<i>Passiflora citrina</i> (Fig. 4b)	Uniestratificada com tricomas tectores uni e multicelulares	- Camadas de células parenquimáticas: 2-5 subepidérmicas; arranjo frouxo das células próximo à epiderme interna - Raros idioblastos com compostos fenólicos próximos à epiderme interna	Uniestratificada com estômatos
<i>Passiflora rubra</i> (Fig. 4c)	Uniestratificada com estômatos e tricomas tectores unicelulares	- Camadas de células parenquimáticas: 4-10 subepidérmicas; arranjo frouxo das células próximo à epiderme interna - Muitos idioblastos com compostos fenólicos dispersos	Uniestratificada com estômatos

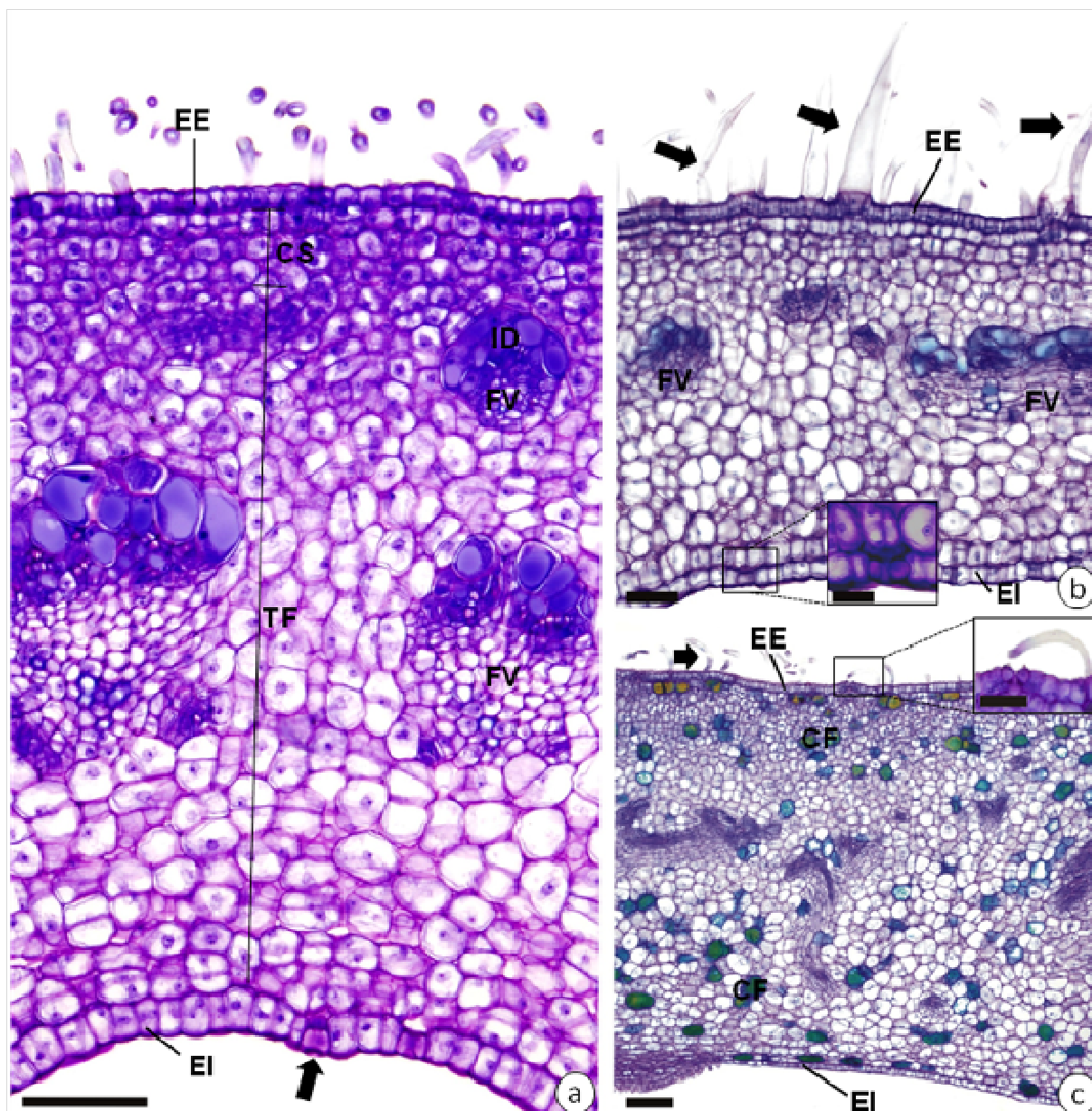


Figura 4: Parede do ovário das espécies de *Passiflora* da seção *Xerogona*. a-b. Secções transversais; c. Secção longitudinal. a. *P. capsularis*. Epiderme externa (EE) com tricomas, tecido fundamental (TF) onde se encontram feixes vasculares (FV) com idioblastos (ID) associados e epiderme interna (EI) com estômatos (seta). Notar 3-6 camadas subepidérmicas (CS) com parede mais espessa que as demais. b. *P. citrina*. Epiderme externa (EE) com tricomas (setas) e tecido fundamental com feixes (FV) dispersos. Detalhe do estômato na epiderme interna (EI) “inset”. c. *P. rubra*. Epiderme externa (EE) apresentando tricomas tectores (seta) e estômato (“inset”). No tecido fundamental, muitos idioblastos com compostos fenólicos (CF) estão dispersos. Epiderme interna (EI) uniestratificada. Escalas: a = 100 µm; b = 25 µm, “inset” = 2 µm; c = 100 µm, “inset” = 10 µm.

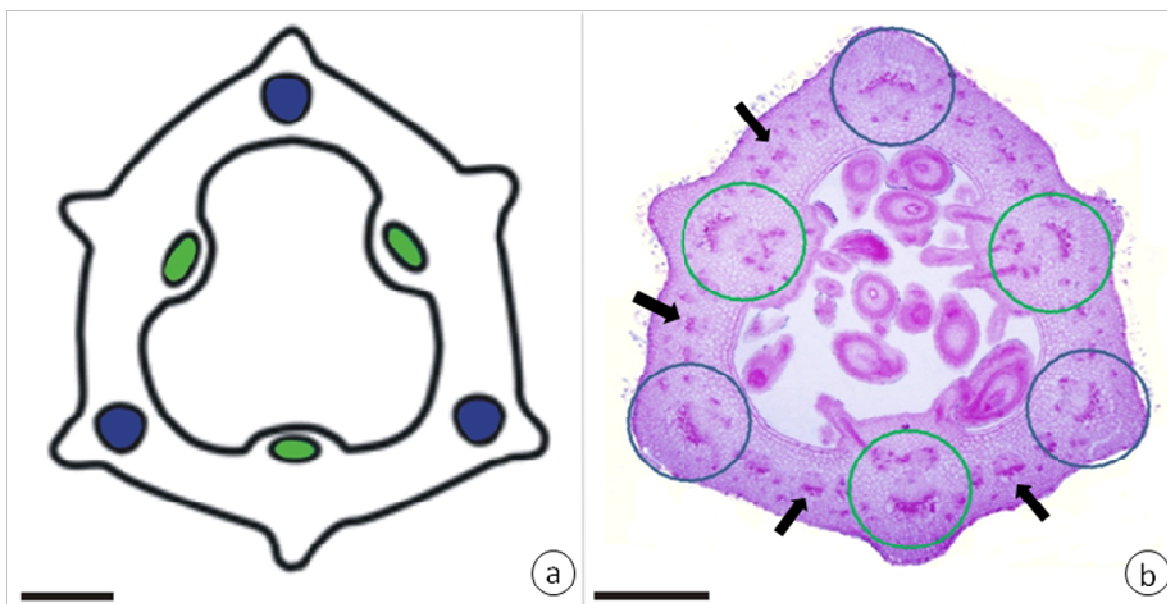


Figura 5: Vascularização do ovário em *Passiflora capsularis*. Notar a posição dos feixes dorsais (azul), ventrais (verde) e dos feixes laterais (setas) em seção transversal. a. Esquema. b. Corte anatômico. Escalas: a = 200 μm ; b = 250 μm .

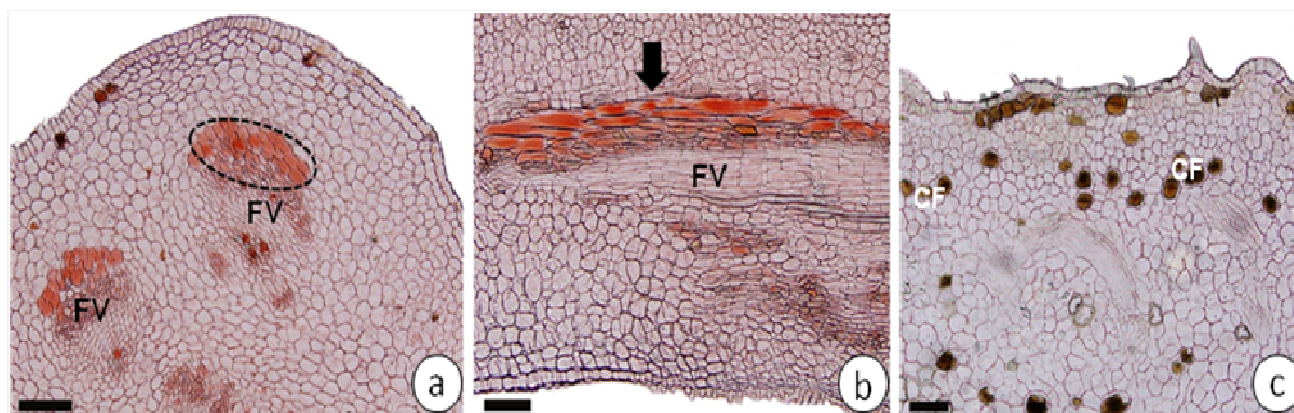


Figura 6: Testes histoquímicos para Xylidine Ponceau (a-b), Cloreto Férrico (c) no ovário de *Passiflora capsularis* (a), *P. citrina* (b) e *P. rubra* (c). a. Secção transversal. b,c. Secções longitudinais. a. Região da costela do ovário mostrando dois feixes vasculares (FV) com um aglomerado de idioblastos associados corados com substâncias proteicas (destaque). b. Detalhe um feixe vascular (FV) no tecido fundamental com idioblastos (seta) contendo proteína. c. Tecido fundamental ovariano com idioblastos dispersos contendo compostos fenólicos (CF). Escalas = 100 μm .

Ontogenia do fruto tipo cápsula

O desenvolvimento observado para os frutos de *Passiflora capsularis*, *P. cervii*, *P. citrina* e *P. rubra* foi o mesmo e apenas *P. capsularis* foi ilustrado (Fig. 7).

Baseados nos eventos de divisão, alongamento e diferenciação celular foram estabelecidos quatro estádios de desenvolvimento: - **Estádio I**: fruto em início de desenvolvimento (4-6 dias) - frequentes divisões celulares; - **Estádio II**: fruto jovem (12 a 24 dias) - alongamento celular e divisões; - **Estádio III**: fruto maduro (26 a 38 dias) - diferenciação celular e deiscência do fruto.

Estádio I (Fig. 7c)

O epicarpo derivado da epiderme externa do ovário é formado por uma única camada de células recoberta por uma cutícula delgada e contém tricomas tectores unicelulares. No mesocarpo, 2-8 camadas subjacentes ao epicarpo apresentam intensa divisão celular periclinal e os feixes vasculares estão em processo de diferenciação. Idioblastos com conteúdo denso foram observados associados aos feixes vasculares. As camadas de células mais internas do mesocarpo são maiores que aquelas mais próximas ao epicarpo e apresentam aspecto esponjoso, devido ao arranjo frouxo das células. O endocarpo possui uma camada única de células com estômatos e se mantém papiloso na região da placenta.

Estádio II (Fig. 7d)

O epicarpo do fruto jovem não sofre muitas alterações, sendo constituído por uma camada de células, recoberta por uma cutícula ornamentada e redução no número de tricomas tectores. No mesocarpo observou-se um aumento no número de camadas e no tamanho das células devido às divisões celulares e ao alongamento celular que é a principal alteração anatômica desse estádio. Além disso, notou-se um espessamento das paredes periclinais das células parenquimáticas logo abaixo do epicarpo. O endocarpo é formado por única camada de células. Nesta fase, de início de maturação do fruto, as células do mesocarpo adjacentes ao endocarpo começam a se afastar formando espaços intercelulares.

Estádio III (Fig. 7e)

O epicarpo do fruto maduro é constituído por uma camada de células com cutícula espessa. Neste estágio os tricomas são caducos e não são tão frequentes. No mesocarpo aumentam os espaços intercelulares devido à morte celular programada, evidenciada pela reação positiva ao teste TUNEL (Fig. 8) de modo que se formam lacunas a partir do endocarpo em direção ao epicarpo. O processo de amadurecimento e, conseqüente abertura do fruto, inicia-se por meio da desorganização da parede celular, seguido de obliteração das camadas de células. Dessa forma, é possível observar, em diferentes regiões do mesocarpo, eventos de afrouxamento que são responsáveis pela separação das células. Não há a formação de uma linha de deiscência. Os espaços intercelulares são formados nas regiões ao redor dos feixes vasculares e à medida que aumentam as lacunas, ocorre o rompimento do pericarpo de dentro para fora, na região entre duas costelas, onde não há feixes vasculares somente células parenquimáticas. Nesta fase, o endocarpo se desintegra e apenas na região papilosa é possível distinguir o formato das células.

Anatomia do fruto maduro

Os dados referentes às características anatômicas do fruto maduro de *P. capsularis*, *P. cervii*, *P. citrina* e *P. rubra* foram sumarizados na tabela 3 e apresentados de acordo com a divisão do pericarpo: epicarpo (Fig. 9), mesocarpo (Fig. 10) e endocarpo (Fig. 11) a fim de facilitar a comparação dos resultados.

Os testes histoquímicos revelaram a presença de idioblastos protéicos associados ao feixe vascular no mesocarpo (Fig. 12a). Já os idioblastos com conteúdo denso dispersos no mesocarpo indicaram a presença de compostos fenólicos (Fig. 12b), somente variando a quantidade dependendo da espécie. A parede celular corou no teste para polissacarídeos evidenciando a grande quantidade de compostos pécticos (Fig. 12c) e a cutícula reagiu positivamente aos testes para compostos lipofílicos (Fig. 12d).

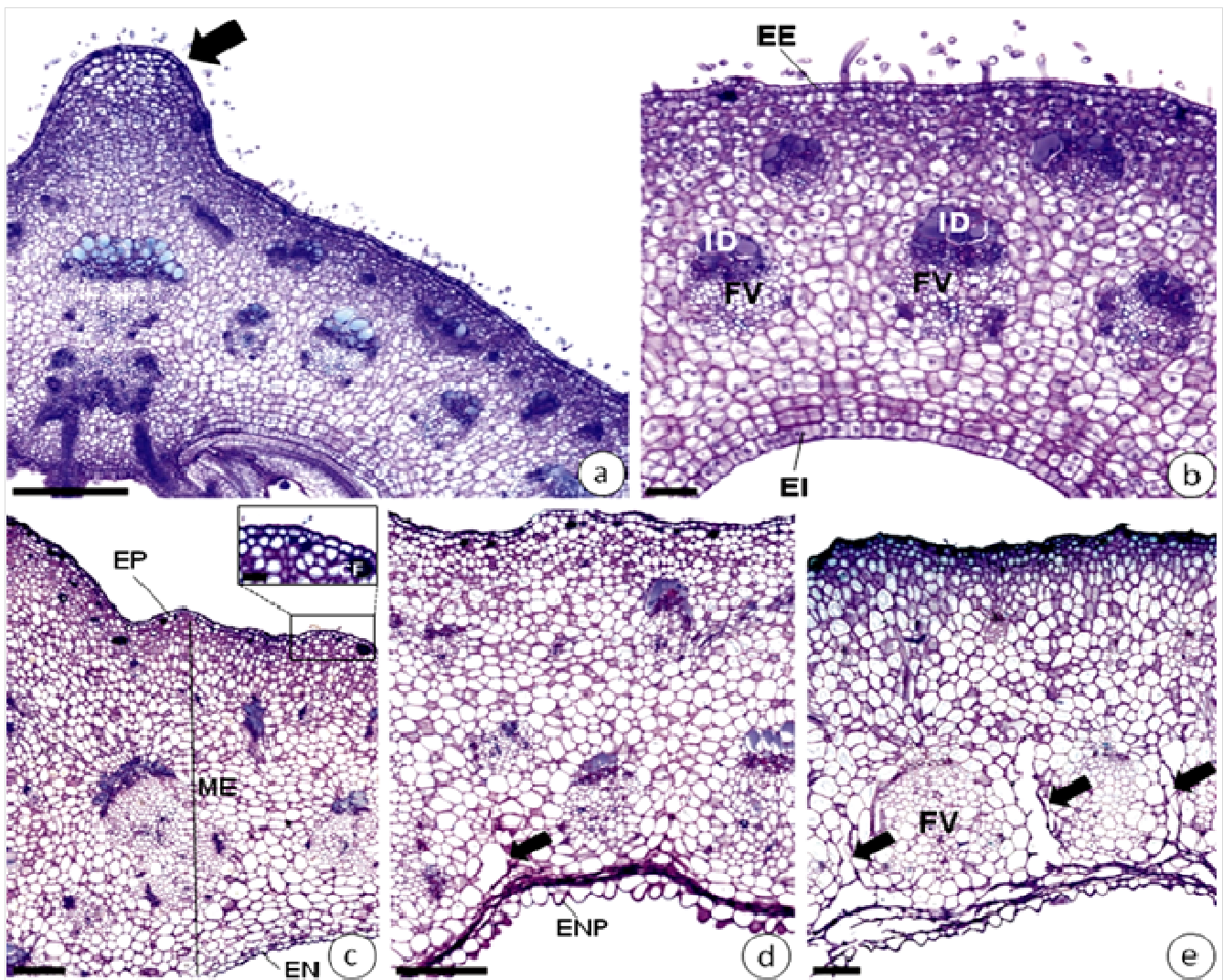


Figura 7: Ontogenia do fruto tipo cápsula de *Passiflora capsularis*. a-e. Secções transversais. a. Visão geral do ovário mostrando a região de uma costela (seta). b. Parede do ovário com epiderme externa (EE) e interna (EI) uniestratificadas. Notar os idioblastos (ID) densos associados ao floema do feixe vascular (FV). c. Estádio I. Pericarpo composto de três regiões: epicarpo (EP), mesocarpo (ME) e endocarpo (EN). Detalhe do epicarpo com tricomas (“inset”) e idioblastos ricos em compostos fenólicos (CF) abaixo do epicarpo. d. Estádio II. Aumento do número de camadas no pericarpo e aumento dos espaços intercelulares próximos ao endocarpo (seta). Notar as células papilosas do endocarpo (ENP). e. Estádio III. Formação de fendas (setas) ao redor do feixe vascular (FV) que irão promover a abertura do fruto. Escalas: a,c,d,e = 200 μm ; b = 50 μm ; “inset” c = 5 μm .

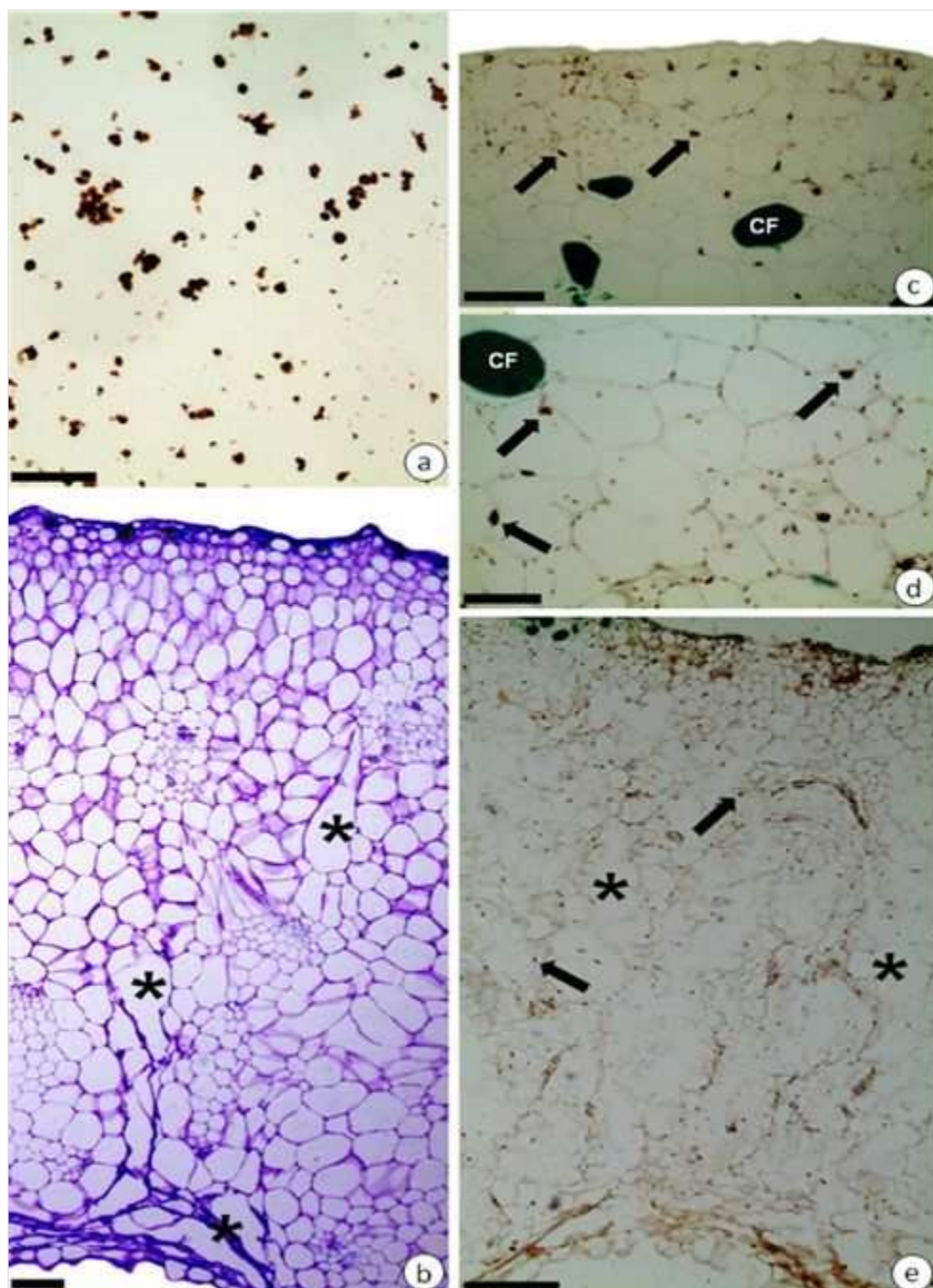


Figura 8: Teste TUNEL aplicado no último estágio de desenvolvimento dos frutos de *Passiflora capsularis* (b,e) e *P. citrina* (c,d). a. Controle positivo – lâmina do Kit. b. Corte anatômico da visão geral do pericarpo ilustrando os espaços intercelulares (*). c. Células do mesocarpo com núcleo corado (setas). d. Reação positiva para algumas células presentes no mesocarpo (setas). e. Teste positivo em algumas células do pericarpo (setas). Notar os espaços intercelulares (*). CF: composto fenólico. Escalas a,c= 50 μ m; b = 200 μ m; d = 25 μ m e = 250 μ m.

Tabela 3: Análise comparativa do pericarpo do fruto maduro de espécies de *Passiflora*.

Espécie	Tecido	Epicarpo	Mesocarpo	Endocarpo
<i>Passiflora capsularis</i>		Uniestratificado com estômatos, lenticela e tricomas tectores unicelulares - Cutícula espessa (Fig. 9a,b)	- 3-6 camadas de células parenquimáticas compactas próximas ao epicarpo (Fig. 10a) - Idioblastos associados ao feixe vascular - Compostos fenólicos próximos ao epicarpo (fig. 9a) - Idioblastos contendo drusas (Fig. 10a) - Espaços intercelulares próximo ao endocarpo (Fig. 10a)	Uniestratificado com estômatos - Cutícula pouco espessada (Fig. 11a)
<i>Passiflora cervii</i>		Uniestratificado com estômatos e tricomas tectores unicelulares - Cutícula espessa	- 3-6 camadas de células parenquimáticas compactas próximas ao epicarpo - Idioblastos associados ao feixe vascular - Compostos fenólicos próximos ao epicarpo - Idioblastos contendo drusas - Espaços intercelulares próximo ao endocarpo	Uniestratificado com estômatos - Cutícula pouco espessada
<i>Passiflora citrina</i>		Uniestratificado com estômatos e tricomas tectores multicelulares - Cutícula ornamentada (Fig. 9c)	- 2-4 camadas de células parenquimáticas compactas próximas ao epicarpo (Fig. 10b) - Idioblastos associados ao feixe vascular - Compostos fenólicos próximos ao epicarpo (Fig. 9c) e ao endocarpo (Fig. 10b) - Espaços intercelulares próximo ao endocarpo (Fig. 10b)	Uniestratificado com estômatos - Cutícula espessa (Fig. 11b)
<i>Passiflora rubra</i>		Uniestratificado com estômatos e tricomas tectores multicelulares - Cutícula espessa (Fig. 9d)	- 5-6 camadas de células parenquimáticas compactas próximas ao epicarpo (Fig. 10c) - Idioblastos associados ao feixe vascular - Muitos compostos fenólicos dispersos (Fig. 10c) - Espaços intercelulares próximo ao endocarpo (Fig. 11c)	Uniestratificado com estômatos - Cutícula espessa (Fig. 11c)

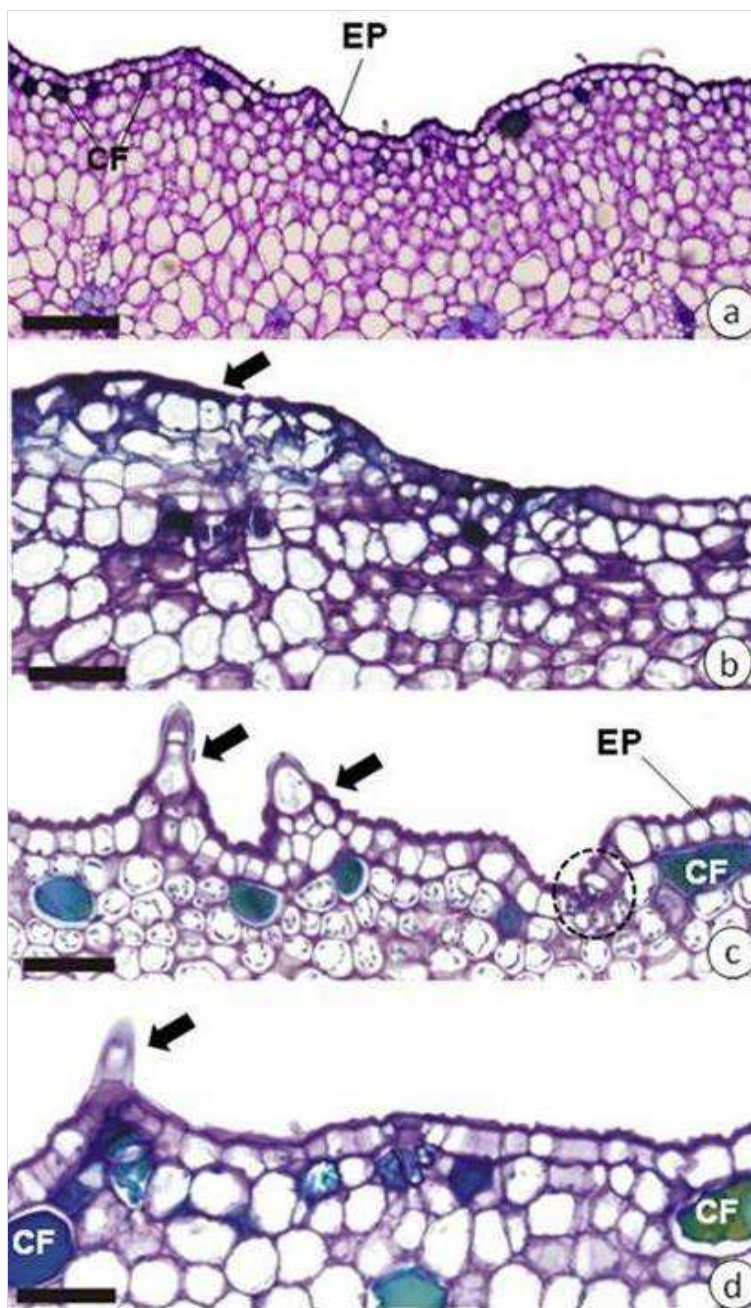


Figura 9: Secções transversais do fruto maduro de quatro espécies de *Passiflora*. Epicarpo uniestratificado e com cutícula espessa em todas as espécies. a-b. *P. capsularis*. a. Epicarpo (EP) com tricomas tectores. Compostos fenólicos (CF) próximos ao epicarpo foram observados. b. Presença de uma lenticela (seta). c. *P. citrina*. Tricomas multicelulares (setas) e estômato (destaque) presentes. Compostos fenólicos (CF) abaixo do epicarpo (EP). d. *P. rubra*. Epicarpo com tricoma (seta). Notar grande quantidade de idioblastos com compostos fenólicos (CF) abaixo do epicarpo. Escalas: a,c,d = 50 µm; b = 100 µm.

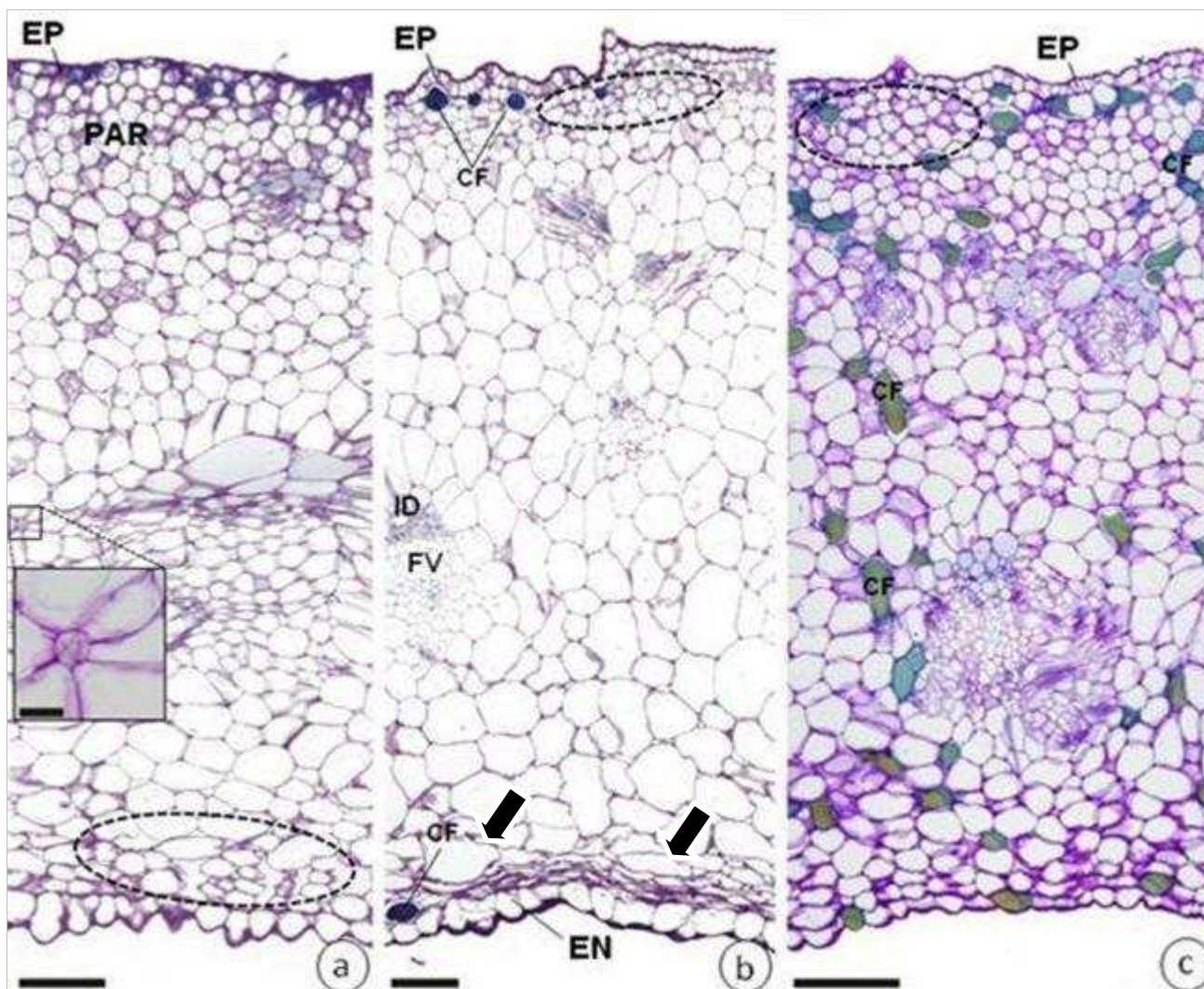


Figura 10: Anatomia do mesocarpo de frutos maduros do tipo cápsula. a-c. Secções transversais. a. *Passiflora capsularis*. Presença de 3-6 camadas de células parenquimáticas (PAR) compactas próximas ao epicarpo (EP), cristais do tipo drusas (“inset”) e espaços intercelulares (destaque) próximo ao endocarpo (EN). b. *P. citrina*. 2-4 camadas de células parenquimáticas compactas (destaque), idioblastos (ID) associados ao feixe vascular (FV) e compostos fenólicos (CF) próximos ao epicarpo (EP) e ao endocarpo (EN). Notar os espaços intercelulares (setas) próximos ao endocarpo. c. *P. rubra*. Mesocarpo apresenta 5-6 camadas de células parenquimáticas compactas (destaque) próximas ao epicarpo (EP) e muitos compostos fenólicos (CF) dispersos. Escalas: a,b = 125 µm; “inset” a = 10 µm; c = 100 µm.

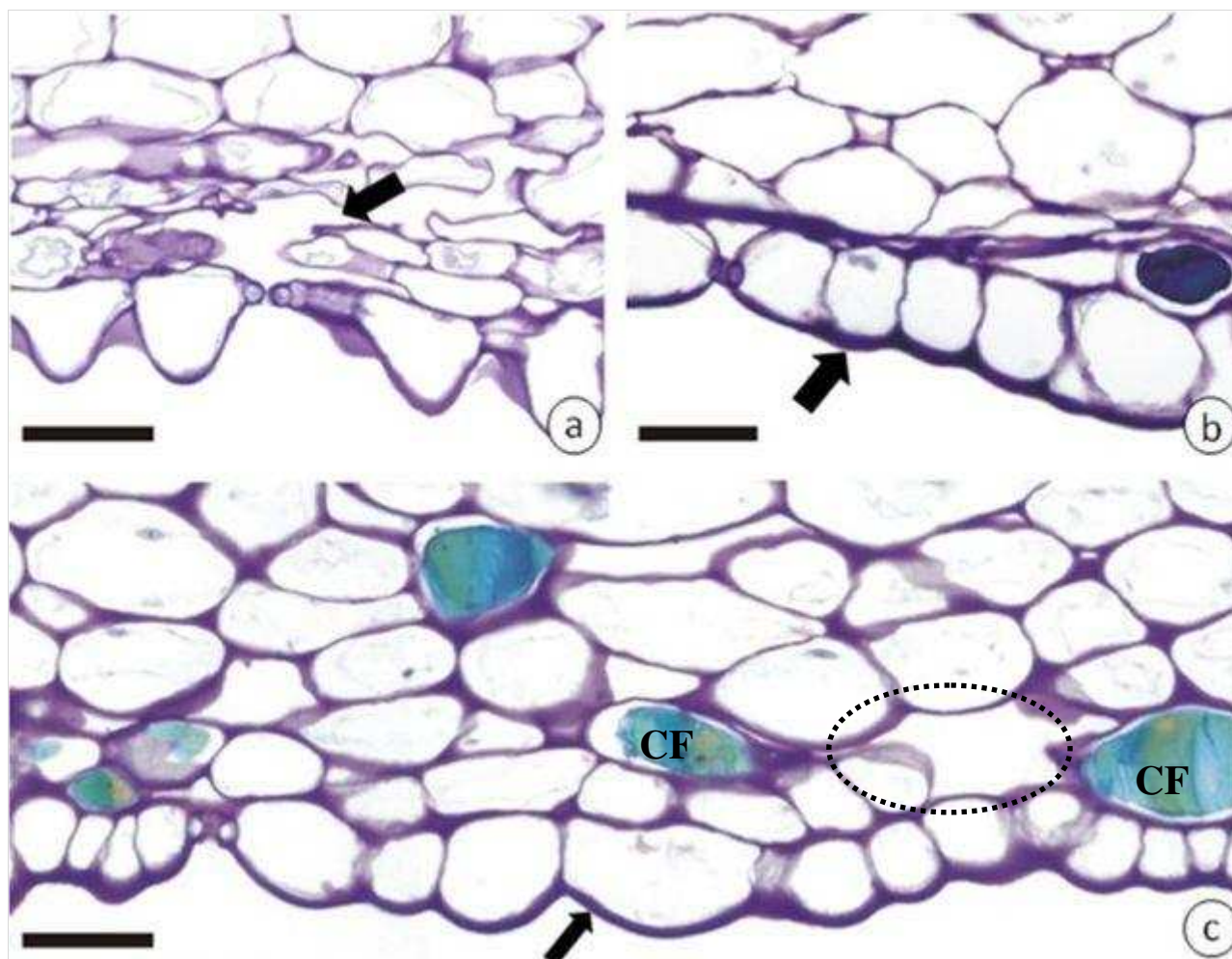


Figura 11: Secções transversais mostrando com detalhe o endocarpo uniestratificado com estômatos das espécies estudadas. a. *Passiflora capsularis*. Notar os espaços intercelulares (seta) próximos ao endocarpo. b. *P. citrina*. Notar a cutícula espessa (seta). c. *P. rubra*. Cutícula espessa (seta) e compostos fenólicos (CF) próximos ao endocarpo. Observar o espaço intercelular (destaque). Escalas = 50 μm .

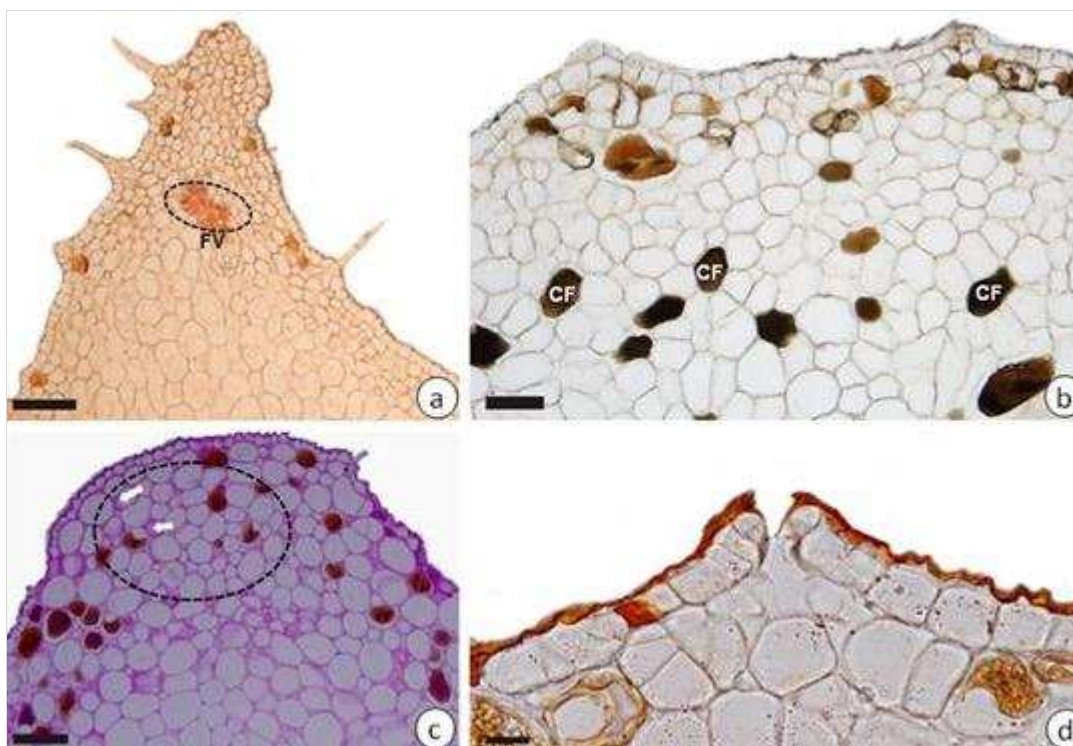


Figura 12: Testes histoquímicos para Xylidine Ponceau (a), Cloreto Férrico (b), PAS (c) e Sudan IV (d) no fruto de *Passiflora citrina* (a), *P. rubra* (b,d) e *P. capsularis* (c). a-d. Secções transversais. a. Idioblastos contendo proteínas (destaque) associados ao feixe (FV) no mesocarpo. b. Idioblastos com compostos fenólicos (CF) espalhados no mesocarpo. c. Conjunto de células (destaque) com parede espessa (setas) na região da costela do fruto. d. Detalhe do epicarpo com estômato evidenciando a reação positiva para substâncias lipofílicas na cutícula. Escalas: a = 200 μm ; b = 50 μm ; c = 100 μm ; d = 20 μm .

DISCUSSÃO

A ontogenia de frutos de espécies de *Passiflora* não é descrita na literatura e este trabalho apresenta a primeira descrição anatômica de frutos deste gênero.

Nos frutos das espécies de *Passiflora* estudadas foi possível estabelecer estádios ontogenéticos devido aos processos de diferenciação do pericarpo. Segundo Souza (2003) as fases de desenvolvimento do fruto são estabelecidas devido à divisão, expansão ou alongamento das células e maturação celular. Corroborando os dados da literatura, o desenvolvimento das cápsulas ocorreu em três etapas: divisão, alongamento e maturação das células do pericarpo.

Nos estádios iniciais do desenvolvimento dos frutos das espécies incluídas no presente estudo, foram encontradas camadas de células com características peculiares de divisão celular como citoplasma denso e núcleo evidente. Segundo Souza (2003), o desenvolvimento do ovário formando o fruto envolve intensa atividade meristemática que varia para cada espécie, conforme a fase de crescimento. Nas espécies de *Passiflora* estudadas e em frutos do tipo legume as divisões celulares são intensas após a abertura da flor. Por outro lado, em *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (Apocynaceae), por exemplo, intensas divisões celulares ocorrem no ovário em pré-antese (Souza 2003).

O período de divisão celular é seguido pelo alongamento das células, que no caso do fruto das espécies de *Passiflora*, ocorre no mesocarpo. Esse processo é marcado pelo aumento de volume dos vacúolos devido à captação de água e pelo espessamento da parede celular (Roth 1977).

O processo de maturação dos frutos envolve, principalmente, mudanças químicas da parede e do conteúdo das células, perda significativa de água e pequenas alterações anatômicas (Souza 2006). No último estágio de desenvolvimento do fruto tipo cápsula das espécies de *Passiflora*, a mudança mais significativa está relacionada à formação de espaços intercelulares devido à morte celular programada facilitando a abertura do fruto.

Morte celular programada (PCD) é um processo ativo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para os mecanismos de desenvolvimento e defesa (Gunawardena *et al.* 2005; Grivicich *et al.* 2007; Reape *et al.* 2008). Tem sido definida como uma sequência de eventos (potencialmente passíveis de interrupção) que levam à destruição controlada e organizada da célula (Lockshin & Zakeri 2004).

O processo de morte celular atuando na abertura das cápsulas de *Passiflora* também foi observado participando da deiscência de frutos de *Brassica napus* L. (Meakin & Roberts 1990) e de *Arabidopsis* (DC.) Heynh. (Gómez *et al.* 2014). Outros exemplos de estudos de PCD em plantas incluem diferenciação dos elementos traqueais (Fukuda 1997), aborto de primórdios de estames em flores pistiladas (Cheng *et al.* 1983; Calderon-Urrea & Dellaporta 1999), formação de aerênquima lisígeno (Gunawardena *et al.* 2001), morfogênese da folha (Gunawardena *et al.* 2004, 2005, 2006, 2007), formação de glândulas na folha (Liu *et al.* 2010), formação de cavidades secretoras (Rodrigues *et al.* 2011) e de laticíferos (Zhou & Liu 2011). Contudo, como ocorreu morte das células ao acaso e não somente entre as costelas que é por onde se rompe o pericarpo das cápsulas de *Passiflora*, pode-se

concluir que nesse caso o processo de morte celular programada apenas auxiliou o mecanismo de deiscência do fruto.

Os mecanismos de deiscência estão baseados, em geral, em movimentos de tecidos vivos ou mortos sendo que dois tipos fundamentais podem ocorrer: o higroscópico e o de turgor. Os higroscópicos dependem, geralmente, do encolhimento ou distensão de paredes secundárias de células mortas, enquanto o de turgor funciona com células vivas, de paredes elásticas (Roth 1977). Com base nos resultados encontrados para *Passiflora*, ainda que os tecidos encontrados no pericarpo das cápsulas não apresentaram parede secundária, inferiu-se que o modo de abertura desses frutos seja do tipo higroscópico, visto que no seu processo de maturação ocorreu encolhimento das paredes formando espaços intercelulares. Porém, análises ultraestruturais se tornam necessárias para melhor compreensão das alterações que ocorrem como consequência da morte programada das células.

Embora os frutos do tipo cápsula das espécies da seção *Xerogona* representem uma condição incomum em Passifloraceae cujos frutos são comumente do tipo baga, o pericarpo dos dois tipos de fruto desenvolve-se de forma semelhante apresentando três regiões: epicarpo correspondente a uma epiderme externa (às vezes com camadas subepidérmicas), mesocarpo que pode se diferenciar em diversas camadas especializadas, e endocarpo geralmente uniestratificado, representado pela epiderme interna (Roth 1977). Diferenças no tamanho e no arranjo das células parenquimáticas que compõem o mesocarpo dos frutos maduros, maiores e apresentando arranjo frouxo à medida que se aproximam do endocarpo, foi também observada no pericarpo de bagas de espécies de *Solanum* L. (Chiarini & Barboza 2008). Entretanto, as células do pericarpo dos frutos do tipo baga são geralmente maiores que aquelas presentes no pericarpo das cápsulas (Roth 1977). Dessa forma, estas características não são úteis para distinguir os dois tipos de frutos.

Os tricomas tectores com diferentes formatos observados na epiderme externa do ovário e no epicarpo como apêndices de todas as espécies estudadas de *Passiflora*, normalmente estão associados com a redução da transpiração e ocorrem especialmente em estruturas jovens quando as paredes externas das células epidérmicas são ainda delicadas e não são revestidas por uma cutícula espessa (Roth 1977).

A periderme também pode fazer parte do epicarpo maduro, comumente sob forma de lenticela. Assim como em *Passiflora capsularis*, lenticelas também foram registradas nos frutos de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) e de *Guarea kunthiana* A. Juss. (figo-do-mato) (Souza 2006).

A presença de lenticelas no epicarpo maduro pode ocorrer originada pela atividade meristemática de tecido subepidérmico (Souza 2003). A localização das lenticelas abaixo dos estômatos em *Passiflora* também foi vista em espécies de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Gomes 2008). Dessa forma, sugere-se que haja uma conexão entre estômatos e lenticelas. A ocorrência destas estruturas nos frutos independe da expansão dos tecidos em decorrência do crescimento, conforme apontado por Roth (1977), mas ainda não há clareza da função de estômatos e lenticelas em frutos.

Os compostos fenólicos encontrados dispersos no mesocarpo dos frutos das espécies de *Passiflora* são considerados um tipo de defesa química contra a herbivoria (Swain 1979) por tornarem os frutos, muitas vezes, impalatáveis quando imaturos. Entre as defesas apresentadas por espécies de *Passiflora* destacam-se aquelas classificadas como constitutivas: presença de antocianinas – em que o estímulo para sua produção é a intensidade de luz solar – e adaptações morfológicas, como tricomas tectores.

Ainda no mesocarpo das espécies da seção *Xerogona* destacou-se a presença de cristais de oxalato de cálcio (drusas) isolados ou em pequenos grupos. A natureza química, a morfologia e a localização dos cristais no corpo da planta podem ser específicos e particularmente interessantes para trabalhos taxonômicos (Judd *et al.* 2009; Webb 1999). A deposição do oxalato de cálcio em forma de cristais pode ter evoluído como um mecanismo primário para controlar o excesso de cálcio em muitas plantas, provendo múltiplos benefícios para os diferentes órgãos e protegendo-os. Estudos de genética molecular oferecem oportunidades adicionais para identificar fatores celulares que afetam a cristalização de oxalato de cálcio, incluindo os genes especificamente expressos em células formadoras de cristais (Webb 1999).

O endocarpo de frutos do tipo cápsula é normalmente esclerenquimático enquanto em frutos do tipo baga é composto por células epidérmicas de parede primária (Souza 2006). No entanto, o endocarpo de todas as espécies de *Passiflora* estudadas apresentou apenas células epidérmicas com parede primária. A presença de um endocarpo fibroso e lignificado está diretamente relacionada ao mecanismo de deiscência dos frutos. Entretanto, nas cápsulas carnosas de *P. capsularis*, *P. cervii*, *P. citrina* e *P. rubra* a ausência desse tecido, bem como uma abertura de maneira atípica sem a formação de uma linha de deiscência – diferindo das cápsulas secas que apresentam deiscência definida por fendas longitudinais (Souza 2003) - sugerem que apenas o processo de morte celular programada participa do mecanismo de deiscência das cápsulas.

A análise da abertura do fruto cápsula de *Passiflora* envolvendo o processo de morte celular representa um dado inédito para a família. Pouco se sabe a respeito do estímulo para que esse processo ocorra, uma vez que houve marcação positiva em várias células do pericarpo de maneira aleatória nos frutos estudados. Sugere-se que no caso das cápsulas carnosas a morte das células ocorra devido à senescência, uma vez que a abertura do fruto ocorre na etapa final do seu desenvolvimento.

As cápsulas carnosas de *Passiflora capsularis*, *P. cervii*, *P. citrina* e *P. rubra* representam um dos poucos casos de frutos carnosos que se abrem. Outro exemplo é o fruto de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), uma cápsula carnosa deiscente de coloração amarelo-alaranjado, apresentando sementes envolvidas por um apêndice carnoso comestível, de cor vermelha (Daleffi Zocoler *et al.* 2006). Espécies da família Meliaceae (*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., *Guarea kunthiana* e *Trichilia catigua* A. Juss.) também apresentam cápsulas carnosas deiscentes. No entanto, em *Guarea kunthiana* o endocarpo é lignificado e participa ativamente no processo de abertura do fruto maduro (Dias-Pinto *et al.* 2003).

As informações encontradas neste estudo revelam que as características anatômicas do fruto são bastante conservadas e unificadoras na seção *Xerogona*. Além disso, as peculiaridades encontradas para cada espécie estudada não influenciam na descrição dos caracteres analisados. Portanto, o estudo anatômico de frutos é de grande valia para a criação de um sistema de classificação mais natural, pois são unidades relativamente conservadas filogeneticamente (Roth 1977).

Diante do exposto, destaca-se a importância de novos estudos abrangendo mais espécies incluídas nos outros subgêneros de *Passiflora* além de abordar a evolução de caracteres e a inclusão de outros novos para facilitar a elucidação das relações infragenéricas do grupo.

Agradecimentos

À Fapesp (processos números 2011/18234-2 e 2010/01779-3) pelo suporte financeiro. À Dra. Tatiane Maria Rodrigues (Unesp – Botucatu) pelo auxílio na interpretação das lâminas obtidas no teste Tunel, à Ana Silvia Garcia e Elton Luiz Scudeler do departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu pela ajuda na realização do teste Tunel e à Bárbara Biazotti pelo auxílio na aquisição das imagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. 1976. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa, The Yowa State University Press. 334p.
- BREMER, B.; ERIKSSON, O. 1992. Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. **Biological Journal of the Linnean Society** 47: 79-95.
- BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSON, D. 1995. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on the *rbc* L sequence data. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 82: 383-397.
- CALDERON-URREA, A.; DELLAPORTA, S. 1999. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. **Development** 126: 435-441.
- CHENG, P.C.; GREYSON, R.I.; WALDEN, D.B. 1983. Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. **American Journal of Botany** 70: 450-462.
- CHIARINI, F.E.; BARBOZA, G.E. 2008. Fruit anatomy of species of *Solanum* sect. *Acantophora* (Solanaceae). **Flora** 204: 146-156.
- CLAUSING, G.; MEYER, K.; RENNER, S.S. 2000. Correlations among fruit traits and evolution of different fruits within Melastomataceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 133: 303-326.
- CUTLER, D.F.; BOTH, T.; STEVENSON, D.W. 2008. **Plant anatomy: An applied approach**. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA. 312p.
- DALEFFI ZOCOLER, A.M.; MATHIAS MOURÃO, K.S.; PALAZZO-DE-MELLO, J.C.; MARQUES, L.C. 2006. Contribuição ao Controle de qualidade farmacognóstico das folhas e caules de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense** 25: 22-7.

DAVID, R.; CARDE, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris, série D** 258: 1338-1340.

DIAS-PINTO, D.; MOURÃO, K.S.M.; SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S. 2003. Morfo-anatomia do fruto e da semente em desenvolvimento de *Guarea macrophylla* Vahl. (Meliaceae). **Acta Cientifica Venezolana** 54 (4): 238-246.

DORNELAS, M.C.; FONSECA, T.C.; RODRIGUEZ, A.P.M. 2006b. Brazilian passionflowers and novel passionate tropical flowering gems. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology** (IV): 630-640.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2007. Passifloraceae. kubitzki, K. (Ed.) The families and genera of vascular plants. **Springer Berlin Heidelberg** 9: 270-281.

FUKUDA, H. 1997. Tracheary element differentiation. **The Plant Cell** 9: 1147-1156.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. 1969. **Histochimie normale et pathologique**. Paris: Gauthier – Villars, v. 1, 1904p.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Cell Biology** 119 (3): 493-501.

GERRITS, P.O; SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal Microscopy** 95: 150-155.

GIVNISH, T.J.; PIRES, J.C.; GRAHAM, S.W.; MCPHERSON, M.A.; PRINCE, L.M.; PATTERSON, T.B.; RAI, H.S.; ROALSON, E.H.; EVANS, T.M.; HAHN, W.J.; MILLAM, K.C.; MEEROW, A.W.; MOLVRAY, M.; KORES, P.J.; O'BRIEN, H.E.; HALL, J.C.; KRESS, W.J.; SYTSMA, K.J. 2005. Repeated evolution of net venation and fleshy fruits among monocots in shaded habitats confirms *a priori* predictions: Evidence from *ndhF* phylogeny. **Proceedings of the Royal Society, B, Biological Sciences** 272: 1481-1490.

GIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. 2007. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia** 53 (3): 335-343.

GOMES, S.M. 2008. Morfo-anatomia de frutos secos em espécies de Apocynaceae: significado ecológico e evolutivo. **Acta Botanica Brasilica** 22: 521-534.

GÓMEZ, M.D.; VERA-SIRERA, F.; PÉREZ-AMADOR, M.A. 2014. Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits. **Journal of experimental Botany**. eru093, p.1-12.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; PEARCE, D.M.; JACKSON, M.B.; HAWES, C.R.; EVANS, D.E. 2001. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta** 212: 205-214.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; GREENWOOD, J.S.; DENGLER, N.G. 2004. Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during leaf development. **The Plant Cell** 16: 60-73.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; SAULT, K.; DONNELLY, P.; GREENWOOD, J.S.; DENGLER, N.G. 2005. Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua*. **Planta** 221: 607-618.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; NAVACHANDRABALA, C. KANE, M.; DENGLER, N.G. 2006. Lace plant: a novel system for studying developmental programmed cell death. In: DA SILVA, J.A.T. ed. **Floriculture, ornamental and plant biotechnology advances and topical issues**. Middlesex, UK: Global Science Books Ltd, 157-162.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; GREENWOOD, J.S.; DENGLER, N.G. 2007. Cell wall degradation and modification during programmed cell death in lace plant, *Aponogeton madagascariensis* (Aponogetonaceae). **American Journal of Botany** 94: 1116-1128.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Book Co, New York. 523p.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético**. 3 ed. Porto Alegre, ArtMed. 632p.

KNAPP, S. 2002. Tobacco to tomatoes: A phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. **Journal of Experimental Botany** 53: 2001-2022.

KROSNICK, S.E.; PORTER-UTLEY, K.E.; MACDOUGAL, J.M.; JØRGENSEN, P.M.; MCDADE, L.A. 2013. New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic relationships and morphological synapomorphies. **Systematic Botany** 38 (3): 692-713.

LILLIE, R.D. 1965. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3 ed., McGraw-Hill, New York. 751p.

LIU, M.; SHI, L.; WYK, B.V.; TILNEY, P.M. 2003. Fruit anatomy of the genus *Bupleurum* (Apiaceae) in northeastern China and notes on systematic implications. **South African Journal of Botany** 69: 151-157.

LIU, M.; PLUNKETT, G.M.; LOWRY II, P.P. 2010. Fruit anatomy provides structural synapomorphies to help define Myodocarpaceae (Apiales). **Systematic Botany** 35: 675-681.

LIU, W.Z.; ZHOU, Y.F.; WANG, X.; JIAO, Z.J. 2010. Programmed cell death during pigment gland formation in *Gossypium hirsutum* leaves. **Plant Biology** 12: 895-902.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 36: 2405–2419.

MARTINS, M.A.G.; OLIVEIRA, D.M.T. 2001. Morfo-anatomia e ontogênese do fruto e da semente de *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Fabaceae: Faboideae). **Revista Brasileira de Botânica** 24 (1): 109-121.

MCMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** 23: 99-108.

MEAKIN, P.J.; ROBERTS, J.A. 1990. Dehiscence of fruit in oilseed rape (*Brassica napus* L.). I. Anatomy of pod dehiscence. **Journal of Experimental Botany** 41: 995-1002.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. 1980. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher-FUNCAMP. 69p.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 368-373.

OGANEZOVA, G.G. 1990. Seed and fruit anatomy of some Amaryllidaceae in connection with their systematics and phylogeny. **Botanicheskii Zhurnal** 75: 615-630.

PABÓN-MORA, N.; LITT, A. 2011. Comparative anatomical and developmental analysis of dry and fleshy fruits of Solanaceae. **American Journal of Botany** 98 (9): 1415-1436.

PAK, J.H.; PARK, J.K.; WHANG, S.S. 2001. Systematic implications of fruit wall anatomy and surface sculpturing of *Microseris* (Asteraceae, Lactuceae) and relatives. **International Journal of Plant Sciences** 162: 209-220.

- PEARSE, A.G.E. 1980. **Histochemistry theoretical and applied preparative and optical technology**. 4. ed. Edinburgh, Churchill Livingstone. 728p.
- REAPE, T.J.; MOLONY, E.M.; MCCABE, P.F. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. **Journal of Experimental Botany** 59: 435-444.
- RODRIGUES, T.M.; SANTOS, D.C.; MACHADO, S.R. 2011. The role of the parenchyma sheath and PCD during the development of oil cavities in *Pterodon pubescens* (Leguminosae-Papilionoideae). **Comptes Rendus Biologies** 334: 535-543.
- ROTH, I. 1977. **Fruits of Angiosperms**. Berlin: Gebrüder Borntraeger. 675p.
- SASS, J.E. 1951. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames, Iowa State College Press. 228p.
- SOUZA, L.A. 2003. **Morfologia e anatomia vegetal (célula, tecidos, órgãos e plântula)**. Ponta Grossa: Editora da Universidade Estadual de Ponta Grossa. 259p.
- SOUZA, L.A. 2006. **Anatomia do fruto e da semente**. Ponta Grossa: UEPG. 200p.
- SOUZA, A.; MOURÃO, K.S.M.; SOUZA, L.A. 2005. Morfologia e anatomia do fruto e da semente em desenvolvimento de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 28 (4): 745-754.
- SPJUT, R.W. 1994. **A systematic treatment of fruit types**. Memoirs of the New York Botanical Garden, v.70, 181p.
- SWAIN, T. 1979. Tannins and lignins. In: ROSENTHAL, G.A.; JANZEN, D.H (Eds). **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. Academic Press, New York, p. 657-674.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. 2004. **Passiflora: passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, Cambridge. 430p.

WEBB, M.A. 1999. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. **The Plant Cell** 11: 751-761.

ZHOU, Y.F.; LIU, W.Z. 2011. Laticiferous canal formation in fruits of *Decaisnea fargesii*: a programmed cell death process? **Protoplasma** 248: 683-694.

CAPÍTULO 2

Morfo-anatomia da semente e ontogenia dos tegumentos em espécies do gênero *Passiflora*, seção *Xerogona* (Passifloraceae)

Milani, J.F.; Vilarta, M.R.; Carmello-Guerreiro, S.M.

RESUMO

O estudo de sementes em espécies pertencentes à família Passifloraceae normalmente é focado em trabalhos de fisiologia. Diante desse fato, este trabalho teve como objetivo caracterizar a morfo-anatomia das sementes de quatro espécies do gênero *Passiflora* subgênero *Decaloba* superseção *Decaloba* seção *Xerogona*, bem como elucidar o seu processo de desenvolvimento por meio de estudos anatômicos, histoquímicos e de superfície. As sementes são levemente achatadas e apresentam ornamentações. Os óvulos são anátropos e bitegumentados. Na semente jovem, a testa é constituída de duas camadas: exotesta e endotesta. O tégmen é composto por três camadas: exotégmen, mesotégmen e endotégmen. Nesta fase foi observado o arilo de origem funicular formado por células parenquimáticas, que recobre parcial ou totalmente a semente. Os testes histoquímicos revelaram a presença de compostos fenólicos e grãos de amido dispersos no arilo. Durante o desenvolvimento das sementes ocorre o alongamento diferencial dos tegumentos, formando sulcos que resultam em um endoperma ruminado. Na semente madura, o tegumento externo origina a sarcotesta e o exotégmen constitui a camada mecânica formada por macroesclereídes em paliçada. O mesotégmen e o endotégmen encontram-se comprimidos e apresentam deposição de compostos fenólicos. As características anatômicas das sementes relatadas neste trabalho são muito semelhantes evidenciando um padrão no grupo.

Palavras-chave: desenvolvimento, semente ruminada, macroesclereídes

ABSTRACT

The study of seeds in species of Passifloraceae is usually focused in physiology works. Given that, this study aimed to characterize the morphology and anatomy of seeds of four species of *Passiflora* genus *Decaloba* subgenus *Decaloba* supersection *Xerogona* section, as well as to elucidate its development process through anatomical, histochemical and surface studies. The seeds are slightly flattened and have surface ornamentation. The ovules are anatropous and bitegmic. In young seed, testa consists of

two layers: exotesta and endotesta. The tegmen is composed of three layers: exotegmen, mesotegmen and endotegmen. At this stage, the aryl of funicular origin formed by parenchyma cells, partially or completely covering the seed, was observed. The histochemical tests revealed the presence of phenolic compounds and starch grains dispersed in the aryl. During seed development the differential tegument elongation occurs, forming sulcus that results in a ruminated endosperm. In mature seed, the outer integument originates sarcotesta and exotegmen is the mechanical layer formed by macrosclereids in palisade. The mesotegmen and endotegmen are compressed and deposition of phenolic compounds are present. The anatomical characteristics of seeds reported in this work are very similar showing a pattern in the group.

Keywords: development, ruminated seed, macrosclereids

INTRODUÇÃO

Passifloraceae *sensu lato* contém atualmente três famílias: Passifloraceae *sensu stricto*, Turneraceae e Malesherbiaceae (APG III 2009). As relações entre os táxons infra-familiares estão bem definidas e estudos moleculares recentes, suportam Passifloraceae *s.l.* como um grupo claramente monofilético (Muschner *et al.* 2003; Soltis *et al.* 2007) bem como as três famílias incluídas nesse grupo (Tokuoka 2012). Passifloraceae *s.s.* cuja distribuição é tropical e subtropical apresenta uma impressionante diversidade de estruturas florais, resultado de relações com insetos herbívoros e polinizadores (Ulmer & MacDougal 2004).

Passiflora L. é o maior dos quatro gêneros de Passifloraceae *s.s.* ocorrentes no Brasil (Feuillet & MacDougal 2007) contando com aproximadamente 560 espécies (Krosnick *et al.* 2013). Divide-se em cinco subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast, *Decaloba* (DC.) Rchb., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Passiflora* L. e *Tetrapathea* (DC). P.S. Green (Krosnick *et al.* 2013).

Passiflora capsularis L., *P. cervii* Milward-de-Azevedo, *P. citrina* MacDougal, *P. rubra* L. e outras dez espécies pertencem à seção *Xerogona* (Raf.) Killip que está incluída no subgênero *Decaloba* superseção *Decaloba* (DC.) J.M. Macdougall & Feuillet. As espécies nesta seção apresentam em comum, frutos tipo cápsula, o que constitui uma exceção em *Passiflora*, cujos frutos comumente são do tipo baga (Ulmer & MacDougal 2004). As sementes das espécies pertencentes ao subgênero *Decaloba* são oblongas, elípticas ou obovadas e a testa foveolada ou irregularmente/transversalmente sulcada (Milward-de-Azevedo & Baumgratz 2004).

A semente funciona originalmente como um diásporo depois de ser liberada do fruto (Leins & Erbar 2010) e pode possuir diferentes atrativos, como o tamanho, o brilho, o contraste de cores, o odor e os materiais nutritivos que estão normalmente presentes em tecidos carnosos como na superfície da semente - a sarcotesta- e em um apêndice especial - o arilo (Werker 1997).

As sementes sarcotestais são geralmente dispersas por endozoocoria, sendo que o tegumento carnoso assume a mesma função de frutos carnosos indeiscentes ao tornar-se atrativo para o animal. Apesar da sarcotesta representar um potencial atrativo para a dispersão da semente por endozoocoria e sinzoocoria, quando se trata de frutos deiscentes, arilos suculentos contribuem consideravelmente para a sua dispersão principalmente na atração de formigas (Werker 1997). Em Passifloraceae, os arilos são comestíveis e fonte de suco dos maracujás (Souza *et al.* 2003), além de terem a função de recompensa alimentar para as formigas que dispersam a semente, já que constituem uma fonte secundária de proteínas para esses agentes dispersores (Passos & Oliveira 2004).

Embora trabalhos recentes tratem da morfo-anatomia de sementes em *Passiflora* (Pérez-Cortéz *et al.* 2002, 2005, 2009), estudos disponíveis sobre semente em espécies de Passifloraceae normalmente focam em trabalhos de fisiologia (Ferreira *et al.* 2002; Ferreira *et al.* 2005; Araújo *et al.* 2009). O conhecimento das estruturas da semente é de grande importância, por fornecer informações sobre germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura. (Kuniyoshi 1990). Além disso, a geração de dados morfo-anatômicos de sementes em *Passiflora* visa a acrescentar conhecimento a essa área pouco estudada.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar a morfologia externa e interna das sementes de quatro espécies pertencentes à seção *Xerogona*, cujo fruto é do tipo cápsula, além de elucidar a ontogenia dos tegumentos seminais dessas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material utilizado foi proveniente de plantas cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas - SP. Foram coletados óvulos da flor em antese e sementes de *Passiflora capsularis*, *P. cervii*, *P. citrina* e *P. rubra* em diferentes estádios, que foram estabelecidos com base no tempo de desenvolvimento em dias do

fruto de cada espécie. O material testemunha está depositado no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) – Tabela 1.

Tabela 1: Espécies de Passifloraceae selecionadas para o presente estudo

Espécie	Coletor	Número
<i>Passiflora capsularis</i> L.	M. Dornelas 15	UEC 153239
<i>Passiflora citrina</i> MacDougal	M. Dornelas 9	UEC153234
<i>Passiflora cervii</i> Milward-de-Azevedo	J.F.Milani 1	UEC181376
<i>Passiflora rubra</i> L.	M. Dornelas 18	UEC 154643

A descrição morfológica dos exemplares foi feita por observações diretas e em estereomicroscópio. A documentação deste estudo foi por fotos digitais realizadas em estereomicroscópio Leica modelo MSV266 com o aumento em escala demonstrativa.

Estudo anatômico

O material coletado foi fixado em FAA (Formaldeído, Ácido Acético, etanol 50%; 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940) ou em FNT - Formalina Neutra Tamponada - por 48 horas (Lillie 1965), desidratado em série etanólica e estocado em etanol 70%. Para estudo anatômico, o material foi incluído em resina plástica (Historesin® Leica) de acordo com a técnica de Gerrits & Smid (1983) seguindo as recomendações do fabricante. Após a inclusão, os materiais foram montados e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo manual com navalha descartável de tungstênio, na espessura de 8 µm a 10µm. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964), as lâminas montadas temporariamente em água e as imagens obtidas com câmera digital (Olympus DP71) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BX51).

Testes histoquímicos

Secções de material emblocado em resina de *Passiflora capsularis*, *P. citrina* e *P. rubra* foram submetidas aos seguintes tratamentos: Sudan IV (Pearse 1980) para detecção de lipídios totais; Lugol (Berlyn & Miksche 1976) para amido; Cloreto de Ferro III 10% (Johansen 1940) para compostos fenólicos; PAS (McManus 1948) para polissacarídeos totais; Vermelho de Rutênio (Johansen 1940) para substâncias pécticas; Acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés

1969); Reagente de Nadi para óleos essenciais e óleo resina (David & Carde 1964) e Xylidine Ponceau (Mello & Vidal 1980) para proteínas. Os resultados foram registrados por meio de imagens capturadas com câmera digital (Olympus DP71) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BX51). Os testes não foram realizados para *P. cervii* uma vez que as características anatômicas estudadas nessa espécie são idênticas às de *P. capsularis*.

Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização do exame de superfície em microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras de sementes maduras foram dissecadas e fixadas em FAA 50 (Johansen 1940), desidratadas em série etanólica até álcool 100%, submetidas ao ponto crítico em um aparelho Bal Tec CPD 030, montadas em suportes metálicos com fita adesiva de carbono e, então, cobertas com ouro em metalizador Bal Tec SCD 050. As observações foram feitas em um microscópio JEOL JSM 5200, sendo as imagens obtidas em câmera fotográfica JEOL MP.

RESULTADOS

Morfologia da semente

As sementes maduras das espécies da seção *Xerogona* são pequenas (Quadro 1), levemente achatadas, apresentam ornamentações no tegumento externo e a coloração varia dependendo da espécie. É preta em *Passiflora capsularis* (Fig. 1a), bege em *P. citrina* (Fig. 1b), bege ou marrom clara em *P. cervii* (Fig. 1c) e marrom escura em *P. rubra* (Fig. 1d). O arilo envolve parcialmente as sementes de *P. capsularis* (Fig. 1a), *P. cervii* (Fig. 1c) e *P. citrina* (Fig. 1b) e recobre totalmente a semente de *P. rubra* (Fig. 1d). Esse resultado também foi observado pelo exame de superfície (Fig. 2)

Quadro 1: Variação de valores (mm) de largura e comprimento das sementes de quatro espécies de *Passiflora*.

Medidas Espécies	Menor largura	Maior largura	Menor comprimento	Maior comprimento
<i>P. capsularis</i>	2,07	2,74	2,90	4,15
<i>P. cervii</i>	2,11	2,60	2,90	5,14
<i>P. citrina</i>	1,68	2,47	2,30	3,73
<i>P. rubra</i>	1,16	3,31	3,36	5,76



Figura 1: Aspecto morfológico da semente madura das quatro espécies de *Passiflora*. a. *P. capsularis*. Arilo cobrindo quase metade da semente (seta) b. *P. citrina*. Arilo recobrindo uma pequena parte da semente (seta) c. *P. cervii*. Arilo cobre quase metade da semente (seta). d. *P. rubra*. Semente sem arilo (seta) e com arilo recobrindo-a completamente (imagem à direita). Escalas: a,b,d = 0,25 cm; c = 1 cm.

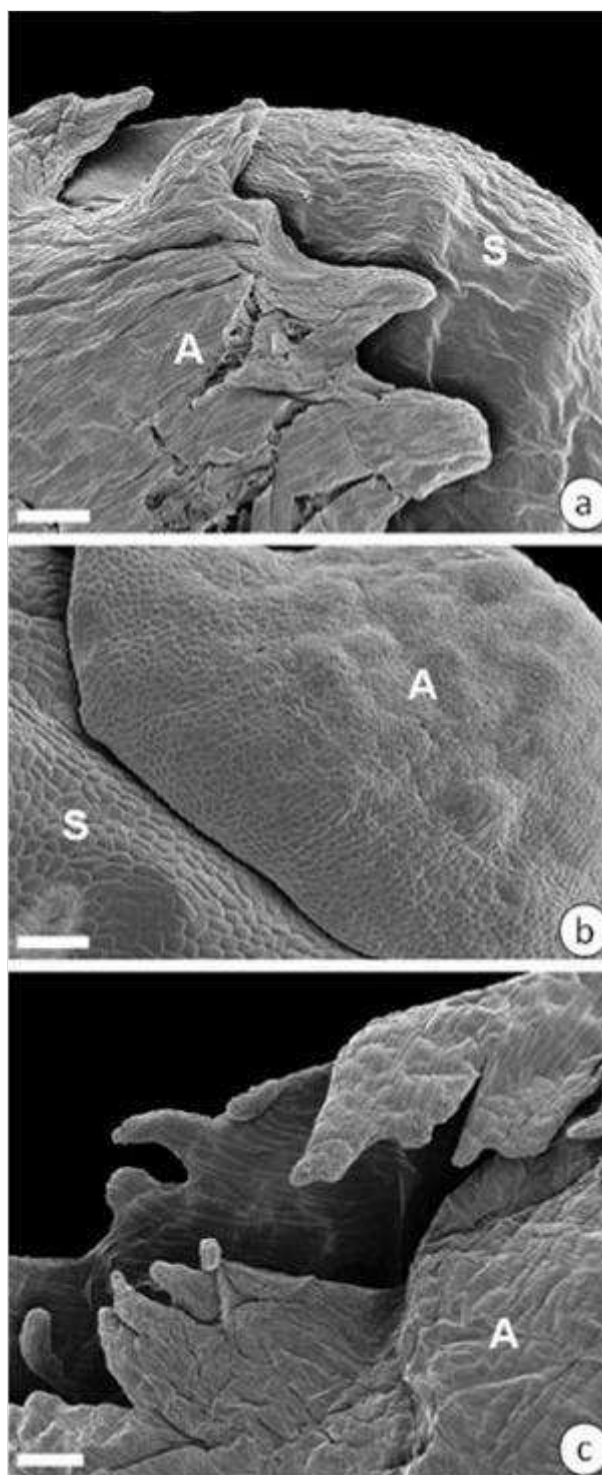


Figura 2: Eletromicrografias de varredura das sementes maduras de *Passiflora capsularis* (a), *P. citrina* (b) e *P. rubra* (c). O arilo (A) recobre parcialmente as sementes (S) de *P. capsularis* e *P. citrina*, enquanto em *P. rubra* não é possível observar a semente, uma vez que o arilo (A) recobre-a totalmente. Escalas: a-b = 50 μ m; c = 25 μ m.

Anatomia do óvulo

Os óvulos das espécies da seção *Xerogona* são anátropos (Fig. 3a) e bitegumentados: o tegumento externo apresenta duas camadas enquanto o interno é formado por três camadas de células (Fig. 3c). A micrópila é formada pelo exóstoma e pelo endóstoma, sendo as aberturas não coincidentes - micrópila em zig-zag (Fig. 3a). Na região oposta à micrópila - calaza - diferencia-se a hipóstase (Fig. 3b) cujas células apresentam paredes mais espessas que as demais, citoplasma denso e núcleo evidente. Neste estágio observou-se o início da formação do arilo (Fig. 3a).

Ontogenia dos tegumentos

Os resultados encontrados foram semelhantes para as quatro espécies da seção *Xerogona* e por isso serão apresentados conjuntamente em cada estágio. Tendo em vista os eventos de divisão, alongamento e diferenciação celular foram estabelecidos três estádios de desenvolvimento: - **Estádio I**: semente em início de desenvolvimento (4-6 dias); - **Estádio II**: semente jovem (12 a 24 dias); - **Estádio III**: semente madura (26 a 38 dias).

Estádio I

O tegumento externo do óvulo formará o tegumento externo da semente denominado testa. Este é constituído de duas camadas: exotesta com células levemente isodiamétricas e endotesta formada por uma camada de células alongadas (Fig. 4a). Já o tegumento interno possui três camadas: exotégmen composto por células alongadas; mesotégmen e endotégmen cada um formado por uma camada de células achatadas muito semelhantes entre si (Fig. 4a). O arilo tem origem funicular e começa a crescer (Fig. 4b). O endosperma está em início de desenvolvimento como um agregado de protoplastos, com núcleos evidentes e citoplasma denso (Fig. 4a).

Estádio II

Na semente jovem as células da exotesta são cubóides e justapostas enquanto a endotesta é formada por células alongadas com alguns espaços intercelulares. As paredes das células que compõem a testa são muito finas. No tegumento interno, o exotégmen é formado por uma camada de células alongadas, e o mesotégmen e endotégmen que não são facilmente distinguíveis, mas observou-se depósito de compostos fenólicos nestas camadas (Fig. 5a).

Nesta fase, o arilo já se desenvolveu e recobre a semente parcial ou totalmente, dependendo da espécie. Em todas as espécies o arilo é formado por células parenquimáticas grandes de parede fina e apresenta idioblastos com compostos fenólicos (Fig. 5b). O feixe vascular que se projetava da parede do ovário para cada óvulo é mantido na semente e o suprimento vascular atravessa o funículo e se estende pela rafe (Fig. 5b).

Estádio III

O desenvolvimento dos tegumentos que se inicia na semente jovem (estádio II) e se completa na semente madura se dá pelo alongamento diferencial das células do exotégmen e da endotesta que sofrem divisões anticlinais. Há regiões com células muito alongadas no sentido radial, intercaladas com células curtas, formando sulcos. Esse padrão também foi notado no exame de superfície (Fig. 6). Nas regiões em que as células do exotégmen são curtas, as células da endotesta se alongam. Já nos intervalos de alongamento do exotégmen, notou-se que ocorre um aumento de volume destas células forçando o encurtamento da endotesta. Esse processo resulta na ruminação do endosperma (Fig. 7a).

Neste estágio também se observou que a parede periclinal interna da endotesta aumenta a sua espessura e torna-se marrom-amarelada, devido ao depósito de substâncias (Fig. 7b,c).

Na semente madura o tegumento externo forma a sarcotesta (Fig. 7d). Neste estágio, o exotégmen se constitui na camada mecânica formada por macroesclereídes em paliçada, representando a esclerotesta. O mesotégmen encontra-se comprimido e o endotégmen apresenta a deposição de compostos fenólicos (Fig. 7d).

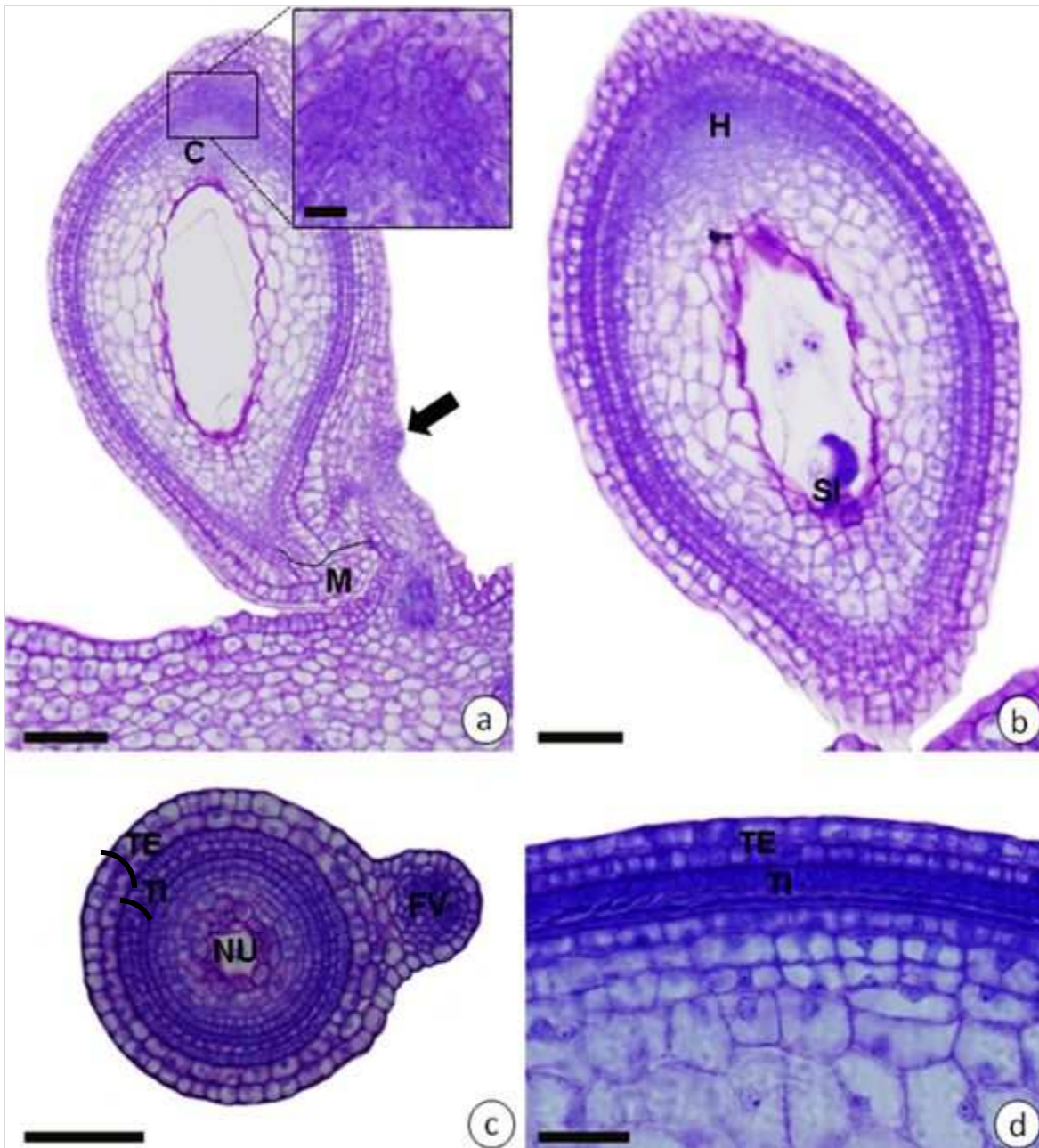


Figura 3: Secções anatômicas dos óvulos de *Passiflora capsularis* (a,b). *P. citrina* (c) e *P. rubra* (d). a-b. Secções longitudinais. c-d. Secções transversais. a. Óvulo anátropo destacando a micrópila (M) em zig zag, a calaza (C) região onde as células apresentam parede espessa indicando a diferenciação em hipóstase (“inset”). Notar o início da formação do arilo (seta). b. Detalhe do óvulo ressaltando a hipóstase (H) e a região da sinérgide (SI) com provável conteúdo do tubo polínico. c. Óvulo bitegumentado. Tegumento externo (TE) com duas camadas e tegumento interno (TI) com três camadas. NU: nucelo. FV: Feixe vascular. d. Detalhe dos tegumentos. Notar que as células do tegumento interno (TI) são menores que as células do tegumento externo (TE). Escalas: a, “inset” a, c,d = 20 μ m; b = 50 μ m.

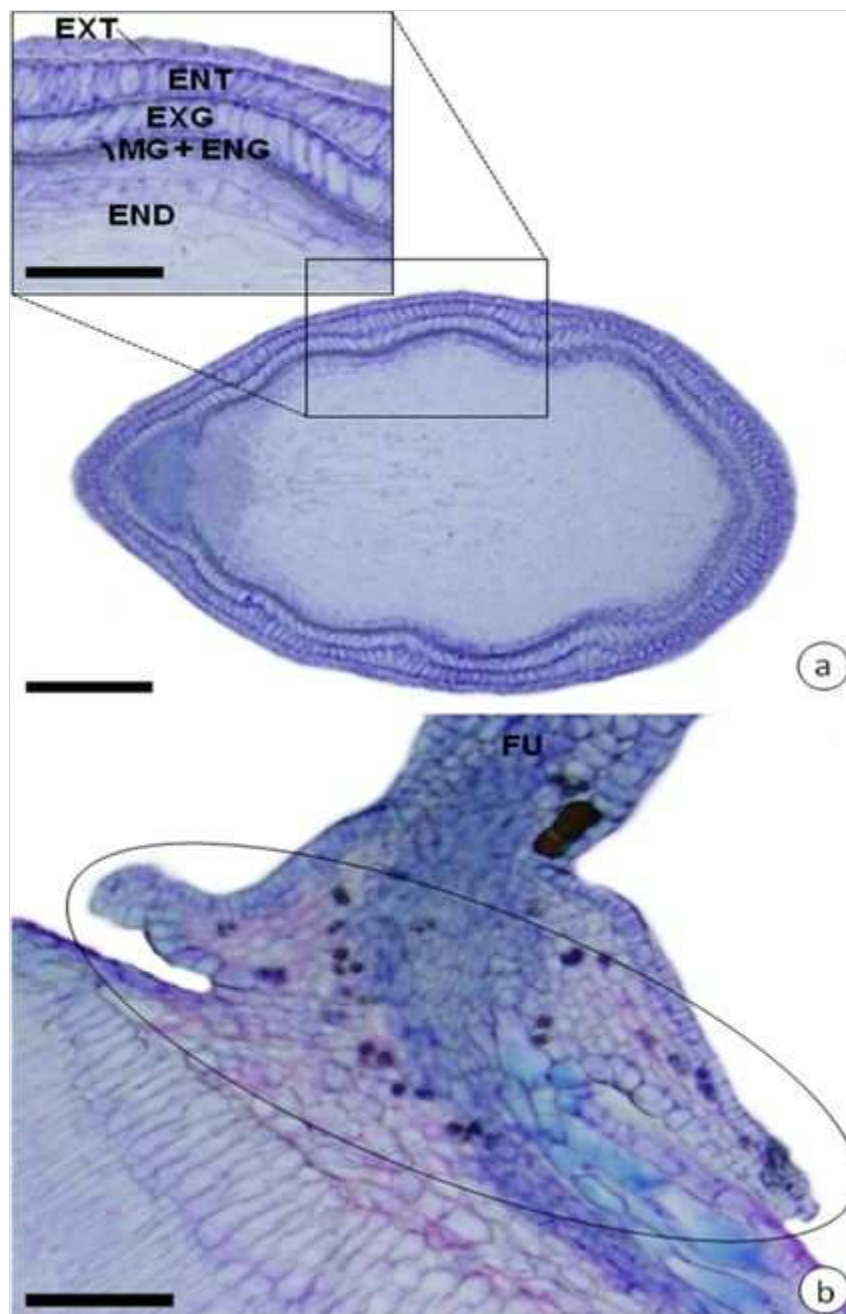


Figura 4: Estádio I do desenvolvimento da semente de espécies de *Passiflora*. a-b. Secções longitudinais. a. Visão panorâmica da semente de *P. capsularis* em início de desenvolvimento. Detalhe dos tegumentos “inset”. EXT: Exotesta. ENT: Endotesta. EXG: Exotégmen. MG: Mesotégmen. ENG: Endotégmen. END: Endosperma com núcleos evidentes. b. Arilo (destaque) que envolve parte da semente em *P. citrina*. FU: Funículo. Escalas: a = 50 μm ; “inset” a = 25 μm ; b = 100 μm .

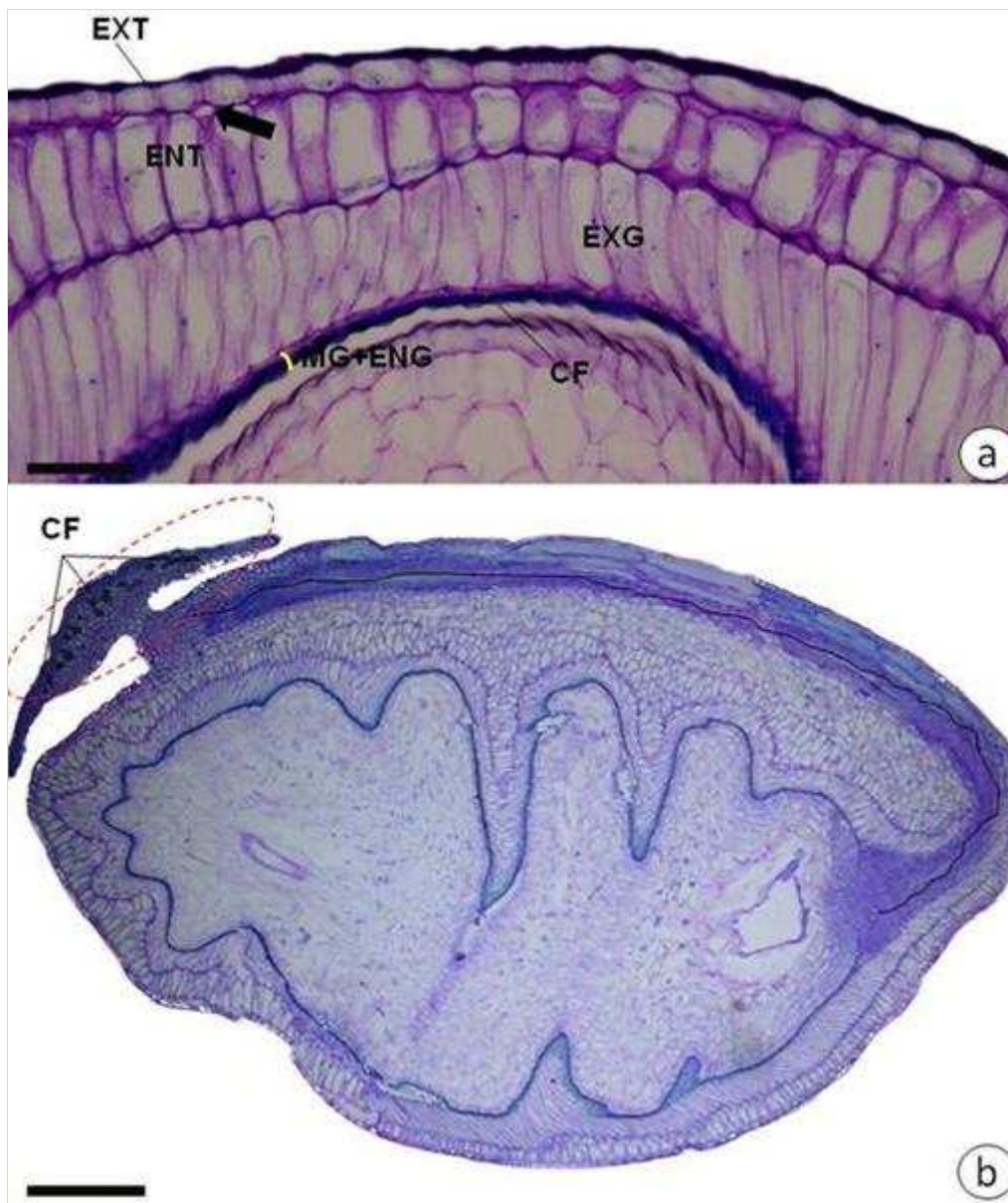


Figura 5: Estádio II do desenvolvimento da semente em *Passiflora rubra*. a-b. Secções longitudinais. a. Testa formada pela exotesta (EXT) com células isodiamétricas e endotesta composta de células alongadas com espaços intercelulares (seta). Já o tégmen é formado pelo exotégmen (EXG) com células alongadas e o mesotégmen (MG) e endotégmen (ENG) indistinguíveis, mas apresentam a deposição de compostos fenólicos no citoplasma das células (CF). b. Arilo (destaque) recobrendo a semente. Notar o feixe que percorre toda a semente (Linha tracejada). Escalas: a = 50 μm ; b = 200 μm .

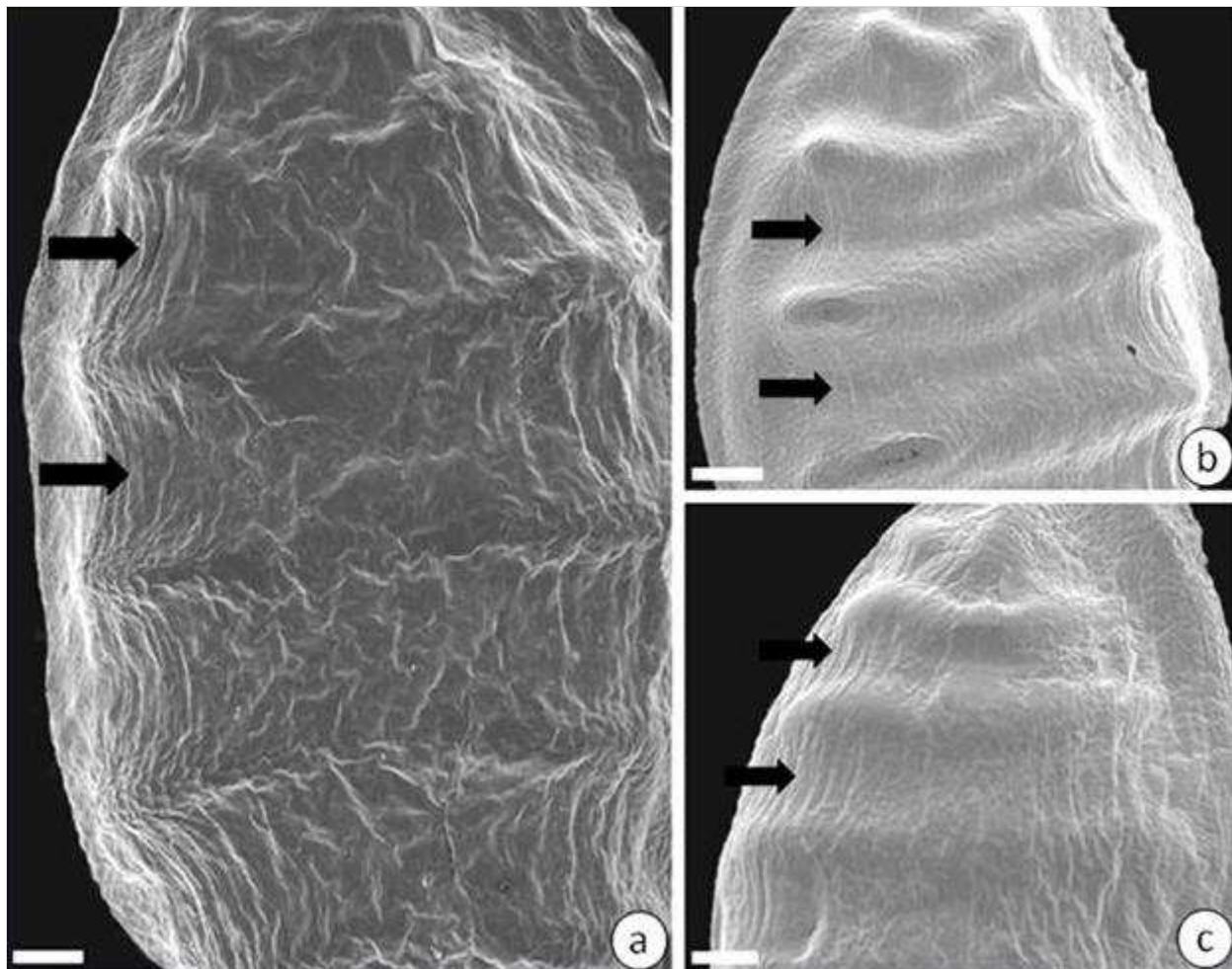


Figura 6: Eletromicrografias de varredura do tegumento da semente das três espécies de *Passiflora* estudadas evidenciando o padrão de distribuição das células formando sulcos (setas). a. *P. capsularis*. b. *P. citrina*. c. *P. rubra*. Escalas = 100 μ m.

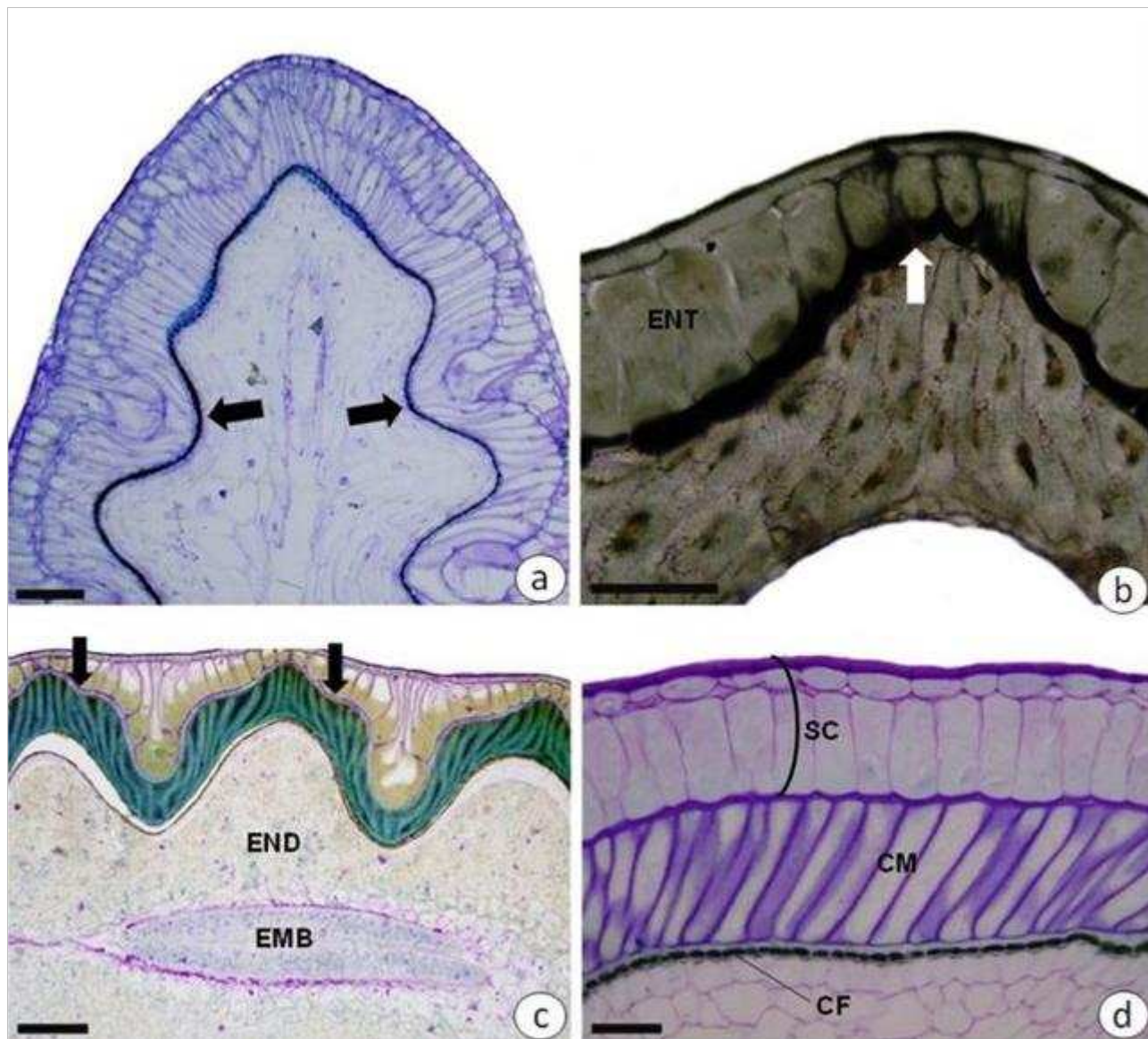


Figura 7: Secções anatômicas da semente madura das espécies de *Passiflora* da seção *Xerogona*. a-d. Corte longitudinais. a,c. *P. rubra*. b. *P. capsularis*. d. *P. citrina*. a. Alongamento diferencial dos tegumentos formando sulcos (setas). b. Detalhe do tegumento mostrando reação positiva para o teste que indica ácido graxos (seta) na parede periclinal interna da endotesta (ENT). c. Semente madura evidenciado o depósito de substâncias na parede periclinal interna da endotesta (setas) e endosperma (END) ruminado. EMB: embrião. d. Sarcotesta (SC), Exotégmen constituindo a camada mecânica (CM) com macroesclerídes em paliçada e depósito de compostos fenólicos (CF). Escalas: a,b = 50 µm; c = 100 µm; d = 20 µm.

Histoquímica

Os testes histoquímicos realizados com as sementes maduras de três espécies estão sintetizados na tabela abaixo e revelam acúmulo de substâncias na parede periclinal interna da endostesta (Fig. 8a,b), presença de grãos de amido (Fig. 8c) e compostos fenólicos (Fig. 5b) dispersos no arilo, além de compostos fenólicos no citoplasma das células nas duas camadas do tegumento interno (mesotégmen e endotégmen) que são indistinguíveis (Fig. 8d).

Tabela 1: Testes histoquímicos para detecção de substâncias nas sementes de *Passiflora capsularis*, *P. citrina* e *P. rubra*.

REAGENTE (Substância detectada)		Acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico (Ácidos graxos)	Cloreto Férrico (Fenólicos)	Lugol (amido)	PAS (Polissacarídeos)	Reagente de Nadi (Óleo essencial)	Sudan IV (Lipídios)	Vermelho de Rutênio (Pectina)	Xylidine Ponceau (Protéina)
Espécie	TECIDO								
<i>Passiflora capsularis</i>	Arilo (Citoplasma)	-	+	++	-	-	-	-	-
	Teg. externo (Parede)	++	-	-	++	-	-	+	-
	Teg. interno (Citoplasma)	-	++	-	-	-	-	-	-
<i>Passiflora citrina</i>	Arilo (Citoplasma)	-	-	++	-	-	-	-	-
	Teg. externo (Parede)	++	-	-	++	-	-	+	-
	Teg. interno (Citoplasma)	-	++	-	-	-	-	-	-
<i>Passiflora rubra</i>	Arilo (Citoplasma)	-	+	+	-	-	-	-	-
	Teg. externo (Parede)	++	-	-	++	-	-	+	-
	Teg. interno (Citoplasma)	-	++	-	-	-	-	-	-

(+: fracamente positivo; ++: fortemente positivo; -: negativo)



Figura 8: Testes histoquímicos para detecção de substâncias na semente de espécies de *Passiflora*. a-d. Secções longitudinais. a. Presença de ácidos graxos na parede periclinal interna da endostesta de *P. rubra* evidenciada pela reação positiva com Acetato de cobre/ Ácido rubeânico. b. Parede da endostesta de *P. capsularis* impregnada de polissacarídeos. c.d. Teste positivo para Lugol destacando a presença de grãos de amido no arilo e na endosta. c. Semente (SE) e arilo (A) de *P. citrina*. d. Detalhe dos tegumentos de *P. citrina* mostrando grãos de amido na endosta (ENT). Notar a presença de compostos fenólicos nas camadas do tegumento interno (seta). Escalas: a,b = 25 μ m; c = 50 μ m.

Anatomia da semente madura

As características anatômicas observadas durante o desenvolvimento da semente neste trabalho são muito semelhantes na seção *Xerogona* e estão representadas na tabela 2.

Tabela 2: Caracteres anatômicos da semente madura das espécies da seção *Xerogona* que apresentam fruto tipo cápsula.

Características	<i>P. capsularis</i> <i>P. cervii</i>	<i>P. citrina</i> <i>P. rubra</i>
Óvulo	Anátropo e bitegumentado	
Tegumento externo	2 camadas	
Tegumento interno	3 camadas	
	Exotégmen camada mecânica com macroesclereídes	
Substâncias detectadas	- Compostos fenólicos dispersos no pericarpo - Amido como reserva no arilo	
Ornamentação da superfície	Sulcada/Foveolada	

DISCUSSÃO

Os dados encontrados no presente trabalho representam a primeira descrição morfo-anatômica para sementes de espécies pertencentes à seção *Xerogona*, as quais compartilham características como óvulos anátropos, bitegumentados e a micrópila em zig zag formada por ambos os tegumentos com espécies do gênero *Passiflora* (Raju 1952; Kloos & Bouman 1980; Souza *et al.* 2002). Outras angiospermas também exibem essas características (Carmello-Guerreiro & Paoli 1999; Moço & Mariath 2003; Cortez & Carmello-Guerreiro 2008; Pires & Souza 2011; Gagliardi *et al.* 2012).

A diferenciação da hipóstase observada nas espécies estudadas já era esperada uma vez que *Passiflora* se enquadra em grande parte das características estudadas por Von Teichman & Van Wyk (1991). Estes autores após analisarem dados próprios e disponíveis na literatura para as 81 famílias de angiospermas associaram a ocorrência de hipóstase a outros caracteres ancestrais, como a formação de óvulos bitegumentados (em 73% das espécies avaliadas), desenvolvimento nuclear de endosperma (74%) e hábito arbóreo (64%) em ambiente tropical (58%).

O termo hipóstase foi proposto por Van Tieghen & Johansen (*apud* Tilton 1980) para designar todos os tipos de modificações da calaza e/ou da região calazal do óvulo. Tilton (1980) após extensa discussão sugere a seguinte definição para hipóstase: um grupo de células modificadas com paredes

geralmente lignificadas presentes na região calazal do óvulo, mas que pode envolver uma parte do megagametófito e estender-se parcialmente na região micropilar.

Bouman (1984) atribui à hipóstase várias funções divergentes. Pode funcionar como uma barreira que limita o crescimento do saco embrionário; pode funcionar como ligação entre o suprimento vascular e o saco embrionário, facilitando o transporte de material nutritivo; pode controlar o balanço hídrico de sementes dormentes ou pode exercer a função protetora em sementes maduras. Tendo em vista que o feixe vascular que se projetava da parede do ovário para cada óvulo nas espécies de *Passiflora* é mantido na semente, atravessando o funículo e se estendendo pela rafe, sugere-se que a hipóstase tenha a função de facilitar o suprimento vascular nas espécies estudadas.

No processo de desenvolvimento dos tegumentos da fase óvulo até a fase de semente madura nas quatro espécies da seção *Xerogona* não se desenvolvem novas camadas e as células dos tegumentos simplesmente crescem e se diferenciam. Este método é classificado por Corner (1976) como mecanismo não-multiplicativo, no qual o desenvolvimento dos tegumentos se dá por divisões anticlinais, com raras divisões periclinais nas camadas medianas dos tegumentos.

Ainda durante o processo de desenvolvimento das sementes de *Passiflora* da seção *Xerogona*, observou-se a ruminação dos tegumentos. O alongamento radial desigual dos tegumentos – endotégmen e exotégmen – resulta em um endosperma ruminado. Este termo foi usado por Periasamy (1962) para classificar o endosperma de sementes de *Passiflora*. Essa característica parece ser comum ao gênero (Raju 1952; Singh 1962; presente trabalho). Bayer & Appel (1996) sugerem que o processo de ruminação tenha evoluído independentemente várias vezes dentro das angiospermas já que há uma distribuição dispersa de endosperma ruminado em várias famílias.

A ruminação dos tegumentos e conseqüente formação de projeções para o interior do endosperma é também ocorrente na família Annonaceae (Battilani *et al.* 2007) e em monocotiledôneas (Neto *et al.* 2010). A ruminação do endosperma pode levar a uma vantagem adaptativa da semente, uma vez que esse processo facilita a entrada de água, oxigênio e/ou nutrientes provenientes da testa, devido ao aumento na superfície de contato (Boesewinkel & Bouman 1984). Neto *et al.* (2010) indicam que as projeções em *Euterpe oleracea* Mart. podem ter a função de transporte durante o processo de degradação das reservas do endosperma.

Notou-se grande acúmulo de compostos fenólicos no tegumento interno (mesotégmen e endotégmen) das sementes estudadas. Esses compostos causam ligações cruzadas de polissacarídeos,

levando a um aumento da rigidez da parede celular e resistência à biodegradação. Alguns compostos fenólicos podem ser tóxicos a predadores e sua quantidade é variável, aumentando após a fertilização (Werker 1997).

Além disso, grãos de amido estavam dispersos no arilo das sementes de *Passiflora capsularis*, *P. citrina* e *P. rubra*. A presença de um arilo, rico em amido, é citada para a família (Johri *et al.* 1992). É provável que essa substância de reserva seja mobilizada durante o desenvolvimento do embrião. Embora seja descrito na literatura que compostos de reserva sejam armazenados no endoperma da semente madura (Carpita & Gibeaut 1993), sugere-se que os polissacarídeos e outras substâncias presentes na parede interna da endotesta das espécies da seção *Xerogona* podem exercer alguma função no processo de desenvolvimento, já que estão próximos ao funículo por onde ocorre o suprimento vascular na semente.

O arilo é considerado um apêndice carnoso do funículo, em geral de coloração viva, relacionado à zoocoria (Beltrati & Paoli 2006). Nas espécies de *Passiflora* estudadas, 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; Singh 1962). Dathan & Singh (1973) também descreveram o início da formação do arilo em torno do funículo no momento em que o óvulo atinge o estágio de saco embrionário organizado. Após a fecundação, as células do primórdio do arilo crescem rapidamente e cobrem a semente.

Não há um consenso para adoção dos termos arilo, arilóide e sarcotesta. Kapil *et al.* (1980) propuseram o termo arilo funicular ou arilo localizado e rejeitaram o uso dos termos arilóide, falso arilo, arilo hilar, entre outros. Boesewinkel & Bouman (1984) referiram-se à sarcotesta como um apêndice carnoso comestível que envolve a semente. Para Corner (1976) sarcotesta e arilo são estruturas diferentes. Para evitar confusões, adotou-se no presente trabalho o termo arilo para crescimentos carnosos formados em certas regiões superficiais do óvulo ou da semente e sarcotesta para camadas formadas em toda ou parte da superfície das camadas tegumentárias da semente (Corner 1976; Werker 1997). Estes termos foram adotados com base nos dados encontrados no estudo da ontogenia das sementes de *Passiflora* da seção *Xerogona* e se mostraram eficazes uma vez que foi possível observar a origem e o desenvolvimento destas estruturas.

Corroborando os dados da literatura, foi observada uma camada de macroesclereídes denominada de esclerotesta, abaixo da sarcotesta nas sementes das espécies de *Passiflora*. A sarcotesta

se desenvolve, geralmente, da transformação das camadas externas do envoltório seminal e o tecido pode envolver uma parte ou a superfície inteira da semente. Ao se retirar essa camada carnosa fica o tecido interno embaixo da sarcotesta, geralmente formado por camadas de células esclerenquimáticas duras (Werker 1997). Uma vez que as sementes de *Passiflora* passam pelo trato digestivo dos animais que a dispersam (Ulmer & MacDougal 2004), acredita-se que a esclerotesta represente uma camada de proteção na semente.

Os macroesclereídes encontrados nas sementes de *Passiflora* geralmente tornam o tegumento impermeável à água, e devido a esta impermeabilidade as sementes apresentam dormência (Rolston 1978). Em sementes de Leguminosae os macroesclereídes também estão associados à impermeabilidade, tornando-as viáveis por mais tempo (Cavanagh 1983; Buriel *et al.* 2007). Outros autores, porém, têm demonstrado que a impermeabilidade das sementes de leguminosas tem sido atribuída a diferentes regiões da camada paliçada (Werker *et al.* 1973; Werker 1980).

A impermeabilidade dos tecidos de revestimento da semente restringindo total ou parcialmente a difusão de água ao embrião é denominada dormência tegumentar física. Esta é uma das formas mais comuns de dormência em sementes de espécies tropicais (Ferreira & Borghetti 2004). Algumas espécies da família Passifloraceae possuem dormência em suas sementes, necessitando de tratamentos para sua superação (Morley-Bunker 1974). Um dos tratamentos adotados para superar a dormência causada pela impermeabilidade do tegumento à água é denominado de escarificação e visa a romper o tegumento (Ramos & Zanon 1986). Outro método utilizado é a secagem das sementes realizada diretamente ao sol ou à sombra e não causam a morte do embrião (Akamine *et al.* 1972). Almeida *et al.* (1987) observaram em seus trabalhos que a secagem a pleno sol favorece a germinação das sementes de maracujá.

Comparando-se os dados anatômicos referentes à semente madura das espécies da seção *Xerogona* com aqueles de *Passiflora suberosa* e *P. edulis* (S.M. Carmello-Guerreiro, comunicação pessoal), verifica-se que apenas o número de camadas do tegumento externo - três camadas em *P. edulis* - e a ornamentação da testa - reticulada em *P. edulis* e foveolada/reticulada em *P. suberosa* variam. Sugere-se que a ornamentação do tegumento externo possa ser útil na delimitação taxonômica dentro do gênero.

Tendo em vista as semelhanças encontradas para as sementes estudadas com outras espécies de *Passiflora* (S.M. Carmello-Guerreiro, comunicação pessoal), conclui-se que há uma uniformidade

dentro do gênero conforme indica Corner (1976) e pode-se afirmar que as características anatômicas da semente analisadas exibem um padrão e são conservadas podendo ser utilizadas em futuros trabalhos taxonômicos a fim de preencher algumas lacunas no conhecimento de sementes em Passifloraceae.

Agradecimentos

À Fapesp (processos números 2011/18234-2 e 2010/01779-3) pelo auxílio financeiro. A Adriane Cristina Sarti Sprogis (Laboratório de Microscopia - IB/ UNICAMP) pelo suporte técnico para realização de MEV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMINE, E.K.; BEUMONT, J.H.; BOWERS, F.A.I.; HAMILTON, R.A.; NISHIDA, T.; SHERMAN, G.D.; SHOJI, K.; STOREY, W.B. 1972. Passion fruit culture in Hawaii. **University of Hawaii Cooperative Extension Service Circular 345**. 35p.

ALMEIDA, A.M.; ALMEIDA, R.M.; NAKAGAWA, J. 1987. Maturação de sementes de maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura 2**: 625-630.

APG III. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society 161**: 105-121.

ARAÚJO, E.C.; SILVA, R.F.; BARROSO, D.G.; CARVALHO, A.J.C. 2009. Efeito do armazenamento e do progenitor masculino sobre a qualidade e micromorfologia de sementes de maracujá. **Revista Brasileira de Sementes 31** (4): 110-119.

BALSALOBRE, L.C.; GUTIERREZ, R.C.; COMARIN, M.T.; GOUVEIA, M.C.; PEREIRA, B.M.; PINTO, D.G.; PILIACKAS, J.M. 2006. Ação alelopática do arilo das sementes de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Dryand. **Revista O Biológico – Suplementos 68**: 644-647.

BATTILANI, J.L.; SANTIAGO, E.F.; SOUZA, A.L.T. 2007. Aspectos morfológicos de frutos, sementes e desenvolvimento de plântulas e plantas jovens de *Unonopsis lindmanii* Fries (Annonaceae). **Acta botanica brasílica** 21 (4): 897-907.

BAYER, C.; APPEL, O. 1996. Occurrence and taxonomic significance of ruminant endosperm. **Botanical Review** 62: 301-310.

BELTRATI, C.M.; PAOLI, A.A.S. 2006. Semente. In: APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa. p. 399-424.

BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. 1976. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa, The Iowa State University Press. 334p.

BOESEWINKEL, F.D.; BOUMAN, F. 1984. The seed: structure. In: JOHRI, B.M. (ed.). **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag. p. 567-610.

BOUMAN, F. 1984. The ovule. In: JOHRI, B.M. (ed.). **Embryology of Angiosperms**. New York: Springer-Verlag. 830p.

BURIEL, R.P.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. 2007. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. **Revista Brasileira de Sementes** 29 (3): 151-159.

CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; PAOLI, A.A.S. 1999. Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica** 22 (1): 91-98.

CARPITA, N.C.; GIBEAU, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal** 3 (1): 1-30.

CAVANAGH, A.K. 1983. The anatomy and morphology of *Acacia* seeds in relation to germination. Bull. **Groupe International pour l'étude des Mimosoideae** 11: 58-62.

CORNER, E.J.H. 1976. **The seeds of dicotyledons**. University Press, Cambridge. 311p.

CORTEZ, P.A.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. 2008. Ontogeny and structure of the pericarp and the seed coat of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) from “cerrado”, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 31 (1): 71-79.

DATHAN, A.S.R.; SINGH, D. 1973. Development and structure of seed in *Tacsonia* Juss. and *Passiflora* L. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences** 77: 5-18.

DAVID, R.; CARDE, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris, série D** 258: 1338-1340.

FERREIRA, G.; DETONI, A.M.; TESSER, S.M.; MALAVASI, M.M. 2002. Avaliação de métodos de extração do arilo e tratamento com etephon em sementes de *Passiflora giberti* N.E. Brown pelos testes de germinação e de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes** 24: 248-283.

FERREIRA, G.; OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, J.D.; DIAS, G.B.; DETONI, A.M.; TESSER, S.M.; ANTUNES, A.M. 2005. Efeito do arilo na germinação de sementes de *Passiflora alata* Curtis em diferentes substratos e submetidos a tratamento com giberelina. **Revista Brasileira de Fruticultura** 27: 277-280.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. 324p.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2007. Passifloraceae. kubitzki, K. (Ed.) The families and genera of vascular plants. **Springer Berlin Heidelberg** 9: 270-281.

GAGLIARDI, K.B.; ROSADO, A.; SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; ALBIERO, A.L.M. 2012. Structure and development of fruits and seeds of weed species of Euphorbiaceae. **Acta Botanica Brasilica** 26 (1): 38-45.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Paris: Gauthier – Villars, 1969. v. 1, 1904p.

GERRITS, P.O; SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal Microscopy** 95: 150-155.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Book Co, New York. 523p.

JOHRI, B.M.; AMBEGAOKAR, K.B.; SRIVASTAVA, P.S. 1992. **Comparative embriology of Angiosperms**. New York: Spring-Verlag. 1221p.

KAPIL, R.N.; BOR, J.; BOUMAN, F. 1980. Seed appendages in Angiosperms. **Botanische Jahrbücher für Systematik** 10: 555-573.

KLOOS, A.; BOUMAN, F. 1980. Case studies in aril development *Passiflora suberosa* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen** 55: 49-66.

KUNIYOSHI, Y.S. 1990. Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária. **Floresta** 20 (1): 1-118.

LEINS, P.; ERBAR, C. 2010. **Flower and Fruit: Morphology, Ontogeny, Phylogeny, Function and Ecology**. Stuttgart, Schweizerbart Science Publishers. 439p.

LILLIE, R.D. 1965. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3. ed., McGraw-Hill, New York. 751p.

MCMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** 23: 99-108.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. 1980. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher-FUNCAMP. 69p.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BAUMGRATZ, J.F.A. 2004. *Passiflora* L. Subgênero *Decaloba* (dc.) Rchb. (Passifloraceae) na região sudeste do Brasil. **Rodriguésia** 55 (85): 17-54.

MOÇO, M.C.C.; MARIATH, J.E.A. 2003. Ovule ontogenesis and megasporogenesis in *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. (Leguminosae-Papilionoideae). **Revista Brasileira de Botânica** 26 (4): 495-502.

MORLEY-BUNKER, M.J.S. 1974. **Some aspects of seed dormancy with reference to *Passiflora* spp. and other tropical and subtropical crops**. London: University of London. 43 p.

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: 1229-1238.

NETO, M.A.M.; LOBATO, A.K.S.; ALVES, J.D.; DE FÁTIMA, P.; GOULART, P.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D. 2010. Seed and seedling anatomy in *Euterpe oleracea* Mart. during the germination process. **Journal of Food, Agriculture and Environment** 8: 1147-1152.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 368-373.

PASSOS, L.; OLIVEIRA, P.S. 2004. Interaction between ants and fruits of *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in a Brazilian sandy plain rainforest: ant effects on seeds and seedlings. **Oecologia** 139: 376-82.

PEARSE, A.G.E. 1980. **Histochemistry theoretical and applied preparative and optical technology**. 4 ed. Edinburgh, Churchill Livingston. 728p.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; TILLET, S.; ESCALA, M. 2002. Estudio morfológico de la semilla de 51 especies del género *Passiflora* L. **Acta Botanica Venezuelica** 25: 67-96.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S. 2005. Anatomía de la cubierta seminal en ocho especies del género *Passiflora* L., subgénero *Passiflora*. **Acta Botanica Venezuelica** 28: 337-348.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S. 2009. Morfoanatomía de la cubierta seminal en siete especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora* (Passifloraceae). **Hoehnea** 36: 131-137.

PERIASAMY, K. 1962. The ruminant endosperm. Development and types of rumination. *In*: **Plant embryology** (symposium). C.S.I.R., New Delhi. p. 62-74.

PIRES, M.M.Y.; SOUZA, L.A. 2011. Morfoanatomía e aspectos da biología floral de *Myrcia guianensis* (Aubl.) A. P. de Candolle e de *Myrcia laruotteana* Cambesse (Myrtaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** 33 (3): 325-331.

RAJU, M.V.S. 1952. Embryology of the Passifloraceae. **Current Science** 10: 288-289.

- RAMOS, A.; ZANON, A. 1986. Dormência em sementes de espécies florestais nativas. *In*: Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais, 1., 1984, Belo Horizonte. **Anais**. p. 241-265.
- ROLSTON, M. P. 1978. Water impermeable seed dormancy. **The Botanical Review** 44 (3): 365-396.
- SINGH, D. 1962. The structure and development of ovule and seed of *Passiflora foetida* Linn. **Agra University Journal of Research** 9: 99-111.
- SOLTIS, D.E.; GITZENDANNER, M.A.; SOLTIS, P.S. 2007. A 567-taxon data set for Angiosperms: the challenges posed by Bayesian analyses of large data sets. **International Journal of Plant Science** 168: 137-157.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; HOFFMANN, M.; MELO, E.J.T.; LOURO, R.P. 2002. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** 25: 471-475.
- SOUZA, M.M., PEREIRA, T.N.S., VIANA, A.P., PEREIRA, M.G., AMARAL, A.T.; MADUREIRA, H.C. 2003. Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae** 101: 373-385.
- TILTON, V.R. 1980. Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae), and notes on the other types of modifications in chalaza of Angiosperm ovules. **Canadian Journal of Botany** 58: 2059-2066.
- TOKUOKA, T. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research** 125: 489-497.
- ULMER, T.; MACDOUGAL J.M. 2004. **Passiflora: passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, Cambridge. 430p.

VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A.E. 1991. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachycalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society** 105: 211-237.

WERKER, E., DAFNI, A.; NEGBI, M. 1973. Variability in *Prosopis farcata* in Israel: anatomical features of the seed. **Botanical of the Linneau Society** 66: 223-232.

WERKER, E. 1980. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. **Israel Journal of Botany** 29: 22-44.

WERKER, E. 1997. **Seed Anatomy**. Berlin, Gebrüder Borntraeger. 424p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Abordagens recentes que envolvem o estudo do desenvolvimento de plantas têm associado o conhecimento clássico de anatomia com a genética molecular para interpretar as funções dos genes que controlam os aspectos do desenvolvimento morfoanatômico.

Dessa forma, a caracterização estrutural dos órgãos reprodutivos, em combinação com estudos moleculares, poderá revelar evidências adicionais para melhor compreensão da evolução do gênero *Passiflora*. Neste contexto, é importante salientar que este trabalho forneceu informações iniciais a respeito do desenvolvimento de frutos e sementes nesse grupo, abrindo portas para novas pesquisas nessa área que podem dar continuidade ao estudo dessa família tão representativa economicamente.