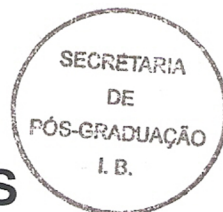


Emília Rosiane Kotovski

**“Morfoanatomia Floral em *Allamanda* L.
(Apocynaceaea, Rauvolfioideae)”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EMÍLIA ROSIANE KOTOVSKI

**“Morfoanatomia Floral em *Allamanda* L.
(Apocynaceae, Rauvolfioideae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Emília Rosiane Kotovski

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestra em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. André Olmos Simões

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

K848m

Kotovski, Emilia Rosiane, 1980-
Morfoanatomia floral em *Allamanda L. (Apocynaceae, Rauvolfioideae)* / Emilia Rosiane Kotovski. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: André Olmos Simões.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anatomia. 2. Flores. 3. Coléteres. 4. Estames. 5. Nectários. I. Simões, Andre Olmos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês Floral morphoanatomy in *Allamanda L. (Apocynaceae, Rauvolfioideae)*

Palavras-chave em Inglês:

Anatomy

Flowers

Colleters

Stamens

Nectaries

Área de concentração: Taxonomia Vegetal

Títuloção: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

André Olmos Simões [Orientador]

Ingrid Koch

Sandra Maria Carmello Guerreiro

Data da defesa: 22-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

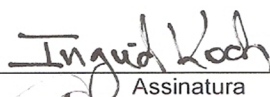
Campinas, 22 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

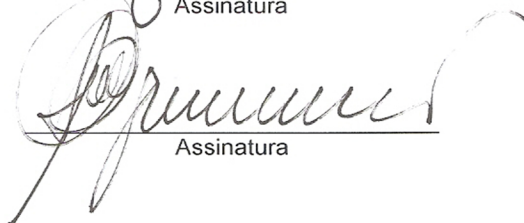
Prof. Dr. André Olmos Simões


Assinatura

Profa. Dra. Ingrid Koch


Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro


Assinatura

Prof. Dr. Diego Demarco

Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

A espantosa realidade das coisas
É a minha descoberta de todos os dias.
Cada coisa é o que é,
E é difícil explicar a alguém quanto isso me alegra,
E quanto isso me basta.

Eu não tenho filosofia, tenho sentidos...
Se falo na natureza não é porque saiba o que ela é,
mas porque a amo, e amo-a por isso,
Porque quem ama nunca sabe o que ama.
Nem sabe por que ama, nem o que é amar...
Amar é a eterna inocência
E a única inocência é não pensar."

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior) pela bolsa de mestrado concedida durante os dois anos de desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. André Olmos Simões pela orientação, por quem tenho grande admiração e respeito. Agradeço sinceramente por ter me aceitado como sua aluna e por ter me ajudado nos momentos difíceis que enfrentei na minha vida. Agradeço também pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela paciência, pela confiança e pelo carinho. Sem ele eu não teria conseguido.

À professora Dra. Luiza Sumiko Kinoshita por ter dado a mim a oportunidade de fazer parte da grande família que é ao Departamento de Biologia Vegetal, como a minha primeira orientadora e agora como minha co-orientadora.

À professora Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro por ter disponibilizado o laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Unicamp onde recebi toda a infraestrutura necessária para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, pela excelência do curso oferecido.

Aos professores do Instituto de Biologia que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos membros da banca de qualificação Professora Dra. Ingrid Koch, Professor Dr. Diego Demarco e Professor Dr. João Semir pelas excelentes sugestões, discussões e correções que foram primordiais para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

À Deise Gonsalves pela companhia, amizade e ajuda nas coletas de campo em Minas Gerais.

Ao Renato Belinello por ter auxiliado nas coletas de campo em Minas Gerais.

Ao técnico de laboratório Sebastião Henrique Militão Jr por auxiliar nas técnicas de laboratório.

Aos colegas pesquisadores do laboratório de Anatomia Vegetal: Bárbara, Carolina, Cristina, Diego, Elizabeth, Juliana e Rafael, pela ajuda e amizade.

Ao meu namorado Leonardo Tozo Bisinoto pela paciência, compreensão, companheirismo, amor e por toda a ajuda na realização deste trabalho. Foi quem esteve comigo neste ano me dando forças em todos os momentos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que torceram por mim, principalmente a minha família, que mesmo longe me deram forças e acreditaram que eu completaria mais esta jornada.

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract.....	3
Introdução Geral	
Histórico taxonômico da família Apocynaceae e <i>Allamanda</i> L.....	5
Gênero <i>Allamanda</i> L.	10
Estrutura floral em Apocynaceae	12
Estruturas secretoras.....	13
Espécies investigadas.....	15
Justificativa.....	25
Objetivos	25
Referências bibliográficas.....	26
Capítulo I:	
Morfoanatomia de Colétres Calicinais em <i>Allamanda</i> L. (Apocynaceae)	
Introdução	33
Materiais e métodos	36
Resultados	37

Ilustrações	41
Discussão	55
Conclusões	58
Referências bibliográficas	60

Capítulo II:

Morfoanatomia da Corola e Androceu em *Allamanda* L. (Apocynaceae)

Introdução	65
Materiais e métodos	68
Resultados	69
Ilustrações	73
Discussão	81
Conclusões	83
Referências bibliográficas	85

Capítulo III:

Morfoanatomia do Nectário e Gineceu em *Allamanda* L. (Apocynaceae)

Introdução	89
------------------	----

Materiais e métodos	93
Resultados	95
Ilustrações	100
Discussão	130
Conclusões	136
Referências bibliográficas	137
Considerações finais	141
Referências bibliográficas	144

Resumo

Allamanda L. é um dos 10 gêneros da tribo Plumerieae (Rauvolfioideae, Apocynaceae), sendo constituído por 15 espécies, das quais 13 nativas do Brasil. Este estudo teve por objetivo contribuir para o melhor conhecimento do gênero através do levantamento de dados morfoanatômicos (cortes anatômicos e Microscopia Eletrônica de Varredura) e testes histoquímicos de estrutura floral em antese de *A. cathartica* L., *A. laevis* Markgr., *A. puberula* A. DC. e *A. schottii* Pohl, para fornecer caracteres que auxiliem na taxonomia e filogenia da tribo. Os coléteres calicinais estão ausentes em *A. cathartica* e nas demais espécies, são persistentes, secretores, em número, distribuição e tipos variáveis. Desde o tipo *Standard* até os bífidos, ramificados e fundidos. Todos os coléteres apresentam pendúnculo não secretor, mas em *A. puberula* estes são mais longos e estreitos. O corpo secretor é formado por uma epiderme uniestratificada em paliçada secretora e cutícula fina, e um eixo central parenquimático não secretor no qual não foram observados laticíferos, feixes vasculares ou idioblastos. A secreção mista, composta principalmente de polissacarídeos e lipídeos, é liberada pela distensão da cutícula. Nestas espécies, a corola é dividida em duas porções denominadas tubo superior e inferior, sendo que a diferença entre o comprimento destas porções diferencia *A. schottii* e *A. cathartica* das demais espécies. Tricomas supra e infrastaminais unicelulares não ornamentados são morfologicamente e espacialmente diferentes entre si, mas se mantêm constantes entre as espécies. O androceu é constituído por estames formados por um filete curto e antera tetrasporangiada. O filete é ornamentado por tricomas unicelulares, esparsamente distribuídos ou agrupados dependendo da espécie. As anteras apresentam duas porções estéreis: duas expansões basais das tecas dorsais, e um apêndice apical, morfologicamente distintos entre as espécies. A lignificação da antera ocorre de maneira homogênea em todo o endotécio. O anel nectarífero ao redor do ovário, difere no grau de pentalobação e na distribuição dos estômatos entre as espécies. Laticíferos articulados e feixes vasculares estão presentes e distribuídos entre o tecido parenquimático nectarífero. O ovário é sincárpico, bicarpelar, unilocular, súpero, com sutura externa visível entre os carpelos e com placentação parietal. Apenas *A. laevis* possui estômatos na epiderme ovariana. A cabeça do estile é morfologicamente complexa e dividida em regiões morfofuncionais, com dois apêndices apicais que diferem entre as espécies quanto à morfologia, um corpo principal cônico revestido por um anel apical de longos tricomas

secretores, tricomas medianos secretores e anel basal formado por células epidérmicas justapostas não secretoras mais expansão parenquimática, formando projeções arredondadas ou acuminadas, e região receptiva localizada abaixo do anel basal. Os tricomas secretores secretam o mesmo tipo de substâncias hidro e lipofílicas. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a presença de polimorfismo, principalmente no apêndice apical da antera, coléteres calicinais, nectário e apêndices apicais da cabeça do estilete entre as espécies, sendo úteis para a caracterização interespecíficas, corroborando também para o melhor conhecimento do gênero pela combinação de distintas abordagens que juntas trouxeram maior riqueza de detalhes da estrutura floral que podem auxiliar em futuros estudos taxonômicos e filogenéticos.

Abstract

Allamanda L. is one of the 10 genera of the tribe Plumerieae (Rauvolfioideae, Apocynaceae), consisting of 15 species, which 13 are native to Brazil. This study aimed to contribute to a better understanding of the genus through the morphoanatomical data survey (anatomical sections and Scanning Electron Microscopy) and histochemical structure of floral anthesis in *A. cathartica* L., *A. laevis* Markgr., *A. puberula* A. DC. and *A. schottii* Pohl. The calyx colleter are absent in *A. cathartica*. In other species, are persistent, secretory, and variable in number, with distribution alternate in *A. puberula*, opposite in *A. laevis* and undetermined in *A. schottii*. The type also varies from the standard to the bifid, branched and fused. All colleters have non-secretory peduncle, but in *A. puberula* these are longer and narrower. The secretory body is formed by a secretory palisade epidermis and a thin cuticle, filled with non-secretory parenchyma without laticifers, vascular bundles or idioblasts. The secretion, mainly composed of mucopolysaccharides, is released without the cuticle disruption, which suffers only distention. In these species, the corolla is divided into two portions referred to as upper and lower tube, and the difference between the lengths of these portions separate *A. schottii* from other species. The unicellular non-ornamented trichomes that are at the upper and lower parts of the stamens are morphologically and spatially different from each other, but remains constant among species, varying only in quantity and size. The androecium comprises a short filament, which is ornamented by unicellular trichomes, variable in length, sparsely distributed or grouped depending on species. The anther presents two sterile portions: wings, formed by the lateral expansion of thecae, which vary proportionately their size in species; and an apical appendix, morphologically distinct among species, formed by connective tissue. The lignification occurs homogeneously throughout the endothecium, including at the sterile wings. A nectary ring around the ovary occurs in all studied species, differing in the degree of lobation between them. At the epidermal tissue in this ring are present stomata, which are distributed throughout nectariferous surface in *A. schottii* or concentrated in the apical region of the ring from the other species. Anatomically, the nectary shows no variation in the species analyzed, being composed of a uniseriate epidermis and nectary parenchyma, which cells carry starch granules. Articulated laticifers and vascular bundles are present and distributed among the parenchyma tissue in all four species. The ovary is superior and unilocular with visible external

suture between the carpels, with parietal placentation. Only *A. laevis* has stomata in ovarian epidermis. The style-head is morphologically complex and divided into three morphofunctional regions: 01) two apical non-secretory appendices which morphologically differ in each species; 02) a main conical body coated by an apical ring of long secretory trichomes, median secretory trichomes and a basal ring formed by juxtaposed non-secretory epidermal cells forming rounded or acuminate projections at the peripheral expansion of the parenchyma; 03) receptive region located below the basal ring, where the pollen grains that come from another flower are deposited by pollinator. The secretory trichomes of the apical ring and the median ones secrete the same type of hydro and lipophilic substance. The results showed the presence of polymorphism among species, especially in the apical appendix of anther, colleters, nectary and apical appendices of style-head, and that they are useful for the characterization within the genus. The study also collaborated to the best knowledge of the genus by combining three different approaches (SEM, anatomy and histochemistry) that brought together richer details of floral structure that can help for taxonomic purposes.

Introdução geral

Histórico taxonômico da família Apocynaceae e *Allamanda* L.

Apocynaceae (ordem Gentianales) é uma das maiores e mais complexas famílias de angiospermas (7ª maior família em número de gêneros), com aproximadamente 5.000 espécies e 400-480 gêneros (Endress & Bruyns, 2000; Rapini 2000; APG III 2009; Endress *et al.*, 2007), distribuídas por todos os continentes, desde regiões tropicais e subtropicais (principalmente), temperadas (poucas espécies), porém ausentes na Antártica (Alberts & Meve, 2001; Potgieter & Alberts, 2001; Rapini, 2004).

No Brasil, esta família é bem representada nos diferentes biomas (Rapini, 2004), com cerca de 850 espécies subordinadas a 95 gêneros (Souza & Lorenzi, 2008). Suas espécies podem ser encontradas em diversas formações vegetacionais como Florestas Pluviais, Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e de Tabuleiro, Florestas Secas, Restingas, Cerrado e Caatinga (Joly, 1977; Barroso *et al.*, 1991).

Na época anterior a Tournefort (1694), as plantas produtoras de látex eram agrupadas sob o nome de Apocynum, abrangendo táxons atualmente circunscritos em famílias tão díspares como Apocynaceae *s. l.* e Euphorbiaceae.

A família Apocynaceae *s. l.* foi estabelecida por Adanson em 1768 sob o nome de Apocyna, a qual englobava táxons de Apocynaceae (atuais subfamílias Rauvolfioideae e Apocynoideae) e Asclepiadaceae (atuais subfamílias Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae) como uma única família (Tournefort, 1694), dividindo em duas seções: plantas com ovário sincárpico e plantas com ovário apocárpico. Posteriormente, Jussieu (1789) modificou o termo “Apocyna” para “Apocineae”, sem alterar a sua circunscrição. Brown (1810), por sua vez, separou a família em dois grupos distintos: Apocineae (Apocynaceae) e Asclepiadeae (Asclepiadaceae) com base, principalmente, na presença ou ausência de polinário e polínia.

No histórico taxonômico a seguir serão tratadas apenas as circunscrições relacionadas à Apocynaceae *s. str.*

Em 1836, Lindley empregou pela primeira vez o nome Apocynaceae *s. str.* (Apocineae *sensu* Jussieu, 1789), aceitando a circunscrição de Brown (1810) e mantendo Jussieu (1789) como autor, separando-a em três grupos: Echitea, Carissea e Rauvolfia, com base em

características de seus frutos e sementes. O primeiro grupo englobava gêneros com folículos separados e sementes glabras; o segundo, gêneros com o mesmo tipo de fruto do anterior e sementes comosas; por fim, o terceiro grupo unia gêneros com frutos do tipo baga ou drupa.

De Candolle (1844), não aceitou as divisões propostas até então para a família, propondo uma nova classificação, sem dividir em subfamílias. O autor utilizou caracteres de frutos e sementes, como Lindley (1836), para caracterizar grandes grupos (sem dar nomes de subfamílias) de Apocynaceae, e caracteres de flores dentro de alguns destes grandes grupos, particularmente em espécies cujas flores possuíam ginostégio (fusão pós-gênita entre determinada região do estame e a cabeça do estilete), para separar em distintas tribos. Em sua circunscrição foram estabelecidas sete tribos: Willughbeieae, Carissieae, Plumerieae, Parsonieae, Wrightieae, Alstonieae e Echiteae. O gênero *Allamanda*, neste novo agrupamento, ficou posicionado na subtribo Allamandae dentro de Willughbeieae por apresentar ovário sincárpico e unilocular. Esta nova classificação proposta por De Candolle (1844) teve grande importância no meio taxonômico e serviu de influência para muitos trabalhos desenvolvidos posteriormente.

Müller (1860), em extenso tratamento sistemático de Apocynaceae *s. str.* publicado na obra *Flora Brasiliensis*, propôs uma nova distribuição dos gêneros em seis tribos: Carisseae, Ophioxileae, Plumerieae, Malouetieae, Echitideae e Allamandae. A proposta de Müller (1860) baseou-se principalmente na classificação de De Candolle (1844), dando ênfase ao seguinte conjunto de caracteres: tipo de inflorescência, anteras totalmente ou parcialmente férteis, com ou sem apêndices basais, pré-floração sinistrorsa ou dextrorsa, grau de sincarpia, número de lóculos do ovário, tipo de fruto e presença ou ausência de coma na semente. Em sua proposta, Müller (1860), elevou a subtribo Allamandae de De Candolle (1844) a categoria de tribo por apresentar ovário sincárpico, unilocular, frutos secos capsulares e sementes ecomosas.

Bentham & Hooker (1876) estabeleceram duas subfamílias em Apocynaceae *s. str.* (Plumerioideae e Echitoideae). Estes autores retornaram a tribo Allamandae de Müller (1860) à categoria de subtribo Allamandae, porém diferentemente de De Candolle (1844), incluíram a mesma na tribo Carisseae com base na sincarpia do fruto e no ovário unilocular.

Em 1878, Gray reduziu as subfamílias “Plumerioideae” e “Echitoideae” à categoria de tribos: Plumerieae e Echitideae, caracterizadas pelas anteras livres, não aderidas à clavícula

(=cabeça do estilete) e totalmente férteis ou anteras coniventes, aderidas à clavícula e parcialmente férteis, respectivamente. Em 1895, Schumann elevou novamente estas duas tribos à categoria de subfamília. Plumerioideae (=Rauvolfioideae), com três tribos (Arduineae, Pleiocarpeae e Plumereae), foi subdividida com base na morfologia do ovário e do fruto, e Echitoideae (=Apocynoideae), com duas tribos (Echitideae e Parsonsieae), foi subdividida com base na posição dos estames em relação à corola. Nesta classificação a subtribo Allamandae foi inserida na tribo Arduineae por apresentar ovário sincárpico. O trabalho de Schumann (1895) serviu de referência para a classificação de outros autores como Woodson (1930) e Pichon (1948, 1950).

Woodson (1930), além de aceitar a classificação de Schumann (1895), estabeleceu mais uma subfamília, Apocynoideae. Esta subfamília era composta de diversos gêneros de Echitoideae oriundos das floras norte-americana, africana e asiática, como *Apocynum* e *Trachelospermum*. O autor não alterou a circunscrição de *Allamanda*.

Além de considerar as duas subfamílias de Schumann (1895), Pichon (1948a, b e c, 1950) elevou a subtribo Cerberineae à categoria de subfamília, Cerberoideae. Esta subfamília abrangia gêneros anteriormente pertencentes à Plumerioideae, como *Cerbera* e *Thevetia*, com base na deiscência das anteras. As tribos de Plumerioideae e Cerberoideae foram circunscritas pelos caracteres de antera e fruto, posicionando e elevando a subtribo Allamandae à categoria de tribo em Plumerioideae por apresentar anteras sésseis e caudadas, basifixa, ovário unilocular e frutos secos e deiscentes. Pichon também dividiu Plumerioideae em dois grupos com base no tipo de fruto (carnosos ou secos), colocando Alstonieae (= "Plumerieae" sensu Leeuwenberg, 1994) e "Allamandae" (fruto com espinhos e carpelo unilocular) no grupo de frutos secos. Enquanto, as tribos de Echitoideae foram circunscritas pela conexão antera e cabeça do estilete.

Em 1976, Allorge considerou a família Apocynaceae s. str. em cinco subfamílias: Plumerioideae, Tabernaemontanoideae, Echitoideae, Apocynoideae e Cerberoideae, com base em estrutura floral. Esta autora transferiu a tribo Allamandae para a subfamília Echitoideae (= Apocynoideae) pela suposta presença de retináculo que formaria o ginostégio. Contudo, Fallen (1985) sugeriu que o melhor posicionamento para *Allamanda* seria mesmo dentro de Plumerioideae, pois, segundo esta autora, as espécies de *Allamanda* não formam ginostégio ao longo do desenvolvimento ontogenético do gineceu, além de apresentarem um

conjunto de características presentes em outros gêneros de Plumerioideae como, anteras sésseis ou subsésseis, sementes aladas, frutos capsulares e presença de iridóides contendo lactose.

Leeuwenberg (1994) reconheceu apenas Plumerioideae e Apocynoideae (= Echitoideae de Pichon (1948 a, b, c e 1950)) como subfamílias de Apocynaceae *s. str.*, separando-as em 12 tribos. Para este autor, *Allamanda* constituiria o único gênero de Allamandaeae, tribo caracterizada pela morfologia da cabeça do estilete e anteras.

Por quase 200 anos permaneceu a delimitação de Brown (1809) para a família, porém esta separação foi questionada por vários autores (Hallier, 1905; Demeter, 1922; Safwat, 1962; Stebbins, 1974; Stevens, 1976; Thorne, 1976, 1992; Judd *et al.*, 1994; Struwe *et al.*, 1994; Endress & Alberts, 1995; Sennblad & Bremer, 1996; Sennblad, 1997; Civeyrel *et al.*, 1998; Sennblad *et al.*, 1998; Potgieter, 1999), pois estas “duas famílias” apresentavam gradação morfológica entre elas. As crescentes informações moleculares, dados morfológicos mais detalhados e as análises filogenéticas, legitimaram a reunificação das duas famílias (Apocynaceae *s. str.* e Asclepiadaceae), além da família Periplocaceae, em Apocynaceae *sensu lato*, promovendo varias mudanças na classificação e agrupamento infrafamiliar (Endress & Bruyns, 2000).

Atualmente, a família Apocynaceae *s. l.* está dividida em cinco subfamílias (Endress & Bruyns, 2000; Endress *et al.*, 2007): Rauvolfioideae Kostel, Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R. Br. Ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R. Br. Ex Burnett.

Endress e Bruyns (2000) reconheceram duas subfamílias englobando as Apocynaceae *s. str.* em sua circunscrição tradicional: Rauvolfioideae (=Plumerioideae) e Apocynoideae. As outras subfamílias como Tabernaemotanoideae (Stapf, 1902), Cerberoideae Pichon (1948b) e Carissoideae Endlicher (1838) não foram reconhecidas. Esta foi a primeira classificação a considerar Apocynaceae em sua circunscrição mais ampla.

Os dados mais recentes de classificação das subfamílias de Apocynaceae *s. l.* (Endress *et al.*, 2007) mostram que apenas Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae são monofiléticas, enquanto Rauvolfioideae e Apocynoideae são parafiléticas (Potgieter & Alberts, 2001; Sennblad & Bremer, 2002; Livshultz *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2007). Um resumo da história taxonômica da família e suas categorias infra-familiares é apresentado no quadro 01.

Quadro 01: Categorias infra-familiares da Família Apocynaceae *s. str.* por alguns autores ao longo do tempo. Asterisco (*) indica que o autor não tratou como subfamília.

Circunscrição da família Apocynaceae <i>s. str.</i>		
Autores	Ano	Categorias infra-familiares
Lindley*	1836	Echitea, Carissea e Rauvolfia
De Candolle*	1844	Willughbeae, Carissieae, Plumerieae, Parsonieae, Wrightieae, Alstonieae e Echiteae
Müller*	1860	Carisseae, Ophioxileae, Plumerieae, Malouetieae, Echitiae e Allamandae
Bentham & Hooker	1876	Plumerioideae e Echitoideae
Gray*	1878	Plumerieae e Echiteae
Schumann	1895	Plumerioideae e Echitoideae
Stapf	1902	Plumerioideae Echitoideae e Tabernaemontanoideae
Woodson	1930	Apocynoideae Plumerioideae e Echitoideae
Pichon	1948/1950	Plumerioideae Echitoideae e Cerberoideae
Allorge	1975	Plumerioideae Tabernaemontanoideae Echitoideae Apocynoideae e Cerberoideae
Endress & Bruyns	2000	Rauvolfioideae (=Plumerioideae sensu Schumann) e Apocynoideae (=Echitoideae sensu Pinchon)

A subfamília Rauvolfioideae possui atualmente 10 tribos, formando um grado parafilético com o restante de Apocynaceae *s. l.* (Endress & Bruyns, 2007; Simões *et al.*, 2007). As espécies constituintes de Rauvolfioideae apresentam flores em geral pequenas e hipocrateriformes, com corola sinistrorsa contorta (dextrorsa em Tabernaemontaneae e alguns gêneros de Vinceae), anteras livres do gineceu e não lignificadas (com dorso lignificado em Tabernaemontaneae), frutos variados (baga, drupa, folículo ou cápsula) e sementes nuas, aladas, comosas ou ariladas.

Evidências recentes sugerem que caracteres usualmente utilizados para circunscrever as suas tribos como, diferenciação da cabeça dos estiletos, fusão do ovário, deiscências de frutos, forma da margem da semente, representam homoplasias, tendo surgido paralelamente

em diferentes grupos de Rauvolfioideae (Endress & Bruyns, 2000; Potgieter & Alberts, 2001; Simões *et al.*, 2007). Quando utilizadas isoladamente podem delimitar grupos não monofiléticos, o que não é desejado na sistemática atualmente praticada na família.

A tribo Plumerieae, na revisão de Endress e Bruyns (2000), foi a que teve maior mudança dentro de Apocynaceae *s. str.*, com a inclusão, nesta tribo, de gêneros das tradicionais Cerbereae, Allamandae e Plumeriinae. Atualmente contém 10 gêneros: *Allamanda*, *Anechites*, *Cameraria*, *Cerbera*, *Cerberiopsis*, *Himatanthus*, *Mortoniella*, *Plumeria*, *Skytanthus* e *Thevetia* (Endress *et al.*, 2007). A monofilia do grupo é fortemente sustentada, com um posicionamento derivado em Rauvolfioideae e próximo à Carisseae (Endress *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2007).

Gênero *Allamanda* L.

Allamanda passou por vários posicionamentos dentro da família Apocynaceae *s. str.*, desde seu estabelecimento por Linnaeus (1771), como mostra o quadro 02.

Em sua circunscrição atual, *Allamanda* é um pequeno gênero da tribo Plumerieae (Rauvolfioideae) que apresenta alto suporte como grupo monofilético em estudos filogenéticos recentes (Endress & Bruyns, 2000; Simões *et al.*, 2007).

Até o final do século XIX só se conhecia a espécie *A. cathartica* L. Após este período, foram descritas mais 25 espécies, porém destas apenas 15 são aceitas atualmente (Sakane & Shepherd, 1986; Souza & Rapini, 2011).

O gênero é nativo do Continente Americano, desde o México até a Argentina, sendo encontrado em clima equatorial, tropical e subtropical, especialmente distribuído pela costa brasileira (Sakane & Shepherd, 1986).

No Brasil, *Allamanda* é representado por 13 espécies (exceto *A. weberbaueri* (Peru) e *A. setulosa* (Suriname)) (Sakane & Shepherd, 1986; Silva & Rapini, 2011). As espécies do gênero podem estar amplamente distribuídas, como *A. cathartica* ou mais restritas, como *A. laevis* endêmica dos Estados de Minas Gerais e Bahia. O gênero ocorre em diversas formações vegetacionais, como Campo Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Mata Amazônica e beira de Mata Ciliar, e suas espécies podem habitar tanto lugares pedregosos e secos, como lugares menos secos a úmidos (Sakane & Shepherd, 1986).

Quadro 02: Posicionamento do gênero *Allamanda* na família Apocynaceae ao longo da história, mostrando as características utilizadas para o posicionamento do gênero dentro das tribos. O símbolo (*) mostra a suposta característica usada para transferir *Allamanda* para Echitoideae. Plumerioideae=Rauvolfioideae; Echitoideae=Apocynoideae.

Posicionamento de <i>Allamanda</i> na família Apocynaceae					
Autores	Ano	Subfamília	Tribo	Subtribo	Características diagnósticas
De Candolle	1844	-	Willughbeieae	Allamandae	Ovário sincárpico e unilocular.
Müller-Arg.	1860	-	Allamandae	-	Ovário sincárpico, unilocular; fruto seco capsular e sementes ecomosas
Bentham & Hooker	1876	Plumerioideae	Carisseae	Allamandae	Ovário sincárpico, anteras sem adnação ao estilete.
Schumann	1895	Plumerioideae	Arduineae	Allamandae	Ovário sincárpico
Pichon	1948	Plumerioideae	Allamandae	-	Antera sesseis, basifixa, caudadas; ovário unilocular e fruto seco deiscente.
Allorge	1975	Echitoideae*	Allamandae	-	Presença de retináculo*; semente alada.
Leeuwenberg	1994	Plumerioideae	Allamandae	-	Morfologia da cabeça do estilete e antera
Endress & Bruyns	2000	Rauvolfioideae	Plumerieae	-	Antera de deiscência latrorsa, caudata no ápice, sem lignificação, fruto seco capsular deiscente e ausência de arilo na semente.

Estrutura floral em Apocynaceae s. l.

A grande diversidade floral apresentada pela família à torna uma das mais complexas entre as angiospermas (Rao & Ganguli, 1953; Fallen, 1986; Endress, 1994). As estruturas florais vão desde inflorescências terminais até axilares, com flores mais simples sem formação de ginostégio, como em espécies de Rauvolfioideae, ou formas mais complexas, com formação de ginostégio e polinários em espécies de Asclepiadoideae (Fallen, 1986; Endress, 1994; Endress & Bruyns, 2000).

A maioria das espécies de Apocynaceae apresenta flores perfeitas (com todos os verticilos estéreis e reprodutivos), com simetria radial à levemente zigomorfa (Rauvolfioideae), geralmente vistosas e, raramente solitárias (Woodson & Moore, 1938; Fallen, 1986). O cálice é constituído de cinco sépalas que podem estar separadas ou unidas formando um tubo, e cinco pétalas fundidas na base formando um tubo com cinco lobos contortos (Cronquist, 1988; Endress & Bruyns, 2000; Judd *et al.*, 2007) para a esquerda ou para a direita, ou mais raramente valvares (Woodson & Moore, 1938; Endress & Bruyns, 2000). O formato da corola varia de infundibuliforme, hipocrateriforme a tubular (Endress & Bruyns, 2000).

Os estames em Apocynaceae, em número de cinco (raro quatro) são epipétalos e alternos com os lobos da corola, apresentando filetes curtos ou ausentes, podendo formar um pé ou tubo estaminal (Endress & Bruyns, 2000). Os estames são livres ou justapostos à cabeça do estilete em Rauvolfioideae, ou adnatos à cabeça do estilete formando o ginostégio nas demais subfamílias, estando inseridos no interior da corola, próximos a base ou no tubo superior da corola (Allorge, 1976; Sakane & Shepherd, 1986; Fallen, 1986; Endress & Bruyns 2000). As anteras apresentam quatro sacos polínicos (dois em Asclepiadoideae) (Kinoshita, 2005; Morales, 2005a; Ezcurra, 1981), ápice curto a conspicuamente alongado, base arredondada a sagitada e com deiscência longitudinal (Woodson & Moore, 1938). A lignificação presente na antera pode apresentar maior espessamento em determinadas regiões, como na porção abaixo, acima ou ao lado da parte fértil da antera, com as peças dispostas em toda a sua extensão ou limitadas à parte superior (Endress & Bruyns, 2000). Na família, as anteras formam uma estrutura em forma de cone acima da cabeça do estilete, com cinco aberturas para o acesso ao néctar pelo visitante floral. O estudo da morfologia do androceu tem sido muito importante para a delimitação das subfamílias dentro de

Apocynaceae, pois apresentam diferenças que são constantes a nível infrafamiliar (Endress & Bruyns, 2000).

O ovário é geralmente súpero e mais raramente semi-ífero, apocárpico com dois carpelos livres, com fusão congênita ou pós-gênita do estilete ou com diferentes graus de sincarpia, uni ou bilocular, com numerosos óvulos por lóculo (Walker, 1975, Endress *et al.*, 1983; Endress & Bruyns, 2000). O gineceu apresenta dois tipos de padrões ontogenéticos: o primeiro padrão está relacionado a iniciação carpelar que pode se dar a partir de uma concavidade mergulhada no receptáculo floral, originando o ovário semi-ífero ou iniciação a partir do domo, originando ovário súpero, sendo é uma condição provavelmente homoplástica, tendo evoluído independentemente em Rauvolfioideae e Apocynoideae (Gomes, 2006). O segundo tipo de ontogenia está relacionado à origem da conação do gineceu, sendo classificado em três tipos principais: sincárpico, hemissincárpico, ou sincárpico de origem mista. No tipo sincárpico os carpelos surgem congenitamente ou pós-genitamente fundidos. No tipo hemisincárpico, os dois primórdios surgem independentemente e se mantêm separados na região do ovário, porém se fundem distalmente na região da cabeça do estilete. Já o tipo de sincarpia de origem mista, os carpelos surgem unidos a partir de um anel meristemático contínuo, sobre o qual se formam dois primórdios que se unem pós-genitalmente (Gomes, 2006).

Estruturas secretoras

Muitas estruturas secretoras envolvidas na produção e liberação de metabólitos secundários são encontradas em diversos órgãos vegetativos e reprodutivos nesta família, como coléteres, epiderme secretora da cabeça dos estiletos e nectários, características estas muito utilizadas para a caracterização de grupos dentro da família nos mais variados níveis taxonômicos (Woodson & Moore, 1938; Metcalfe & Chalk, 1950, 1975, 1983; Fallen, 1986; Sennblad *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2007).

Os **coléteres** possuem ampla ocorrência na família. Sua importância taxonômica é inegável em diferentes níveis hierárquicos, pois mesmo em espécies do mesmo gênero podem estar presentes ou ausentes e em diferentes níveis de organização (Woodson & Moore, 1938; Sakane & Shepherd, 1986; Thomas, 1991; Endress & Bruyns, 2000; Rio & Kinoshita, 2005; Rio *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2006; Demarco, 2008). Coléteres são

estruturas secretoras responsáveis pela proteção do meristema e de órgãos em desenvolvimento, produzindo exsudatos que impedem o dessecamento (Thomas, 1991). Podem também estar relacionados à função de combater a proliferação de microrganismos patogênicos, uma vez que, continuam persistentes mesmo após o desenvolvimento dos órgãos (Thomas, 1991; Demarco, 2005, 2008). Os constituintes da secreção podem ser variados em diferentes espécies e em diferentes estágios de desenvolvimento, desde única e exclusivamente mucilagínosa, misto de mucilagem e compostos lipofílicos, podendo apresentar só compostos lipofílicos após término de produção e liberação de mucilagem (Fahn, 1979; Appezzato-da-Gloria & Estelita, 2000; Demarco, 2005, 2008; Rio, 2006; Marasca, 2008). Na família são encontrados tanto em órgãos vegetativos como lâmina foliar e pecíolo, quanto florais como brácteas, bractéolas e sépalas (Thomas, 1991). O tipo *Standard* (glândulas digitiformes com cabeça secretora e pedúnculo curto não secretor) (Lersten, 1974) predomina em Apocynaceae, mas outras formas como, laminares, bífidos ou ramificados também são encontrados (Thomas, 1991; Rio, 2000; Rio *et al.*, 2002, Rio, *et al.*, 2005; Demarco, 2005; Simões *et al.*, 2006; Marasca, 2008).

O **nectário** pode se apresentar na forma de um espessamento basal na base do ovário e ao menos parcialmente fundido com este; de um anel contínuo, frequentemente bilobado ou pentalobado no seu ápice; na forma de dois lobos alternos aos carpelos; ou no tubo estaminal com distribuição alternos aos estames, sendo bastante variáveis quanto a sua origem, posição e forma (Woodson & Moore, 1938; Rao & Ganguli, 1963; Endress & Bruyns, 2000 e Gomes, 2006). Geralmente em Apocynaceae *s. str.*, os nectários formam-se a partir da região congenitamente conata do gineceu, com feixes vasculares e parênquima nectarífero revestido por epiderme unisseriada coberta por uma fina cutícula e estômatos principalmente na região apical que liberam o néctar para o meio exterior (Martins, 2008).

A **cabeça do estilete**, porção apical e dilatada do gineceu posicionada na região distal do estilete, é originada pela união congênita ou pós-gênita dos carpelos (Endress *et al.*, 1983; Endress & Bruyns, 2000; Gomes, 2006). Esta estrutura é revestida por uma epiderme que produz e secreta polissacarídeos (substância adesiva) em conjunto com outros metabólitos secundários (*polenkitt*) (Walker, 1975; Fallen, 1983 e 1986; Sakane & Shepherd, 1986), de grande importância para o sistema de polinização (Fallen, 1986; Endress, 1994; Koch *et al.*, 2002).

Fallen (1986) definiu uma progressão em relação aos estágios evolutivos da cabeça dos estiletos dentro da família Apocynaceae, desde os tipos morfológicamente mais simples com regiões morfofuncionais não diferenciadas, coberto por uma camada de células epidérmicas secretoras, com ou sem adnação a qualquer verticilo floral, até os tipos com regiões morfofuncionais diferenciadas que apresentam uma região apical com um anel de tricomas formado por uma epiderme de células em paliçada, uma região mediana com epiderme secretora e região basal com ou sem um colar membranoso de tricomas longos; com ou sem adnação com as anteras formando um tipo complexo de estrutura chamada ginostégio. Evidências recentes sugerem que a proposta de Fallen (1986) para a evolução da cabeça do estilete merece ser revista, uma vez que estas formas morfológicamente simples deste órgão evoluíram em paralelo ao menos oito vezes em Rauvolfioideae, e desta forma não representam necessariamente uma condição ancestral em Apocynaceae (Simões *et al.*, 2007).

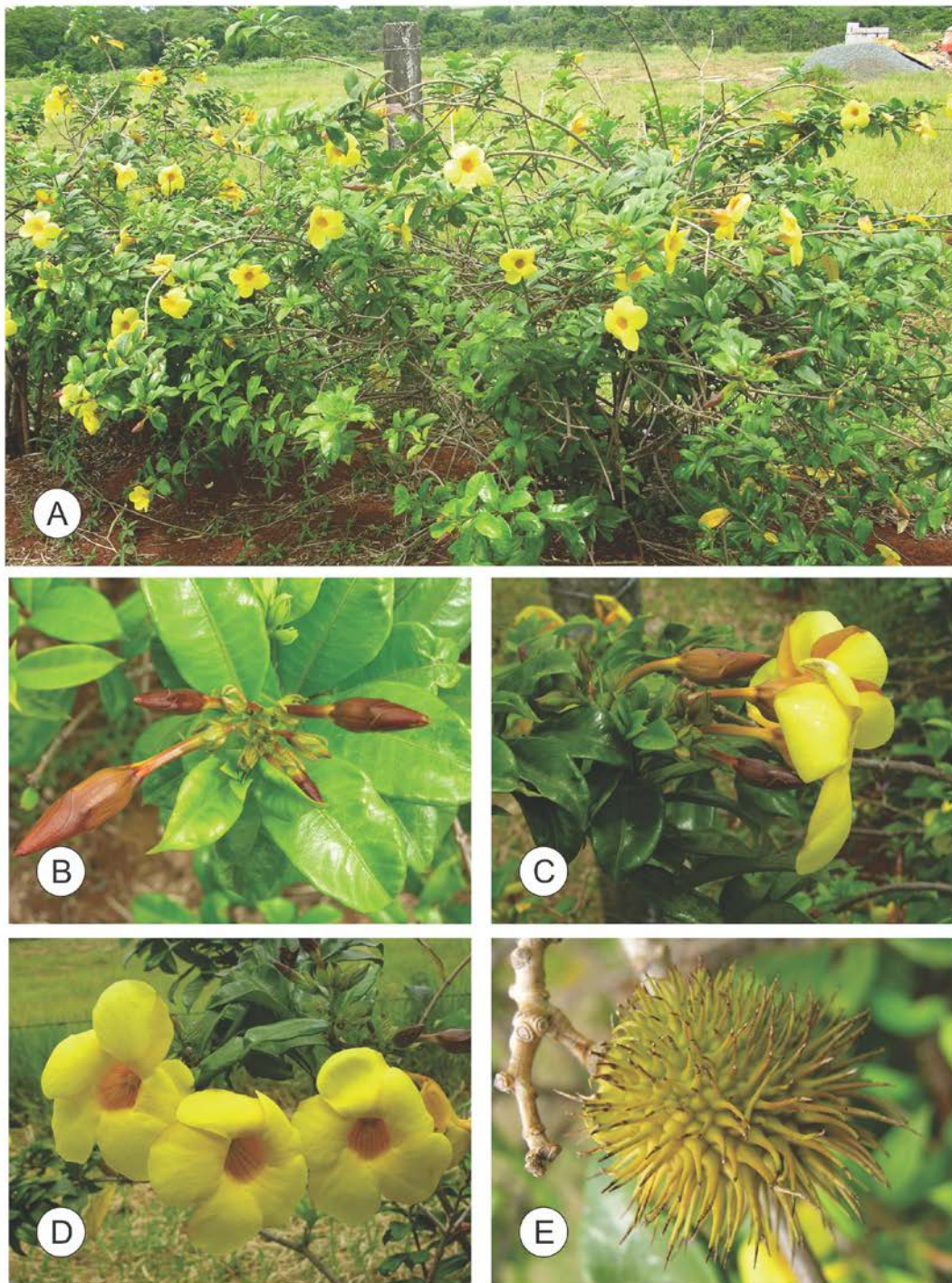
Espécies investigadas

As espécies escolhidas para o presente estudo são *Allamanda cathartica* L., *Allamanda schottii* Pohl, *Allamanda laevis* Markgr. e *Allamanda puberula* A. DC. As duas primeiras espécies ocorrem geralmente em ambiente úmido e as duas últimas ocorrem em ambiente geralmente seco. O gênero apresenta espécies com hábito subarbustivo, arbustivo (Figs. A, F, K, L) ou árvore (Figs. Q, R). *A. cathartica* é encontrada desde a Venezuela até sul do Brasil e nas Antilhas, principalmente distribuída pela região litorânea (Fig. 04), sendo a espécie mais amplamente distribuída entre as espécies do gênero e muito cultivada não só no Brasil, como em outros países, como na Europa, por exemplo. *A. schottii* é nativa nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Fig. 06), e assim como *A. cathartica*, também é utilizada como planta ornamental. Ambas as espécies e principalmente *A. cathartica*, são escolhidas para estudos científicos, provavelmente pela maior facilidade de encontrá-las em relação às demais espécies do gênero como, *A. puberula* com distribuição restrita ao interior do Piauí, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (Fig. 8) e *A. laevis* com distribuição restrita ao norte de Minas Gerais e região central da Bahia (Fig. 10).

No gênero, a inflorescência pode ser terminal ou axilar, variando de cimosa a dicasial ou bostricoide (mais frequente) (Figs B-D, G, H, M, N, S-V), com cálice gamossépalo

geralmente portando glândulas calicinais (Sakane & Shepherd, 1986). A corola infundibuliforme de coloração amarela, amarelo-alaranjada ou violácea (*A. blanchetii*) apresenta prefloração sinistrorsa (Figs. D, H, I, O, V), com duas partes distintas: um tubo superior alongado e dilatado, com lobos inseridos em sua porção distal e um tubo inferior cilíndrico e estreito que se estende desde a região do nectário e do ovário até a base do tubo superior, onde se localizam os estames, com tamanho e pilosidade variando nas espécies (Sakane & Shepherd, 1986). As anteras possuem quatro sacos polínicos e deiscência introrsa, nectário anelar quando presente, ovário sincárpico e unilocular, com sutura externa visível entre os dois carpelos e placentação parietal (Sakane & Shepherd, 1986; Fallen, 1985).

O fruto de *Allamanda* L é deiscente, seco e leve, em forma de cápsula septicida (Aguiar, 2009) globosa ou compressa, ornamentado de estruturas em forma de espinhos (liso em *A. laevis*) (Figs. E, J, P). Este conjunto de características é exclusiva do gênero, tornando-o fácil de distinguir dos outros gêneros de Apocynaceae quando em fruto (Sakane & Shepherd, 1986).



Figuras A-E: *Allamanda cathartica*. Características gerais: Hábito (A); inflorescência, botão floral (B), flores (C, D); fruto (E). (Fotos: Emilia R. Kotovski).

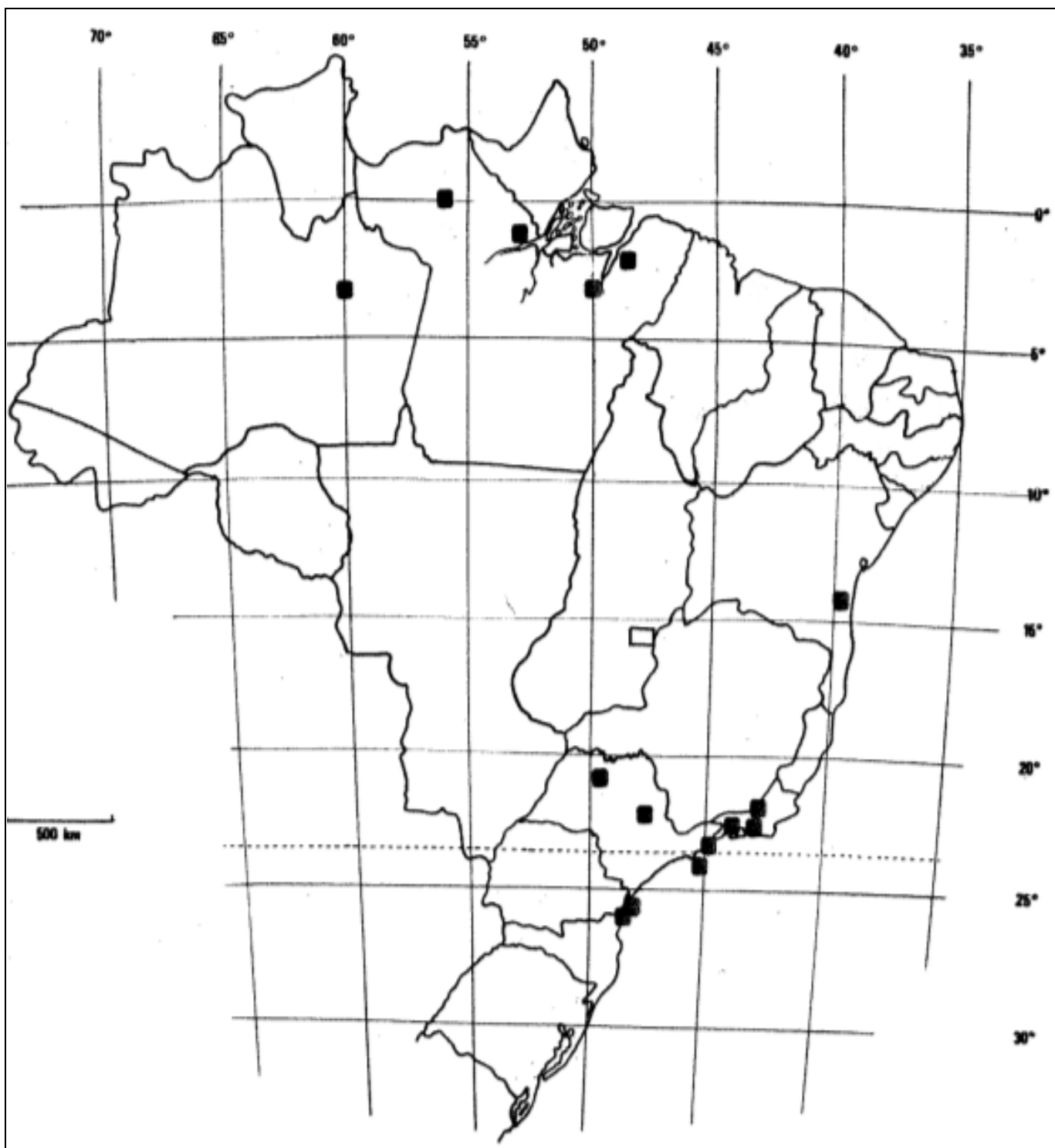
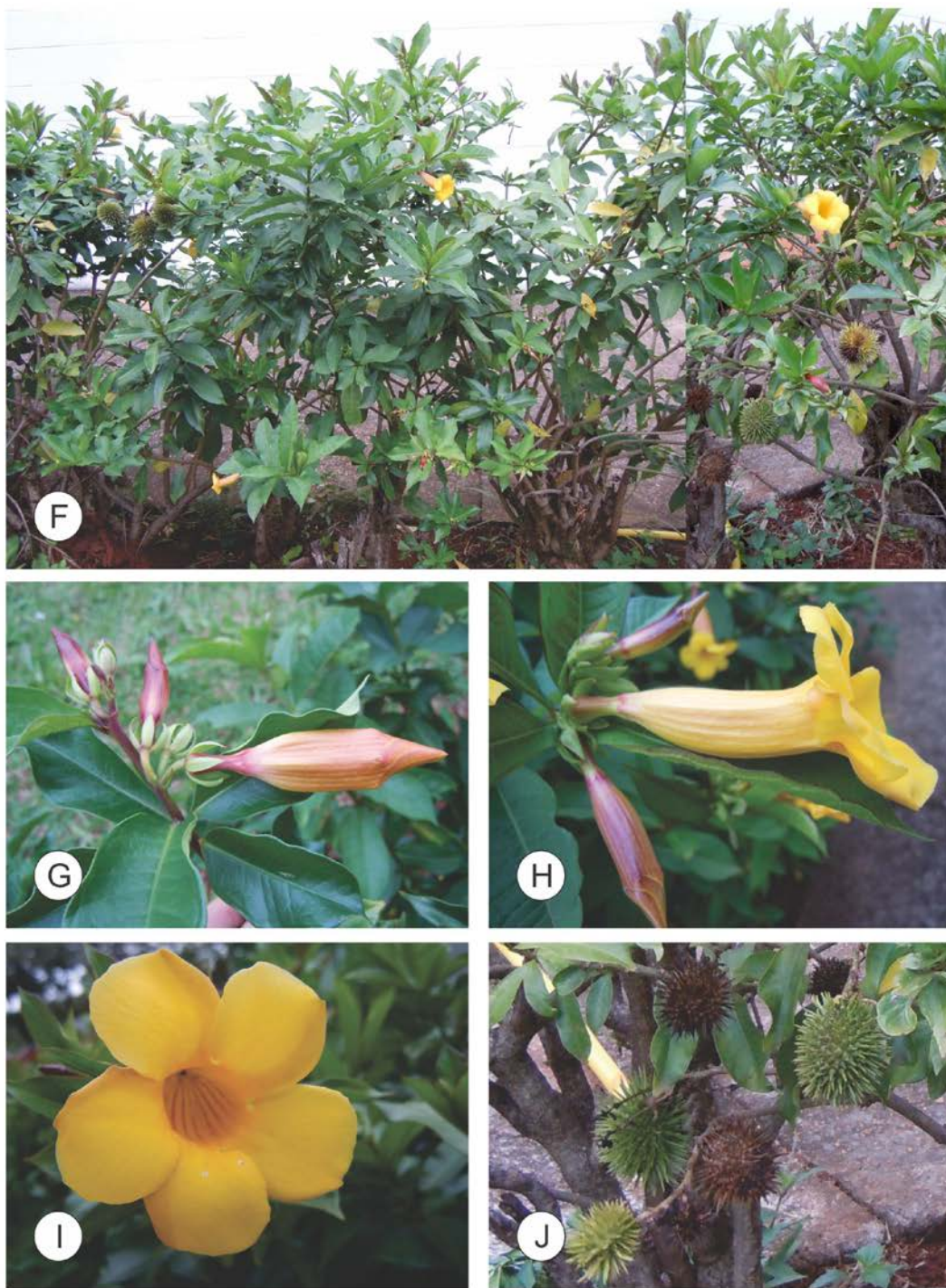


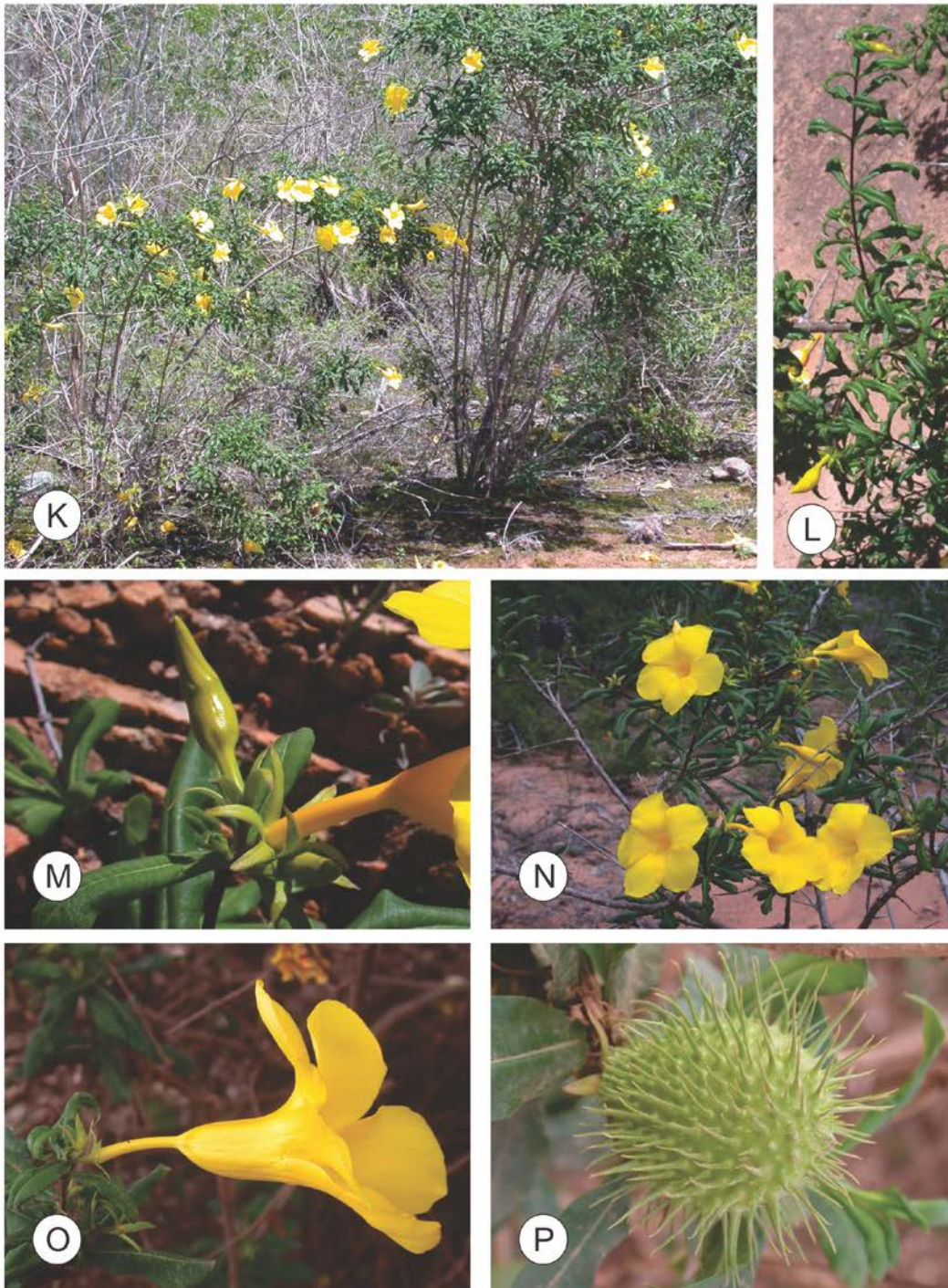
Figura 04: Dados de ocorrência de *Allamanda cathartica* no território brasileiro. Fonte: Sakane & Sherpherd (1986).



Figuras F-J: *Allamanda schottii*. Características gerais: Hábito (F); inflorescência, botão floral (G), flores (H, I); fruto (J). (Fotos: Emilia R. Kotovski).



Figura 06: Dados de ocorrência de *Allamanda schottii* no território brasileiro. Fonte: Sakane & Sherpherd (1986).



Figuras K-P: *Allamanda puberula*. Características gerais: Hábito (K, L); inflorescência, botão floral (M), flores (N, O); fruto (P). (Fotos: Emilia R. Kotovski).

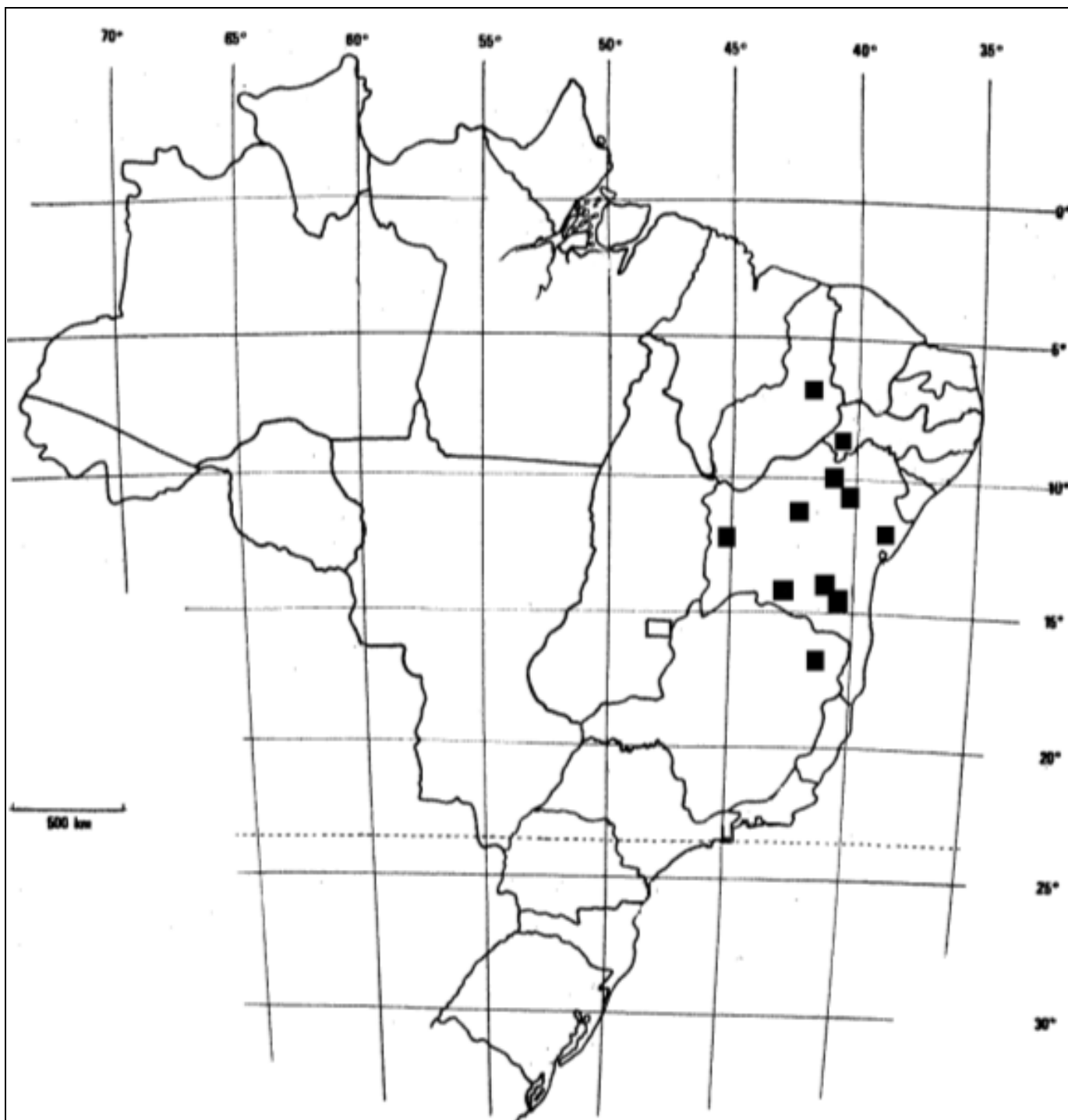


Figura 08: Dados de ocorrência de *Allamanda puberula* no território brasileiro. Fonte: Sakane & Sherpherd (1986).



Figuras Q-V: *Allamanda laevis*. Características gerais: Hábito (Q, R); inflorescência (S, T); botão floral (U), flores (V). (Fotos: Emilia R. Kotovski).

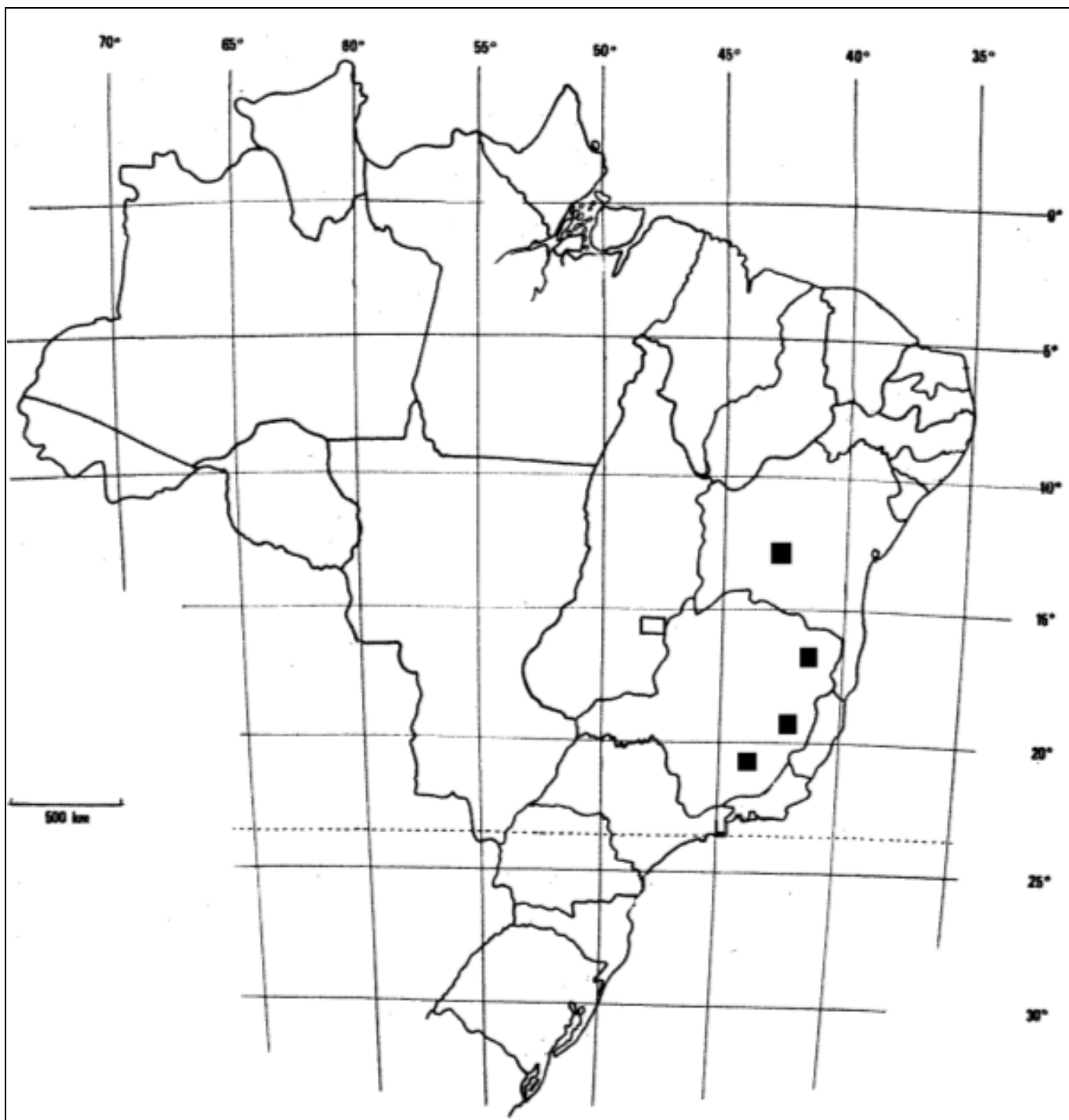


Figura 10: Dados de ocorrência de *Allamanda laevis* no território brasileiro. Fonte: Sakane & Sherpherd (1986).

Justificativa

Embora o gênero seja bem representado na flora brasileira e algumas espécies largamente cultivadas como ornamentais, ainda é pouco estudado, com escassos trabalhos publicados, destaque para a revisão taxonômica do gênero publicada por Sakane & Shepherd (1986). Também é inegável a complexidade morfológica deste gênero, tanto por apresentar caracteres compartilhados com outras tribos, como também um conjunto de características particulares, como sincarpia pós-gênita e unilocular, placentação parietal, frutos capsulares portando sementes aladas e a estrutura da cabeça do estilete. Este fato se reflete nas dificuldades históricas em seu posicionamento em categorias supragenéricas em Apocynaceae s. str., por vezes até constituindo uma tribo monogenérica. Neste contexto, o estudo da estrutura floral de espécies de *Allamanda* representa uma importante contribuição ao maior conhecimento desse gênero, pois o seu posicionamento em Plumerieae ainda é incerto, uma vez que esta tribo apresenta grande heterogeneidade morfológica e ainda carece de estudos mais detalhados de seus gêneros constituintes. Além de rever seu posicionamento em Rauvolfioideae com base na presença ou ausência de ginostégio e na presença ou ausência de lignificação especializadas das anteras.

Objetivos

O presente trabalho tem o objetivo de caracterizar morfológicamente e anatomicamente a estrutura floral de quatro espécies de *Allamanda* (*A. cathartica* L., *A. laevis* Markgr., *A. puberula* A. DC. e *A. schottii* Pohl) para fornecer caracteres que auxiliem em futuros estudos taxonômicos e filogenéticos da tribo, e também investigar a presença ou ausência de ginostégio e lignificação especializada das anteras para constatar o seu posicionamento em Rauvolfioideae.

Os resultados obtidos são apresentados na forma de três capítulos, cada um destes referentes ao estudo anatômico e histoquímico de determinados órgãos florais. O capítulo I, intitulado “Morfoanatomia de coléteres calicinais em *Allamanda* L. (Apocynaceae)”, visa caracterizar e descrever a estrutura anatômica de coléteres calicinais, além de determinar sua organização, número e tipo de compostos secretados. O capítulo II, intitulado “Morfoanatomia da corola e androceu em *Allamanda* L. (Apocynaceae)”, visa 1) caracterizar e descrever a estrutura da corola e de seus tricomas internos; 2) caracterizar e descrever a estrutura dos

estames; e 3) identificar a presença ou não de lignificação especializada das anteras. Por fim, o capítulo III, intitulado “Morfoanatomia do nectário e gineceu em *Allamanda* L. (Apocynaceae)”, visa 1) caracterizar e descrever o gineceu, com ênfase no ovário e cabeça do estilete; 2) caracterizar e descrever o nectário na base da flor, além de determinar a presença e organização de estômatos e histoquímica dos produtos secretados.

Referências bibliográficas

- Adanson, M. 1768.** Familles des plantes. (Reimp. 1966. Introdução de F.A. Stafleu.) Ed. Lehre, Paris.
- Alberts, F. & Meve, U. 2001.** A karyological survey of Asclepiadoideae, Periplocoideae, and Secamonoideae, and evolutionary considerations within Apocynaceae s.l. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 624-656.
- Allorge, L. 1976.** *Morphologie et biologie florale des Apocynacées: Applications taxonomiques*. PhD diss. École pratique des Hautes Etudes, Paris.
- Appenzato-Da-Gloria & Estelita, M. E. 2000.** Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae)
- APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
- Barroso, G.M.; Guimaraes, E. F.; Ichasso, C.L.; Gonçalves, C. C. & Peixoto, A.L. (1991).** *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Edusp: São Paulo
- Bentham, G. & Hooker, J. D., 1876.** *Genera Plantarum*. Londini. Reeve & CO., Williams & Norgate. Vol. 2 Pt:2, p 681-728.
- Brown, R., 1810.** *Prodromus Flore Nove Hollandie et insule van-diemen, exhibens caracteres Plantarum quas Annis 1802-1805*. Londini. Botanical Museum of Harvard University.
- Candolle, A. P., DE, 1844:** Ordo CXXIX. Apocynaceae. - In Candolle, A. E. DE, (Ed.): *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, pp. 317-489. - Paris: Fortin, Masson.
- Civeyrel, L., A. Le Thomas, K. Ferguson, and M. Chase. 1998.** Critical reexamination of palynological characters used to delimit *Asclepiadaceae* in comparison to the molecular phylogeny obtained from plastid *matK* sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:517–527.
- Cronquist A., 1988.** *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York Botanical Garden, NY.

- Demarco, D. 2005.** Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne (Apocynaceae s.l.). Tese de mestrado, Univ. Estadual de Campinas, Campinas.
- Demarco, D., 2008.** Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécie de Asclepieae (R. BR.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de S.P. (TESE).
- Demeter, K., 1992:** Vergleichende Asclepiadeenstudien. -Flora 115: 130-176.
- Endress, P. K. 1994.** *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Camb. Univ Press, Cam Massachussets.
- Endress, M. E. & Albert. V. A., 1995.** A morphological cladistic study of Apocynaceae: Trends in character evolution within a broadened familial circumscription. Amer. J. Bot. 82 (6, Abstracts): 127.
- Endress, M.E. & Bruyns, P. 2000.** A revised classification of Apocynaceae s.l. *Botanical Review*, **66**: 1-56. 74
- Endress, P. K.; Jenny, M. & Fallen, M. E. 1983.** Convergent elaboration of apocarpous gynoecia in higher dicotyledons (Sapindales, Malvales, Gentianales). Nordic Journal of Botany 3: 293-300.
- Endress, M.E., Liede-Schumann, S. & Meve, U. 2007.** Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 259- 267.
- Ezcurra, C. 1981.** Revisión de las Apocynaceae de la Argentina. Darwiniana 23: 367-474.
- Fahn, 1979.** Secretory Tissues in Plants. Academic Press Inc., London.
- Fallen, M. E. 1983.** Morphological, functional, and evolutionary aspects of the flower in the Apocynaceae. Ph.D. thesis, University of Zurich, Zurich.
- Fallen, M.E. 1986.** Floral structure in Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **106**: 245-286.
- Gomes, S. M. 2006.** Ontogenia floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae s.l. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Hallier, H. 1905.** Provisional scheme of the natural (phylogenetic) system of flowering plants. New Phytol. 4: 151–162.

- Joly, A.B. 1977.** Botânica: chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil – baseadas em chaves de Franz Thonner. Ed. Nacional, São Paulo.
- Judd, W. S., Sanders, R.W. & Donoghue, M.J. 1994.** Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analysis. *Harvard Papers of Botany* 5: 1–51.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellog, E.A. & Stevens, P.F. 2007.** *Plant systematics: a phylogenetic approach, 3rd. edition.* Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Jussieu, A. L. de. 1789.** Genera Plantarum. Herissant, Paris.
- Kinoshita, L.S. (coord.). 2005.** Apocynaceae. Pp. 35 – 91. *In: M.G.L. Wanderley; G.J. Shepherd; T.S. Melhem & A.M. Giulietti (orgs.). Flora fanerogâmica do estado de São Paulo.* vol. 4. São Paulo, FAPESP/HUCITEC.
- Koch, I.; Bittrich, V. & Kinoshita, L.S. 2002.** Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Mull. Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae)- a report of dioecy in Apocynaceae. *Botanischer jahrbucher fur Systematik* 124: 83-104.
- Leeuwenberg, A.J.M. 1994.** *A revision of Tabernaemontana. Volume 2: The New World species and Stemmadenia.* Royal Botanical Gardens, Kew, Kent.
- Livshultz et al., 2007.** Phylogeny of Apocynoideae and the APSA clade (apocynaceae s.l.). *Annals of the Missouri Botanical Garden.* Volume 94, Number 2.
- Linnaeus, C. 1771.** Systema naturae II. Holmiae, Laurentii Salvii. *Mantissa Plantarum* 2: 214.
- Marasca, R. 2008.** Estrutura secretora em *Rauvolfia* (Apocynaceae). Tese de Mestrado.
- Martins, F. M. 2008.** Glandulas foliares e florais em três espécies de Apocynaceae: Apocynoideae do Cerrado..
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950.** Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C.R., & Chalk, L. 1983.** Anatomy of the dicotyledons. 2nd ed., vol. 2. Clarendon Press, Oxford.
- Morales, J. F. 2005.** Estudios en las Apocynaceae neotropicales xvii: una revisión del género *Galactophora* (Apocynaceae: Apocynoideae). *BRIT.ORG/SIDA* 21(4).
- Morales, J. F. 1997a.** A synopsis of the genus *Prestonia* (Apocynaceae) section *Tomentosae* in Mesoam. *Novon* 7: 59-66.
- Muller-Argovensis, J. M., 1860.** Apocynaceae. *In: Martius, C.P.P. (Ed.). Flora brasiliensis.* Lipsiae: Frid. Fleisher. v. 6, pt.1.

- Pichon, M. 1948a.** Classification des Apocynacées. V. Cerberoidées. *Notul. Syst. (Paris)* 13: 212-229.
- Pichon, M 1948b.** Classification des Apocynacées. X. Genre Mandevilla. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. 2*, 20: 211-216.
- Pichon, M., 1948c.** Classification des Apocynacées. XIX. Lérétinacée des Echitoidées. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser 2*, 22. 211.
- Pichon, M., 1950.** Classification des Apocynacées. XXVIII. Supplément aux Plumérioïdées. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., Sér. B, Bot.* 1: 145–173.
- Potgieter, K. 1999.** Phylogenetic study of Apocynaceae Juss. And *Aspidosperma* Mart. & Zucc. Ph.D. diss., University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Potgieter, K. & Albert, V.A. 2001.** Phylogenetic relationships within Apocynaceae s.l. based on *trnL* intron and *trnL-F* spacer sequences and propagule characters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88: 523-549.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963.** Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 43: 419-435.
- Rapini, A., 2000.** Asclepiadaceae ou Asclepiadoideae (Apocynaceae)? Conceitos distintos de agrupamento taxonômico. *Hoehnea*, v. 27, n. 2, p. 121-130.
- Rapini, A. 2004.** Apocynaceae (dogbane and milk-weed family). In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.Wm. & Head, S.V. (eds.). *Flowering plants of the Neotropics*. Princeton University Press, Princeton.
- Rio, M.C.S., 2001.** Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. Br. *nom. cons.* (Apocynaceae). Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Rio, M.C. & Kinoshita, L.S. 2005.** *Prestonia* (Apocynaceae) do Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 32: 233-258.
- Rio, M. C., Kinoshita, L.S., & Castro, M. M., 2005.** Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas.
- Rio, M.C.S., 2006.** Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G. Mey (Apocynaceae) de cerrado. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Sakane, M. & Shepherd, G. J. 1986.** Uma revisão do genero *Allamanda* L. (Apocynaceae).
- Schumann, K. 1895.** Apocynaceae. In: Engler, A e Prantl, L. (ed) *Die naturlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann, vol.4, part. 2, p 109-189.

- Sennblad, B., 1997.** Phylogeny of the Apocynaceae s.l. (Ph.D. dissertation summary). Acta Universitatis Uppsaliensis. Comprehensive Summaries Uppsala Dissertations, Faculty of Science and Technology 295. 18 pp. Uppsala.
- Sennblad, B. & Bremer, B. 1996.** The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with rbcL data. *Plant Systematics and Evolution* **202**: 153-175.
- Sennblad, B. & Bremer, B. 2002.** Classification of Apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. *Systematic Biology* **51**: 389–409.
- Sennblad, B. ; Endress, M. E & Bremer, B. 1998.** Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. *American Journal of Botany* 85 (8): 1143-1158.
- Simões, A.O., Castro, M. De M. & Kinoshita, L.S. 2006.** Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:387-398
- Simões, A.O.; Livshultz, T.; Conti, E. & Endress, M.E. 2007.** Phylogenetic and systematics of the Raulvolfoideae (Apocynaceae) based on molecular and morphological evidence. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 268.
- Silva & Rapini, 2011.** *Allamanda calicicola* (Apocynaceae), an overlooked new species from limestone outcrops in the States of Minas Gerais and Bahia, Brazil. *Kew Bulletin* vol. 64: 171–174 (2009).
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008.** Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Stapf, O. 1902.** Apocynaceae. Pp. 24-231 in W. T. Thiselton-Dyer (ed.), *Fl. Trop. Afr.* 4(1). L. Reeve, London.
- Stebbins, G. L. 1974.** Flowering plants: Evolution above the species level. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Stevens, W. D. 1976.** A revision of *Matelea* subg. *Dictyanthus* (Apocynaceae, sensu lato). Ph.D. diss., Michigan State University.
- Struwe, L., Albert, V. A. & Bremer, B., 1994.** Cladistics and family level classification of Gentianales- Cladistic 10: 175-206.

- Thomas, V. 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* **68**: 287-305.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1991.** Structure and development of follicles of *Nerium indicum* Mill. (Apocynaceae). *Feddes Repertorium* **102**: 399-407.
- Thorne, R. F. 1976.** A phylogenetic classification of the Angiospermae. *Evol. Biol.* **9**: 35–106.
- Thorne, R. F., 1992.** An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso* **13**: 365–389.
- Tournefort, J. P. 1694.** *Eléments de Botanique*. Paris: l'Imprimerie Royale.
- Walker, D.B. 1975.** Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynoecial ontogeny. *American Journal of Botany* **62**:457-467.
- Woodson, R. E., Jr. 1930.** Studies in the Apocynaceae. I. A critical study of the Apocynoideae (with special reference to the genus *Apocynum*). *Ann. Missouri Bot. Gard.* **17**: 1-213.
- Woodson Jr, R.E. & Moore, J.A. 1938.** The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceous flowers.

Capítulo I

Morfoanatomia de coléteres calicinais em *Allamanda* L.(Apocynaceae)

Introdução

Coléteres são estruturas secretoras encontradas em 58 famílias de angiospermas, desde aquelas advindas de linhagens basais até aquelas pertencentes a linhagens mais derivadas. Estas estruturas são particularmente comuns em famílias pertencentes à ordem Gentianales, especialmente Apocynaceae e Rubiaceae (Lersten, 1974a, b; Ezcurra, 1981; Thomas 1991; Rio & Kinoshita, 2002; Judd *et al.*, 2007).

Os coléteres receberam diferentes denominações ao longo do tempo, dentre as quais se podem citar: “squamellae” (Woodson & Moore, 1938; Rao & Ganguli, 1963; Ramayya & Bahadur, 1968; Allorge, 1976), “glândula” (Solereeder, 1908; Meyer, 1944; Metcalfe & Chalk 1950, 1979; Occhioni, 1956; Fontella-Pereira, 1965; Spellman, 1975), “protuberâncias glandulares” e “escamas” (Rao & Ganguli, 1963).

A origem destas estruturas secretoras foi pesquisada, entre outros, por Decaisne (1844), Fournier (1885), Schumann (1895), Malme (1900), Solereeder (1908) e Hoehne (1916). Woodson & Moore (1938) interpretaram os coléteres (“squamellae”) como sendo estípulas vestigiais. Allorge (1976), por outro lado, contestou a origem estipular descrita por Woodson & Moore (1938), ao menos para os coléteres florais, pelo fato dessas glândulas estarem inseridas na fase ventral das lacínias do cálice. Mais recentemente, Rio & Kinoshita (2002) ao estudarem a espécie *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson, relataram a ocorrência de uma origem independente para os coléteres.

Em Apocynaceae os coléteres são emergências (Thomas, 1991) que podem ser encontrados na margem da lâmina foliar, inter ou intrapeciolar, brácteas, bractéolas, região nodal e sépalas, sendo descritos em 65 gêneros, incluindo *Allamanda* (ex. Ezcurra, 1981; Woodson, 1950; Woodson e Moore, 1938; Rao & Ganguli, 1963a, b; Fjell, 1983; Dave *et al.*, 1987; Thomas & Dave, 1989a, b; Thomas, 1991; Appezzato da Gloria & Estelita, 2000; Rio, 2001, 2006; Rio *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2004; Demarco, 2005, 2008; Rio *et al.*, 2005; Gomes, 2006; Simões *et al.*, 2006; Marasca, 2008).

Nas sépalas, os coléteres são denominados de coléteres calicinais e são encontrados em espécies das cinco subfamílias atualmente reconhecidas: Rauvolfioideae Kostel., Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R.Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R. Br. ex Burnett (Endress & Bruyns, 2000; Endress *et al.*, 2007). Os coléteres calicinais geralmente apresentam-se como estruturas digitiformes a laminares ligadas à base da face adaxial das sépalas, mas podem também ocorrer na forma de pequenas protuberâncias na margem das lacínias (Rao & Ganguli, 1963a, b; Allorge, 1976; Fallen, 1986; Endress & Bruyns, 2000).

Os coléteres calicinais destacam-se pela importância taxonômica, na derivação dos diferentes níveis hierárquicos por apresentarem variações quanto ao número, forma, arranjo e distribuição (Rao, 1956; Woodson & Moore, 1938; Sakane & Shepherd, 1986; Thomas 1991; Endress & Bruyns, 2000; Koch *et al.*, 2002; Rio & Kinoshita, 2005; *Rio et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2006). Em relação à forma, o tipo mais comum é o *Standard* (Lersten, 1974a, b) sendo caracterizado como um órgão digitiforme com uma longa cabeça secretora maciça e um pedúnculo curto e não secretor. Contudo, outras formas como bífidos, fimbriados, laminares e ramificados já foram descritos para espécies de Apocynaceae (Thomas, 1991; Rio, 2001; *Rio et al.*, 2002, *Rio et al.*, 2005; Demarco, 2005; Simões *et al.*, 2006; Marasca, 2008). Coléteres calicinais dentiformes, fundidos na base também foram registrados por Matozinhos & Konno (2011). Segundo Simões *et al.* (2006), coléteres laminares, bifurcados e sésseis possivelmente são derivações do tipo *Standard*, tendo a separação, a proliferação ou o alongamento das células do coléter como mecanismos fundamentais de mudança estrutural. Quanto à distribuição dos coléteres, estes podem ser alternos, opostos ou contínuos (Rao & Ganguli, 1963; Thomas *et al.*, 1989; Sennblad *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2006). Woodson & Moore (1938) sugeriram que coléteres alternos representariam uma condição basal, enquanto os opostos uma condição derivada.

Os coléteres atuam principalmente na proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, por apresentarem um corpo secretor que produz exsudatos que impedem o dessecação (Thomas, 1991; Demarco, 2008). Este corpo secretor é constituído por uma região central de células parenquimáticas revestidas por epiderme em paliçada secretora e uniestratificada. São as células epidérmicas que produzem e liberam a secreção para o meio extracelular (Thomas *et al.*, 1989; Thomas, 1991; Demarco, 2008). O processo de liberação

dessas substâncias produzidas pelos coléteres foi descrito como a distensão parcial da cutícula com o acúmulo de exsudato (Fjell, 1983).

Os coléteres podem também estar relacionados à função de combater a proliferação de microrganismos patogênicos, uma vez que, continuam persistentes mesmo após o desenvolvimento do órgão (Thomas, 1991; Demarco, 2005, 2008). Os constituintes da secreção podem ser variados em diferentes espécies e em diferentes estágios de desenvolvimento, desde única e exclusivamente mucilaginosa, misto de mucilagem e compostos lipofílicos, podendo apresentar só compostos lipofílicos após término de produção e liberação de mucilagem (Fahn, 1979; Thomas *et al.*, 1989; Thomas, 1991; Appezzato-da-Gloria & Estelita, 2000; Demarco, 2005, 2008; Rio, 2006; Marasca, 2008). Os testes histoquímicos ajudam na diferenciação destas estruturas dos nectários extraflorais que por muitas vezes se confundem. Segundo Thomas (1991), existem diversas estruturas secretoras de mucilagem que não são cóleteres.

A ausência de vascularização nos coléteres calicinais em espécies de Apocynaceae foi considerada uma característica predominante por Woodson & Moore (1938); entretanto, coléteres calicinais vascularizados foram observados (Woodson & Moore, 1938; Rao & Ganguli, 1963; Dave *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1989). Laticíferos de pequeno calibre estão presentes nos coléteres de alguns gêneros de Apocynaceae, tendo sido registrados em *Allamanda*, *Mandevilla* e *Nerium* (Thomas & Dave 1989a, 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita, 2000).

No gênero *Allamanda*, os coléteres são encontrados no pecíolo, brácteas, bractéolas e cálice (Thomas & Dave, 1991; Sakane & Shepherd, 1986), sendo que a presença ou ausência de coléteres calicinais é importante para a delimitação de espécies (Sakane & Shepherd, 1986).

Diante da falta de estudos morfoanatômicos e histoquímicos em coléteres calicinais abordando o gênero, o presente estudo tem o objetivo de descrever morfoanatomicamente e identificar o tipo de compostos secretados por estes coléteres calicinais, além de verificar a ocorrência, a posição, o número e o tipo destas estruturas secretoras em espécies de *Allamanda* com possíveis valores para a taxonomia do gênero e filogenia da tribo. Este estudo também busca trazer novos dados para o conhecimento das Apocynaceae neotropicais.

Materiais e métodos

Material Botânico

Para a realização deste estudo foram utilizadas flores em antese de *A. cathartica* L., *A. laevis* Markgr., *A. puberula* A.DC. e *A. schottii* Pohl, coletadas a partir de indivíduos localizados no Campus da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), SP (*A. schottii* e *A. cathartica*), Grão Mogol, MG (*A. puberula*) e região de Medina, MG (*A. laevis*).

Os exemplares foram identificados pela primeira autora e a identificação posteriormente confirmada pelo Prof. Dr. André Olmos Simões. Os materiais testemunho foram herborizados e incorporados ao Herbário UEC.

Tabela 01. Dados de coleta das espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae).

Espécie	Localidade	Nome e nºcoletor	Data	Número do coletor
<i>A. cathartica</i>	Campinas, Unicamp, SP	Kotovski E.R.	20/06/2011	4
<i>A. laevis</i>	Medina, MG	Kotovski E.R. <i>et al.</i>	26/02/2012	2
<i>A. puberula</i>	Grão Mogol, MG	Kotovski E.R. <i>et al.</i>	26/02/2012	1
<i>A. schottii</i>	Campinas, Unicamp, SP	Kotovski E.R.	20/06/2011	3

Estudos anatômicos

Flores em antese foram isoladas do material previamente coletado e fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)). Devido ao grande tamanho das flores destas espécies, optou-se por seccionar as mesmas em uma porção basal (região do ovário) com o comprimento de aproximadamente um 1cm. O material foi previamente desidratado pela série butílica até à concentração de 100% (Johansen, 1940) e incluído em paraplast. Após o emblocamento foram feitos seccionamentos em micrótomo rotativo Leica. Cortes seriados transversais e longitudinais foram obtidos com 12µm de espessura, montados em lâminas e corados com Safranina alcoólica 1% e Azul de Astra 1% (Gerlach, 1984). As lâminas permanentes foram montadas com resina sintética Permout e observadas em microscópio Olympus BX51. As imagens em alta resolução dos aspectos considerados relevantes foram obtidas em câmera digital DP72 acoplada ao microscópio, e as pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Histoquímica

Para o estudo histoquímico, foram separadas lâminas, desparafinizadas e sem corar, com cortes longitudinais e transversais de coléteres calicinais fixados em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)).

Os tratamentos feitos para a detecção de presença dos principais compostos químicos foram: Vermelho de Rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas, 1989), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reation) para polissacarídeos totais (Jensen, 1962), Preto de Sudão e Sudão IV para lipídeos totais (Pearse, 1985), Azul de Alciano para mucopolissacarídeos ácidos. As lâminas foram montadas em gelatina glicerina e observadas em microscópio Olympus BX51. As imagens em alta resolução dos aspectos considerados relevantes foram obtidas em câmera digital DP72 acoplada ao microscópio, e as pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise micromorfológica, o material fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)) foi desidratado em série etílica até 100%, seco pelo método de ponto crítico, montado em suporte e submetido a metalização com ouro. As observações e registros de imagens foram efetuados em MEV Jeol JSM 5800 LV a 10kV com câmera digital acoplada. As pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Resultados

Coléteres calicinais foram encontrados em *A. laevis*, *A. puberula* e em *A. schottii*, estando ausentes em *A. cathartica* (Figs. 09, 15, 21). Os coléteres nas três espécies são persistentes, mantendo sua forma e a atividade secretora na flor em antese (Figs. 01-03).

Os coléteres de *A. laevis* e *A. schottii* se localizam na base da face adaxial das sépalas. Em *A. laevis*, ocorrem em cinco conjuntos opostos às sépalas (Figs. 02 e 18), enquanto em *A. schottii* ocorrem na forma de um conjunto único circundando a base da corola (Figs. 03 e 24). Já em *A. puberula*, os coléteres estão inseridos na margem das sépalas internas e são ausentes nas sépalas externas (Figs. 01 e 11).

O número de coléteres em cada sépala é variável até mesmo em uma mesma flor. *A. laevis* pode ter de quatro a oito ou mais (Fig. 02), *A. puberula* de zero a dois (Fig. 01), e em *A. schottii* esse número é difícil de precisar pela fusão entre eles (Fig. 03).

Os coléteres são inteiros e levemente achatados dorsoventralmente em *A. puberula* (Figs. 01,06), inteiros ou bífidos na mesma flor em *A. laevis* (Figs. 02, 07, 08) e em *A. schottii* podem ser inteiros ou fundidos, bífidos ou ramificados (Figs. 03, 04, 05). Em *A. puberula* estas estruturas secretoras apresentam um pedúnculo relativamente longo e estreito, atingindo um terço do comprimento total do coléter, e um corpo cônico-ovoide arredondado no ápice, mantido como tipo *Standard* (Fig. 06). Em *A. laevis* podem ser do tipo *Standard* ou com ápice levemente bífido, com um pedúnculo curto e alargado e um corpo longo (Figs. 07,08). Em *A. schottii* ocorre uma variação, sendo os coléteres na sua maioria fundidos entre si (fig. 25); os inteiros podem ser do tipo *Standard*, bífido ou ramificado (Figs. 03, 04, 05).

Um resumo do tipo dos coléteres calicinais encontrados nas três espécies está disponível na Tabela 02, com informações sobre o tamanho e forma dos pendúnculos.

Tabela 02: Resumo dos tipos de coléteres calicinais e tamanho e forma dos pedúnculos encontrados nas três espécies de *Allamanda* (Apocynaceae).

Espécies	Tipo de coléteres	Tamanho e forma do pendúnculo
<i>Allamanda laevis</i>	<i>Standard</i> e bifurcado	Curto e mais largo que o corpo secretor
<i>Allamanda puberula</i>	<i>Standard</i>	Longo e mais estreito que o corpo secretor
<i>Allamanda schottii</i>	<i>Standard</i> , bifurcado, ramificado e fundidos.	Curto e mais largo que o corpo secretor

Nas três espécies o pedúnculo dos coléteres é constituído por uma epiderme unisseriada não secretora, recoberta por uma camada de cutícula delgada e células parenquimáticas. A porção secretora, denominada de corpo é constituída por uma camada de células alongadas dispostas em paliçada recoberta por uma cutícula fina e com eixo central

parenquimático de células não secretoras alongadas longitudinalmente e perpendicular às células epidérmicas (Figs. 10-14, 15-17, 21-23).

As células secretoras têm paredes finas e citoplasma de aspecto denso, responsáveis pela produção de exsudato ácido, que cora fortemente pela safranina. O núcleo ocupa diferentes posições dentro da célula, porém predomina na região basal desta célula (Figs. 13-14, 17-20, 23, 26). Espaços periplasmático formados pela retração do protoplasto, também estão presentes nas células em paliçada (Figs. 13, 17, 23). Na região mais apical da cabeça do coléter ocorre o destacamento da cutícula formando um espaço subcuticular, sendo possível visualizar a presença de secreção nesta região. A secreção é liberada para o exterior sem o rompimento da cutícula (Figs. 16, 20, 32).

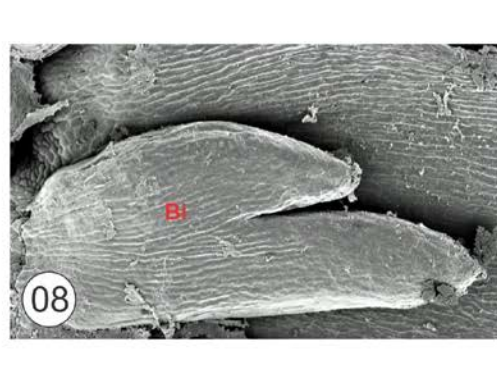
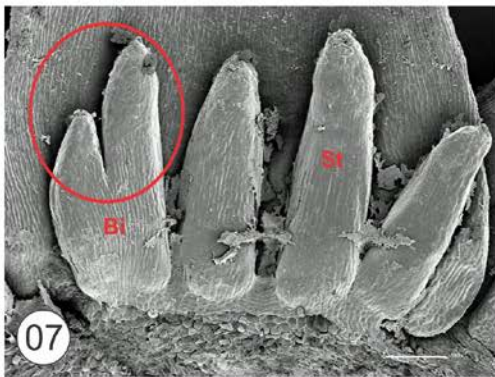
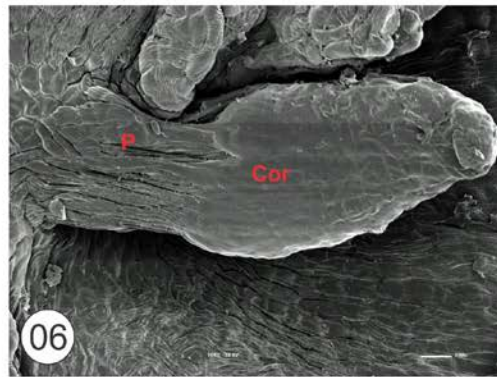
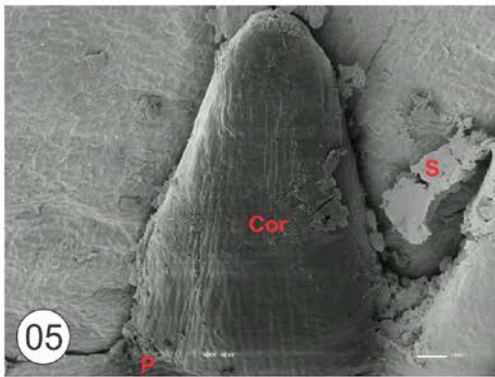
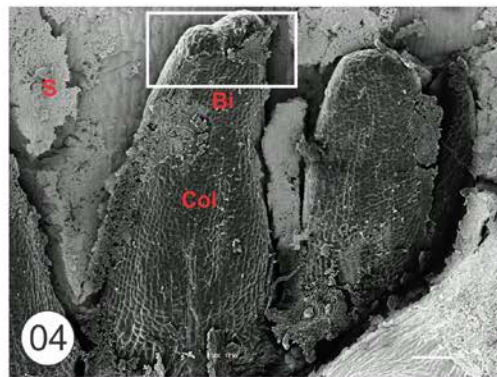
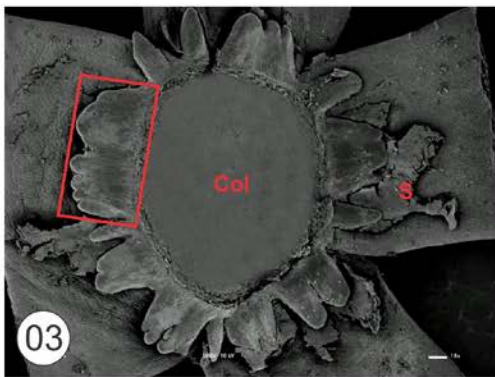
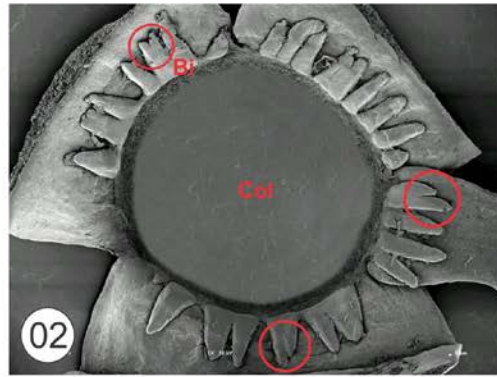
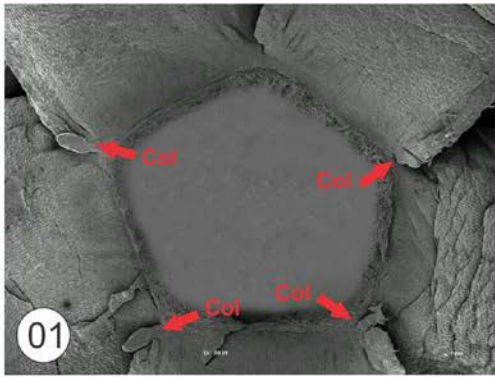
Nas três espécies, os coléteres calicinais não apresentam tricomas, vascularização, idioblastos, laticíferos ou qualquer outro tipo celular (Figs. 14, 16, 20, 22, 26).

Os testes histoquímicos confirmaram a presença de secreção heterogênea nos coléteres, com variação do tipo de compostos entre as espécies estudadas (Figs. 27-47). Em *A. schottii*, a secreção reagiu positivamente para polissacarídeos totais (Figs. 29-30), mucilagem ácida (Fig. 33, 36-37), lipídeos totais (Figs. 39, 42) e compostos fenólicos (Figs. 45-47), evidenciados pelos testes de PAS, Vermelho de Rutênio, Azul de Alciano, Sudão IV, Preto de Sudão e Sulfato Ferroso em Formalina (SFF), respectivamente. Estas secreções podem ser vistas tanto no interior das células secretoras quanto no meio extracelular. O teste com SFF só foi realizado em *A. schottii*, por ser a única espécie a ter material fresco para a fixação neste meio. Já em *A. laevis*, a secreção é composta por polissacarídeos totais (Figs. 27-28), polissacarídeos ácidos (Figs. 34-35) e lipídeos totais (Figs. 40, 43-44). Contudo, resultado negativo para lipídeos totais pela técnica de Preto de Sudão também foi observado nos coléteres, corando apenas a cutícula (Fig. 43). Em *A. puberula*, o resultado foi positivo para polissacarídeos totais (Fig. 31) e lipídeos totais (Fig. 41) e, diferentemente das demais espécies o resultado foi negativo para polissacarídeos ácidos (Fig. 38). Para uma melhor visualização dos resultados os testes histoquímicos estão apresentados também na Tabela 03.

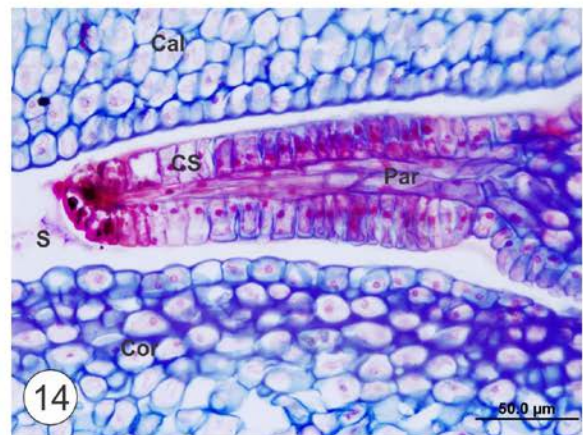
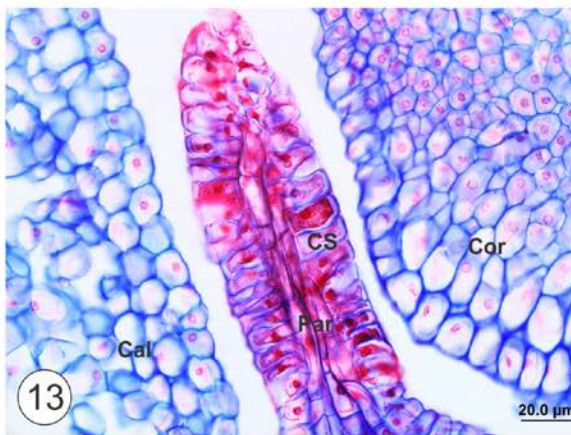
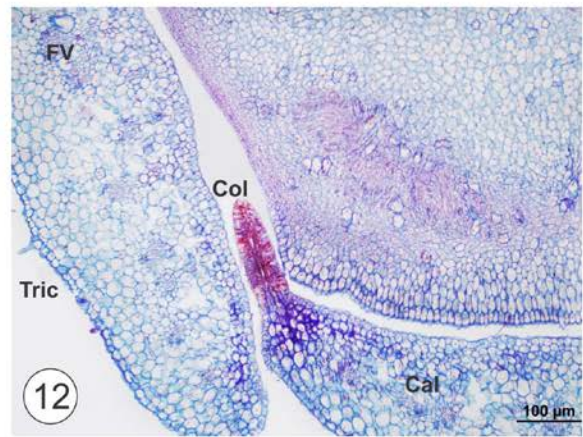
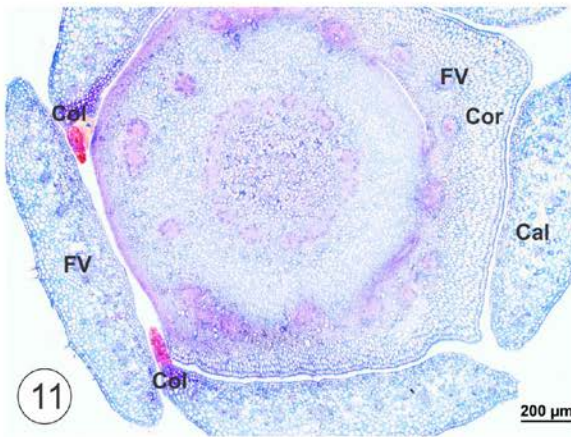
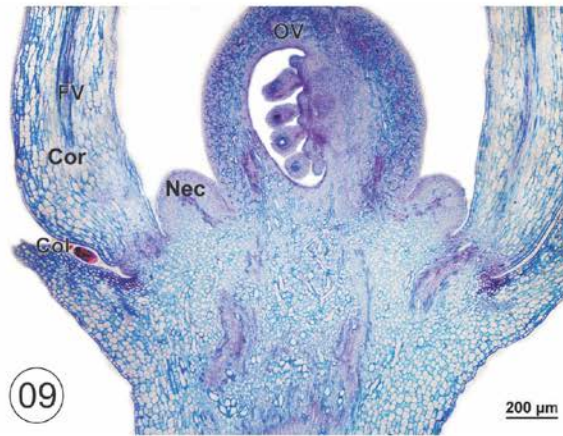
Tabela 03: Resultados dos testes histoquímicos aplicados em coléteres calicinais em *Allamanda* (Apocynaceae) + (positivo para o teste); - (negativo para o teste); 0 (não testado); +/- (resultado positivo e negativo dependendo do coléter); (F) (fraco positivo).

Tratamento histoquímico		Coléteres calicinais		
		<i>A. laevis</i>	<i>A. puberula</i>	<i>A. schottii</i>
Vermelho de Rutênio	Mucilagens ácidas	—	0	+ (F)
Reação PAS	Polissacarídeos totais	+	+	+
Reagente de Lugol	Amido	—	—	—
Sulfato ferroso em formalina	Compostos fenólicos totais	0	0	+
Sudão IV	Lipídeos totais	+	+	+
Preto de Sudão	Lipídeos totais	+/_	0	+
	Mucopolissacarídeos ácidos	+ (F)	—	+

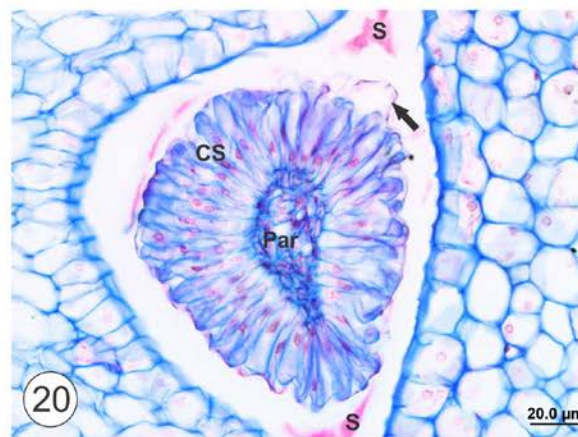
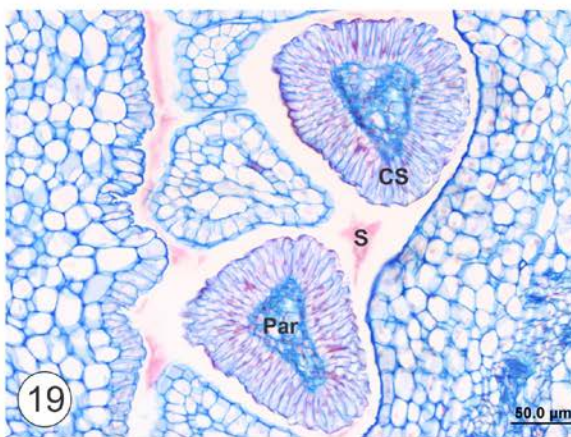
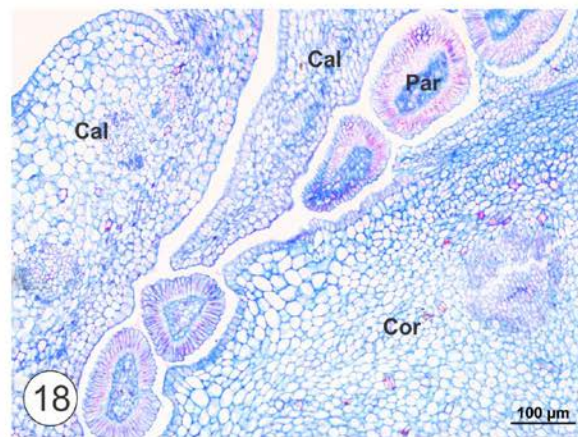
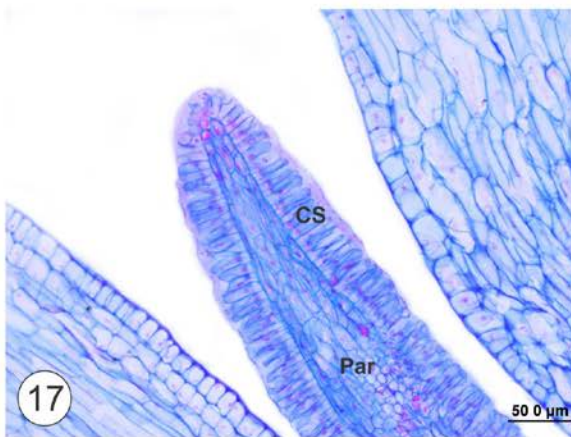
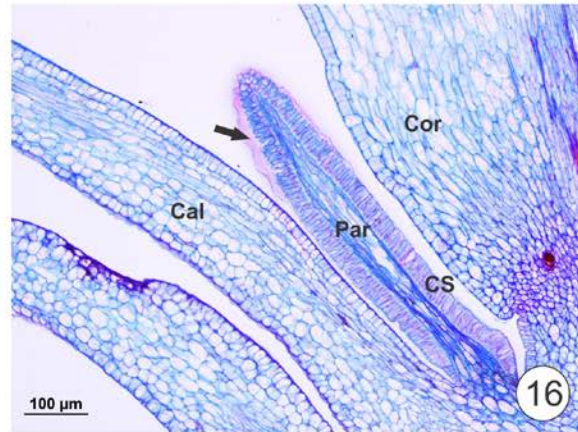
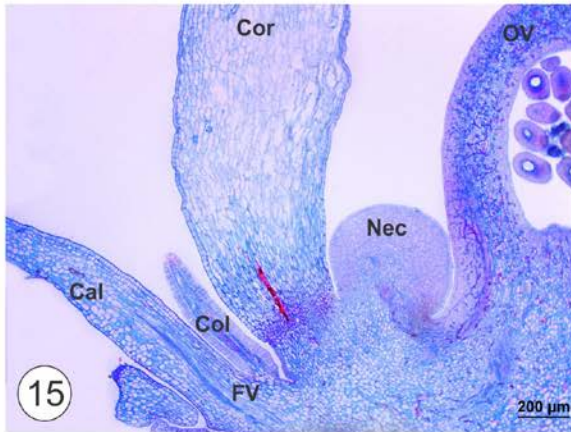
Figuras 01-08: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de coléteres calicinais em *Allamanda* L. (Apocynaceae). 01-03, vista geral dos coléteres calicinais. 01-*Allamanda puberula*; 02-*Allamanda laevis*; 03-*Allamanda schottii*, indeterminados. 04 e 05-Detalhes dos coléteres calicinais de *A. schottii*. 06-Detalhe dos coléteres calicinais de *A. puberula*. 07 e 08-Detalhe dos coléteres de *A. laevis*. **Círculos e **retângulo branco** indicando a bifurcação dos coléteres; **Retângulo vermelho** indicando coléteres fundidos; **Bi**=Bifurcação; **Col**=Coléter; **Cor**=Corpo secretor; **P**=Pendunculo não secretor; **S**=Secreção; **St**=Standard.**



Figuras 09-14: Secções anatômicas de coléteres calicinais de *Allamanda puberula* (Apocynaceae). 09 e 10, secções longitudinais; 11-14, secções transversais. 09- Vista geral da localização dos coléteres na flor. **10-** Detalhe do coléter. **12-** Distribuição dos coléteres calicinais. **12-14-** Detalhes dos coléteres calicinais, mostrando o corpo secretor. **Cal**=Cálice; **Col**=Coléter; **Cor**=Corola; **CS**=Células secretoras; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **Nec**=Nectário; **Ov**=Ovário; **S**=Secreção; **Tric**=Tricomas.

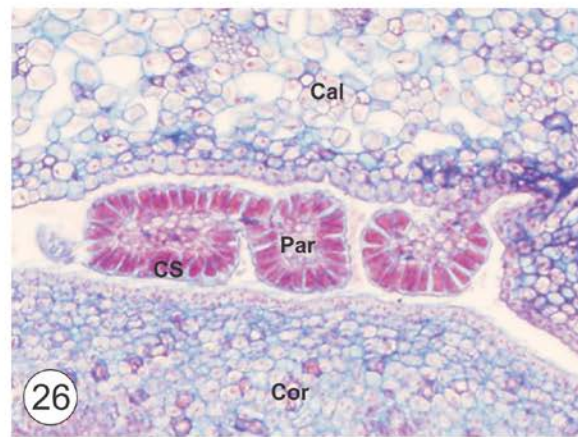
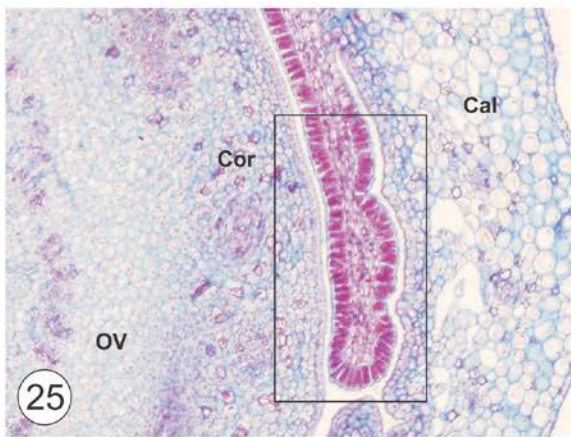
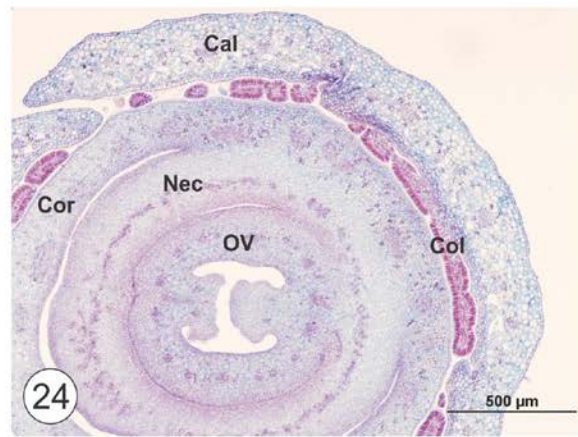
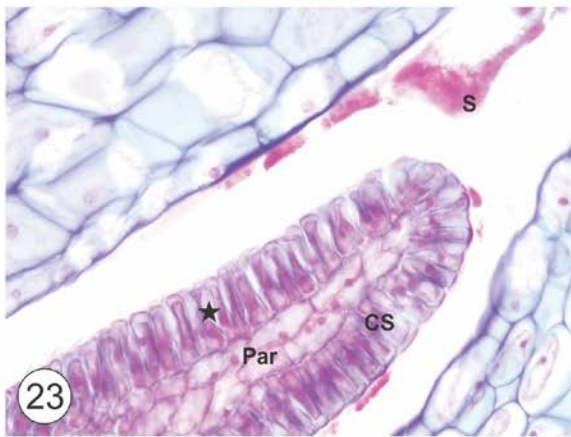
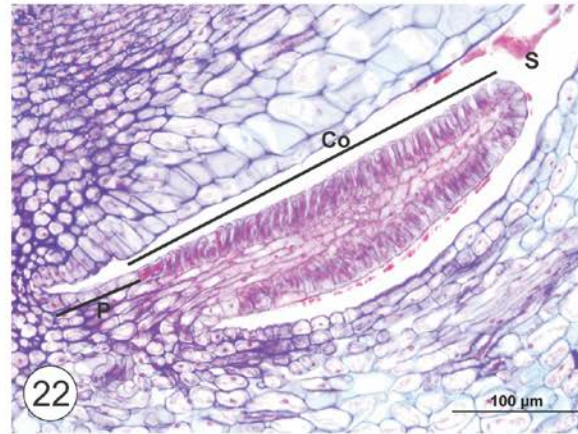
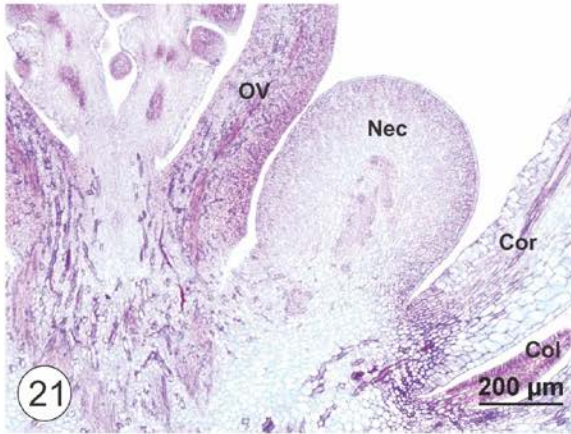


Figuras 15-20: Secções anatómicas de coléteres calicinais de *Allamanda laevis* (Apocynaceae). 15-17, secções longitudinais; 18-20, secções transversais. 15-Vista geral da localização dos coléteres na flor. 16 e 17-Detalhe do coléter. 18-Distribuição dos coléteres calicinais. Secreção (19) distensão da cutícula (20). **Cal=Cálice; **Col**=Coléter; **Cor**=Corola; **CS**=Células secretoras; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **Nec**=Nectário; **Ov**=Ovário; **S**=Secreção; **Setas** indicando a distensão da cutícula.**



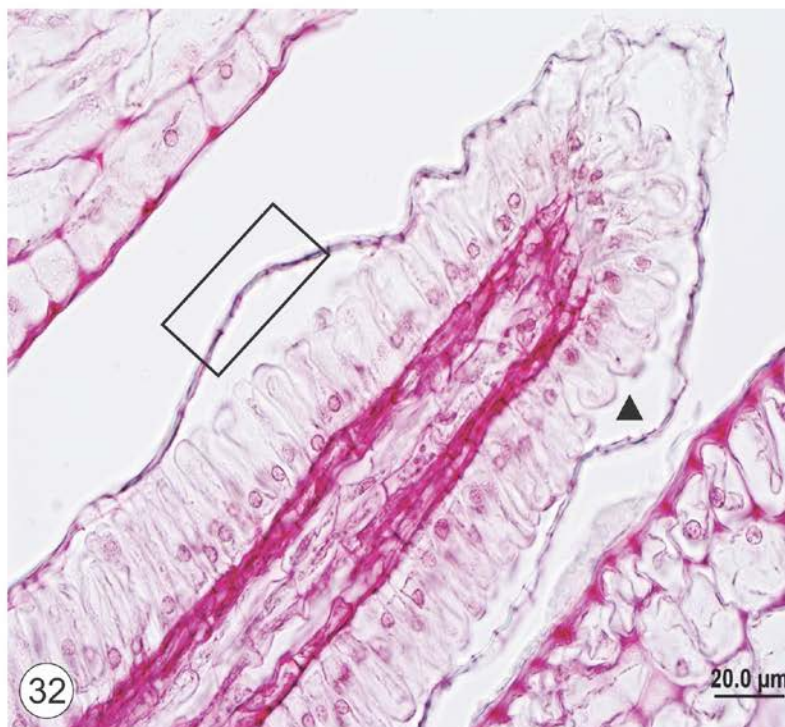
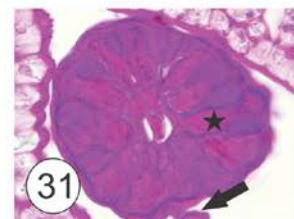
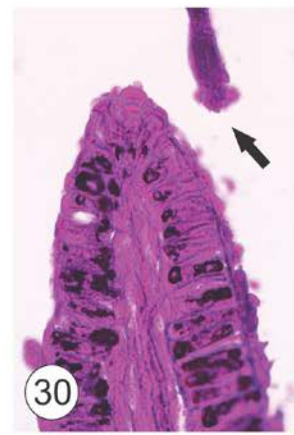
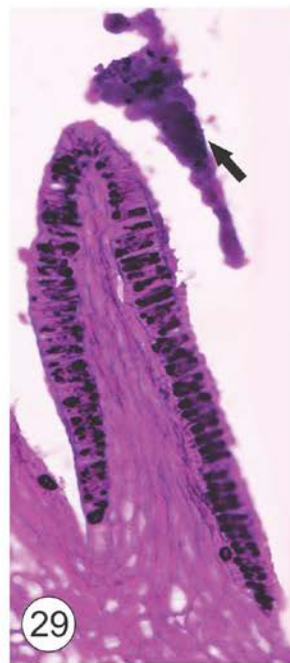
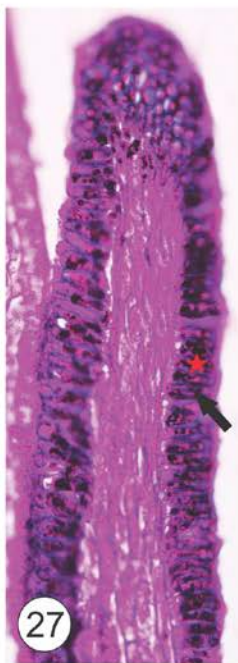
Figuras 21-26: secções anatômicas de coléteres calicinais de *Allamanda schottii*.

21-23, secções longitudinais; **24-26**, secções transversais. **21**-Vista geral da localização dos coléteres na flor. **22 e 23**-Detalhe do coléter, mostrando o pedúnculo e o corpo secretor. **24**-Distribuição dos coléteres calicinais. **25 e 26**-Detalhes dos coléteres calicinais, mostrando a fusão entre os coléteres (retângulo). **Cal**=Cálice; **Col**=Coléter; **Cor**=Corola; **CS**=Células secretoras; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **Nec**=Nectário; **Ov**=Ovário; **S**=Secreção; **Estrela**=Retração do protoplasto.

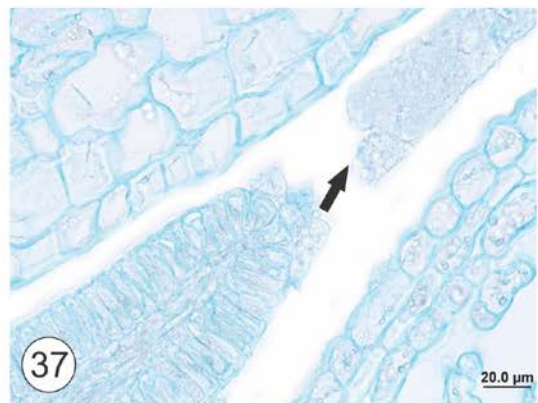
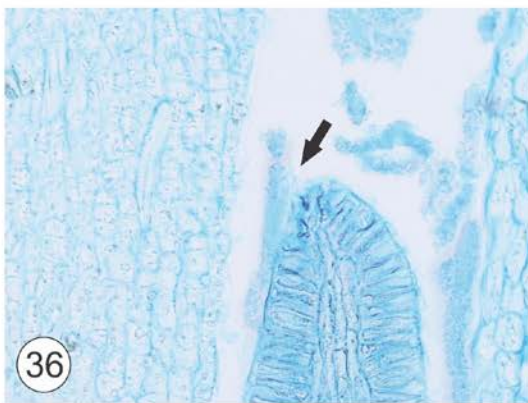
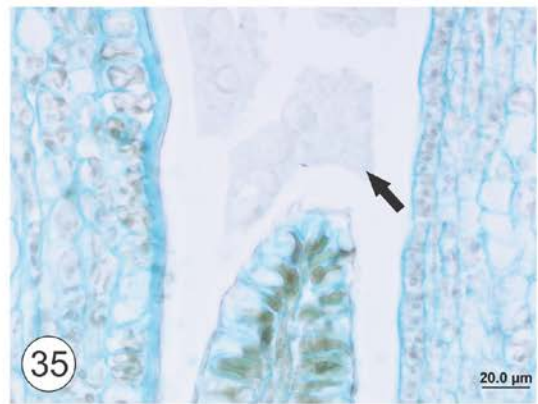
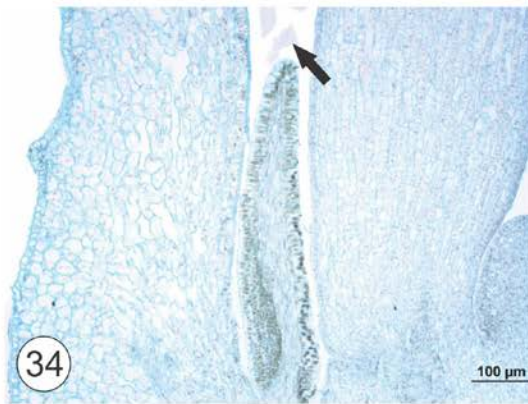


Figuras 27-31: Teste histoquímico com PAS em coléteres calicinais em *Allamanda*. 27 e 28-A. *laevis*, secções longitudinais; 29 e 30-A. *schottii*, secções longitudinais; 31-A. *puberula*, secção transversal. **Setas indicam a secreção extracelular e **Estrelas** indicam secreção no interior citoplasmático.**

Figuras 32-33: Teste histoquímico com Vermelho de Rutênio para mucilagem ácida em coléteres calicinais em *Allamanda*. 32-A. *laevis*, secção longitudinal. Resultado positivo apenas para a primeira camada de células parenquimáticas. Notar a distensão da cutícula e a presença de pontuações (retângulo); 33-A. *schottii*; 31-A. *puberula*, secção transversal com positivo para a secreção intra e extracelular. **Setas indicam a secreção extracelular; **Triângulo**=distensão; **Retângulo**=Cutícula distendida com pontuações.**



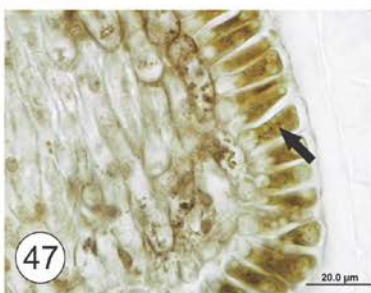
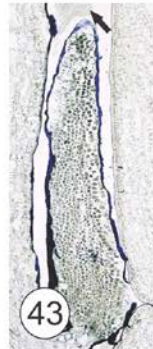
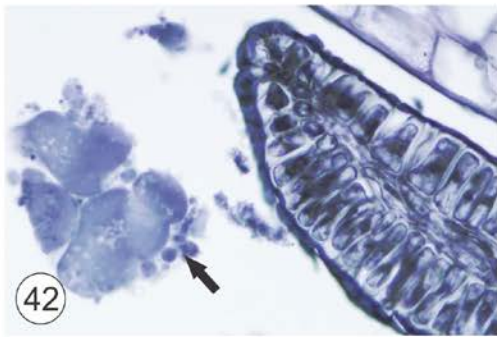
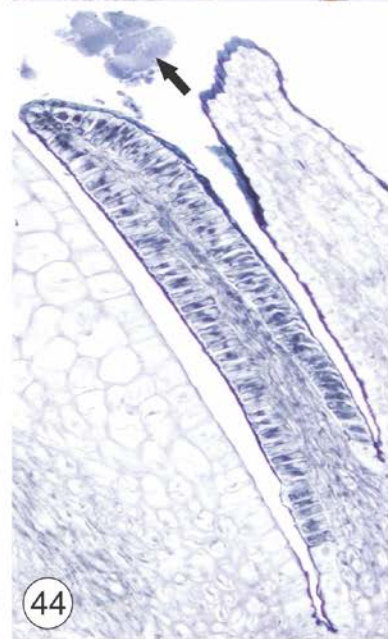
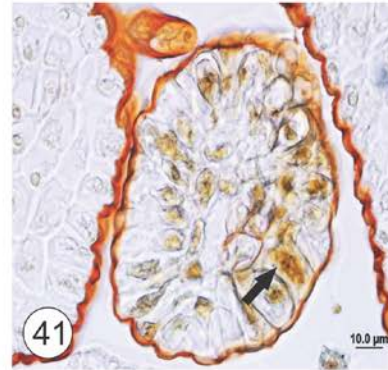
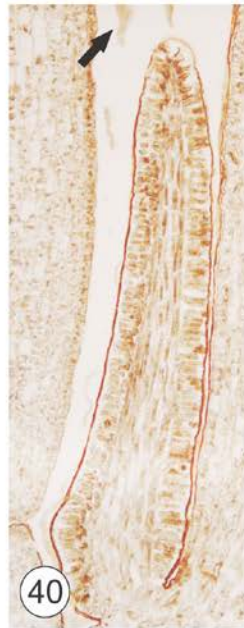
Figuras 34-38: Teste histoquímico com Azul de Alcian em coléteres calicinais de *Allamanda* para mucopolissacarídeos ácidos. Figuras 34 e 35- *A. laevis*, fraco positivo; 36 e 37-*A. schottii*, positivo e 38-*A. puberula*, negativo para a secreção. **Setas** indicam a secreção extracelular.



Figuras 39-41: Teste histoquímico com Sudão IV para lipídeos totais em coléteres calicinais em *Allamanda* L. (Apocynaceae). 39-*A. schottii*, secção longitudinal; 40-*A. laevis*, secção longitudinal; 41-*A. puberula*, secção transversa. Em todas as espécies o resultado foi positivo. **Setas** indicam a secreção.

Figuras 42-44: Teste histoquímico com Preto de Sudão para lipídeos totais em coléteres calicinais em *Allamanda* L. (Apocynaceae). 42-*A. schottii*, secção longitudinal; 43 e 44-*A. laevis*, secção longitudinal. Resultado positivo para ambas as espécies, contudo na figura 43 apenas corou a cutícula. **Setas** indicam a secreção.

Figuras 45-47: Teste histoquímico com Sufato Ferroso em Formalina (SFF) para compostos fenólicos em coléteres calicinais em *Allamanda* L. (Apocynaceae). 45-47-*A. puberula*, secções transversais. Resultado positivo no interior das células em paliçada. **Setas** indicando compostos fenólicos.



Discussão

A importância taxonômica dos coléteres calicinais foi evidenciada por Woodson & Moore (1938), quanto à variação da sua forma, número e posição. Segundo estes autores, há três categorias relacionadas com o cálice: alternos, opostos ou contínuos às sépalas, podendo ser utilizados para diagnóstico de espécies em chave de identificação, como para *Allamanda* (Sakane & Shepherd, 1986). A quantidade pode variar entre indivíduos, como em *Thevetia* (Thomas, 1991), ou mesmo no próprio indivíduo como em *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco, 2005). Neste estudo, os coléteres calicinais solitários ocorrem na margem somente das sépalas internas em *A. puberula*, como descrito para outras espécies como *Oxipetalum banksii* var. *banksii*, *Asclepia curassavica* L., *Gonolobus axillaris* Vell., e *M. denticulata* (Vahl) Fontella & E. A. Schwarz (Demarco, 2008), diferindo da descrição feita por Sakane & Shepherd (1986). Estes autores registraram a presença de coléteres em todas as cinco sépalas, variando de dois a oito coléteres opostos as sépalas e formando um anel quase contínuo ao redor da base do cálice. Em *A. laevis* os coléteres opostos às sépalas se dispõem contornando quase que completamente o tubo da corola como descrito por Sakane & Shepherd (1986). Contudo estes autores relataram a ausência de coléteres nas duas lacínias menores, o que não ocorreu com os exemplares observados neste estudo. Em *A. schottii*, a disposição é contínua e o número de coléteres é difícil de definir por eles estarem fundidos entre si. Provavelmente esta fusão ocorra durante o desenvolvimento desses coléteres calicinais. Estes padrões de distribuição encontrados nas espécies de *Allamanda* também são vistos em outras espécies de Rauvolfioideae (com mais de uma fileira em alguns representantes de Tabernaemontaneae G. Don e Hunterieae Miers, (Endress & Bruyns, 2000; Simões *et al.*, 2007).

Tabela 04: Disposição e ocorrência dos coléteres calicinais em espécies de *Allamanda* (Apocynaceae) entre os estudos de Sakane & Shepherd (1986) e o atual, com diferenças destacadas em vermelho.

	Estudo presente	Sakane & Sherpherd (1986)	Estudo presente	Sakane & Sherpherd (1986)
Espécies	Disposição nas lacínias	Disposição nas lacínias	Ocorrencia nas lacínias	Ocorrencia nas lacínias
<i>A. laevis</i>	Oposissépalo	Oposissépalo	Em todas	Apenas nas maiores
<i>A. puberula</i>	Alternissépalo	Oposissépalo	Apenas nas internas	Em todas
<i>A. schottii</i>	Indeterminado	Oposissépalo	Em todas	Em todas

Diferenças no tamanho dos coléteres foram relatadas para espécies de *Forsteronia* G. Mey., *Mandevilla* Lindl., *Macrosiphonia* Müll.Arg., *Mesechites* Müll.Arg. (Galetto, 1997; Appezzato-da-Gloria & Estelita, 2000; Simões *et al.*, 2006; Marasca, 2008). Em *A. schottii* e em *A. laevis*, os coléteres também têm tamanhos variados na mesma flor, sugerindo que esta característica seja variável e de baixo valor taxonômico em Apocynaceae. É digno de menção que os coléteres de *A. puberula* são consideravelmente menores do que os de *A. laevis* e *A. schottii*, sugerindo uma possível correlação entre organização em relação às lacínias e tamanho geral.

Quanto à morfologia dos coléteres, o tipo mais comumente relatado para Apocynaceae é o *Standard* como descrito por Lestern (1974a) visto, por exemplo, em *Thevetia* L. (Fjell, 1983), *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson, podendo ter base reduzida e alargada com ou sem tricomas, como encontrados em diversas espécies de Apocynaceae (Endress & Bruyns, 2000; Rio & Kinoshita, 2002).

Em *A. puberula* estas emergências glandulares foram mantidas como o tipo *Standard*, apresentando um corpo cônico-ovoide curto e arredondado no ápice e um pedúnculo mais estreito, atingindo um terço do comprimento total do coléter como visto em coléteres foliares de *Rauvolfia sellowii* (Marasca, 2008). Porém este tipo de coléter não condiz com a definição do tipo *Standard* feita por Lestern (1974a), visto que, este autor caracterizou o tipo *Standard* como apresentando um pedúnculo curto e em *A. puberula* esse pedúnculo é longo. Sakane & Shepherd (1986) descreveram os coléteres de *A. puberula* como formados por uma cabeça secretora longa com ápice acuminado e pedúnculo curto e alargado, o que não foi confirmado pelos resultados deste estudo. Em *A. laevis*, os coléteres se apresentam como tipo *Standard* ou com ápice bifido, porém Sakane & Shepherd (1986) descrevem o ápice de *A. laevis* como sendo agudo, diferindo do aqui registrado. Em *A. schottii* ocorre uma variação, sendo os coléteres na sua maioria fundidos entre si ou ramificados; os inteiros são do tipo *Standard*, como descrito para *Mandevilla* Lind. (Appezzato-da-gloria & Estelito, 2000), entretanto Sakane & Shepherd (1986) apenas descreveram e ilustraram o tipo *Standard* sem mencionar as variações estruturais aqui encontradas. Coléteres do tipo *Standard*, cônico e ramificado também foram descritos para *Prestonia* R. Br., *Blepharodon* Decne, *Forsteronia* spp., *Mandevilla* spp., *Ceropegia* spp., *Cryptolepis* spp., *Rauvolfia sellowii* e *Holarrhena* spp. (Rao &

ganguli, 1963; Rio, 2001; Rio *et al.*, 2002; Demarco, 2005; Rio *et al.*, 2005; Rio, 2006; Simões *et al.*, 2006 e Marasco, 2008). Segundo Simões *et al.* (2006), a bifurcação se dá pela separação celular no desenvolvimento desta estrutura e provavelmente a ramificação ocorra da mesma forma. Como o coléter do tipo *Standard* aparece tanto em gêneros mais basais quanto em gêneros mais derivados em Apocynaceae, supõe-se que esta seja uma condição plesiomórfica. Os demais tipos já relatados para a família seriam, por consequência, condições apomórficas surgidas independentemente em diferentes grupos de Apocynaceae como sugerido por Simões *et al.* (2006).

Os coléteres são menos achatados dorsiventralmente em *A. puberula* e mais achatados dorsiventralmente nas outras duas espécies. Allorge (1976) interpreta o achatamento dorsiventral dos coléteres como sendo o efeito da compressão destas estruturas pelo cálice e corola, contudo, as formas estão relacionadas com cada espécie, como descritas por Sakane & Shepherd (1986), visto que *A. puberula* tem a forma mais globosa.

Anatomicamente, o pedúnculo apresenta diferenças celulares em relação ao corpo principal, não possuindo epiderme secretora. O corpo principal é composto de uma região central de células parenquimáticas, rodeadas por uma camada de células epidérmicas secretoras em paliçada de paredes finas, e cobertas por uma fina cutícula. Nos coléteres de *Allamanda* não foi encontrada vascularização como descrito por Demarco (2008) para *O. banksii* var. *banksii*, *A. curassavica* L., *G. axillaris*, e *M. denticulata*. Tricomas, laticíferos, idioblastos cristalíferos ou qualquer outro tipo celular também estão ausentes. Embora os coléteres calicinais de Apocynaceae sejam normalmente desprovidos de vascularização, coléteres vascularizados já foram observados em algumas espécies desta família também por outros autores (Woodson & Moore, 1938; Rao & Ganguli, 1963). Segundo Appezzato-da-Gloria & Estelito (2000), a vascularização depende da proximidade com os traços vasculares dos órgãos próximos aos locais onde estes coléteres se desenvolvem. Laticíferos foram visualizados em *Plumeria* L e *Vallaris*, *Aganosma* apresenta tricomas no coléteres (Murungan & Inandar, 1987 a; Thomas & Dave, 1989b) e *Rauvolfia sellowii* contém idioblastos cristalíferos com drusas (Marasca, 2008). Thomas & Dave (1991), consideram as modificações estruturais em coléteres como sendo um passo evolutivo.

A função dos coléteres é proteger o meristema (Thomas & Dave, 1991), como também visto por, Ramayya & Bhader (1968), Willians *et al.* (1982), Mueller (1985), Dave *et al.* (1987),

Thomas *et al.* (1988), Esau (1965) e Fahn (1979), que descreveram esta função pela produção e secreção de uma substância viscosa liberada por estas estruturas secretoras.

O exsudato pode apresentar diferentes compostos desde mucilagem como constituinte principal, lipídeos, compostos fenólicos, açúcares, amido, terpenos até uma mistura de vários compostos hidro e lipofílicos (Thomas & Dave, 1991; Esau, 1965; Mohan & Inamdar, 1986; Rio & Kinoshita, 2002; Demarco, 2005; Rio, 2006 e Simões *et al.*, 2006; Demarco, 2008 e Marasca, 2008).

O tipo de composto na secreção dos coléteres variou entre as espécies, mas a presença de polissacarídeos totais (mucilagem) e lipídeos totais em *A. laevis*, *A. puberula* e *A. schottii* é constante. Segundo Demarco (2008), a mucilagem tem um papel importante no início do desenvolvimento floral evitando o dessecamento dos órgãos em desenvolvimento e do meristema pela capacidade de retenção de água pela mucilagem. Compostos lipídicos em células epidérmicas em alta concentração em coléteres foliares jovens já foram registrados em *Allamanda*, desaparecendo em estágio posterior (Thomas & Dave, 1989), porém, neste estudo com coléteres calicinais, ainda em antese é constatada a presença de lipídeos totais em *A. schottii*, *A. laevis* e *A. puberula*, como encontrado em outras espécies, como em *Aganosma*, *Alstonia* G.Don, *Roupelia* e *Nerium* (Thomas & Dave, 1989) e, em *Plumeria*, os compostos lipídicos estão presentes em todos os estádios (Mohan & Inamdar, 1986).

Como os coléteres de *Allamanda* continuam secretores após o desenvolvimento floral, eles provavelmente desempenham a função de combater a proliferação de microrganismos secretando compostos lipídicos que são considerados agentes antimicrobianos como descrito por Demarco (2008) para *Asclepia curassavica* L., *Fischeria stellata* E. Fourn., *Matelia denticulata* (Vahl) Fontella & E. A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *Banksii* Roem. & Schult..

Conclusões

Os coléteres calicinais de *A. laevis* são do tipo opostos, contínuos em *A. schottii* e alternos em *A. puberula*. Eles apresentam pedúnculos estreitos e longos em *A. puberula*, e curtos e alargados em *A. laevis* e *A. schottii*. Os coléteres são compressos dorsi-ventralmente em *A. laevis* e *A. schottii* e menos compressos em *A. puberula*. O tipo *Standard* é encontrado nas três espécies, porém coléteres bífidos ocorrem em *A. laevis* e *A. schottii* e, fundidos e

ramificados em *A. schottii*. O número de coléteres é variável nas três espécies, sendo ausentes nas lacínias externas em *A. puberula*. A porção secretora é formada por epiderme secretora uniestratificada em paliçada e parênquima não secretor em todas as espécies. A secreção é composta por mucilagem, nas três espécies, que tem por função impedir o dessecamento dos meristemas nos estágios iniciais de desenvolvimento da flor e, compostos fenólicos (*A. schottii*) e lipídeos totais que agem como microbicidas, impedindo a proliferação de microrganismos patogênicos em todas as fases. A variação observada nos coléteres das três espécies e a manutenção dos padrões entre os indivíduos confirma o valor taxonômico dos caracteres associados a este órgão em termos de estrutura, organização, dimensões e exsudato produzido.

Tabela 05: Comparação dos resultados obtido dos coléteres calicinais em *Allamanda* L. (Apocynaceae).

Espécies	Tipo de coléter	Padrão de distribuição	Distribuídos em todas as sépalas	Número	Tamanho	Laticíferos Feixes vasculares Idioblastos	Distensão da cutícula sem rompê-la	Compostos secretados
<i>Allamanda laevis</i>	<i>Standard</i> e bifurcado	Opostos	X	Variável (4-8)	variável	—	X	Hidrofílicos e lipofílicos
<i>Allamanda puberula</i>	<i>Standard</i>	Alternos	—	Variável (0-5)	variável	—	X	Hidrofílicos e lipofílicos
<i>Allamanda schottii</i>	<i>Standard</i> , bifurcado, ramificado e fundidos	Contínuos	X	Indeterminado	variável	—	X	Fenólicos, Hidrofílicos e lipofílicos

Referências bibliográficas

- Appezato-Da-Gloria & Estelita, M. E., 2000.** Development, struture and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. veluina* (Apocynaceae)
- Allorge, L. 1976.** *Morphologie et biologie florale des Apocynacées: Applications taxonomiques*. PhD diss. École pratique des Hautes Etudes, Paris.
- Dave,Y., Thomas, V. & Kuriachen, P.M., 1987.** Estruture and development of coleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. *Pakistan Journal of Botany* (19: 243-248).
- Decaisne, J. 1844.** Asclepiadaceae. In: Candolle A.P. (e d.). *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Vol. 8. Fortin, Masson & Cie, Paris. Pp. 490-665.
- Demarco, D. 2005.** Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne (Apocynaceae s.l.). Tese de mestrado, Univ. Estadual de Campinas, Campinas.
- Demarco, D., 2008.** Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécie de Asclepieaeae (R. BR.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de S.P. (Tese de doutorado).
- Endress, M.E. & Bruyns, P. 2000.** A revised classification of Apocynaceae s.l. *Botanical Review*, **66**: 1-56. 74
- Endress, M.E., Liede-Schumann, S. & Meve, U. 2007.** Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 259- 267.
- Esau, K. 1965.** Plant anatomy. Segunda Ed., John Wiley e Sons, New York.
- Ezcurra, C. 1981.** Revisión de las Apocynaceae de la Argentina. *Darwiniana* 23: 367-474.
- Fahn, 1979.** *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press Inc., London.
- Fjell, I. 1983.** Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3: 383-392.
- Fontella-Pereira, J. 1965.** Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras, II. *Sellowia* 17:61-76.
- Fournier, E.P.N. 1885.** Asclepiadaceae. In: Martius C.F.P. & Eichler A.W. (eds.). *Flora brasiliensis*. Typographia Regia, Monachii. Vol. 6, pt. 4. Pp. 189-332; tabs. 50-98.

- Galetto, L. 1997.** Flowers structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192: 197-207.
- Gerlach, D., 1984.** Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3 rd ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- Gomes, S. M. 2006.** Ontogenia floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae s.l. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Gregory, M. & Baas, P., 1989.** A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany*. 38: 125-174.
- Hoehne, F. C. 1916.** Monographia das Asclepiadaceae brasileiras. Oxypetalum et Calostigma. *Relat. Commiss. Linhas Telegr. Estratég. Matto Grosso Amazonas* 38:11–131.
- Jensen, W.A., 1962.** Botanical Hystochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- Johansen, D.A., 1940.** Plant microtechnique. New York, Mc. Graw-hill.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellog, E.A. & Stevens, P.F. 2007.** *Plant systematics: a phylogenetic approach, 3rd. edition*. Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Koch, I.; Bittrich, V. & Kinoshita, L.S. 2002.** Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Mull. Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae)- a report of dioecy in Apocynaceae. *Botanischer jahrbucher fur Systematik* 124: 83-104.
- Lersten, N.R. 1974a.** Colleter morphology in Pavetta, Neorosea and Tricalysia (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 69: 125–136.
- Lersten, N.R. 1974b.** Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of Psychotria (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973–981.
- Malme, G. O. A. 1900.** Die Asclepiadaceen des Regnell'schen Herbars. *Kongl. Svenska Vetensk. Acad. Handl* 34:1–101; tab. 1–8.
- Marasca, R., 2008.** Estrutura secretora em Rauvolfia (Apocynaceae). Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- Carolina Nazareth Matozinhos, C. N. & Konno, T. U. P., 2011.** Diversidade taxonômica de Apocynaceae na Serra Negra, MG, Brasil. *Hoehnea* v.38 n.4 São Paulo.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1979.** Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2nd ed., v. 1, Oxford, Clarendon Press.

- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1950.** Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- Meyer, T. 1944.** Asclepiadaceae. 1–273. tab. 1–121 in *Genera et Species Plantarum Argentinarum* vol. 2. Descole, H. R., editor. Buenos Aires Guillermo Kraft Ltda.
- Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1986.** Ultrastructure and secretion of the extrafloral nectaries of *Plumeria rubra*. *Annals of Botany* 57: 389-401.
- Mueller, R.J. 1985.** Determinate branch development in *Alstonia scholaris* (Apocynaceae), the plagiotropic module. *Am. J. Bot.* 72: 1435-1444.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A., 1987.** Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. *Proceedings of Indian Academy of Sciences*, 97:25-31.
- Occhioni, P. 1956.** Contribuição ao estudo do gênero *Oxypetalum*, com especial referência às spp. do Itatiaia e Serra dos Órgãos. *Arch. Jard. Bot. Rio de Janeiro* 14:37–210
- Pearse, A. G. E., 1985.** Histochemistry: theoretical and applied. 4th ed., v.2, Edinburgh, C. Livingstone.
- Ramayya, N., & Bahadur, B., 1968.** Morfology of “squamellae” in the light of their ontogeny. *Current Science* (18: 520-522).
- Rao, S. A., 1956.** A revision of *Rauvolfia* with particular reference of the American species. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 43: 253–355.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963a.** Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42: 419-435.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963b.** The floral anatomy of some Asclepiadaceae. *Proceedings of Indian Academy of Sciences (B)*. 57: 15-44.
- Rio, M. C., 2001.** Estudos Taxonômicos e Anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom. cons. (Apocynaceae). Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- Rio, M. C., 2006.** Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de doutorado, Instituto de biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Rio, M.C. & Kinoshita, L.S. 2005.** *Prestonia* (Apocynaceae) do Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 32: 233-258.

- Rio, M.C., Castro, M. M. & Kinoshita, L.S., 2002.** Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasil. Bot.*, V.25, n.3, p.339-349.
- Rio, M. C., Kinoshita, L.S., & Castro, M. M., 2005.** Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas.
- Sakane, M. & Shepherd, G. J., 1986.** Uma revisão do genero *Allamanda* L. (Apocynaceae).
- Schumann, K., 1895.** Apocynaceae. In: Engler, A e Prantl, L. (ed) *Die naturlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann, vol.4, part. 2, p 109-189.
- Sennblad, B. .; Endress, M. E & Bremer, B., 1998.** Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. *American Journal of Botany* 85 (8): 1143-1158.
- Simões, A. O., Castro, M. De M. & Kinoshita, L.S. 2006.** Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:387-398
- Simões, A.O.; Endress, M.E.; Niet, T.V.D.; Kinoshita, L.S. & Conti, E. 2004.** Tribal and intergeneric relationships of Mesechiteae (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence from three noncoding plastid DNA regions and morphology. *American Journal of Botany* 91: 1409-1418.
- Simões, A.O.; Livshultz, T.; Conti, E. & Endress, M.E. 2007.** Phylogenetic and systematics of the Raulvolfioideae (Apocynaceae) based on molecular and morphological evidence. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94: 268.
- Solereeder, H., 1908.** Systematic anatomy of the dicotyledons. English translation by L.A. Boodle and F.E. Fritsch, 2v., Oxford, Clarendon Press.
- Spellman, D. L. 1978.** A new *Mateleia* (Asclepiadaceae) from the Bahamas. *Ann. Missouri Bot. Gard* 65:1255–1257.
- Thomas, V. 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68: 287-305.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989a.** The coleters of *Alstonia acholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contactor* (6: 25-29).
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989b.** Struture, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* (32: 163-172).

- Thomas, V. & Dave, Y. 1991.** Structure and development of follicles of *Nerium indicum* Mill. (Apocynaceae). *Feddes Repertorium* 102: 399-407.
- Thomas, V., Dave, Y. & Menon, A.R.S. 1989.** Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- Williams, R.F., Metcalfe, R.A. & Gust, L.W., 1982.** The genesis of form in oleander (*Nerium oleander* L.). *Australian Journal of Botany* 30:677-687.
- Woodson Jr, R. E. 1950.** *Miscellanea taxonomica* I. Apocynaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard* 37:397–408.
- Woodson Jr, R.E. & Moore, J.A. 1938.** The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceous flowers.

Capítulo II

Morfoanatomia da Corola e Androceu em *Allamanda* L. (Apocynaceae)

Introdução

Apocynaceae apresenta uma grande variação em seus órgãos florais, possuindo desde flores mais simples morfológicamente, nas subfamílias mais basais como Rauvolfioideae, até flores com maior complexidade estrutural como aquelas encontradas em Asclepiadoideae (Fallen, 1986; Endress, 1994; Endress & Bruyns, 2000; Endress *et al.*, 2007). Um dos trabalhos mais abrangentes envolvendo estudos das estruturas florais de espécies de Apocynaceae, muito citado em estudos para esta família, foi realizado por Woodson e Moore (1938). Estes autores estudaram a vascularização e a morfologia floral de 39 gêneros e 59 espécies de Apocynaceae. Outros trabalhos como os de Rao & Ganguli (1963), Fallen (1985, 1986), Kunze (1997), Galetto (1997), Torres & Galetto (1998), Lin & Bernardello (1999), Alvarado-Cárdenas & Ochoterena (2007), Livshultz *et al.* (2007), Marquete *et al.* (2007) também trouxeram grandes contribuições para o conhecimento dentro de Apocynaceae. No Brasil, merecem destaque os trabalhos de morfologia e/ou anatomia de Sakane & Shepherd (1986), Rio (2002, 2006), Rio *et al.* (2002), Simões & Kinoshita (2002), Simões *et al.* (2004), Demarco (2008), Gomes (2006), Simões *et al.* (2006, 2007), Marasca (2008) e Aguiar (2009).

A família apresenta flores perfeitas (com todos os verticilos estéreis e reprodutivos), simetria radial (raro levemente zigomorfa), geralmente vistosas e organizadas em inflorescências ou mais raramente solitárias (Woodson & Moore, 1938; Fallen, 1986). A corola é formada por cinco pétalas fundidas na base formando um tubo que pode apresentar variação entre a porção mais basal e a porção mais apical, com cinco lobos contortos (Cronquist, 1988; Judd *et al.*, 2007) sinistrorsos (Rauvolfioideae) dextrorsos (Apocynoideae) ou mais raramente prefloração valvar (demais subfamílias) (Woodson & Moore, 1938), úteis na delimitação em nível de subfamília. O formato da corola varia de infundibuliforme, hipocrateriforme, tubular a rotáceo (Endress & Bruyns, 2000). Internamente, a epiderme da corola pode formar tricomas unicelulares, ornamentados ou não, denominados de supra ou infrastaminais por Pichon (1948a, b, c) dependendo da sua localização em relação aos

estames. Estes tricomas são constantes em nível genérico, podendo ser úteis na delimitação de gêneros dentro de tribo (Pichon, 1948a, b, c; Alvarado-Cárdenas & Ochoterena, 2007).

O estudo taxonômico do androceu tem sido muito importante para a delimitação das subfamílias dentro de Apocynaceae (Endress & Bruyns, 2000).

Em Apocynaceae, os estames, em número de cinco (raro quatro), são epipétalos e alternos aos lobos da corola. Podem estar inseridos no interior próximos a base ou ao longo do tubo floral, apresentando filetes curtos ou ausentes, ou formar estrutura denominada de “pé” ou “tubo” estaminal (Endress & Bruyns, 2000). As anteras são livres ou justapostas à cabeça do estilete em Rauvolfioideae, ou adnatas à cabeça do estilete formando o ginostégio nas demais subfamílias. Pichon (1950) separou tribos de acordo com o tipo de conexão entre as anteras e a cabeça do estilete em Apocynaceae.

Na família, as anteras formam uma estrutura em forma de cone acima da cabeça do estilete, com cinco aberturas para o acesso ao néctar pelo visitante floral. Apresentam quatro sacos polínicos (dois em Asclepiadoideae) por antera (Kinoshita, 2005; Morales, 2005; Ezcurra, 1981), com os sacos polínicos dispostos em toda a sua extensão ou limitados à parte mais apical (Sakane & Shepherd, 1986; Fallen, 1986; Endress & Bruyns 2000).

Existe uma significativa diversidade do ponto de vista morfológico das anteras e estas diferenças são taxonomicamente relevantes, pois sua forma, com diferenças na porção basal e apical é variável na família.

Fallen (1986) reconheceu quatro níveis de complexidade nas anteras de Apocynaceae. O primeiro nível é o mais basal evolutivamente, cujas anteras não especializadas são ovóides, cordadas na base e sem lignificação no dorso. No segundo nível, as anteras tem o conectivo expandido na base causando o afastamento das tecas para os lados. O terceiro nível apresenta tecido esclerificado na região adaxial que se prolonga em base sagitada, encontrado, por exemplo, em *Tabernaemontana*. O quarto nível é idêntico ao terceiro, porém apresenta tecido de conexão chamado retináculo (Fallen, 1986), formando o ginostégio que é a fusão do tecido do androceu com o gineceu.

Na família há uma variação na localização e extensão da lignificação das anteras, que pode estar presente na porção abaixo, acima ou lateral à porção fértil da antera (Endress & Bruyns, 2000). Este processo é raro em Rauvolfioideae (ocorrendo apenas em gêneros de *Tabernaemontaneae*) e ausente em *Periplocoideae*. Em *Apocynoideae* ocorre em cinco tribos.

Em Secamonoideae é bem desenvolvido e ocorre abaixo da parte fértil da antera e em Asclepiadoideae a antera é bem lignificada ao longo ou abaixo da sua parte fértil.

Allamanda, pertence à subfamília Rauvolfioideae, tribo Plumerieae (Endress & Bruyns, 2000; Endress *et al.*, 2007). O gênero compreende 15 espécies, sendo 13 de ocorrência no Brasil e a maioria endêmica ao nosso território (Sakane & Shepherd, 1986; Silva & Rapini, 2011; Koch *et al.*, 2012). O estudo mais abrangente sobre este gênero foi realizado por Sakane & Shepherd (1986) que fizeram a revisão taxonômica utilizando caracteres de estruturas vegetativas, florais, de frutos e sementes. Outros trabalhos com diferentes enfoques que incluíram espécies de *Allamanda* foram: Woodson & Moore (1938), em estudos da vascularização e morfologia floral de Apocynaceae, incluindo *A. cathartica*; Allorge (1976), em estudos morfológicos e de biologia floral de Apocynaceae, incluindo *A. cathartica*; Fallen (1986), que estudou a ontogenia do gineceu em *Allamanda schottii* Pohl; Thomas & Dave (1989), em estudos de coléteres peciolares de *A. cathartica*; Alvarado-Cárdenas & Ochoterena (2007), em estudos filogenéticos na tribo Plumerieae incluído *A. cathartica* em seu trabalho; Simões *et al.* (2007), incluindo *A. cathartica* em estudos filogenéticos e sistemáticos em Rauvolfioideae; Aguiar (2009), em estudos anatômicos de frutos com *A. blanchetii* e *A. schottii* Pohl; Araujo *et al.* (2011), que estudaram a biologia floral de *Allamanda blanchetii*. Contudo trabalhos com enfoque mais direcionado à anatomia e morfologia floral para as espécies deste gênero não foram encontrados, além do citado para Sakane & Shepherd (1986).

Diante da importância das características florais em Apocynaceae e a fim de reunir dados úteis para o melhor conhecimento do gênero, como também para auxiliar e fornecer dados para futuros estudos filogenéticos e sistemáticos em Plumerieae e na subfamília Rauvolfioideae, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfoanatomicamente a corola de espécies de *Allamanda* com ênfase nos tricomas supra e infrastaminais. Avaliar a morfologia e a anatomia das anteras, analisando suas semelhanças e diferenças em relação às demais Apocynaceae, e também, observar se há ou não lignificação especializada das anteras, sendo sua ausência predominantes em Rauvolfioideae, subfamília a qual pertence o gênero *Allamanda*.

Materiais e métodos

Material Botânico

Para a realização deste trabalho foram utilizadas flores em antese de *A. cathartica* L., *A. laevis* Markgr. *A. puberula* A.DC. e *A. schottii* Pohl, coletadas a partir de indivíduos localizados no Campus da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (*A. schottii* e *A. cathartica*), em grão Mogol, MG (*A. puberula*) e na região de Medina, MG (*A. laevis*).

Os exemplares foram identificados pela primeira autora e a identificação posteriormente confirmada pelo Prof. Dr. André O. Simões. Os materiais testemunho foram herborizados e incorporados ao Herbário UEC.

Tabela 01. Dados de coleta das espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae).

Espécie	Localidade	Nome e nºcoletor	Data	Número do coletor
<i>A. cathartica</i>	Campinas, Unicamp, SP	Kotovski E.R.	20/06/2011	4
<i>A. laevis</i>	Medina, MG	Kotovski E.R. <i>et al.</i>	26/02/2012	2
<i>A. puberula</i>	Grão Mogol, MG	Kotovski E.R. <i>et al.</i>	26/02/2012	1
<i>A. schottii</i>	Campinas, Unicamp, SP	Kotovski E.R.	20/06/2011	3

Estudos anatômicos

Flores em antese foram isoladas do material previamente coletado e fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)). Devido ao grande tamanho das flores destas espécies, optou-se por seccionar as mesmas em uma porção apical (região do androceu) com o comprimento de aproximadamente 1cm. O material foi previamente desidratado pela série butílica até à concentração de 100% (Johansen, 1940) e incluído em paraplast. Após o emblocamento foram feitos seccionamentos em micrótomo rotativo Leica. Cortes seriados longitudinais e transversais foram obtidos com 12µm de espessura, desparafinizados, montados em lâminas e corados com Safranina alcoólica 1% e Azul de Astra 1% (Gerlach, 1984). As lâminas permanentes foram montadas com resina sintética Permount e observadas em microscópio Olympus BX51. As imagens em alta resolução dos aspectos considerados relevantes foram obtidas em câmera digital DP72

acoplada ao microscópio, e as pranchas de ilustrações montadas apartir do software Corel Draw X5.

Histoquímica

Para o estudo histoquímico para detecção de lignina, foram coletadas flores e fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)). Foram separadas lâminas, desparafinizadas e sem corar, com cortes longitudinais da antera. O tratamento feito para a detecção de presença de lignina foi: Floroglucina. As lâminas foram montadas em gelatina glicerizada e observadas em microscópio Olympus BX51. As imagens em alta resolução dos aspectos considerados relevantes foram obtidas em câmera digital DP72 acoplada ao microscópio, e as pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise micromorfológica, o material fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)) foi desidratado em série etílica até 100%, seco pelo método de ponto crítico, montado em suportes e submetido a metalização com ouro. As observações e registros de imagens foram efetuados em MEV Jeol JSM 5800 LV a 10kV, com câmera digital acoplada. As pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Resultados

A corola é infundibuliforme e de prefloração sinistrorsa. A cor é amarela em *A. cathartica*, *A. laevis* e *A. puberula*, e amarelo-alaranjada em *A. schottii*. O tubo da corola apresenta duas porções bem definidas: um tubo inferior estreito e tubular que se estende até a região de inserção dos estames, e um tubo superior dilatado acima da região de inserção dos estames, apresentando cinco lobos oblíquo-obovados no ápice. A relação entre o comprimento do tubo inferior e o tubo superior diferencia a *A. schottii* das outras três espécies. Em *A. schottii*, o tubo inferior é conspicuamente mais curto do que o tubo superior e levemente giboso, já em *A. cathartica*, o tubo inferior é mais longo do que o tubo superior e sempre cilíndrico. Em *A.*

laevis e *A. puberula* também a porção inferior é mais curta como ocorre em *A. schottii*, contudo, naquelas espécies esta diferença de proporção não é tão evidente, apresentando o tubo inferior conspicuamente alongado. Nas quatro espécies, na região onde os estames se inserem, há dois tipos morfológicos de tricomas corolinos e uma gradação quanto ao seu tamanho (Figs. 01-04). Os tricomas localizados no início da adnação dos filetes com a corola até o ponto onde os filetes se tornam livres (infraestaminais) são unicelulares, afilados em direção ao ápice, com superfície lisa e ápice arredondado (Fig. 06). Estes tricomas circundam a corola entre os estames, aumentando gradativamente seu comprimento em direção à fauce. Os tricomas localizados acima dos filetes livres (supraestaminais) também são unicelulares e com ápice arredondado, porém a superfície é moniliforme (Figs. 05, 06). O comprimento desses tricomas suprastaminais também varia, aumentando das laterais para o centro de cada estame, cobrindo-o quase que completamente. Este padrão se repete para cada um dos cinco estames nas quatro espécies (Figs. 01-04).

A quantidade dos dois tipos de tricomas também varia entre as quatro espécies. Em *A. laevis* (Fig. 01) os tricomas suprastaminais são mais numerosos, seguido por *A. schottii* (Fig. 04), *A. cathartica* (Fig. 02) e *A. puberula* (Fig. 03), respectivamente. Os tricomas infrastaminais também apresentam uma variação quantitativa, separando *A. puberula* das demais espécies por apresentar um número menor desses tricomas (Figs. 01-04). Já em *A. laevis*, apesar da quantidade de tricomas, estes são relativamente mais curtos em relação às outras espécies (Fig. 01).

Anatomicamente, a corola apresenta, em ambas as faces, uma epiderme uniestratificada, com cutícula fina. Entre as células parenquimáticas, ocorrem feixes vasculares próximos à face adaxial. Não foram visualizados idioblastos, porém laticíferos estão presentes (Figs. 17, 18, 26).

Nas quatro espécies estudadas, a flor apresenta cinco estames epipétalos. A porção adnata dos filetes à corola e a porção livre apresentam tricomas unicelulares de parede lisa e ápice acuminado, e a porção livre do filete destas espécies também apresenta tricomas. A quantidade e a distribuição variam entre as espécies (Figs. 01-04). Em *A. laevis* e *A. cathartica*, os tricomas são mais numerosos e se distribuem ao longo do filete, antes deste se tornar livre (Figs. 01, 02). Em *A. puberula* e em *A. schottii* os tricomas estão em menor número e sua distribuição se diferencia por apresentar uma maior porção ventral apical do

filete adnato sem formação de tricomas (Figs. 03 e 04). Em *A. puberula* e em *A. cathartica* há um agrupamento de tricomas próximo à inserção da antera (Figs. 02, 07, 03), porém em *A. puberula* estes tricomas são mais longos. Em *A. schottii* e em *A. laevis* os tricomas estão distribuídos de forma aleatória (Figs. 01, 04). Os filetes recurvam-se pelas suas porções livres em direção ao centro do tubo da corola, e as anteras, próximas umas das outras, formam um cone acima da cabeça do estilete (Figs. 15, 16, 23, 24).

As anteras são sempre tetrasporangiadadas e com deiscência introrsa rimosa, tecas unidas pelo conectivo. Cada antera apresenta uma região fértil e outra estéril que são prolongamentos dos sacos polínicos dorsais que constituem as asas da antera, parcialmente soldados ao filete. A base é sagitada e apresenta variação quanto à proporção entre esta e a parte fértil entre as quatro espécies, variando aproximadamente de 1/3, 1/4, 1/5 e 1/6 para *A. cathartica*, *A. puberula*, *A. schottii* e *A. laevis*, respectivamente (Figs. 01-04). O conectivo se estende acima formando o apêndice da antera. Este apêndice, nas quatro espécies, difere na forma e no tamanho (Figs. 09-10). Em *A. laevis* o ápice é mais longo, dorsiventralmente compresso, continuamente afilado até o ápice (Fig. 09). Em *A. puberula* é curto e abruptamente cônico, como em *A. cathartica*, porém nesta última, a região distal do ápice é curvada na direção ventral da antera (Figs. 10 e 11). Em *A. schottii* o apêndice também é curto, contudo, com formato obcordato (Fig. 12).

Anatomicamente, o filete é constituído por uma epiderme uniestratificada, com cutícula delgada, tecido parenquimático fundamental e um único feixe vascular central (Fig. 17).

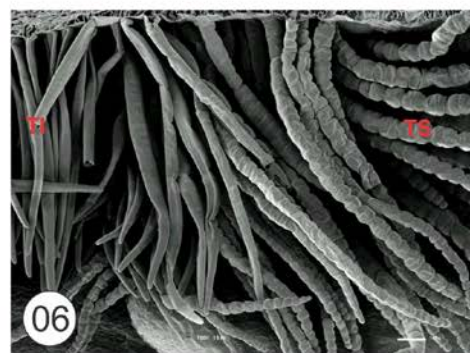
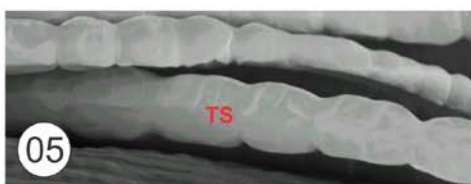
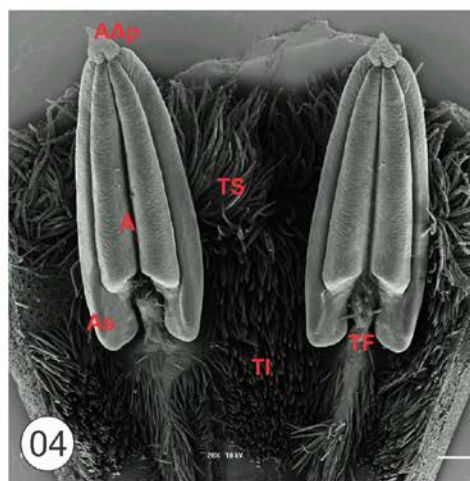
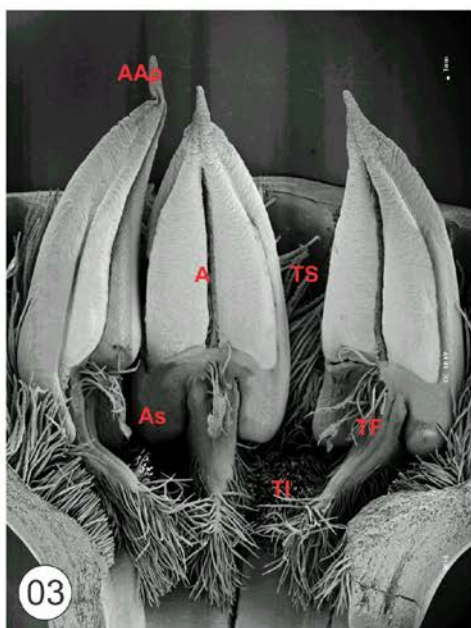
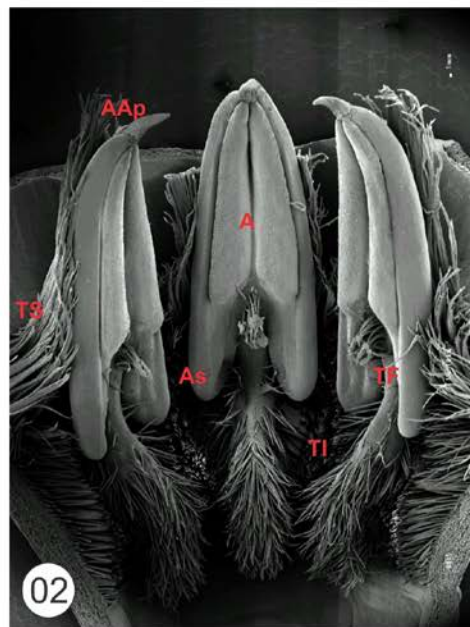
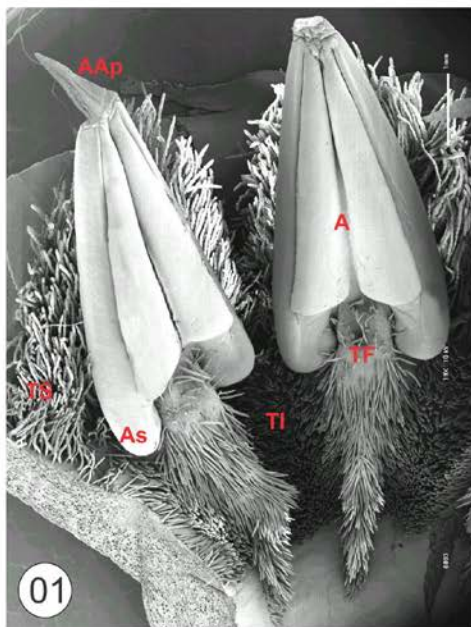
O conectivo apresenta epiderme uniestratificada, com cutícula delgada, tecido parenquimático fundamental e um feixe vascular central oriundo do filete. Em nenhuma região do conectivo ocorre lignificação (Figs. 19, 20, 23 e 24).

Na antera, cada saco polínico observado é constituído por epiderme e pelo endotécio. A epiderme é uniestratificada, com células de formato variado e cutícula delgada. Não foi visualizado espessamento secundário nas células da epiderme das anteras. O endotécio é formado por células alongadas, cujas paredes apresentam espessamento secundário lignificado em forma de faixas (barras de espessamento) em todo o tecido, confirmado pelo teste com Floroglucinol (Figs. 21, 22, 29 e 30). Este espessamento ocorre desde a base, na parte estéril, até o ápice, em toda a parte fértil das anteras e é ausente nos apêndices apicais

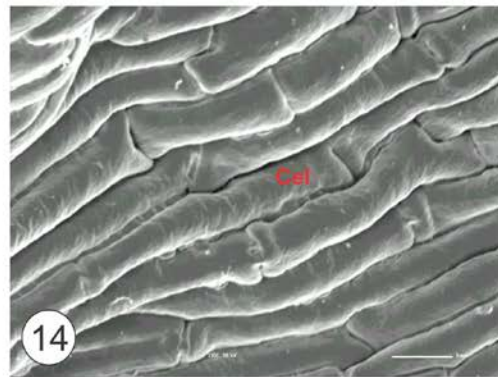
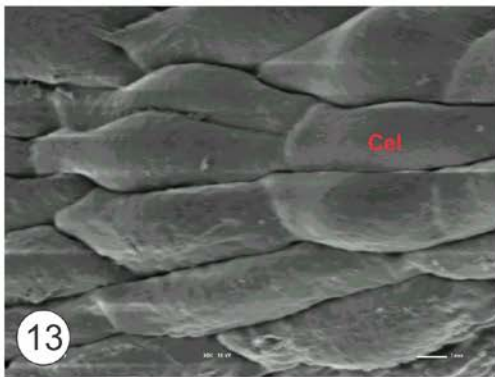
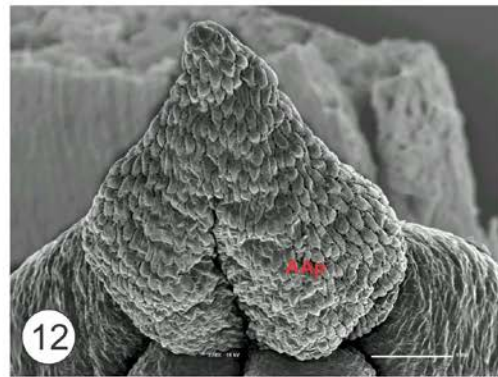
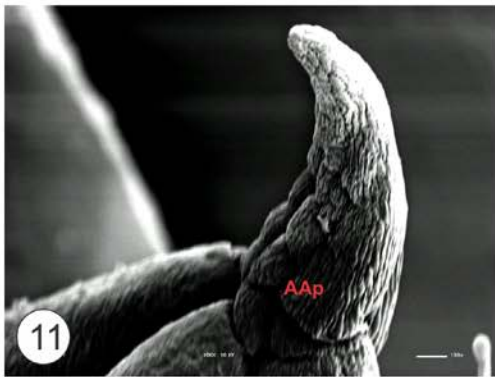
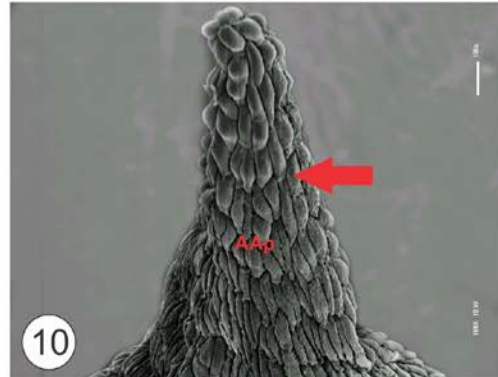
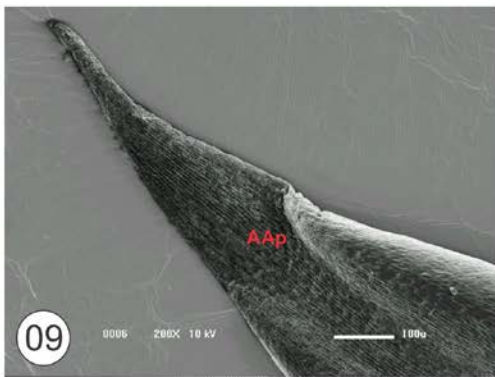
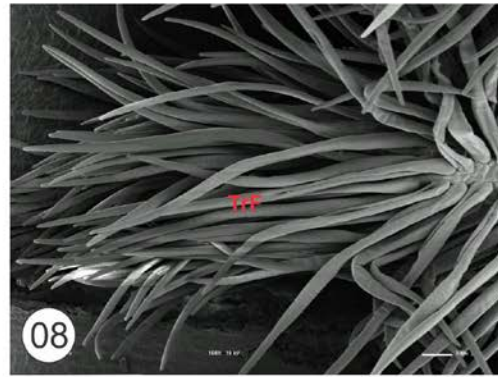
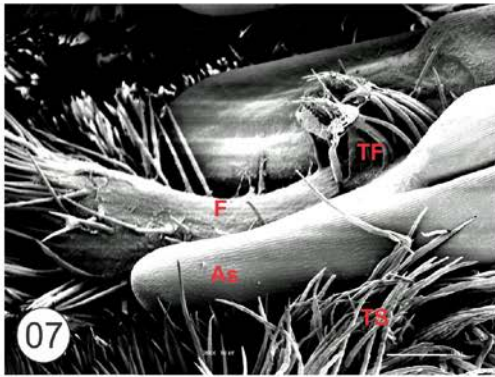
formados por tecidos do conectivo, nas quatro espécies. O tapete está ausente, devido a sua desintegração em fase anterior.

Os apêndices apicais apresentam epiderme simples com células alongadas. O alongamento das células epidérmicas está relacionado com o comprimento dos apêndices (Figs. 13 e 14). Em *A. laevis*, cujo apêndice é mais longo em relação às outras espécies, ocorre o maior alongamento celular, visto em MEV. O corpo é preenchido por células parenquimáticas, sem feixe vascular.

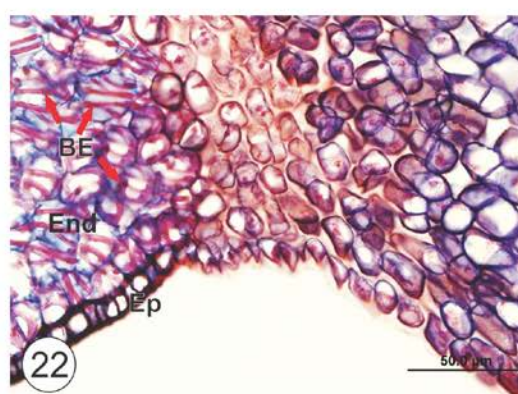
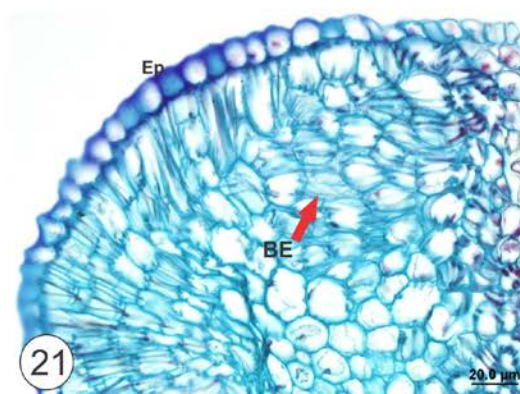
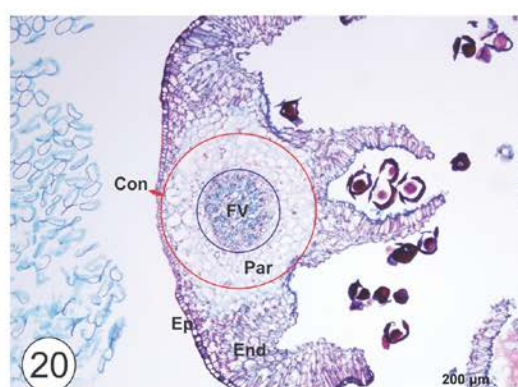
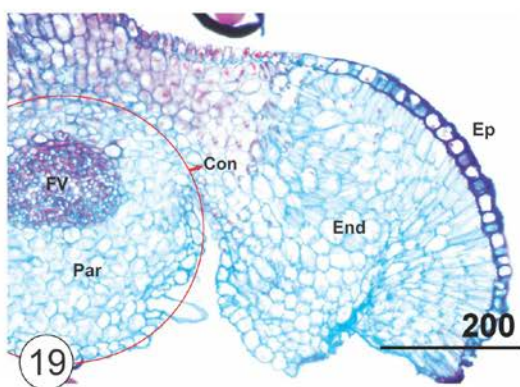
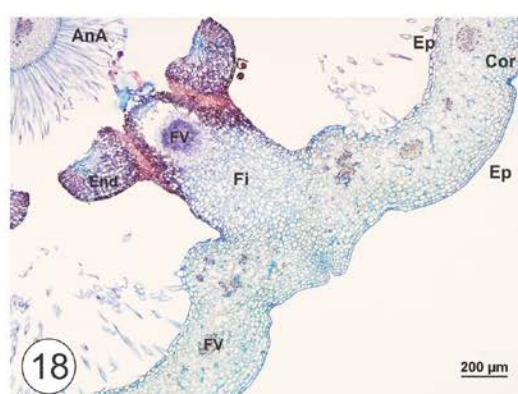
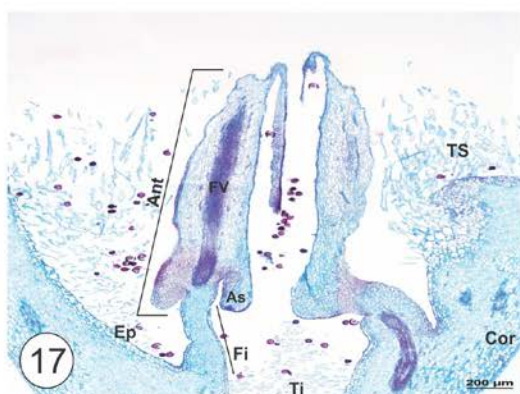
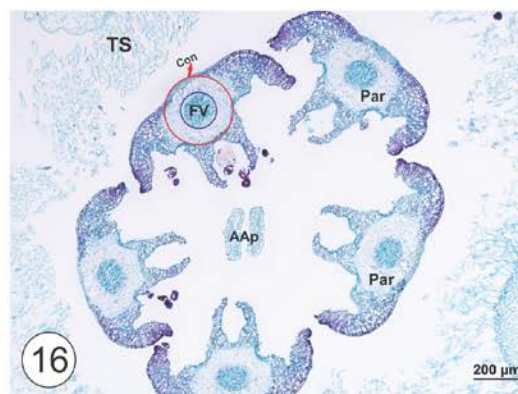
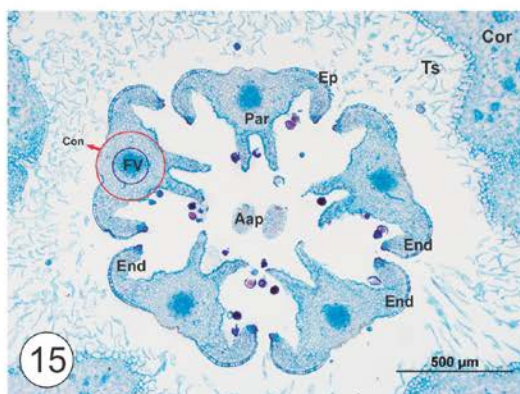
Figuras 01-06. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Morfologia e distribuição dos tricomas infrastaminais, suprastaminais e estames na parte interna da corola em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae) 01- *A. laevis*; 02- *A. cathartica*; 03- *A. puberula*; 04-*A. schottii*. 05- Tricomas suprastaminais de *A. cathartica*. 06- tricomas infrastaminais e suprastaminais de *A. puberula*, evidenciando suas diferenças e o limite entre ambas. **A=Anteras; **AAp**=Apendice apical da antera; **As**=Apendices basais da antera (Asas); **TF**=Tricomas do filete; **TI**=Tricomas infrastaminais; **TS**= Tricomas suprastaminais.**



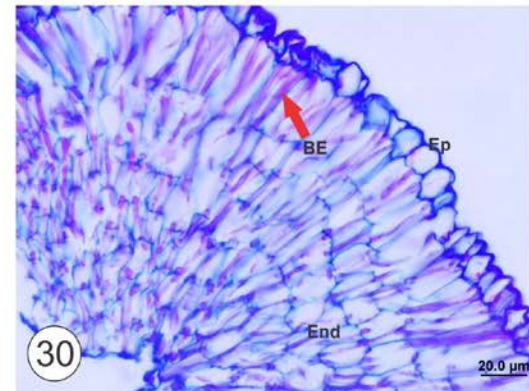
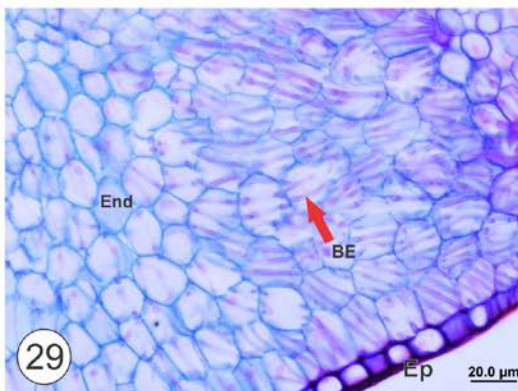
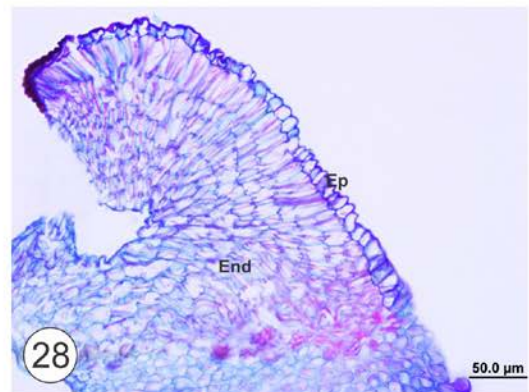
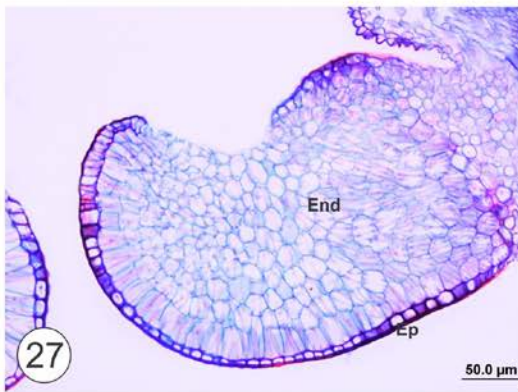
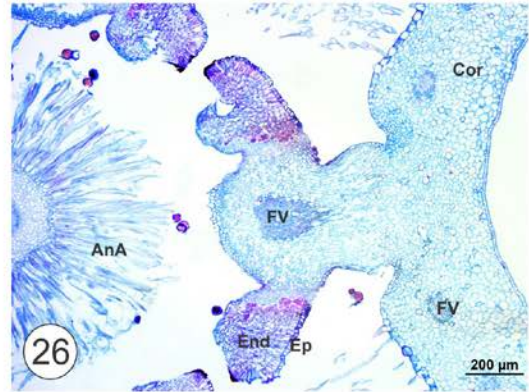
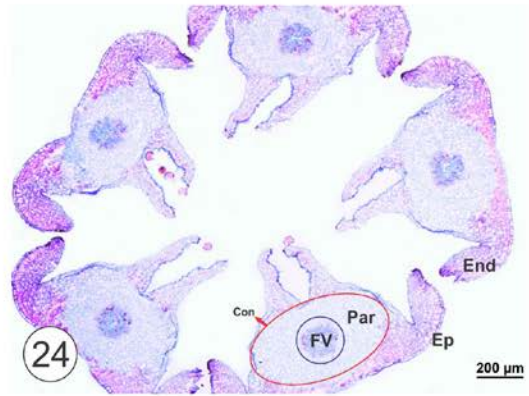
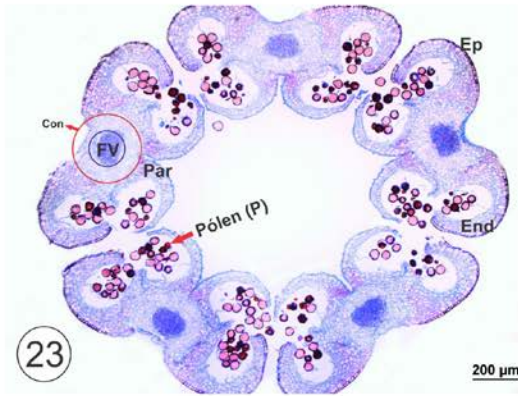
Figuras 07-14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Detalhes dos tricomas do filete, apêndice apical da antera e células do apêndice apical da antera em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae). 07 e 08-Tricomas do filete de *A. cathartica*, morfologia e distribuição. 09-12: morfologia do apêndice apical da antera. 09-*A. laevis*; 10-*A. cathartica*; 11-*puberula*; 12- *A. schottii*. 13 e 14: Células epidérmicas do apêndice apical da antera em detalhe (13-*A. puberula* e 14-*A. laevis*). **AAp=Apendice apical da antera; **As**=Apendices basais da antera (Asas); **Cel e seta**=Células do apêndice apical; **F**=Filete; **TF**=Tricomas do filete.**



Figuras 15-22. Secções anatômicas dos estames em flores de *Allamanda schottii* e *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *A. schottii* (15, 17, 19, 21) e *A.cathartica* (16, 18, 20 e 22). 15 e 16-Vista geral das anteras. 17 e 18-Estames em maior detalhe. 19 e 20-Detalhe da antera, evidenciando epiderme uniestratificada e endotécio com células apresentando espessamento secundário. 21 e 22-Detalhe do espessamento secundário do endotécio. Cortes transversais: 15, 16, 18-22. Corte longitudinal: 17. **AAp=Apendice apical da antera; **AnA**=Anel apical da cabeça do estilete; **Ant**=Antera; **As**=Apendices basais da antera (Asas); **BE**=Barra de espessamento; **Con**=Conectivo; **Cor**=Corola; **Ep**=Epiderme; **End**=Endotécio; **Fi**=Filete; **FV**=Feixe vascular; **Par**= Parênquima; **TI**=Tricomas infrastaminais; **TS**=Tricomas suprastaminais. 16-18, 20, 21. 200 µm; 15, 22. 500 µm**



Figuras 23-30. Secções anatômicas dos estames em flores de *Allamanda puberula* e *Allamanda laevis* (Apocynaceae). *A. puberula* (23, 25, 27 e 29) e *A.laevis* (24, 26, 28 e 30). 23 e 24- Vista geral das anteras em secções transversais. **25 e 26-**Estames em maior detalhe. **27 e 28-**Detalhe da antera. **29 e 30-**Detalhe do espessamento secundário do endotécio. Cortes transversais: 23-30. **AAp**=Apendice apical da antera; **AnA**=Anel apical da cabeça do estilete; **Ant**=Antera; **As**=Apendices basais da antera (Asas); **BE**=Barra de espessamento; **Con**=Conectivo; **Cor**=Corola; **Ep**=Epiderme; **End**=Endotécio; **Fi**=Filete; **FV**=Feixe vascular; **Par**= Parênquima. **23, 24, 26.** 200 µm; **25.** 100 µm; **27,28.** 50 µm; **29, 30.** 20 µm



Discussão

Em relação à corola, as quatro espécies apresentam gamopetalia, com o tubo corolino dividido em uma porção inferior cilíndrica e uma porção superior dilatada após a região da inserção estaminal até a base dos lobos, comum para vários representantes da família Apocynaceae, como descrito por Sakane & Shepherd (1986), Fallen (1986) e Araújo *et al.* (2011). Existe diferença quanto ao comprimento da porção inferior do tubo da corola entre *A. schottii* e as outras três espécies, separando-a das demais espécies estudadas, como descrito por Sakane & Shepherd (1986), que utilizaram esta variação como uma das características para diferenciar as espécies de *Allamanda* dentro do gênero.

Anatomicamente, a corola apresenta arranjos celulares comuns, com uma epiderme uniestratificada, tecido parenquimático fundamental com laticíferos, cordões de feixes vasculares, mas sem idioblastos ou qualquer outro tipo celular (Esau, 1965; Torres & Galetto, 1998; Toste *et al.*, 2003). Porém a epiderme da face adaxial apresenta dois tipos de tricomas unicelulares supra e infrastaminais, que podem estar presentes ou ausentes em representantes da família.

Os tricomas suprastaminais e infrastaminais, encontrados nas quatro espécies, apresentam morfologia e distribuição espacialmente definidos, provavelmente relacionados ao processo de polinização (Araújo *et al.*, 2011). A presença de tricomas supraestaminais, termo cunhado por Pichon (1948 a, b, c), foi reportada para espécies de *Himatanthus* e *Plumeria* (Pichon, 1948a), sendo a presença ou ausência constante dentro das espécies. A presença ou ausência de ornamentação nos tricomas suprastaminais, citados como sendo um tipo de corona (Endress & Bruyns, 2000), podem ser úteis para agrupar espécies. *Allamanda* não apresenta nenhum tipo de ornamentação nos tricomas suprastaminais moniliformes, e esta foi umas das características utilizadas para separá-la em uma subtribo isolada dos demais gêneros em Plumerieae por Alvarado-Cárdenas & Ochoterena (2007). Segundo estes a presença de ornamentação já havia sido relatado para *Himathantus* e *Plumeria* por Pichon (1948b), mas nunca este caráter foi inserido em análise cladística. Estes mesmos autores observaram que a ausência ou presença de ornamentação é constante dentro dos gêneros, fazendo uso deste estado de caráter para análise filogenética de Plumerieae. Análises sobre graus de complexidade do androceu foram feitas por Fallen (1986), que apontou para a importância taxonômica deste verticilo. Nas quatro espécies, há cinco estames epipétalos,

alternipétalos, com os filetes curtos adnatos individualmente ao tubo corolino, recurvando-se pelas suas porções livres em direção ao centro do tubo da corola.

As anteras são tetrasporangiadas, característica comum nas subfamílias de Apocynaceae, exceto para Asclepiadoideae que se torna bisporangiada (Endress & Bruyns, 2000). A deiscência é introrsa e rimosa, com o conectivo que se estende acima da antera para formar o apêndice apical. As anteras, próximas umas das outras, formam um cone acima da cabeça do estilete sem formar ginostégio, isolando a metade inferior do tubo floral, apresentando cinco espaços que se localizam entre as anteras adjacentes para o acesso ao néctar pelo visitante floral (Araújo *et al.*, 2011; Fallen, 1986). A antera é fértil em quase toda a sua extensão, sendo estéril na porção basal pelo prolongamento das asas, diferindo do tipo normalmente encontrado em Rauvolfioideae, cujas anteras são férteis até a base e de Apocynoideae que apresentam anteras férteis confinadas na região superior como na tribo Mesechiteae (Endress & Bruyns, 2000; Simões *et al.*, 2006). A porção estéril é constituída por dois longos apêndices formando a base sagitada que difere proporcionalmente entre as quatro espécies. Esta estrutura anteral está presente em diferentes espécies de Apocynaceae (Boke, 1949), sendo a base sagitada muito comum. Porém outras formas também podem ser encontradas como a truncada, a cordata, a auriculada e a obtusa. Esta variação foi utilizada, por exemplo, por Woodson & Moore (1938) para delimitação infrafamiliar. A função atribuída é auxiliar no direcionamento do aparelho bucal do polinizador para que ele passe entre as duas anteras e ao longo de regiões específicas da cabeça do estilete (Lipow & Wyatt 1999; Tostes *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2011;).

Sakane & Shepherd (1986) relataram que o estudo das anteras dentro do gênero era pouco interessante em nível taxonômico, pois o tamanho e a forma eram pouco variáveis. Todavia, o presente estudo mostra que os apêndices apicais são diferentes nas quatro espécies, fornecendo caracteres diagnósticos úteis para separá-las. Em Plumerieae, ao qual pertence *Allamanda*, todos os gêneros apresentam esta estrutura, sendo variável, com morfologia caudada e alongada. Por meio desta variação, Alvarado-Cárdenas & Ochoterena (2007) posicionaram *Allamanda* como grupo irmão de Thevethineae por apresentar apêndice deltoide, entre outras características. Em Asclepiadeae (R. Br.) Duby e Marsdenieae Benth., a morfologia é usada para separar gêneros pela ausência ou presença de constrição da parte basal do apêndice apical das anteras, como ocorre em *A. schottii*, porém nessas tribos o

caráter pode desaparecer na maturidade floral. Em *Tylophora* R. Br. ocorre incisão horizontal entre a antera e o apêndice (Kunze, 1996) e em Willughebeae A. DC. e em Secamonoideae Endl., o apêndice é escassamente desenvolvido. Alvarado-Cárdenas & Ochoterena (2007) descrevam, em estudo filogenético de Plumerieae E. Mey., que a forma obtusa representa uma condição plesiomórfica que derivou para o deltoide que se transformou em filamentosos duas vezes de maneira independente, interpretada como progressivo alargamento do tecido conectivo. Porém, não existe nenhuma informação sobre a possível função desta estrutura, que pode estar relacionada ao processo de polinização.

Fica evidente que o uso de características morfológicas do apêndice apical da antera pode ser útil, junto com outras características, para o agrupamento infrafamiliar, até mesmo em nível infragenérico como é o caso de *Allamanda*.

Anatomicamente, epiderme de cada teca é uniestratificada, com células de forma variada e cutícula delgada. O endotécio é constituído por células alongadas, cujas paredes apresentam espessamento secundário lignificado em forma de trabécula. Simões (2006) ao estudar a lignificação das anteras em representantes da tribo Mesechiteae Miers (Apocynoideae), relatou que a formação dos “trilhos” para guiar o aparato bucal do polinizador era decorrente, principalmente, do espessamento endoteczal. Normalmente, a lignificação especializada está ausente em Rauvolfioideae Kostel., Allg. (exceto em gêneros de Tabernaemontaneae G. Don) e Periplocoideae R. Br. ex Endl., enquanto nas demais subfamílias a lignificação está presente, podendo ocorrer em diferentes regiões da antera como na parte apical, basal ou em toda a sua extensão (Endress & Bruyns, 2000). O padrão de lignificação observado em *Allamanda* é diferente da lignificação observada em espécies de Apocynoideae, Asclepiadoideae e Secamonoideae. Em nenhuma região da antera há uma concentração espacial deste espessamento secundário para formar os “trilhos” que auxiliam no processo de polinização, justificando a manutenção de *Allamanda* em Rauvolfioideae. Este espessamento parietal do endotécio, provavelmente, atua somente como um tecido mecânico no processo de deiscência da antera.

Conclusões

As flores de *Allamanda* são do tipo infudibuliforme com o tubo inferior mais curto, em relação ao tubo superior, apenas em *A. schottii*. Os tricomas unicelulares supra e

infrastaminais possuem, entre eles, diferenças na sua morfologia e distribuição espacial, porém são similares entre as quatro espécies. Os estames são epipétalos com filete curto ornamentado com tricomas unicelulares agrupados na porção mais apical em *A. cathartica* e *A. puberula* e esparsos em *A. laevis* e *A. schottii*. As anteras estão agrupadas em forma de cone acima da cabeça do estilete, sem formar ginostégio, com quatro sacos polínicos férteis e dois apêndices basais estéreis denominados de asas. Os apêndices apicais das anteras, formados por projeções do conectivo, são morfologicamente diferentes nas quatro espécies com potencial taxonômico relevamente na separação interespecífica. Nas quatro espécies, a lignificação ocorre de forma homogênea em todo o tecido que constitui o endotécio, inclusive nos apêndices basais estéreis, resultado este que corrobora a manutenção de *Allamanda* em Rauvolfioideae.

Tabela 02: resumo geral das semelhanças e diferenças entre as espécies de *Allamanda* (Apocynaceae) investigadas no presente estudo.

Espécies	4 sacos polínicos férteis	Base Sagitada Estéril	Apêndice apical	Lignificação especializada das anteras	Tricomas filete	Ginostégio
<i>A. cathartica</i>	X	X	X	—	X	—
<i>A. schottii</i>	X	X	X	—	X	—
<i>A. laevis</i>	X	X	X	—	X	—
<i>A. puberula</i>	X	X	X	—	X	—

Referências bibliográficas

- Aguiar, S. 2009.** Anatomia de frutos e sementes em Apocynaceae. Tese de Doutorado. Univ. Estadual de Campinas.
- Allorge, L. 1976.** *Morphologie et biologie florale des Apocynacées: Applications taxonomiques*. PhD diss. École pratique des Hautes Etudes, Paris.
- Alvarado-Cárdenas, L. O. & Ochoterena H. 2007.** A phylogenetic analysis of the *Cascabela-Thevetia* species complex (Plumerieae, Apocynaceae) based on morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94:298-323.
- Araújo L. D. A.; Quirino Z. G. M. & Machado I. C. 2011.** Fenologia reprodutiva, biologia floral e polinização de *Allamanda blanchetii*, uma Apocynaceae endêmica da Caatinga.
- Boke N. H. 1949.** Development of stamens and carpels in *Vinca rosea* L. *American Journal of Botany*, Vol. 36, No. 7 (Jul., 1949), pp. 535-547
- Cronquist A., 1988.** The Evolution and Classification of Flowering Plants. New York Botanical Garden, NY.
- Demarco, D., 2008.** Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécie de Asclepieae (R. BR.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de S.P. (Tese de doutorado).
- Endress, M.E. & Bruyns P. 2000.** A revised classification of Apocynaceae s.l. *Botanical Review*, 66: 1-56. 74
- Endress, M.E., Liede-Schumann, S. & Meve, U. 2007.** Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94: 259- 267.
- Esau, K. 1965.** Plant anatomy. Segunda Ed., John Wiley e Sons, New York.
- Ezcurra, C. 1981.** Revisión de las Apocynaceae de la Argentina. *Darwiniana* 23: 367-474.
- Fallen, M.E. 1985.** The ginecial Development and Systematic Position of *Allamanda* (Apocynaceae).
- Fallen, M.E. 1986.** Floral structure in Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 106: 245-286.
- Galetto, L. 1997.** Flowers structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192: 197-207.
- Gerlach, D., 1984.** Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3 rd ed., Stuttgart, Georg Thieme.

- Gomes, S. M. 2006.** Ontogenia floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae s.l. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellog, E.A. & Stevens, P.F. 2007.** *Plant systematics: a phylogenetic approach, 3rd. edition.* Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Kinoshita, L.S. (coord.). 2005.** Apocynaceae. Pp. 35 – 91. *In: M.G.L. Wanderley; G.J. Shepherd; T.S. Melhem & A.M. Giulietti (orgs.). Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. V. 4. São Paulo, FAPESP/HUCITEC.*
- Koch, I., Rapini, A., Kinoshita, L.S., Simões, A.O., Spina, A.P. 2012.** Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004507>).
- Kunze, H. 1997.** Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). *Flora* 192: 175–183.
- Lin, S. & Bernardello, G. 1999.** Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Sciences* 160: 869-878
- Livshultz et al., 2007.** Phylogeny of Apocynoideae and the APSA clade (apocynaceae s.l.). *Annals of the Missouri Botanical Garden. Volume 94, Number 2.*
- Lipow, R. S. & R. Wyatt. 1999.** Floral morphology and late-acting selfincompatibility in *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). *Plant Systematics and Evolution* 219: 99-109.
- Marasca, R., 2008.** Estrutura secretora em *Rauvolfia* (Apocynaceae). Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Marquete, N.F.S., Fontella-Pereira, J. & Valente, M.C. 2007.** Asclepiadoideae (Apocynaceae) from southeastern Brazil. I. The genus *Oxypetalum* from Rio de Janeiro State, Brazil. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 94: 435-462.
- Morales, J. F. 2005.** Estudios en las Apocynaceae neotropicales XV: sinopsis del género *Thoreauea*(Apocynoideae, Echiteae), con una nueva especie de Veracruz, México. *Brittonia* 57: 258–263.
- Pichon, M. 1948a.** Classification des Apocynacées. V. Cerberöidées. *Notul. Syst. (Paris)* 13: 212-229.
- Pichon, M 1948b.** Classification des Apocynacées. X. Genre *Mandevilla*. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. 2*, 20: 211-216.

- Pichon, M 1948c.** Classification des Apocynacées.XIX. Lerétinacle des Echitoidées. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser 2*, 22. 211
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963.** Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* **43**: 419-435.
- Rio, M. C., 2006.** Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de doutorado, Instituto de biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Rio, M.C. & Kinoshita, L.S. 2005.** *Prestonia* (Apocynaceae) do Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* **32**: 233-258.
- Rio, M.C., Castro, M. M. & Kinoshita, L.S., 2002.** Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasil. Bot.*, V.25, n.3, p.339-349.
- Sakane, M. & Shepherd, G. J. 1986.** Uma revisão do genero *Allamanda* L. (Apocynaceae).
- Silva & Rapini, 2011.** *Allamanda calcicola* (Apocynaceae), an overlooked new species from limestone outcrops in the States of Minas Gerais and Bahia, Brazil. *Kew Bulletin* vol. 64: 171–174 (2009).
- Simões, A. O. & Kinoshita, L.S. 2002.** The Apocynaceae s. str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil.
- Simões, A.O., Castro, M. De M. & Kinoshita, L.S. 2006.** Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:387-398
- Simões, A.O.; Endress, M.E.; Niet, T.V.D.; Kinoshita, L.S. & Conti, E. 2004.** Tribal and intergeneric relationships of Mesechiteae (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence from three noncoding plastid DNA regions and morphology. *American Journal of Botany* 91: 1409-1418.
- Simões, A.O.; Livshultz, T.; Conti, E. & Endress, M.E. 2007.** Phylogenetic and systematics of the Raulvolfioideae (Apocynaceae) based on molecular and morphological evidence. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 268.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008.** Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

- Torres, C. & Galetto, L. 1998.** Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127:207-233.
- Tostes, R.B, Vieira, M.F. & Campos, L.A. 2003.** Polinização de *Peltastes peltatus* (Vell.) Woodson (Apocynoideae, Apocynaceae) por abelhas euglossíneas. In Apoideae Neotropica.
- Woodson Jr, R.E. & Moore, J.A. 1938.** The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceous flowers.
- Yeo, P. F. 1993.** Secondary pollen presentation. Form, function and evolutionat. Plant Systematics and Evolution (Supplementum) 6: 1–268.

Capítulo III

Morfoanatomia de Nectário e Gineceu em *Allamanda* L. (Apocynaceae)

Introdução

A família Apocynaceae apresenta grande variação floral, formando estruturas únicas e complexas dentro das angiospermas, como a cabeça do estilete e a adnação do androceu e gineceu formando o ginostégio. Esta complexidade morfológica floral encontrada na família faz com que os mecanismos de polinização sejam bastante especializados, tais como forte hercogamia e apresentação secundária de pólen (Fallen, 1985, 1986; Yeo 1993, Araújo *et al.*, 2011), o que aumenta a complexidade floral e o nível de especialização dos polinizadores.

Na família, a presença de nectário não é universal, sendo a ausência uma provável condição plesiomórfica em Rauvolfioideae, confirmado pela filogenia (Endress *et al.*, 1996).

Duas origens do nectário foram relatadas para Apocynaceae: apendicular (Gomes, 2006; Gomes *et al.*, 2008) e receptacular (Galetto, 1997), sendo que em Rauvolfioideae e Apocynoideae podem ocorrer as duas formas de origem de nectários.

O nectário pode ocorrer na forma de um espessamento da base do ovário, na forma de lobos ou anel circundando o mesmo, sendo bastante variável quanto a sua origem, forma e posição. Também pode ser extra ovariano, como em Asclepiadoideae, de natureza diversa e não homólogo aos situados na base do ovário (Woodson & Moore, 1938; Rao & Ganguli, 1963; Endress & Bruyns, 2000; Gomes, 2008).

Na maioria dos tratamentos taxonômicos, são denominados de disco nectarífero (Woodson e Moore, 1938; Pichon, 1948; Allorge, 1976; Ezcurra, 1981; Sakane & Shepherd, 1986; Morales, 1999; Kinoshita, 2005), porém referir como forma de anel corresponde melhor a forma desenvolvida por esta estrutura ao redor do ovário (Simões, 2000).

O nectário basalmente anelar que contorna o ovário é frequentemente bilobado ou pentalobado no seu ápice (Woodson & Moore, 1938). Em Rauvolfioideae, este tipo de nectário é comum, podendo se apresentar com o ápice lobado ou não, contudo, dois nectários alternos aos dois carpelos e zona nectarífera no ovário também foram evidenciados em algumas

espécies desta subfamília, especialmente na tribo Vinceae (Woodson & Moore, 1938; Allorge, 1976).

Gomes (2006) sugeriu uma provável tendência evolutiva para a estruturação do nectário em Apocynaceae baseada em estudos ontogenéticos. Segundo esta autora as zonas nectaríferas do ovário teriam se tornado mais salientes, evoluindo para a forma anelar, que gradativamente aumentaria o grau de divisão da estrutura em lobos até se tornarem profundamente pentalobados, culminando na supressão de três lobos. Esse processo de supressão teria originado os nectários na forma de dois lobos alternicarpelares. A hipótese de Gomes (2006) vai de encontro às ideias de Woodson & Moore (1938), que sugeriram uma origem derivada de nectários anelares a partir de dois ou cinco nectários livres entre si na base do ovário.

Desde muito tempo o gineceu tem sido utilizado para separação de táxons. Linnaeus (1753) e Andanson (1768) separaram grupos baseando no número de carpelos. Para separação infrafamiliar em Apocynaceae, Jussieu (1789) usou o caráter fusão carpelar e De Candolle (1844) o número de lóculos do gineceu. Outros autores como Gray (1878), Schumann (1895) e Woodson (1930) também utilizaram características do gineceu para caracterizar tribos e subfamílias.

Uma das características de Apocynaceae é a predominância de dois carpelos livres (apocarpia) na porção ovariana. Contudo, sincarpia parcial e total do ovário também estão presentes em alguns representantes desta família, podendo ocorrer gradação dentro de um mesmo gênero (Koch *et al.*, 2002).

Fahn (1990) e Weberling (1992) descreveram dois padrões de fusão carpelar, congênita (desenvolvimento a partir de um anel contínuo) e pós-gênita (dois primórdios carpelares que se fundem ao longo do desenvolvimento floral). Endress *et al.* (1996) também descreveram os estados de caráter como congenitamente sincárpico e pós-genitamente sincárpico, sugerindo que a sincarpia seria uma condição apofomórfica na família. Gomes (2008) descreveu uma terceira possibilidade para a sincarpia em Apocynaceae, denominando de sincarpia de origem mista (origem inicial congenitamente sincárpica, e outra distal, pós-genitamente conata). Este tipo de sincarpia já havia sido relatado por Falen (1985) ao estudar a ontogenia do gineceu em *Allamanda*. A condição de sincarpia congênita, com ovário 1-locular e placentação parietal, já era considerada como a condição “primitiva” em

Apocynaceae desde De Candolle (1844), hipótese esta que foi amplamente aceita por outros pesquisadores na família, como Schumann (1895), Pichon (1948, 1950) e Leeuwenberg (1994). Estudos filogenéticos indicam que a apocarpia é a condição plesiomórfica em Apocynaceae, a partir da qual a sincarpia do tipo congênita e pós-gênita evoluíram de forma convergente repetidas vezes, especialmente em Rauvolfioideae. Este padrão já havia sido proposto, embora de forma pouco conclusiva, em Potgieter & Albert (2001) e foi melhor explorado por Simões *et al.* (2007).

Outras variações do ovário em Apocynaceae são a sua posição no receptáculo floral e a simetria entre os carpelos. Em Apocynaceae *s. str.*, Woodson e Moore (1938) descreveram as espécies como portando ovário súpero, porém esta não é uma condição universal na família. Há espécies que apresentam ovário semi-infero como é caso de representantes das tribos Plumerieae e Apocyneae (Endress & Bruyns, 2000; Alvarado-Cárdenas & Ochoterena, 2007).

O ovário pode apresentar ou não diferença entre os carpelos em uma mesma flor, tanto em gineceu apocárpico quanto em gineceu sincárpico, variando assim entre anisocarpelar, condição encontrada em cerca de 60% das espécies de Rauvolfioideae, ou isocarpelar, encontrada em cerca de 70% das espécies de Apocynoideae. A condição isocarpelar é considerada derivada da condição anisocarpelar (Endress *et al.*, 1996; Gomes, 2008).

A união congênita ou pós-gênita dos carpelos em Apocynaceae origina a cabeça do estilete, um espessamento no ápice do estilete que pode ter a forma cilíndrica, fusiforme, umbraculiforme, claviforme, cônica, capitada ou pentagonal, com ápice inteiro ou mais comumente possuindo dois apêndices livres (Endress *et al.*, 1983). Esta estrutura é revestida por uma epiderme secretora produtora de substância adesiva (polenkitt) (Walker, 1975; Fallen, 1983; 1986; Sakane & Shepherd, 1986), responsável pelo transporte do pólen e, de grande importância para o sistema de polinização (Fallen, 1986; Endress, 1994; Koch *et al.*, 2002).

Este órgão recebeu diferentes denominações por diferentes autores como, estigma (Leite, 1975), cabeça do pistilo (Zarucchi *et al.*, 1995), cabeça do ginostégio (Pirani, 2003), clavúncula (Allorge, 1976; Fallen, 1986; Sakane & Shepherd, 1986). Todavia, estas denominações caíram em desuso porque não descrevem a estrutura corretamente. Por exemplo, estigma é a zona receptiva e não corresponde a toda extensão da cabeça do

estilete na maioria das espécies de Apocynaceae (Fallen, 1986) e, nem sempre a forma é de clava para chamar de clavícula.

Fallen (1986) hipotetizou uma progressão evolutiva em relação aos tipos estruturais da cabeça do estilete dentro da família Apocynaceae. Nesta sequência hipotética, as formas morfolologicamente mais simples, sem compartimentalizações, totalmente recobertas por uma camada de células epidérmicas secretoras e sem adnação a qualquer verticilo floral seriam a condição plesiomórfica, a partir da qual formas morfolologicamente mais complexas, com diferentes graus de compartimentalização e organização dos tricomas secretores derivaram. Exemplos de compartimentalização da cabeça do estilete é a presença de anel de tricomas nas suas regiões apical, e a presença de colar membranoso na transição com o estilete, com a região receptiva localizada abaixo do colar basal (Fallen, 1986).

Em Rauvolfioideae, há evidências de que a condição ancestral seja a ausência de especialização da cabeça do estilete, apresentando formato cilíndrico a fusiforme, com revestimento homogêneo de tricomas secretores, ausência de anel basal ou anel de tricomas apical. Contudo, dentro desta subfamília ocorrem cabeças do estilete tanto morfolologicamente simples quanto com diferentes graus de diferenciação, mesmo dentro de um mesmo clado como em Aspidospermeae, Vinceae, Tabernaemontaneae, Melodineae, Alyxieae e Plumerieae (Simões *et al.*, 2007). Quando diferenciada, há a presença de um anel apical abaixo da região dos apêndices apicais, uma região mediana secretora e/ou um colar basal. Quando o colar basal está presente, a região receptiva fica abaixo desta estrutura. Quando não há diferenciação, a região receptiva se estende ao longo de toda a cabeça do estilete, menos na porção dos apêndices apicais. Entretanto, em nenhum dos seus representantes há a presença de retináculo para a formação do ginostégio, diferindo das demais subfamílias (Endress & Bruyns, 2000; Simões *et al.*, 2007).

Fallen (1985) ao analisar o desenvolvimento do gineceu junto com outras características sugeriu que *Allamanda* ocupasse um lugar isolado dentro de Apocynaceae, por apresentar características únicas que o distingue de outros gêneros: como sincarpia unilocular de origem mista, fruto seco capsular deiscente e peculiaridade da morfologia da cabeça do estilete. Todavia, as espécies de *Allamanda* possuem caracteres compartilhados com outras tribos, como sementes aladas, glândulas calicinais, anteras com lignificação não

especializada e subsséiseis, o que dificulta a determinação de seu posicionamento em Apocynaceae.

O presente estudo tem por objetivo analisar morfoanatomicamente o nectário e o gineceu (ovário e cabeça do estilete) de espécies de *Allamanda*, além de realizar testes histoquímicos para evidenciar as principais classes químicas de metabólitos encontrados na secreção da cabeça do estilete. Os resultados obtidos contribuirão assim para um melhor entendimento das estruturas florais para este gênero, além de fornecer caracteres que podem ser úteis para a filogenia e sistemática de Plumerieae e Rauvolfioideae.

Materiais e métodos

Material Botânico

Para a realização deste trabalho foram utilizadas flores em antese de *A. cathartica* L, *A. laevis* Markg, *A. puberula* A.DC. e *A. schottii* Pohl., coletadas a partir de indivíduos localizados no Campus da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (*A. schottii* e *A. cathartica*), Grão Mogol-MG (*A. puberula*) e região de Medina-MG (*A. laevis*). Os exemplares foram identificados pela primeira autora e a identificação posteriormente confirmada pelo Prof. Dr. André O. Simões. Os materiais testemunho foram herborizados e incorporados ao Herbário UEC.

Tabela 01: Dados de coleta das espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae).

Espécie	Localidade	Nome e nºcoletor	Data	Número do coletor
<i>A. cathartica</i>	Campinas, Unicamp, SP	Kotovski E.R.	20/06/2011	4
<i>A. laevis</i>	Medina, MG	Kotovski E.R. <i>et al.</i>	26/02/2012	2
<i>A. puberula</i>	Grão Mogol, MG	Kotovski E.R. <i>et al.</i>	26/02/2012	1
<i>A. schottii</i>	Campinas, Unicamp, SP	Kotovski E.R.	20/06/2011	3

Estudo anatômico

Flores em antese foram isoladas do material previamente coletado e fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)). Devido ao grande tamanho as flores destas espécies, foram separadas em duas uma

porções: uma basal (região do nectário e ovário) e uma apical (região da cabeça do estilete) com o comprimento de aproximadamente 1cm cada. O material foi previamente desidratado pela série butílica até à concentração de 100% (Johansen, 1940) e inclusão em paraplast. Após o emblocamento foram feitos seccionamentos em micrótomo rotativo Leica. Cortes seriados transversais e longitudinais foram obtidos com 12µm de espessura, montados em lâminas e corados com Safranina alcoólica 1% e Azul de Astra 1% (Gerlach, 1984). As lâminas permanentes foram montadas com resina sintética Permound e observadas em microscópio Olympus BX51. As imagens em alta resolução dos aspectos considerados relevantes foram obtidas em câmera digital DP72 acoplada ao microscópio, e as pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Histoquímica

Para o estudo histoquímico, foram separadas lâminas, desparafinizadas e sem corar, com cortes longitudinais da cabeça do estilete, fixados em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)). Os tratamentos feitos para a detecção de presença dos principais compostos químicos foram: Vermelho de Rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas1989), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reation) para polissacarídeos totais (Jensen, 1962), Preto de Sudão e Sudão IV para lipídeos totais (Pearse, 1968), Azul de Alcian para mucopolissacarídeos ácidos. As lâminas foram montadas em gelatina glicerizada e observadas em microscópio Olympus BX51. Os nectários foram submetidos ao Reagente de Lugol para detectar presença de amido. As imagens em alta resolução dos aspectos considerados relevantes foram obtidas em câmera digital DP72 acoplada ao microscópio, e as pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise micromorfológica, o material fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% na proporção 1:1:18 (Johansen, 1940)) foi desidratado em série etílica até 100%, seco pelo método de ponto crítico, montado em suporte e submetido a metalização com ouro. As observações e registros de imagens foram efetuados em MEV Jeol

JSM 5800 LV a 10kV, com câmera digital acoplada. As pranchas de ilustrações montadas com o uso do software Corel Draw X5.

Resultados

Um anel nectarífero conspicuo está localizado ao redor do ovário nas quatro espécies, sendo particularmente desenvolvido em *A. schottii* (Figs. 01-04). Este anel é livre desde a base até o ápice, com cinco lobos apicais bem definidos, profundamente pentalobado em *A. schottii*, e levemente pentalobado em *A. laevis*, *A. cathartica* e *A. puberula* (Figs. 10, 17, 23, 28). Em *A. laevis*, a região do nectário localizado na mesma direção ao da linha de sutura entre os carpelos, apresenta uma profunda invaginação da parede (Figs. 01,14-16). Morfologicamente, o nectário em *A. schottii* apresenta a base mais estreita e o corpo nectarífero mais globoso em relação ao nectário das demais espécies (Fig. 29). Nas quatro espécies, a epiderme não secretora do anel nectarífero é uniestratificada com uma fina cutícula e apresenta diversos estômatos (Figs. 12, 19, 25, 30). A presença de estômatos circundados por células subsidiárias do tipo ciclocítico é evidenciada nas quatro espécies (Figs. 05-07). Em nectários totalmente desenvolvidos, os estômatos estão projetados acima do nível das células epidérmicas, porém variando quanto a sua quantidade e distribuição. Os estômatos são numerosos e distribuídos em toda a superfície nectarífera em *A. schottii*, conferindo um aspecto verrugoso ao anel nectarífero (Fig. 04). Em *A. laevis*, os estômatos também são numerosos, porém distribuídos na porção mais apical do nectário (Fig. 01). Em *A. cathartica* e *A. puberula*, os estômatos são poucos e esparsamente distribuídos na porção apical (Figs. 02 e 03). O parênquima nectarífero é constituído por células pequenas de parede fina, núcleo grande e citoplasma denso, com grãos de amido na fase secretora e laticíferos de parede pecto-celulósica levemente espessa, formato cilíndrico, muitas vezes ramificado, com diversos núcleos, distribuídos no tecido fundamental (Figs. 12, 24, 25). O tecido vascular do nectário é composto por feixes vasculares que circundam toda a extensão desta estrutura (Figs. 08, 14, 20, 26).

Tabela 02: características morfológicas e histoquímica do nectário em espécies *Allamanda* estudadas.

Nectário	Espécies			
	<i>A. laevis</i>	<i>A. puberula</i>	<i>A. schottii</i>	<i>A. cathartica</i>
Tipo	Levemente pentalobado com duas invaginações opostas entre sí.	Levemente pentalobado	Profundamente pentalobado	Levemente pentalobado
Quantidade de estômatos	Poucos	Poucos	Muitos	Poucos
Localização dos estômatos	Porção mais apical do nectário	Porção mais apical do nectário	Em toda a superfície do nectário	Porção mais apical do nectário
Reação de Lugol	+	+	+	+

O gineceu é bicarpelar (Figs. 01-04) e unilocular com placentação parietal, portando duas fileiras de óvulos ao longo de cada sutura carpelar (Figs. 10, 17, 21 , 27). Dois estiles filiformes fundidos e longos se estendem até a região apical do tubo inferior da corola, formando uma estrutura apical denominada de cabeça do estilete, logo abaixo das anteras.

Anatomicamente, as quatro espécies apresentam a mesma estruturação celular no ovário, variando apenas no número de camadas do mesofilo e na quantidade de laticíferos. A parede do ovário possui uma epiderme externa uniestratificada, núcleos evidentes basais, citoplasma com aspecto denso e cutícula delgada (Figs. 11, 18, 25, 31). Estômatos foram observados em toda a superfície do ovário apenas em *Allamanda laevis* (Fig. 01).

O mesofilo ovariano é formado por abundantes camadas compactas de parênquima constituídas por células pequenas de paredes pecto-celulósicas delgadas, núcleo evidente e citoplasma de aspecto denso. Entre as células parenquimáticas estão dispersos feixes

vasculares e muitos laticíferos. Os laticíferos são células bem destacadas no tecido fundamental por apresentarem parede pecto-celulósica levemente espessa, formato cilíndrico, muitas vezes ramificado, e diversos núcleos (Figs. 11, 13, 18, 24, 31). O sistema vascular do ovário consiste de feixes vasculares indistintos que circundam toda a estrutura ovariana, sendo mais desenvolvidos os marginais, próximos à região de da sutura. Na região de união dos carpelos nota-se uma linha, pouco proeminente, constituída de células parenquimáticas de paredes bem justapostas, que se estende da epiderme externa até a placenta. Próximos às linhas de deiscência estão localizados feixes vasculares marginais (Figs. 09, 16, 20, 26). A epiderme interna do ovário é unisseriada e revestida por cutícula delgada possuindo células levemente alongadas de citoplasma e núcleo evidentes.

Em nenhuma das quatro espécies, a cabeça do estilete apresenta adnação às anteras ou a qualquer outro verticilo floral. Morfologicamente, se caracterizam por apresentar um corpo cônico dividido em três regiões morfofuncionais (Figs. 37-40, 45, 50, 55, 60). A primeira região é constituída por um par de apêndices apicais, com células epidérmicas não secretoras. Estes apêndices apicais são variáveis nas quatro espécies quanto à forma, tamanho e o formato das células epidérmicas (Figs. 41-44). Em *A. cathartica*, são achatados dorsiventralmente, alongados com ápice arredondado, com células mais ou menos isodiamétricas (Figs. 44, 60-61). Em *A. laevis*, estes apêndices são dilatados, compressos dorsiventralmente e de aspecto rugoso (Figs. 43, 50-51). *Allamanda puberula* (Figs. 42, 45-46) é morfolgicamente similar à *A. cathartica*, porém as células epidérmicas são papilosas. Em *A. schottii*, são curtos, cônicos e também compressos dorsiventralmente (Figs. 41, 55-56).

A segunda região constitui o corpo principal cônico (Figs. 45, 50, 55, 60), sendo por sua vez dividido em **três** porções: **01**- porção superior revestida por um anel apical de tricomas bem alongados, sendo que em *A. puberula* são proporcionalmente mais longos em relação às outras três espécies, com base celular alargada onde o núcleo está presente (Figs. 37-40, 45, 50, 55, 60); **02**-porção mediana onde se localizam os tricomas secretores, com base celular alargada onde o núcleo está localizado, sendo mais curtos em *A. laevis* (Figs. 45, 48, 50, 53, 55, 58, 60, 63) e; **03**-porção inferior constituída por um anel basal de epiderme alongada justaposta. O anel basal é morfolgicamente diferente nas quatro espécies (Figs. 37-40). Em *A. schottii* (Figs. 39, 55, 59) e em *A. laevis* (Figs. 38, 50,54) o eixo central parenquimático abaixo do anel basal se expande para a periferia formando projeções arredondadas nas

células epidérmicas justapostas do anel basal, apresentando projeções onduladas na borda, contornando todo o anel, porém nesta última espécie este anel basal é proporcionalmente menor em relação a *A. schottii*. Em *A. cathartica* (Figs. 40, 60, 64) e em *A. puberula* (Figs. 37, 45, 49) o núcleo parenquimático se prolonga para a periferia formando projeções agudas nas células epidérmicas justapostas em todo o contorno do anel, sendo mais expressivo em *A. puberula*.

A terceira região, denominada região estigmática, é a parte receptiva da cabeça do estilete aos grãos de pólen alógenos, localizada abaixo do anel basal na transição com o estilete (Figs. 37-40, 45, 50, 55, 60). Nas quatro espécies, há uma gradação no tamanho e na distância entre os tricomas formados pelas células epidérmicas (Figs. 37-40, 45, 50, 55, 60). No anel apical, os tricomas são os mais longos e mais esparsos, porém à medida que se formam em direção aos apêndices apicais e à região mediana eles diminuem de tamanho e mudam a sua conformação, dando origem abruptamente as células epidérmicas não secretoras e gradativamente aos tricomas secretores menos esparsos, respectivamente. À medida que os tricomas secretores medianos se formam mais próximos da porção do anel basal, vão se tornando mais próximos e mais longos até se tornarem justapostos.

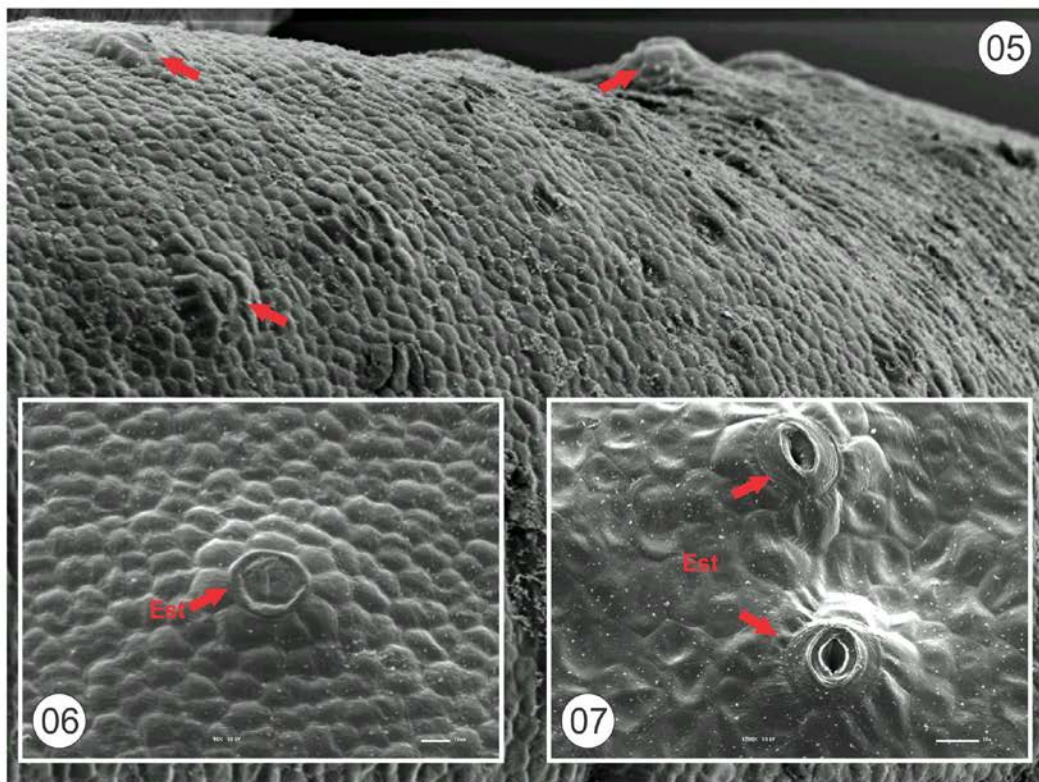
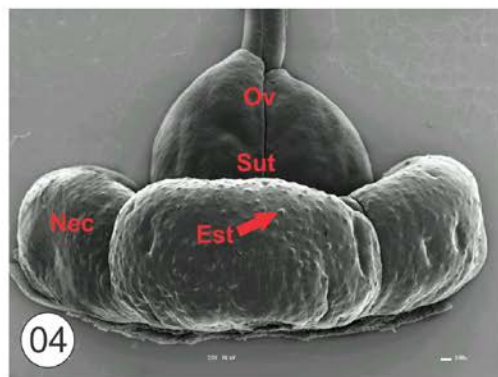
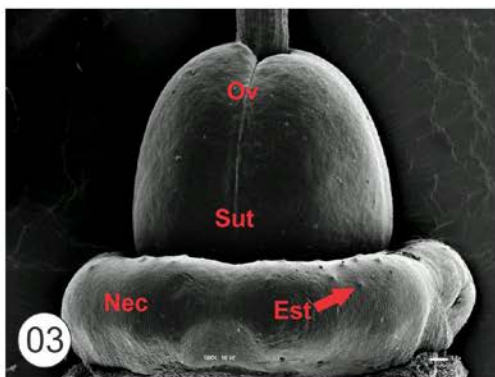
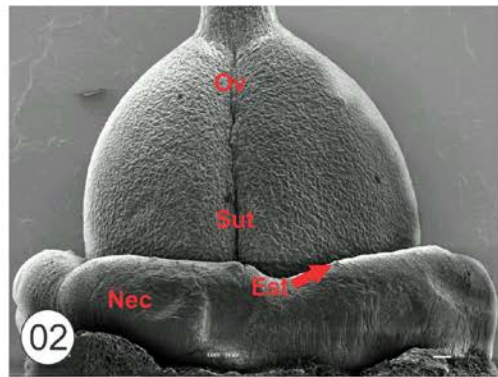
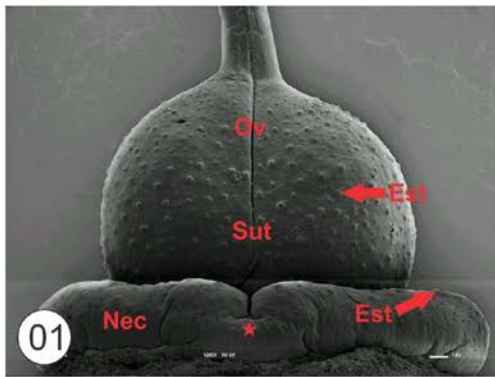
Com relação ao ângulo que estão dispostos os tricomas ao longo da cabeça do estilete, nas quatro espécies, há variação entre o anel apical, tricomas medianos e o anel basal. No anel apical os tricomas estão direcionados para cima em direção as anteras. Os tricomas medianos são perpendiculares ao corpo da cabeça do estilete e no anel basal a epiderme está direcionada ao ovário da flor (Figs. 37-40, 45, 50, 55, 60).

O corpo cônico parenquimático da cabeça do estilete é constituído por células heterodimensionais de parede delgada, sem idioblastos. Próximo aos feixes vasculares, as camadas de células parenquimáticas seguem a mesma orientação desses feixes. Também são maiores e mais alongadas à medida que se aproximam da periferia do anel basal. Dois feixes vasculares concêntricos se estendem desde o início do estilete filiforme até o ápice da cabeça do estilete, bifurcando e direcionando um feixe vascular para cada um dos apêndices apicais, apresentando apenas elementos traqueais no ápice desses apêndices, vistos nos cortes transversais e longitudinais (Figs. 45-46, 50-51, 55-56, 60).

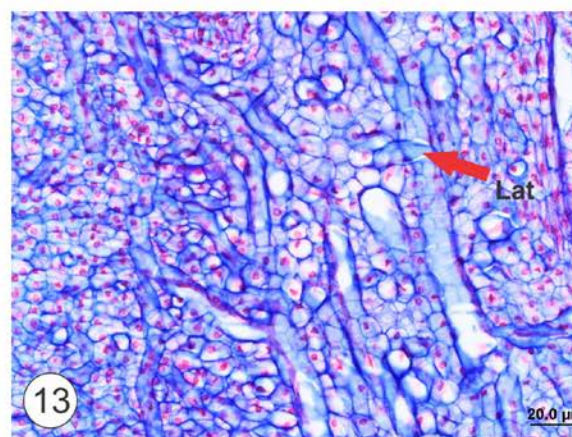
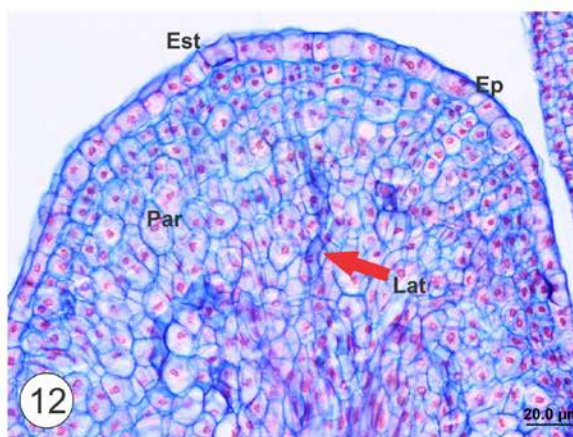
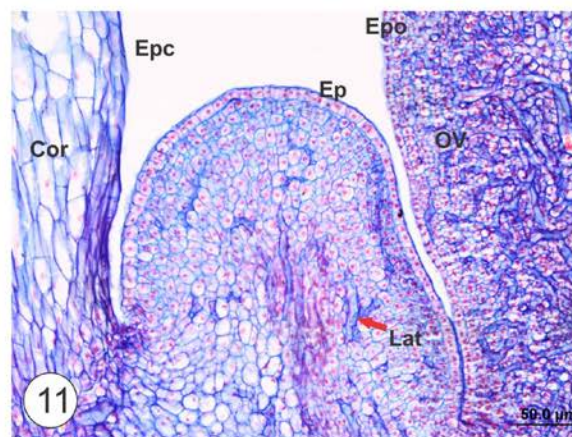
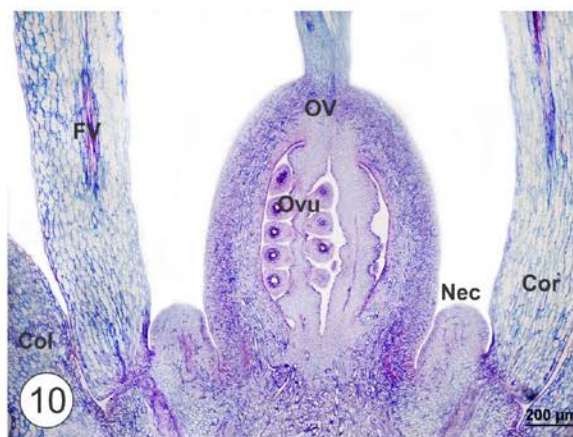
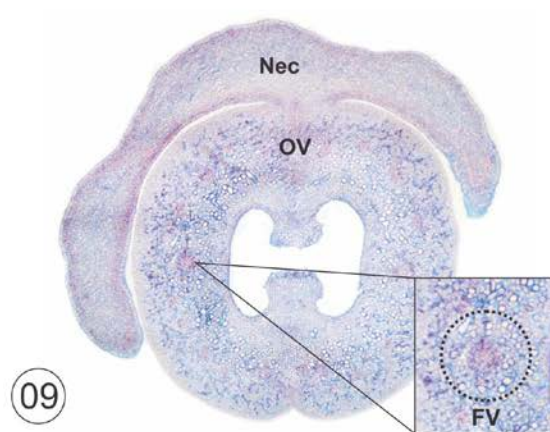
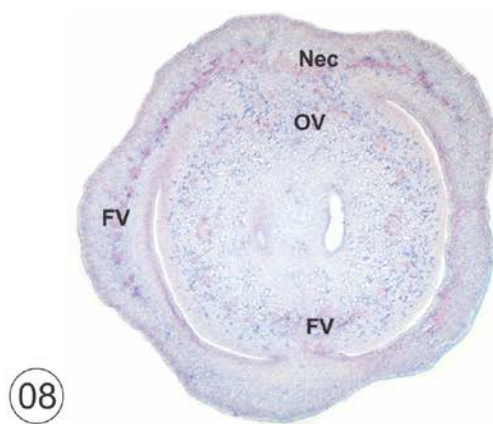
Os testes histoquímicos realizados para a cabeça do estilete confirmaram a presença de compostos lipídicos totais (Figs. 65-76), polissacarídeos ácidos (Figs. 77-84),

polissacarídeos totais (Figs. 85-88) e mucilagem ácida (Figs. 90-93), submetidos aos testes de Preto de Sudão, Sudão IV, Azul de Alciano, PAS e Vermelho de rutênio, respectivamente. Estes compostos, igualmente presente em todas as espécies, são evidenciados tanto no interior dos tricomas do anel apical e dos tricomas medianos quanto no meio extracelular. As células epidérmicas justapostas do anel basal não coraram com nenhum dos testes histoquímicos aqui aplicados, caracterizando sua natureza não secretora.

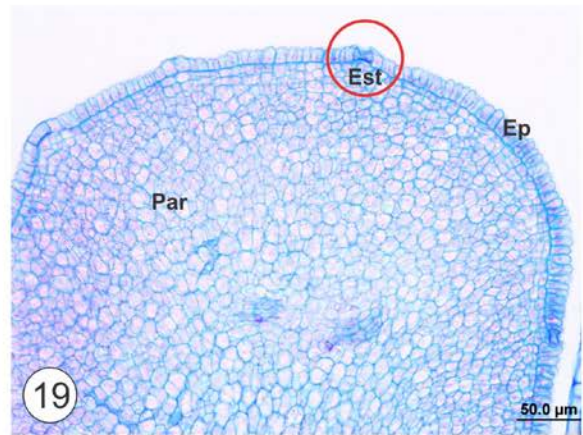
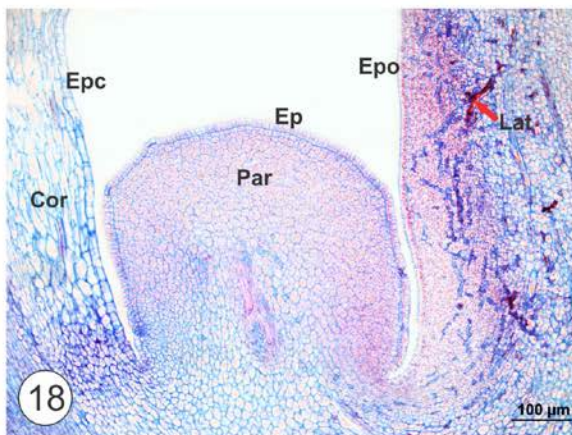
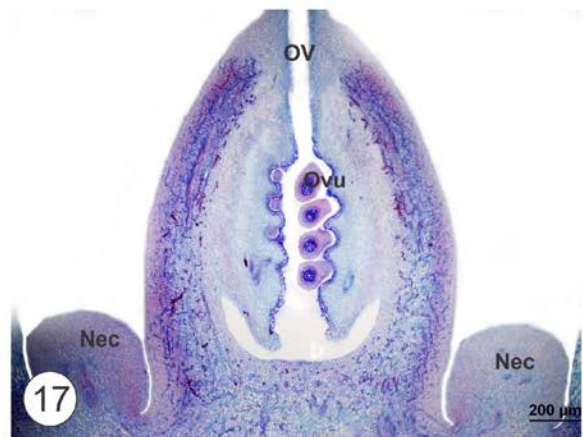
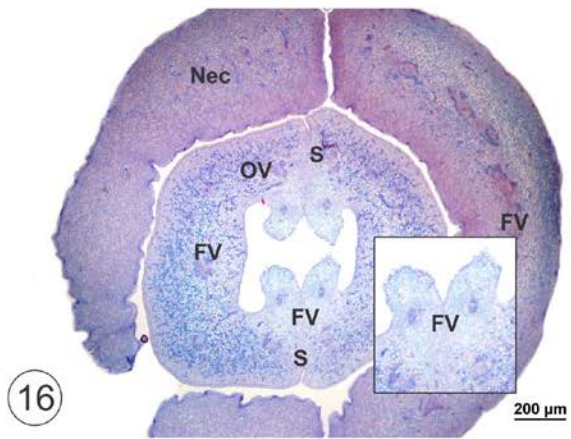
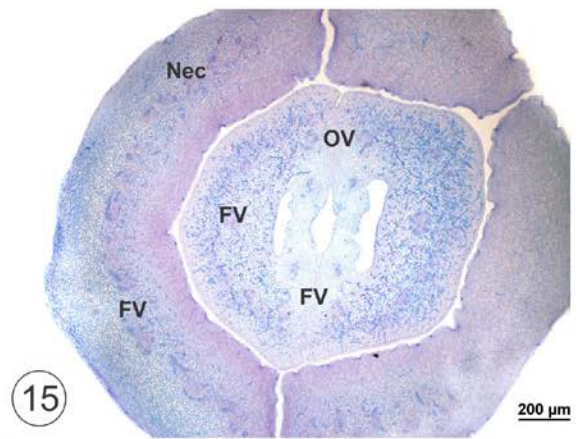
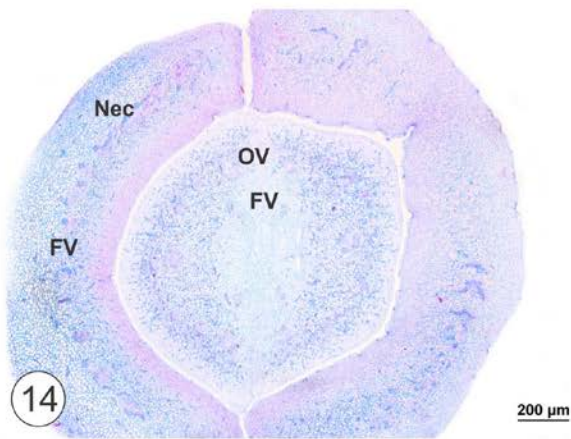
Figuras 01-07: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do nectário e ovário em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae). 01-04: vista geral do nectário e do ovário. 01-*A. laevis*; 02-*A. puberula* e 03-*A. cathartica*; 04-*A. schottii*. Figuras 05-07: Detalhes dos estômatos de *Allamanda schottii*. Observar os estômatos acima do nível epidérmico e as células subsidiárias. **Est e **setas**=Estômatos; **Nec**=Nectário; **O**=Ovário; **Sut**=Sutura.**



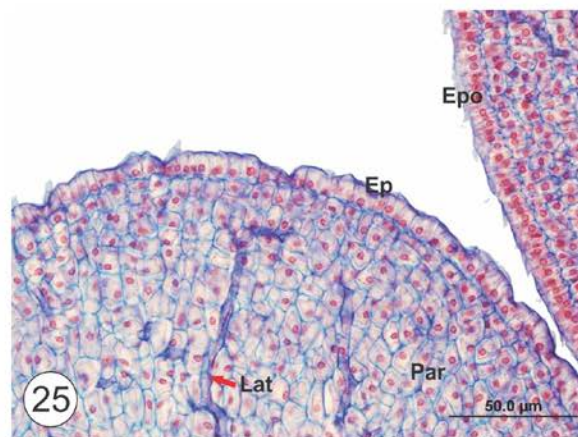
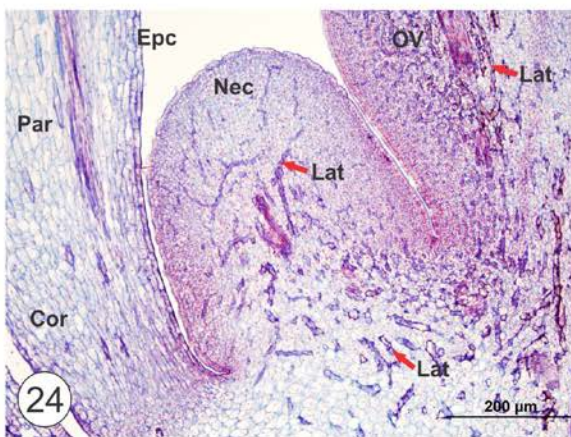
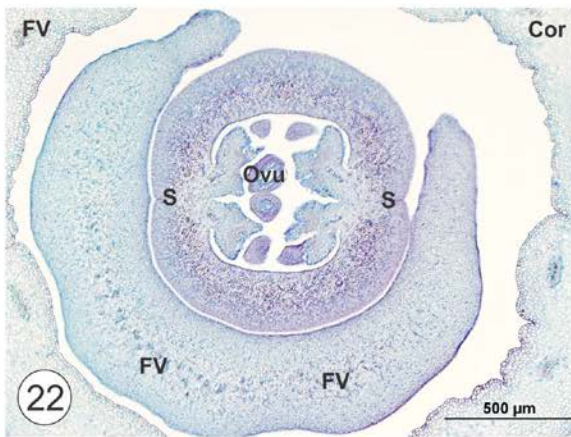
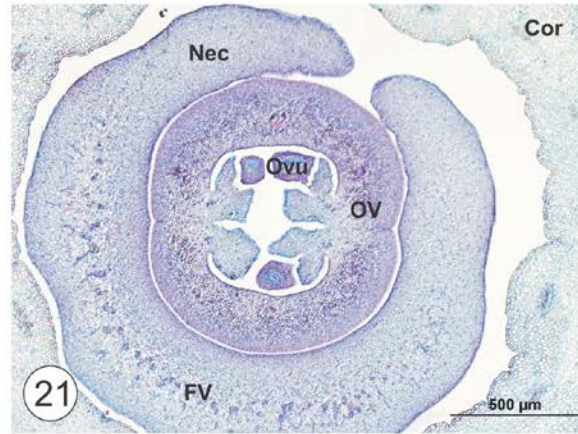
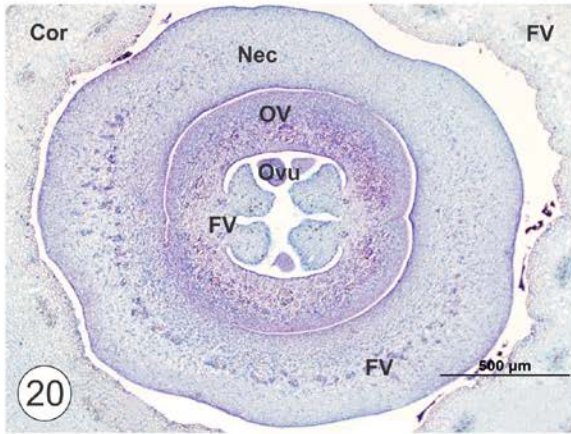
Figuras 08-13: Secções anatômicas do nectário e do ovário em flores de *Allamanda puberula* (Apocynaceae). 08 e 09-Secção transversal em diferentes alturas do nectário. 10-secção longitudinal evidenciando a localização do nectário e do ovário na flor. 11-Detalhes do nectário e ovário. 12-Nectário em maior aumento. 13-Detalhes dos laticíferos do ovário. 10-13: coetes longitudinais. Cal= Cálice; Cor=Corola; Ep=Epiderme; Epc=Epiderme da corola; Epo=Epiderme do ovário; Est=Estômatos; FV=Feixe vascular; Lat e seta=Laticífero; Nec=Nectário; OV=Ovário; Ovu=Óvulo. 08-10. 200 µm; 11. 50 µm; 12, 13. 20 µm



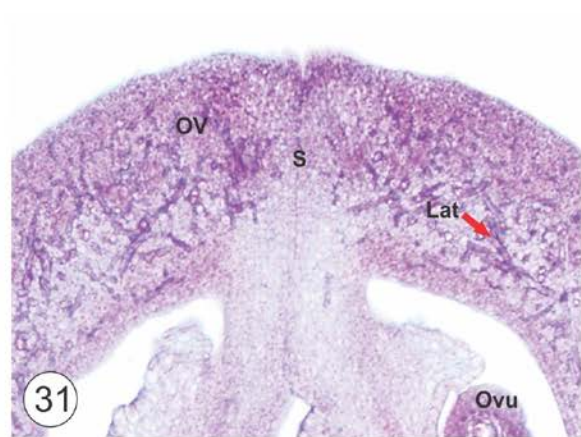
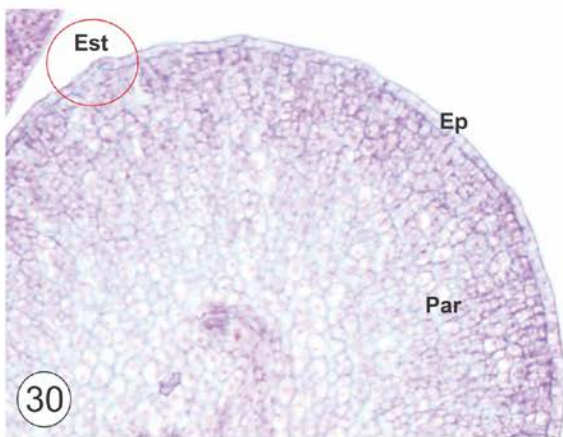
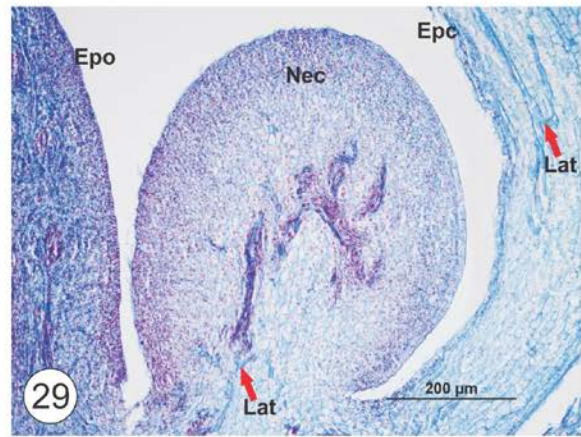
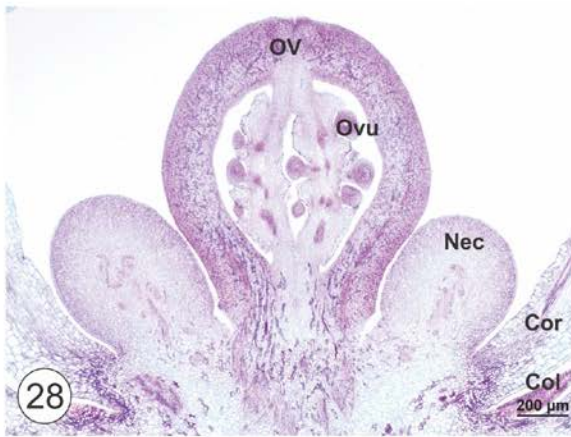
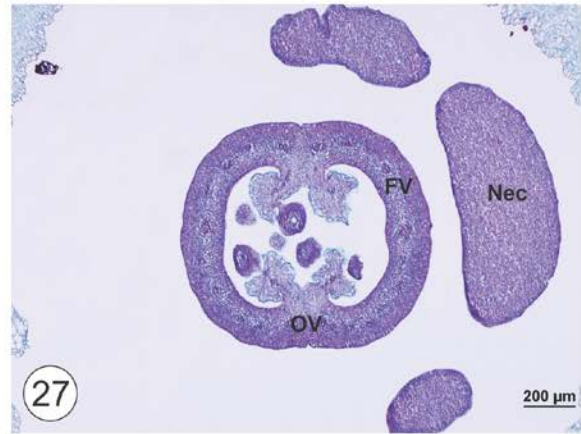
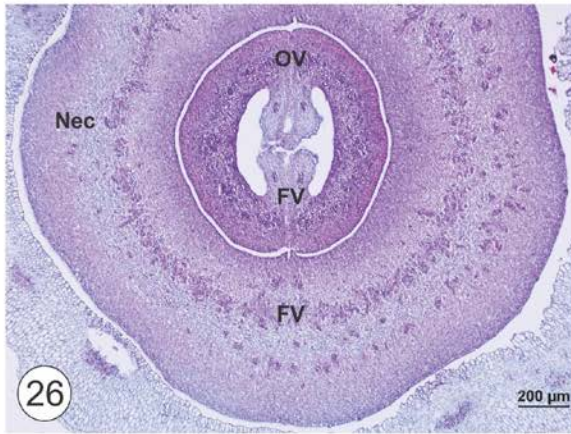
Figuras 14-19: Secções anatómicas do nectário e do ovário em flores de *Allamanda laevis* (Apocynaceae). **14-16**-Secção transversal em diferentes alturas do nectário. **17**-secção longitudinal evidenciando a localização do nectário e do ovário na flor. **18**-Detalhes da organização celular do nectário e ovário. **19**- maior aumento do nectário. Corte longitudinal: 17-19 **Cal**= Cálice; **Cor**=Corola; **Ep**=Epiderme; **Epc**=Epiderme da corola; **Epo**=Epiderme do ovário; **Est**=Estômatos; **FV**=Feixe vascular; **Lat e seta**=Laticífero; **Nec**=Nectário; **OV**=Ovário; **Ovu**=Óvulo; **S**=Sutura ovariana. **14-17**. 200 µm; **18**.100 µm; **19**. 50 µm.



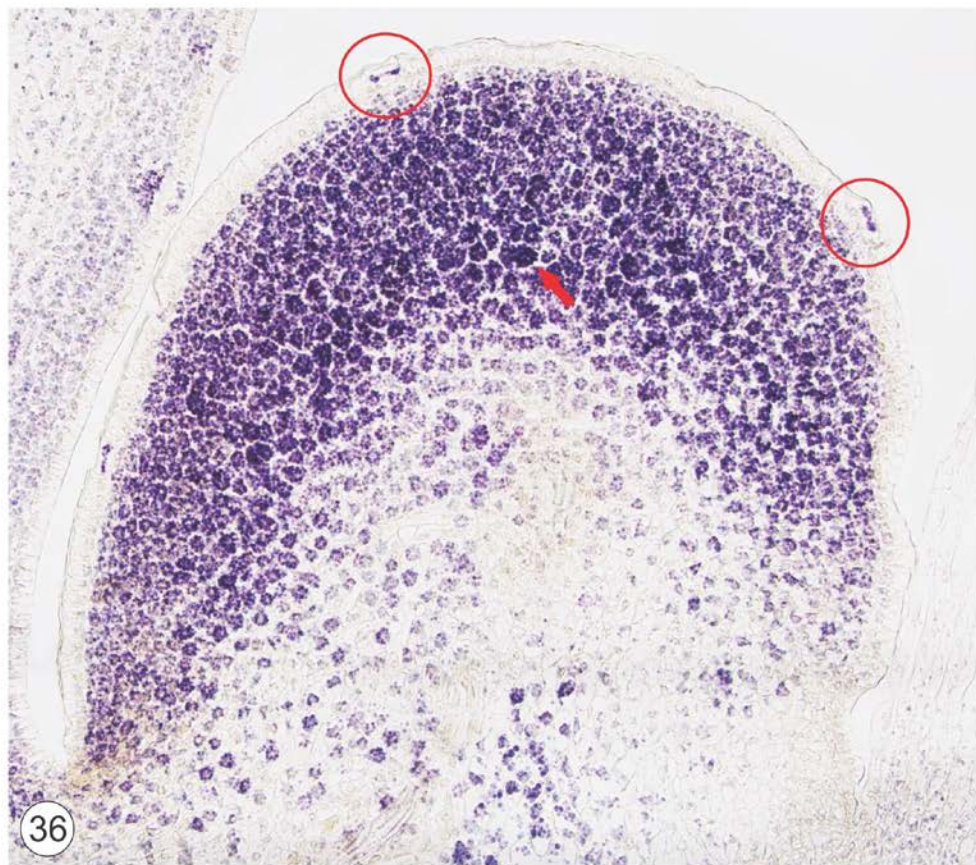
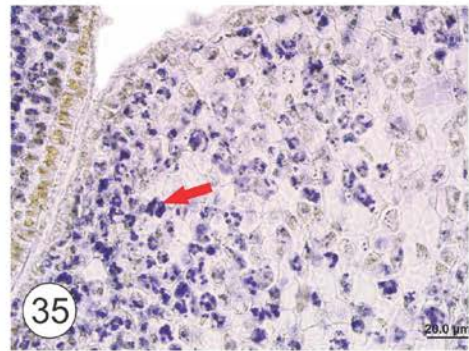
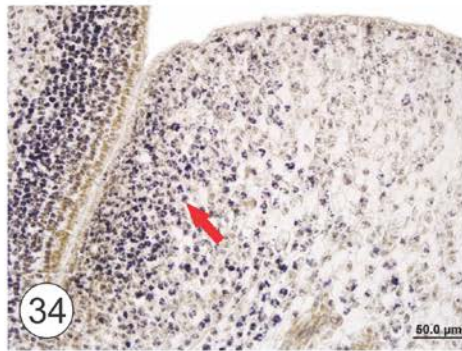
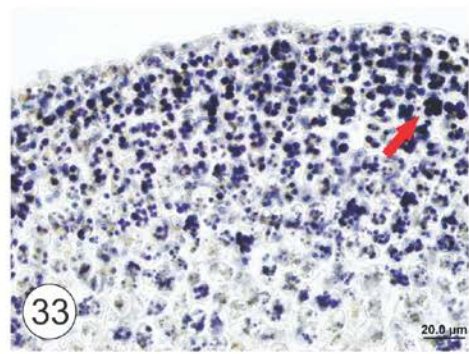
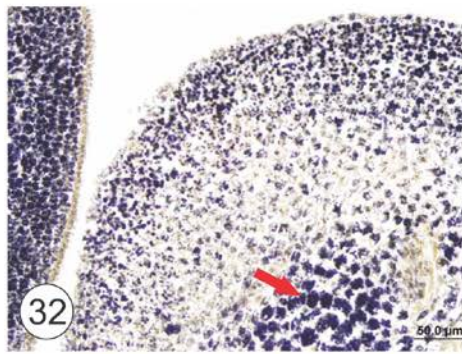
Figuras 20-25: Secções anatômicas do nectário e do ovário em flores de *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). 20-22-Secção transversal em diferentes alturas do nectário. 24-secção longitudinal evidenciando a localização do nectário e do ovário na flor. 25-Detalhes do nectário e ovário. 19-maior aumento do nectário. Corte longitudinal: 23-25. **Cal**= Cálice; **Cor**=Corola; **Ep**=Epiderme; **Epc**=Epiderme da corola; **Epo**=Epiderme do ovário; **Est**=Estômatos; **FV**=Feixe vascular; **Lat e seta**=Laticífero; **Nec**=Nectário; **OV**=Ovário; **Ovu**=Óvulo; **S**=Sutura ovariana. 20-22. 500 µm; 23, 24. 200 µm; 25. 50 µm.



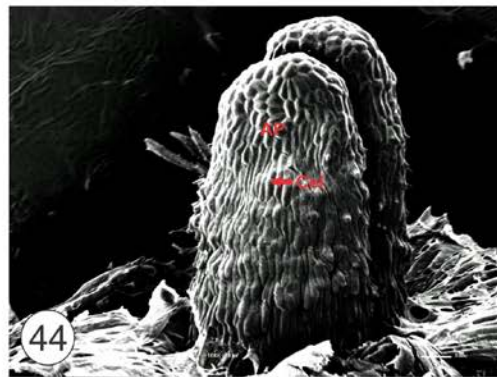
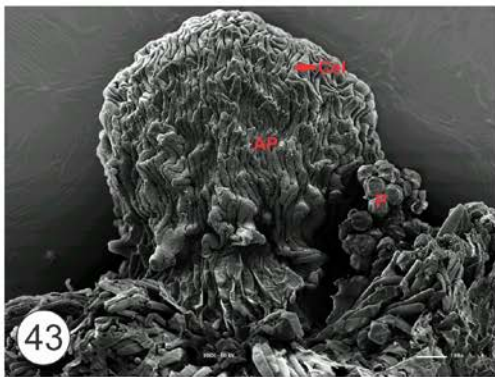
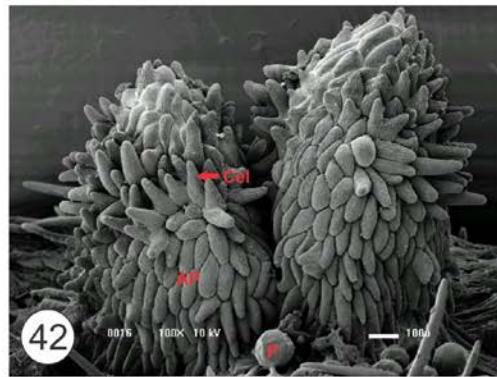
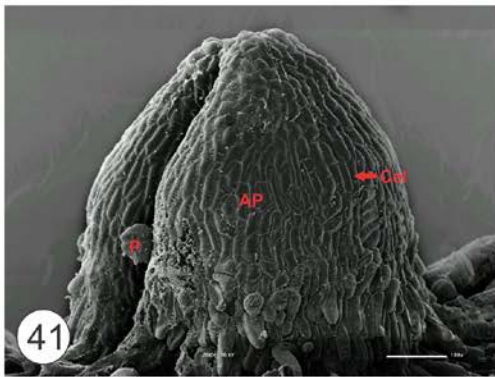
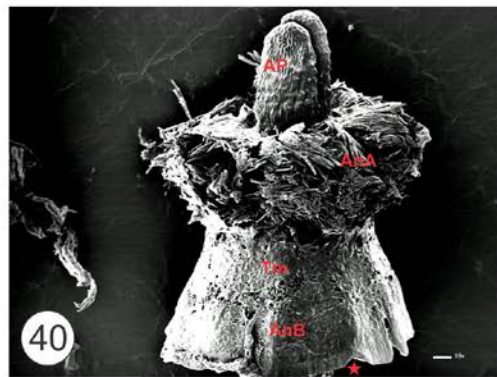
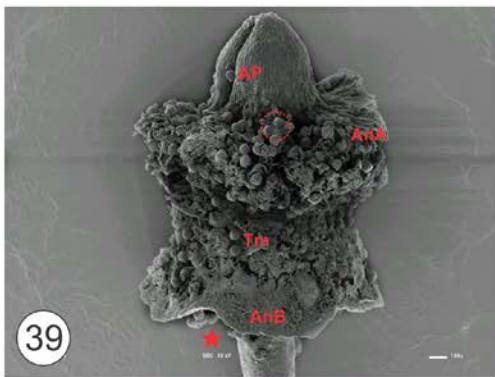
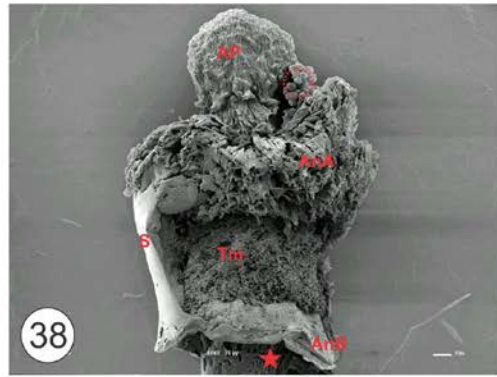
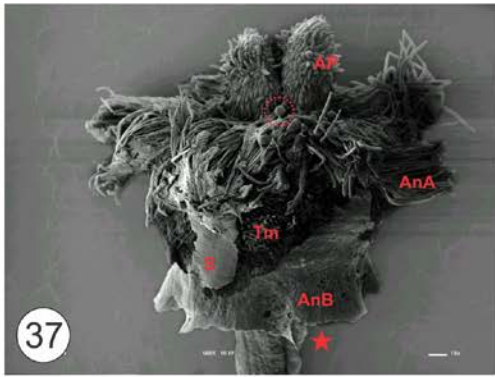
Figuras 26-31: Secções anatômicas do nectário e do ovário em flores de *Allamanda schottii* (Apocynaceae). 26-27-Secção transversal em diferentes alturas do nectário. 28-secção longitudinal evidenciando a localização do nectário e do ovário na flor. 29-Detalhes do nectário e ovário. 30-maior aumento do nectarífero. 31-Detalhes do ovário. Corte longitudinal: 28-31. Col=Coléter; Cor=Corola; Ep=Epiderme; Epc=Epiderme da corola; Epo=Epiderme do ovário; Est=Estômatos; FV=Feixe vascular; Lat e seta=Laticífero; Nec=Nectário; OV=Ovário; Ovu=Óvulo; S=Sutura ovariana. 26-29. 200 µm.



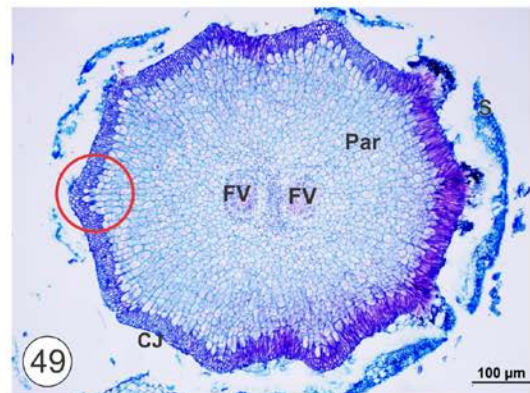
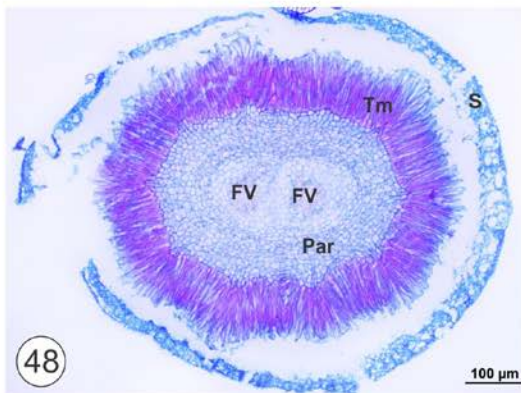
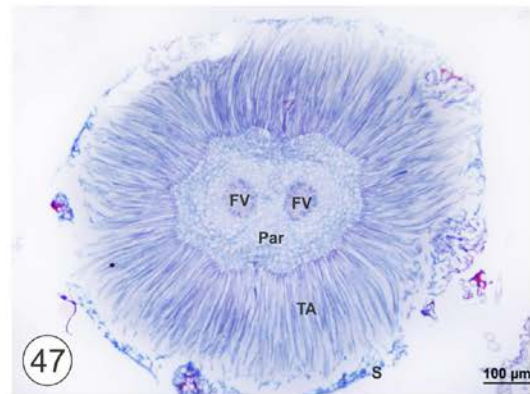
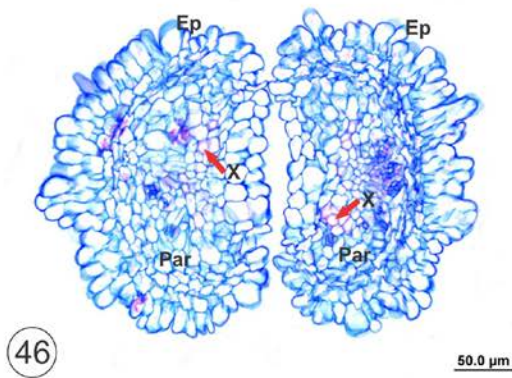
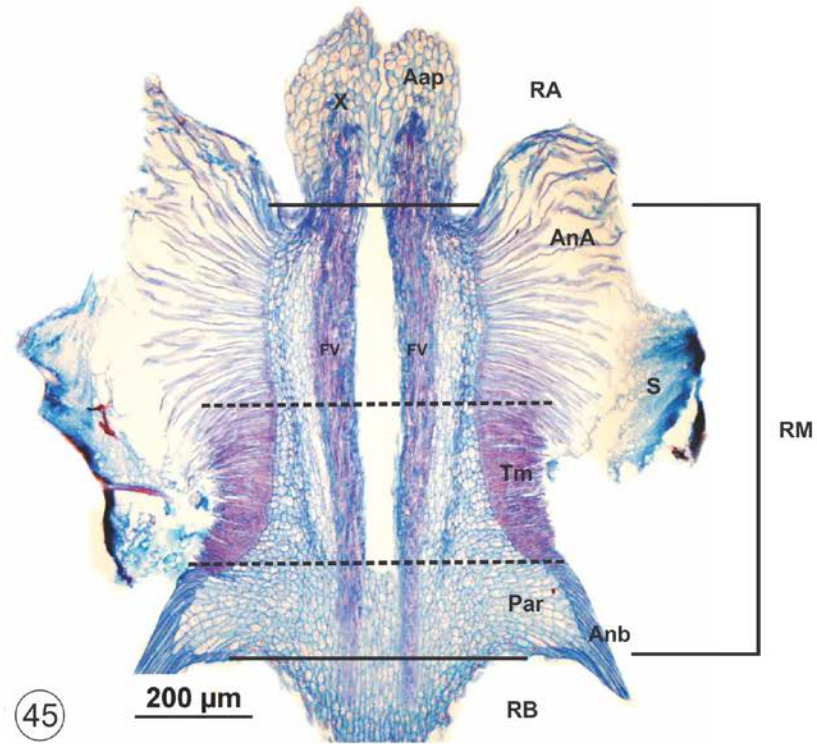
Figuras 32-36: Secções longitudinais de nectários de *Allamanda* L. (Apocynaceae) submetidos ao teste histoquímico com Lugol. 32 e 33-*A. schottii*; 34-*A. cathartica*; 35-*A. puberula*; 36-*A. laevis*. Setas indicam os grânulos de amido e os círculos indicam os estômatos.



Figuras 37-44: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da cabeça do estilete em flores de espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae). 37-40, vista geral da cabeça do estilete. Figuras 41-44, detalhes dos apêndices apicais. Figuras 37 e 42-*Allamanda puberula*; 38 e 43-*Allamanda laevis*; 39 e 41-*Allamanda schottii*; 40 e 44-*Allamanda cathartica*. **AnA=Anel apical; **AnB**=Anel basal; **AP**=Apêndices apicais; **Cel**=Células epidérmicas; **P**; **S**=secreção; **Tm**=Tricomas medianos e círculos=Pólen; região receptiva (estrela).**

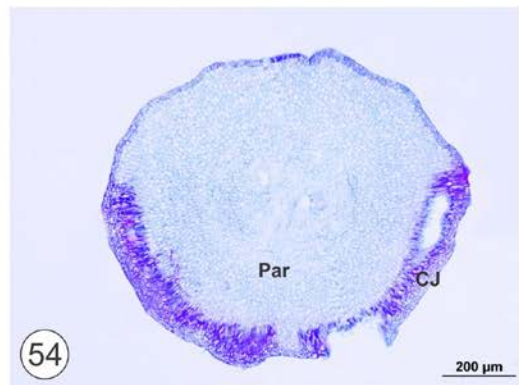
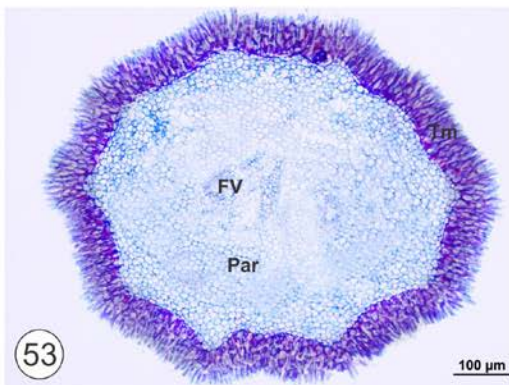
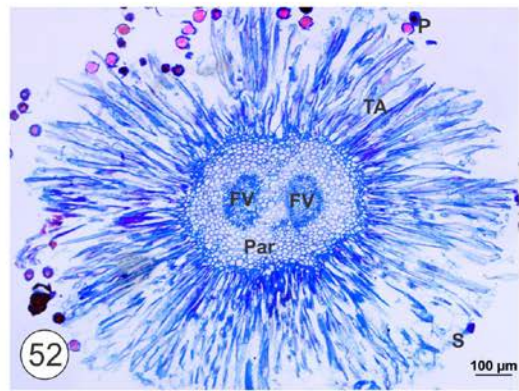
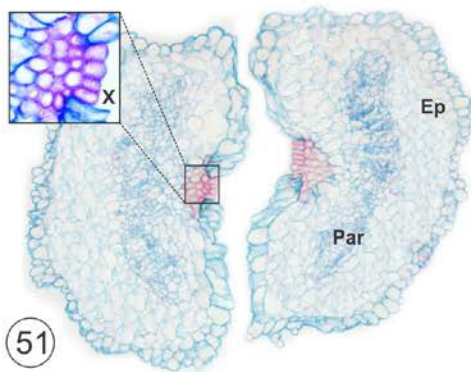
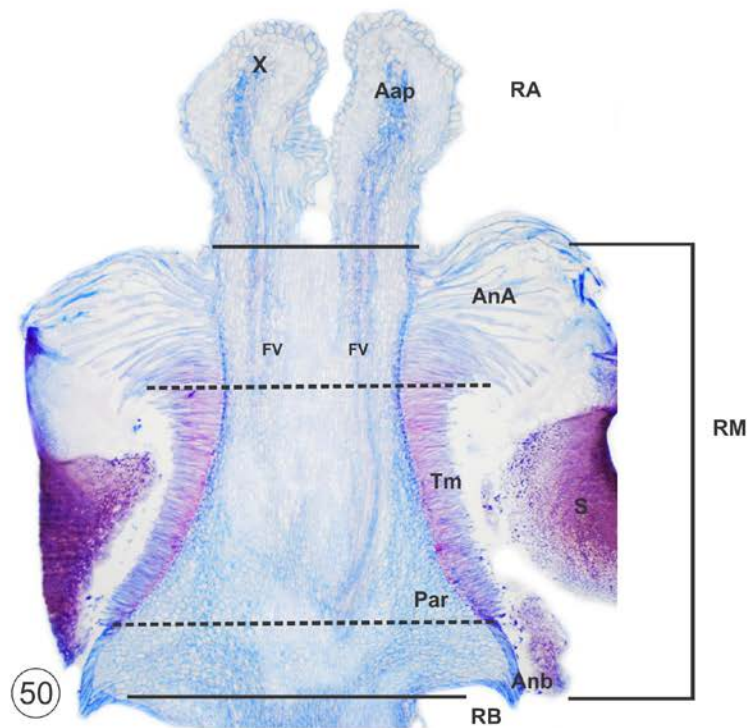


Figuras 45-49: Secções anatômicas da cabeça do estilete de *Allamanda puberula* (Apocynaceae). **45**-Vista geral em secção longitudinal da cabeça do estilete. **46**-Secção transversal dos apêndices apicais. **47**-Secção transversal do anel apical secretor; **48**-Secção transversal dos tricomas medianos. **49**-Secção transversal do anel basal. Observar as projeções formadas pela expansão das células parenquimáticas (círculo). **Aap**=Apêndices apicais da cabeça do estilete; **AnA**=anel apical; **AnB**=anel basal; **CJ**=Células justapostas; **Ep**=Epidérme; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **S**=Secreção; **Tm**=Tricomas mediano; **X** e **Setas** indicando o xilema. **RA**=região apical; **RM**=Região mediana; **RB**=região basal. **45**. 200 µm; **46**. 50 µm; **47-49** 100 µm.



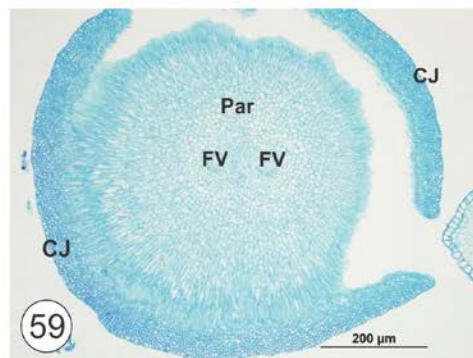
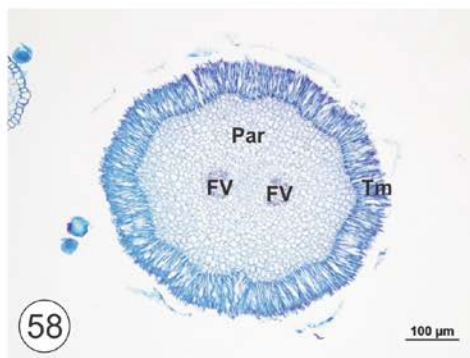
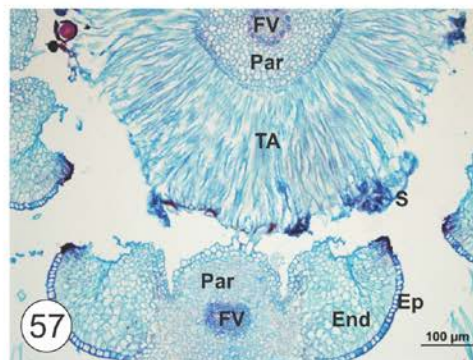
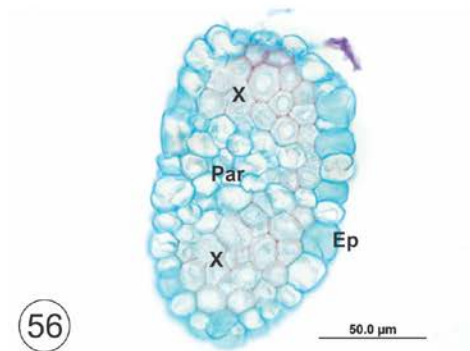
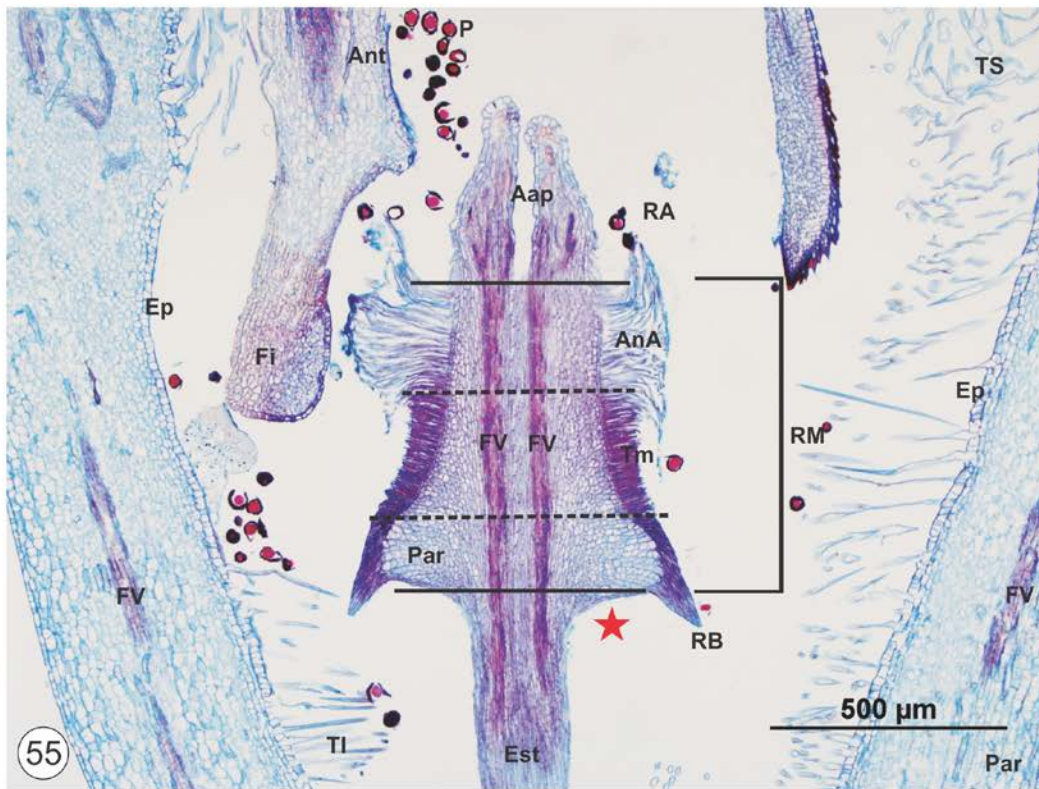
Figuras 50-54: Secções anatômicas da cabeça do estilete de *Allamanda laevis* (Apocynaceae).

50-Vista geral em secção longitudinal da cabeça do estilete. **51**-Secção transversal dos apêndices apicais. **52**-Secção transversal do anel apical secretor; **53**-Secção transversal dos tricomas medianos. **54**-Secção transversal do anel basal. **Aap**=Apêndices apicais da cabeça do estilete; **AnA**=anel apical; **AnB**=anel basal; **CJ**= Células justapostas; **Ep**=Epidérme; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **S**=Secreção; **Tm**=Tricomas mediano; **X** e **Setas** indicando o xilema. **RA**=região apical; **RM**=Região mediana; **RB**=região basal. **50, 54.** 200 µm; **52, 53.** 100 µm.

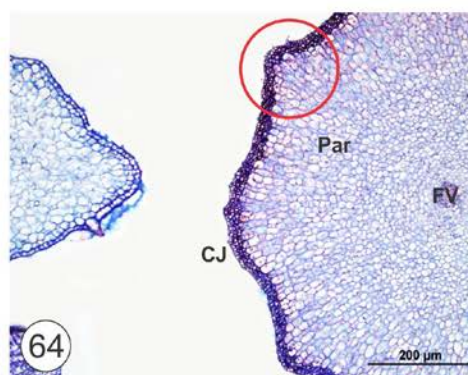
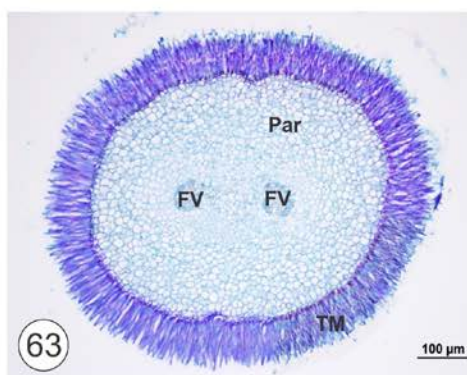
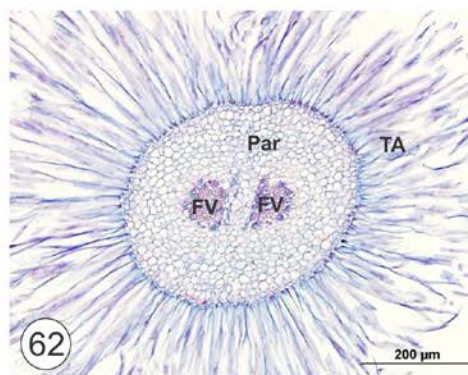
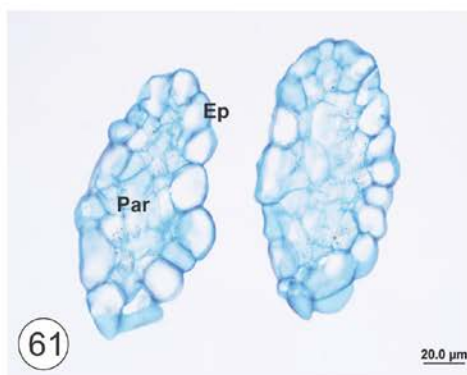
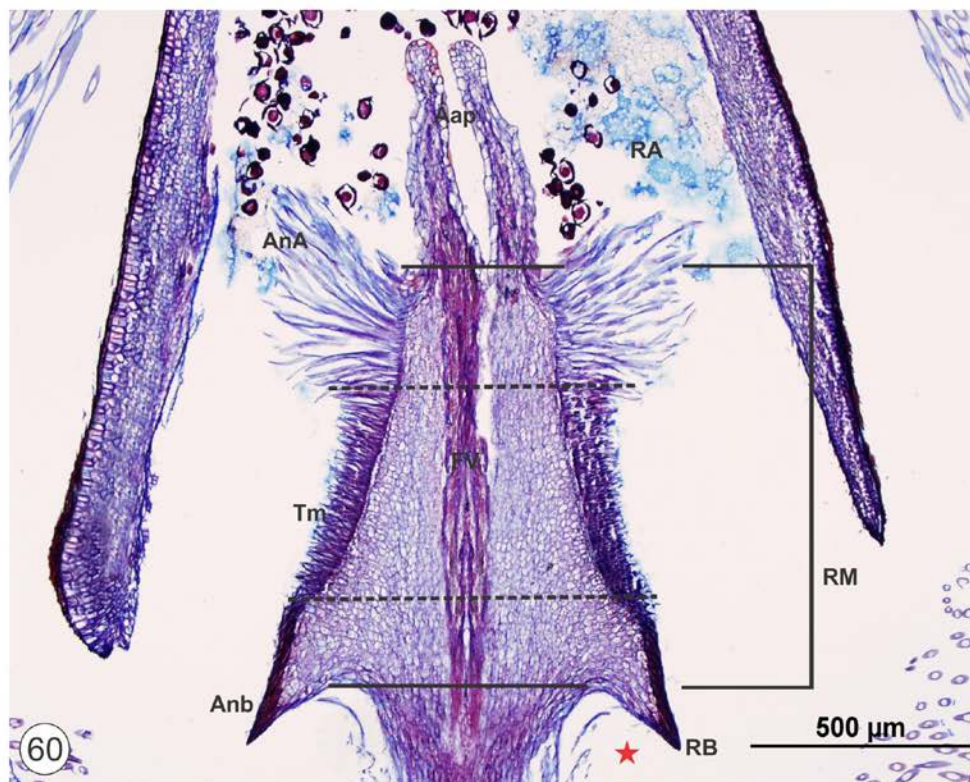


Figuras 55-59: Secções anatómicas da cabeça do estilete de *Allamanda schottii* (Apocynaceae).

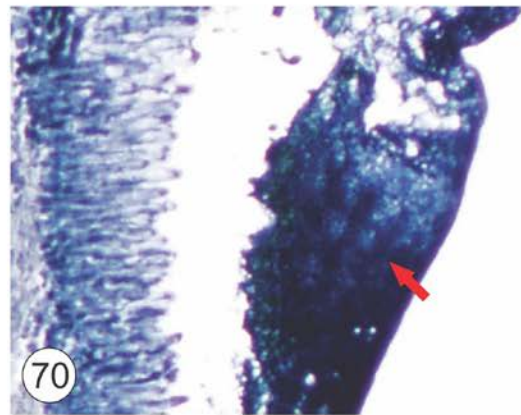
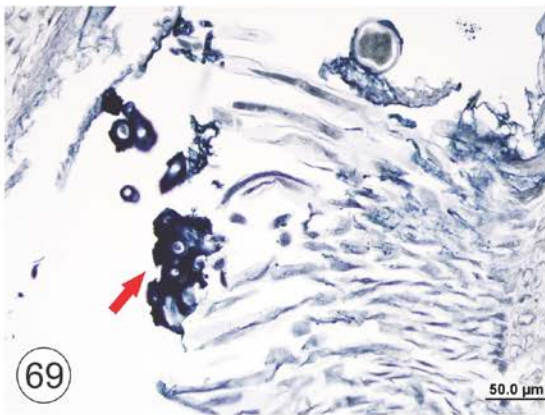
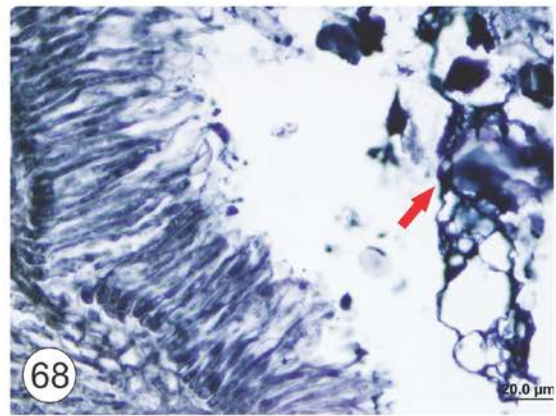
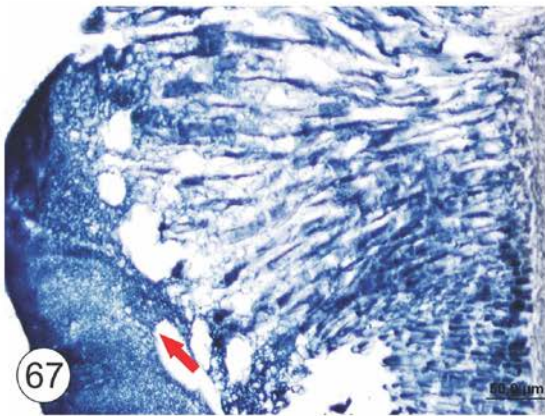
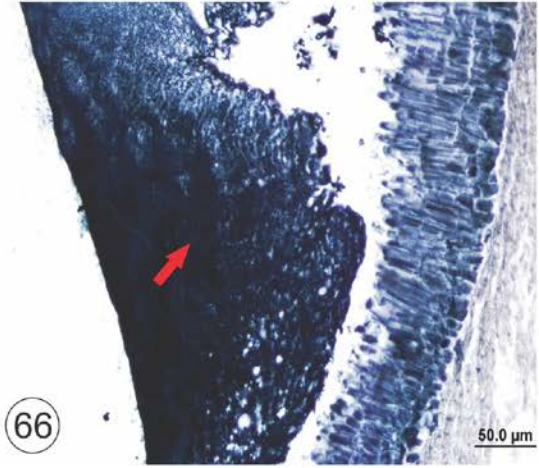
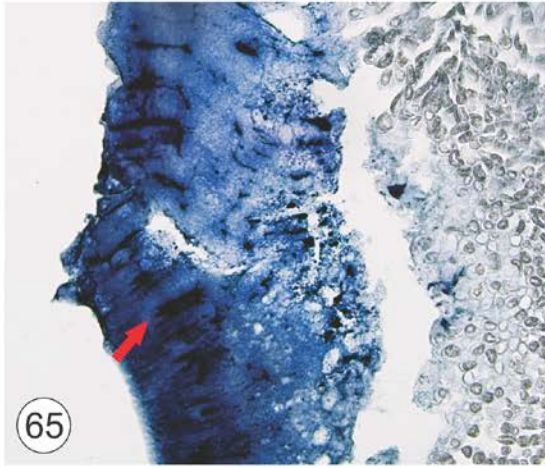
55-Vista geral em secção longitudinal da cabeça do estilete. **56**-Secção transversal dos apêndices apicais. **57**-Secção transversal do anel apical secretor; **58**-Secção transversal dos tricomas medianos. **59**-Secção transversal do anel basal. **Aap**=Apêndices apicais da cabeça do estilete; **AnA**=anel apical; **AnB**=anel basal; **Ant**=Antera; **CJ**= Células justapostas; **Ep**=Epidérme; **Est**=Estilete; **Estrela**=Região receptiva; **Fi**=Filete; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **S**=Secreção; **TA**=Tricomas do anel apical; **TI**=Tricomas infrastaminais; **Tm**=Tricomas mediano; **TS**=Tricomas suprastaminais; **X** e **Setas** indicando o xilema. **RA**=região apical; **RM**=Região mediana; **RB**=região basal. **55**.500 µm; **56**. 50 µm; **57, 58**. 100 µm; **58**. 200 µm.



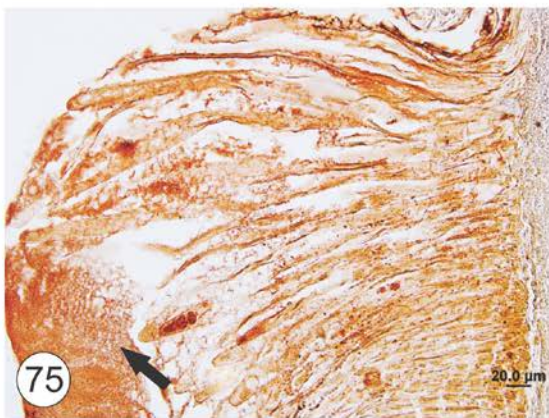
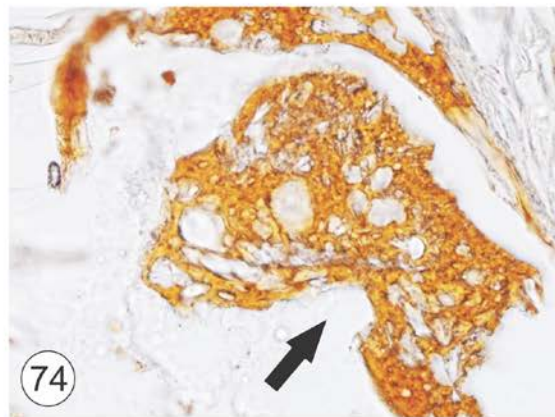
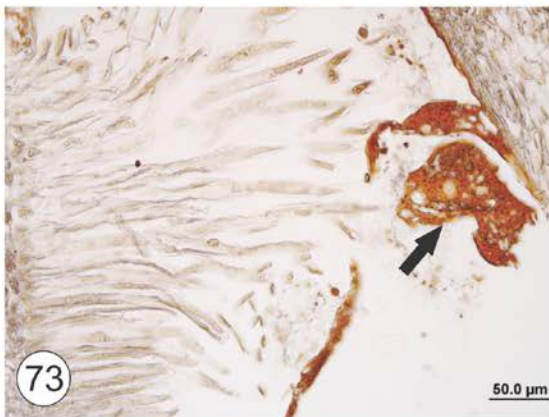
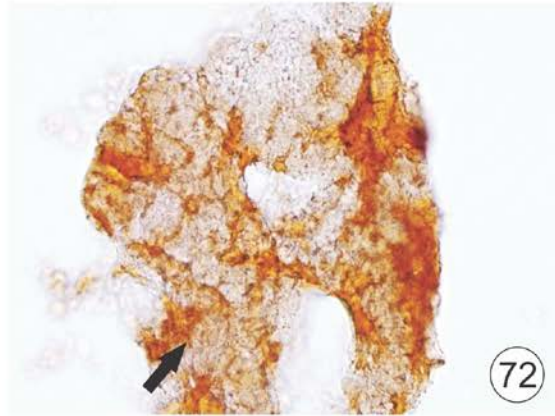
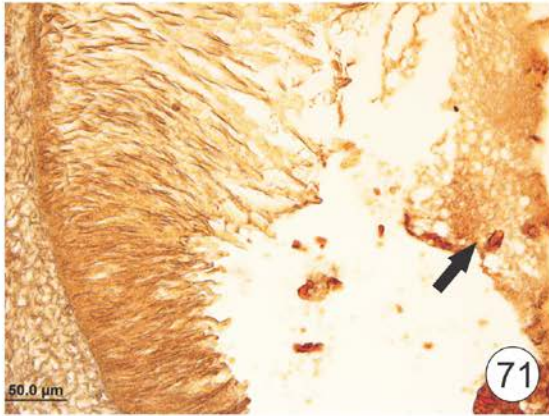
Figuras 60-64: Secções anatômicas da cabeça do estilete de *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). **60**-Vista geral em secção longitudinal da cabeça do estilete. **62**-Secção transversal do anel apical secretor; **63**-Secção transversal dos tricomas medianos. **64**-Secção transversal do anel basal. Observar as projeções periféricas (círculo) **Aap**=Apêndices apicais da cabeça do estilete; **AnA**=anel apical; **AnB**=anel basal; **Ant**=Antera; **CJ**= Células justapostas; **Ep**=Epidérme; **Est**=Estilete; **Estrela**=Região receptiva; **Fi**=Filete; **FV**=Feixe vascular; **Par**=Parênquima; **S**=Secreção; **TA**=Tricomas do anel apical; **Tm**=Tricomas mediano; **TS**=Tricomas suprastaminais. **RA**=região apical; **RM**=Região mediana; **RB**=região basal. **60**. 500 µm; **61**. 20 µm; **62, 64**. 200 µm; **63**. 100 µm.



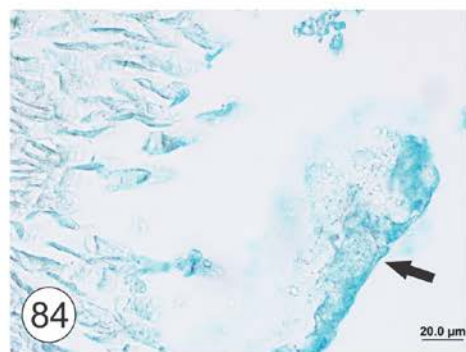
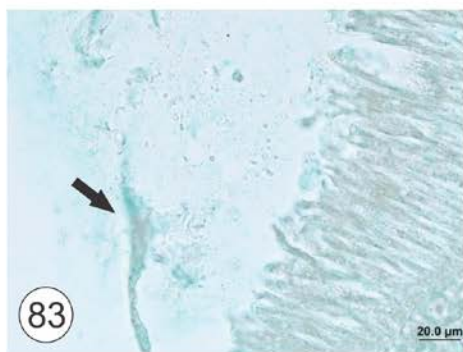
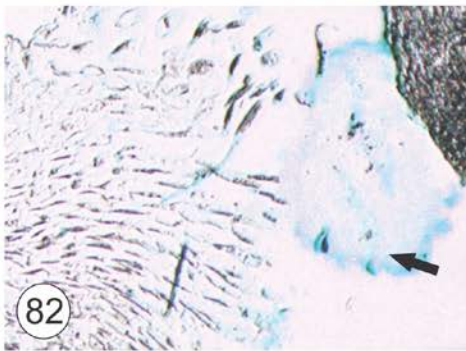
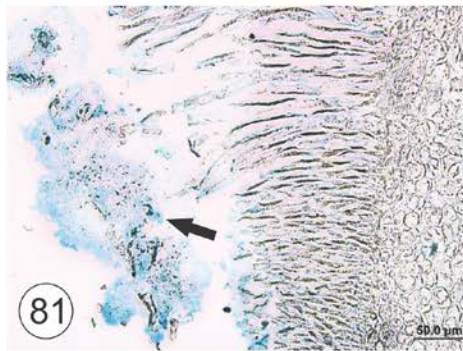
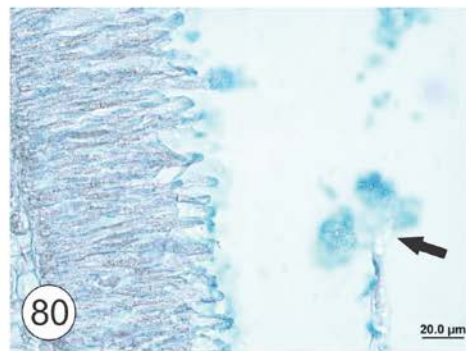
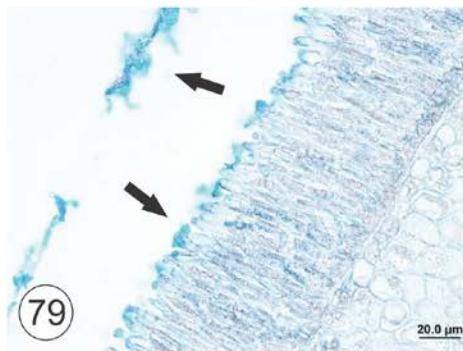
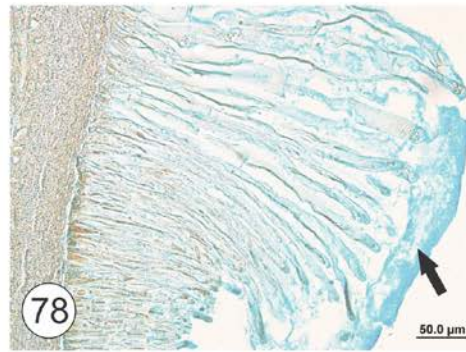
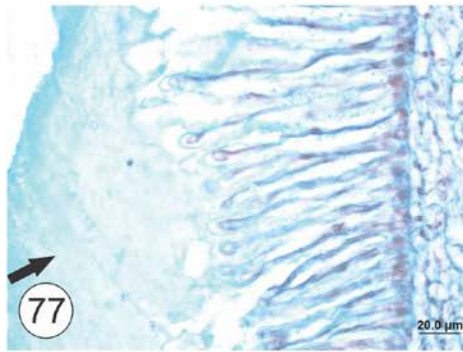
Figuras 65-70: Secções longitudinais da cabeça do estilete em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae) coradas pela técnica de Preto de Sudão B. Resultado positivo para Lipídeos totais. 65 e 66-*A. laevis*; 67-*A. schottii*; 68-*A. cathartica*; 69 e 70- *A. puberula*. Setas indicando secreção extracelular.



Figuras 71-76: Secções longitudinais da cabeça do estilete em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae) coradas pela técnica de Sudão IV. Resultado positivo para Lipídeos totais. Figuras 71- *A. puberula*; 72-*A. catharticas*; 73 e 74-*A. schottii*; 75 e 76-*A. laevis*. Setas indicando secreção extracelular.



Figuras 77-84: Secções longitudinais da cabeça do estilete em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae) coradas pela técnica de Azul de Alciano. Resultado positivo para mucopolissacarídeos ácidos. Figuras 77 e 78- *A. laevis*; 79 e 80-*A. schottii*; 81 e 82-*A. cathartica*; 83 e 84-*A. puberula*. Setas indicando secreção extracelular.



Figuras 85-88: Secções longitudinais da cabeça do estilete em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae) coradas pela técnica de PAS. Resultado positivo para polissacarídeos totais. Figuras **85-** *A. laevis*; **86-** *A. cathartica*; **87** e **89-** *A. schottii*; **88-** *A. puberula*. Setas indicando secreção extracelular.

Figuras 90-93: Secções longitudinais da cabeça do estilete em espécies de *Allamanda* L. (Apocynaceae) coradas pela técnica de Vermelho de Rutênio. Resultado positivo para mucilagem ácida. Figuras **90-** *A. laevis*; **91-** *A. cathartica*; **92-** *A. schottii*; **93-** *A. puberula*. Setas indicando secreção extracelular.

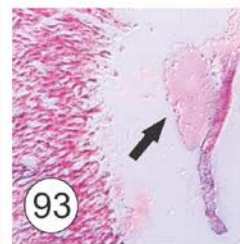
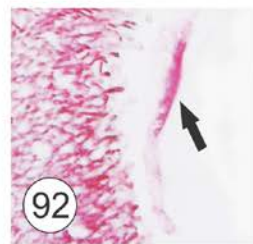
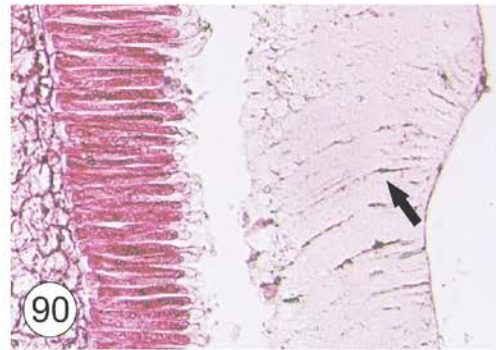
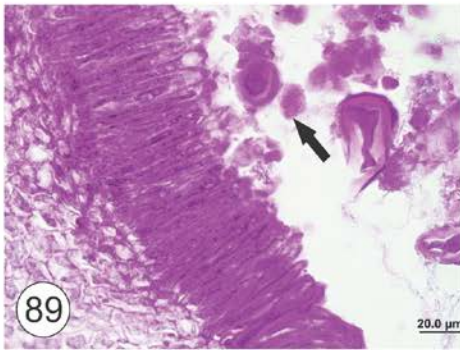
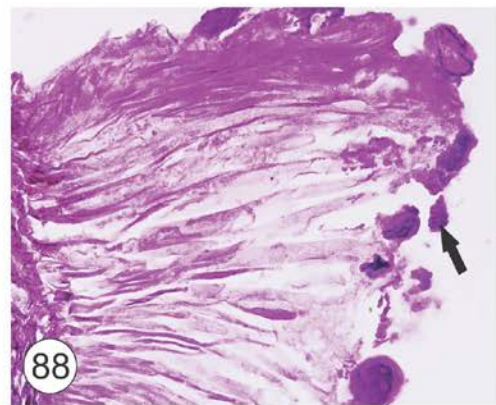
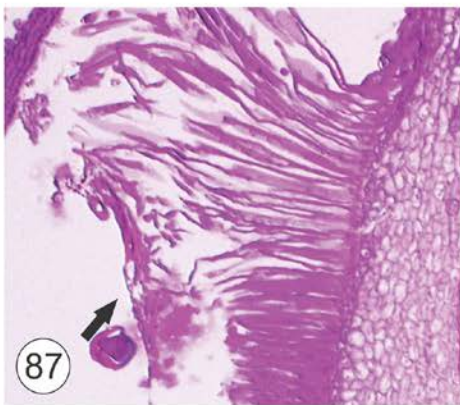
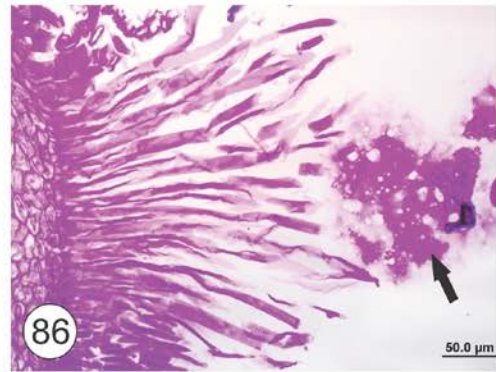


Tabela 03: Resultados dos testes histoquímicos aplicados em cabeça do estilete em espécies de *Allamanda* (Apocynaceae).

Tratamento histoquímico	Substância a ser detectada	Cabeça do estilete			
		<i>A.laevis</i>	<i>A. puberula</i>	<i>A. schottii</i>	<i>A.cathartica</i>
Vermelho de Rutênio	Mucilagens ácidas	+	+	+	+
Reação PAS	Polissacarídeos totais	+	+	+	+
Sundão IV	Lipídeos totais	+	+	+	+
Preto de Sudão	Lipídeos totais	+	+	+	+
Azul de Alciano	polissacarídeos ácidos	+	+	+	+

Discussão

Em Apocynaceae *s.str.* (Rauvolfioideae e Apocynoideae) é comum o nectário na forma de anel, variando de linear a profundamente pentalobado. Em diferentes trabalhos é usual a denominação de disco nectarífero para descrever a morfologia do nectário (Woodson & Moore, 1938; Pichon 1948a, b, c; Allorge, 1976; Ezcurra 1981; Huber, 1983; Sakane & Shepherd, 1986; Middleton, 1994, 1997; Zarucchi *et al.*, 1995; Judd *et al.*, 1999; Morales, 1999; Kinoshita, 2005), porém referir como anel corresponde melhor à forma desenvolvida por esta estrutura ao redor do ovário (Simões, 2000).

O anel nectarífero encontra-se circundando o ovário e, segundo Fallen (1986), começa a se formar quando o ovário está se desenvolvendo, sendo ambos distintos entre si. Estes dados foram confirmados em Gomes (2006). No gênero *Allamanda*, o nectário é usado para diferenciar espécies por apresentar variação desde aneliforme e íntegro, ou mais ou menos profundamente pentalobado (Sakane & Shepherd, 1986). Entre as quatro espécies estudadas, é possível separar em três grupos: 1) *A. schottii*; 2) *A. laevis*; 3) *A. puberula* e *A. cathartica*.

Em *A. schottii* o anel nectarífero é hipertrofiado e apresenta-se profundamente pentalobado, enquanto nas demais espécies o nectário e a pentalobação é menos conspícua. Porém em *A. laevis* ocorre uma profunda linha de invaginação da parede do nectário, dividindo quase que completamente em duas porções, na mesma região da sutura do ovário

em dois carpelos. Sakane & Shepherd (1986) ao estudar o gênero descreveram *A. laevis* e *A. puberula* como sendo aneliformes e em nenhum momento fizeram referência a invaginação em *A. laevis*. Uma hipótese para a diferença dos resultados seria que, a sutil pentalobação nestas duas espécies daria margem para uma denominação errada por estes autores. Contudo a morfologia em *A. laevis* é facilmente vista.

Gomes (2008) sugeriu uma tendência evolutiva para a estruturação do nectário. Segundo esta autora, a forma anelar gradativamente aumentaria o grau de pentalobação até se tornarem profundamente pentalobado, e posteriormente haveria a supressão de três lobos formando dois nectários alternicarpelares, contrariando a hipótese de Woodson & Moore (1938) que sugeriram que a forma anelar seria derivada de estrutura com dois ou cinco nectários na base do ovário. Seguindo a hipótese de Gomes (2008), *A. schottii* seria mais derivada em relação às outras espécies estudadas. Mas afirmar esta hipótese com base apenas em análise das quatro espécies não é prudente, visto que a diferença do grau de pentalobação em *A. cathartica*, *A. laevis* e *A. puberula* é muito sutil para sugerir que há uma derivação dentro do gênero. Em *A. schottii*, a provável diferença no grau de pentalobação do nectário pode ser decorrente do hipertrofiamento desta estrutura e não uma tendência evolutiva para formar dois apêndices nectaríferos, uma vez que, não há indício de atrofiamento dos lobos do seu nectário para que isso ocorra.

Tabela 04: resultados comparativos quanto à morfologia do nectário de *Allamanda* (Apocynaceae) entre o presente estudo e o estudo feito por Sakane & Shepherd (1986). Estrelas mostram os resultados diferentes.

Tipos de nectários		
Espécies	Meus resultados	Sakane & Sherpherd (1986)
<i>A. laevis</i>	Levemente pentalobado com duas invaginações opostas entre si.	★ Aneliforme
<i>A. puberula</i>	Levemente pentalobado	★ Aneliforme
<i>A. cathartica</i>	Levemente pentalobado	Ligeiramente pentalobado
<i>A. schottii</i>	Profundamente pentalobado	Profundamente pentalobado

A epiderme nectarífera nas quatro espécies apresenta estômatos do tipo ciclocítico, projetados acima do nível das células epidérmicas, havendo uma diferença na quantidade e na forma como eles são distribuídos em relação a *A. schottii* e as demais espécies (de numerosos e distribuídos em toda a superfície nectarífera á poucos e restrito a porção apical). Na família esta variação está presente em diferentes espécies. Marasca (2008) descreveu estômatos principalmente na região apical do disco nectarífero para *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg., Galetto (1997) e Rio (2006) também relataram a presença de estômatos na região apical, contudo notaram estômatos também na região mediana do nectário em *Mandevilla* ssp Lindl. e *Forsteronia* ssp G. Mey., respectivamente. Segundo Fahn (1979a), os estômatos estão relacionados ao processo de liberação do néctar produzidos pelo parênquima nectarífero e, esta também é a função em *Allamanda*. Araújo *et al.*, (2011) ao estudar a fenologia reprodutiva, biologia floral e polinização de *Allamanda blanchetii*, A.DC. relataram que a produção de néctar nesta espécie se inicia ainda no botão floral (pré-antese) e cessa quando a flor entra em antese.

Anatomicamente, o nectário não apresenta variação estrutural entre as espécies. O parênquima nectarífero é constituído, principalmente, por células pequenas de parede fina, núcleo grande e citoplasma denso na fase secretora, como citados para outras espécies de Apocynaceae (Woodson & Moore, 1938; Walker, 1975; Toste *et al.*, 2003; Watanabe, 2009; Simões *et al.*, 2007). Os grãos de amido encontrados no interior das células parenquimáticas são substâncias de reserva que estão relacionadas com a síntese de néctar por estas células. O tecido vascular do nectário é composto por feixes vasculares com muitos laticíferos próximos a estes e à medida que se aproximam do ápice tornam-se constituído apenas por elementos floemáticos, como descritos por Woodson & Moore (1938).

Fallen (1985), ao analisar o desenvolvimento do gineceu junto com outras características, sugeriu que *Allamanda* L. ocupasse um lugar isolado dentro de Apocynaceae, por apresentar, principalmente, sincarpia de origem mista, dando origem ao ovário unilocular com placentação parietal.

Nas quatro espécies aqui analisadas, o gineceu é sincárpico, súpero, bicarpelar e unilocular, com sutura externa visível decorrente da fusão pós-gênita como descrita por Fallen (1985) para *A. schottii*. Woodson & Moore (1938) consideraram que a sincarpia unilocular, como encontrados em *Allamanda*, seria uma condição derivada filogeneticamente de ovário

sincárpico bilocular em Apocynaceae *s. str.* Ovário súpero não é universal em Plumerieae E. Mey., pois os gêneros *Himatanthus* Willd. ex Schult. in Roem. & Schult., *Mortoniella* Woodson e *Plumeria* L. apresentam ovário semi-infero (Alvarado-Cárdenas & Ochoterena, 2007).

A morfologia do ovário é variada nas espécies estudadas, porém também variam em um mesmo indivíduo, ficando difícil usar este tipo de característica morfológica dos carpelos para separá-las. Contudo a presença de grande quantidade de estômatos em *A. laevis* a diferencia das demais espécies, cujos ovários estão desprovidos destas estruturas.

Endress *et al.* (1996) e Gomes (2008) descrevem duas condições relevantes da morfologia carpelar em uma mesma flor, denominando-os de isocarpelar ou anisocarpelar. Em *Allamanda*, mesmo sendo sincárpica, um dos lados que corresponde a um carpelo pode não atingir a mesma altura do outro carpelo como visto em *A. schottii*. Contudo, nas demais espécies pode-se observar o padrão isocarpelar, que segundo Gomes (2008) corresponde a 40% em Rauvolfioideae. Vale lembrar que em ovários apocárpicos o desenvolvimento individual de cada carpelo tem mais chances de formar carpelos desiguais ao contrário do que ocorre em ovário sincárpico como em *Allamanda*.

Anatomicamente, o ovário não apresenta variação entre as espécies. Todas apresentam parede do ovário com epiderme externa e interna unisseriadas, constituídas por células com núcleos evidentes e cutícula delgada. Na epiderme externa não ocorrem tricomas como visto em algumas espécies de Apocynaceae, como *Forsteronia velloziana* (A. DC.) Woodson (Simões & Kinoshita, 2002) e *Catharanthus roseus* (Walker, 1975). O mesófilo ovariano é formado por camadas de parênquima compacto de células pequenas, com parede delgada, núcleo evidente, entre as quais estão dispersos feixes vasculares e muitos laticíferos ramificados. O sistema vascular do ovário consiste de feixes vasculares pouco diferenciados, circundando toda a estrutura ovariana, sendo mais desenvolvidos os marginais, próximos à região de sutura entre os carpelos.

Na região de união dos carpelos nota-se uma linha, pouco proeminente, constituída de células parenquimáticas de paredes bem justapostas, que se estende da epiderme externa até a placenta como descrito por Fallen (1986) e Aguiar (2009).

A cabeça do estilete é uma estrutura complexa que apresenta uma epiderme especializada podendo se diferenciar em distintas zonas morfofuncionais e muito variáveis

quanto a sua forma, desde fusiforme, cilíndrica, cônica até pentagonal, nos representantes da família Apocynaceae (Endress & Bruyns, 2000; Simões *et al.*, 2007).

Todas as espécies estudadas possuem cabeça do estilete morfologicamente complexa, mas sem formar ginostégio, correspondendo ao tipo 02 estabelecido por Fallen (1986). A ausência de ginostégio é uma característica predominante e só ocorre em Rauvolfioideae (Endress & Bruyns, 2000). Allorge (1976) e, mais recentemente, Gomes (2008) relataram a presença de adnação entre androceu e gineceu em *Allamanda*, contudo as análises anatômicas e de MEV realizados no presente trabalho demonstraram não existir nenhuma fusão entre estas estruturas, apenas justaposição de partes do androceu e gineceu. Uma provável explicação para a interpretação equivocada destas autoras pode ser decorrente da proximidade entre os tricomas da cabeça do estilete e as anteras. O anel apical possui tricomas longos que acabam entrando em contato com os tricomas dos filetes próximos as anteras. Além disso, a secreção liberada pela cabeça do estilete possui aspecto pegajoso que pode causar a adesão entre esses tricomas, dando a falsa impressão de formação de um retináculo.

A cabeça do estilete apresenta um corpo principal cônico, dividido em três regiões morfofuncionais: apical, corpo principal e região estigmática. Corpo cônico com anel apical e anel basal é visto também em *Kopsia fruticosa* (Ker Gawl.) A. DC. (Vinceae), sendo muito parecido com a morfologia de *Allamanda*, porém sem apêndices apicais (Fallen, 1985, 1986).

A primeira região é constituída por um par de apêndices apicais com células epidérmicas não secretoras, comum na família, vistos desde as subfamílias mais basais como em Rauvolfioideae até nas mais derivadas como em Asclepiadoideae (Endress & Bruyns, 2000). Em *Allamanda* é a única região do gineceu que não sofreu fusão (Gomes, 2008). Estes apêndices são morfologicamente variáveis até mesmo entre espécies de um mesmo gênero, como em *Allamanda*, onde cada uma das espécies apresenta diferenças tanto na forma da estrutura do corpo quanto na morfologia das células epidérmicas, úteis para a taxonomia dentro do gênero. Além disso, é a região onde os grãos de pólen da flor são depositados no final da pré-antese (Araújo *et al.*, 2011).

A segunda região é dividida em três porções: anel apical, tricomas secretores medianos e anel basal. Esta organização demonstra a alta complexidade que o gênero *Allamanda* apresenta, diferindo de outras espécies presente em tribos de Rauvolfioideae como

Ancylobotris scandens, *Geissospermum laevis* (Vell) Miers, *Alyxia clusiophylla* Guill., *Hunteria eburnea* Pichon, *Landolphia kirkii* Dyer, *Saba comorensis* (Boj.) Pichon e *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. ex Roem. & Schult que não apresentam anel apical e anel basal. Na tribo Plumerieae E. Mey., *Allamanda* é o único gênero a apresentar anel apical bem desenvolvido (Alvarado-Cárdenas & Ochoterena, 2007).

O anel apical apresenta tricomas bem desenvolvidos, em contato e posicionados espacialmente abaixo da parte fértil das anteras, com função de barreira física impedindo que o pólen da própria flor seja deslocado para a região receptiva, pois no gênero *Allamanda*, como nas demais espécies da família, há autoincompatibilidade tardia (Araújo *et al.*, 2011). Esta função de manter compartimentalizado o pólen na porção apical da cabeça do estilete seria uma condição análoga àquela exercida pelo retináculo. Em *A. puberula*, os tricomas são proporcionalmente mais longos que nas demais espécies. Como estas estruturas estão em contato com as anteras, a diferença de comprimento desses tricomas entre as espécies analisadas, poderia ser uma característica que permite alcançar as anteras. Os tricomas do anel apical também são secretores, porém a quantidade de secreção produzida é menor quando comparado com os tricomas da região mediana. A presença de tricomas secretores não é universal em Apocynaceae, podendo ocorrer em toda a extensão da cabeça do estilete como, por exemplo, em representantes da tribo Hunterieae Miers, Willughbeeae A. DC., Vinceae Duby e Tabernaemontaneae G. Don, exceto nos apêndices apicais, ou em regiões específicas como é o caso de *Allamanda* (Fallen, 1986; Endress & Bruyns, 2000; Gomes, 2008). A secreção apresenta como principais constituintes polissacarídeos e lipídeos, e a função principal está relacionada ao processo de transporte de pólen, porém a presença de lipídeos também pode estar relacionada ao processo de defesa contra proliferação de microrganismos, já que forma um microclima adequado para ação de patógenos (Demarco, 2008).

Na porção mediana do corpo principal localizam-se os tricomas secretores que produzem substância adesiva. Esta substância permite a adesão de nova carga de pólen no processo de retirada do aparato bucal do polinizador. Este entra em contato com a substância e acaba posteriormente passando pela região acima do anel apical onde o pólen é aderido (Araújo *et al.*, 2011).

O anel basal tem a função de acumular o pólen trazido pelo polinizador e é formado de epiderme alongada justaposta, com expansão das células parenquimáticas, dando um formato cônico à cabeça do estilete em *Allamanda*. A morfologia do anel basal varia dentro do gênero, podendo ser arranjados em dois grupos. Um grupo com projeções de formato ondulado (*A. laevis* e *A. schottii*) e outro grupo com projeções acuminadas (*A. cathartica* e *A. puberula*).

A terceira região, denominada região estigmática, é a parte receptiva da cabeça do estilete aos grãos de pólen alógenos trazidos pelos polinizadores, localizada abaixo do anel basal, como visto por Fallen (1986) e Sakane & Shepherd (1986).

Morfologicamente, as quatro espécies são semelhantes, porém existem diferenças significativas entre elas na região distal da cabeça do estilete onde se encontra o anel basal e nos apêndices apicais, além dos tricomas serem mais longos no anel apical em *A. puberula*. Estas variações podem ser utilizadas como estado de caráter para separar cada uma das quatro espécies. Provavelmente, a variação morfológica do anel basal seja decorrente ao tipo de expansão que as células parenquimáticas exercem em cada espécie, influenciando no arranjo das células epidérmicas justapostas.

Conclusões

Através de estudos morfoanatômicos pode-se comprovar que o nectário apresenta-se pentalobado em diferentes graus de intensidade, sendo *A. schottii* e *A. laevis* distintas das demais espécies por apresentar pentalobações e invaginações epidérmicas profundas, respectivamente. O padrão de distribuição e o número de estômatos são variáveis desde muitos e distribuídos em toda a superfície nectarífera em *A. schottii* ou poucos e distribuídos na porção mais apical do nectário nas demais espécies. O ovário é morfollogicamente variável tanto entre as espécies quanto em uma mesma espécie, não sendo um bom caráter para separação interespecífica. Entretanto, a presença de estômatos na epiderme do ovário apenas em *A. laevis* pode servir para distingui-la das demais espécies. A cabeça do estilete possui um formato cônico dividido em diferentes regiões morfofuncionais, sem formar ginostégio. Os dois apêndices apicais da cabeça do estilete são morfollogicamente diferentes entre as espécies, sendo um bom caráter taxonômico para o gênero. O anel apical e os tricomas medianos são secretores e produzem o mesmo tipo de substâncias hidro e lipofílicas

relacionadas ao processo de polinização e combate à proliferação de microrganismos patogênicos. O anel basal não é secretor e difere em sua morfologia em dois tipos de projeções: arredondadas (*A. laevis* e *A. cathartica*) e acuminadas (*A. puberula* e *A. schottii*), devido à expansão das células parenquimáticas em direção à periferia. A região receptiva se localiza abaixo do anel basal e está relacionada à hercogamia e a apresentação secundária de pólen em *Allamanda* L. Perante os resultados obtidos neste trabalho, os dados trazem importante contribuições para o melhor conhecimento do gênero e podem ser úteis em futuras análises filogenéticas e taxonômicas para o grupo.

Referencias bibliográficas

- Adanson, M. 1768.** Familles des plantes. (Reimp. 1966. Introdução de F.A. Stafleu.) Ed. Lehre, Paris.
- Aguiar, S. 2009.** Anatomia de frutos e sementes em Apocynaceae. Tese de Doutorado. Univ. Estadual de Campinas.
- Allorge, L. 1976.** *Morphologie et biologie florale des Apocynacées: Applications taxonomiques.* PhD diss. École pratique des Hautes Etudes, Paris.
- Alvarado-Cárdenas, L. O. & Ochoterena, H. 2007.** A phylogenetic analysis of the *Cascabela-Thevetia* species complex (Plumeriaceae, Apocynaceae) based on morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94:298-323.
- Araújo L. D. A.; Quirino Z. G. M. & Machado I. C. 2011.** Fenologia reprodutiva, biologia floral e polinização de *Allamanda blanchetii*, uma Apocynaceae endêmica da Caatinga.
- Candolle, A. P., DE, 1844:** Ordo CXXIX. Apocynaceae. - In Candolle, A. E. DE, (Ed.): *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, pp. 317-489. - Paris: Fortin, Masson.
- Demarco, D., 2008.** Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécie de Asclepieae (R. BR.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de S.P. (Tese de doutorado).
- Endress, P. K.; Jenny, M. & Fallen, M. E. 1983.** Convergent elaboration of apocarpous gynoeceia in higher dicotyledons (Sapindales, Malvales, Gentianales). *Nordic Journal of Botany* 3: 293-300.

- Endress, P. K. 1994.** *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Camb. Univ Press, Cam Massachussets.
- Endress, M. E., B. Sennblad, S. Nilsson, L. Civeyrel, M. W. Chase, S. Huysmans, E. Grafstrom y B. Bremer. 1996.** A phylogenetic analysis of Apocynaceae s. str. And some related taxa in Gentianales: a multidisciplinary approach. *Opera Botanica Belgica* 7: 59-102.
- Endress, M.E. & Bruyns, P. 2000.** A revised classification of Apocynaceae s.l. *Botanical Review*, **66**: 1-56. 74
- Ezcurra, C. 1981.** Revisión de las Apocynaceae de la Argentina. *Darwiniana* 23: 367-474.
- Fahn, 1979.** *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press Inc., London.
- Fahn, A. 1990.** *Plant anatomy*. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Fallen, M.E. 1985.** The ginecial Development and Systematic Position of Allamanda (Apocynaceae).
- Fallen, M.E. 1986.** Floral structure in Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **106**: 245-286.
- Galetto, L. 1997.** Flowers structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192: 197-207.
- Gomes, S. M. 2006.** Ontogenia floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae s.l. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Gomes, S. M., & Cavalcanti, T. B. 2008.** Morfo-anatomia de frutos secos em espécies de Apocynaceae: significado ecológico e evolutivo. *Acta bot. bras.* 22(2): 521-534. 2008
- Gomes, S.M.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2008.** Hemisyncarpy and appendicular nectary approached by floral ontogeny of *Mandevilla velame* (A. St.-Hil.) Pichon, Apocynoideae. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 81-93.
- Jussieu, A. L. de (1789).** *Genera Plantarum*. (Herissant: Paris).
- Kinoshita, L.S. (coord.). 2005.** Apocynaceae. Pp. 35 – 91. *In: M.G.L. Wanderley; G.J. Shepherd; T.S. Melhem & A.M. Giulietti (orgs.). Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. vol. 4. São Paulo, FAPESP/HUCITEC.
- Koch, I.; Bittrich, V. & Kinoshita, L.S. 2002.** Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Mull. Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae)- a report of dioecy in Apocynaceae. *Botanisher jahrbucher fur Systemtik* 124: 83-104.

- Leeuwenberg, A.J.M. 1994.** *A revision of Tabernaemontana. Volume 2: The New World species and Stemmadenia*. Royal Botanical Gardens, Kew, Kent.
- Linnaeus, C. 1753.** *Species Plantarum*, ed. 1. 1: 210. Stockholm.
- Morales, J.F. 1999.** A synopsis of the genus *Odontadenia*: series of revisions of Apocynaceae XLV. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 67:381-477.
- Pichon, M. 1948a.** Classification des Apocynacées. V. Cerberoidées. *Notul. Syst. (Paris)* 13: 212-229.
- Pichon, M 1948b.** Classification des Apocynacées. X. Genre Mandevilla. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. 2*, 20: 211-216.
- Pichon, M 1948c.** Classification des Apocynacées.XIX. Lerétinacle des Echitoidées. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser 2*, 22. 211
- Pichon, M., 1950.** Classification des Apocynacées. XXVIII. Supplément aux Plumérioïdées. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., Sér. B, Bot.* 1: 145–173.
- Pirani, J.R., Mello-Silva, R. & Giulietti, A.M. 2003.** Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Brasil. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 21(2): 1-24.
- Potgieter, K. & Albert, V.A. 2001.** Phylogenetic relationships within Apocynaceae s.l. based on *trnL* intron and *trnL-F* spacer sequences and propagule characters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **88**: 523-549.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963.** Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* **43**: 419-435.
- Rio, M. C., 2006.** Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de doutorado, Instituto de biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Sakane, M. & Shepherd, G. J. 1986.** Uma revisão do genero *Allamanda* L. (Apocynaceae).
- Schumann, K. 1895.** Apocynaceae. In: Engler, A e Prantl, L. (ed) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Wilhelm Engelmann, vol.4, part. 2, p 109-189.
- Simões, A. O. & Kinoshita, L.S. 2002.** The Apocynaceae s. str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil.
- Simões, A.O.; Livshultz, T.; Conti, E. & Endress, M.E. 2007.** Phylogenetic and systematics of the Raulvolfioideae (Apocynaceae) based on molecular and morphological evidence. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 268.

- Tostes, R.B, Vieira, M.F. & Campos, L.A. 2003.** Polinização de *Peltastes peltatus* (Vell.)Woodson (Apocynoideae, Apocynaceae) por abelhas euglossíneas. In *Apoideae Neotropica*.
- Walker, D. B. 1975.** Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Fine structure of the epidermis before fusion. *Protoplasma* 86: 86: 29-41.
- Weberling F. 1992.** Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Woodson, R. E., Jr. 1930.** Studies in the Apocynaceae. I. A critical study of the Apocynoideae (with special reference to the genus *Apocynum*). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 17: 1-213.
- Woodson Jr, R.E. & Moore, J.A. 1938.** The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceous flowers.
- Zarucchi, J.L., Morillo, G.N., Endress, M.E., Hansen, B.F. & Leeuwenberg, A.J.M. Apocynaceae. 1995.** In *Flora of the Venezuelan Guayana* (P.E. Berry, B.K. Holst & K. Yatskievych). Missouri Botanical Garden, St. Louis, v.2, p.471-571.
- Yeo, P. F. 1993.** Secondary pollen presentation. Form, function and evolutionat. *Plant Systematics and Evolution (Supplementum)* 6: 1–268.

Considerações finais

A subfamília Rauvolfioideae compreende as linhagens mais basais em Apocynaceae s.l., caracterizadas pelas anteras sem lignificação especializada e pela ausência de ginostégio. *Allamanda* é um dos gêneros de Rauvolfioideae, sendo considerado um dos mais distinto morfológicamente dentro da tribo Plumerieae por apresentar ovário unilocular com sincarpia pós-gênita, fruto capsular com sementes aladas e cabeça do estilete estruturalmente complexa.

Através do estudo morfoanatômico e histoquímico floral em *Allamanda* foi possível observar uma variação no número, tipo, tamanho e distribuição dos coléteres entre as espécies, com potencial uso na taxonomia do grupo, além de trazer novos registros do tipo desses coléteres como descrito por Simões *et al.* 2006. O presente estudo descreve três novos tipos de coléteres calicinais em *Allamanda*, (bífid, ramificados e fusionados assimétricos), que podem inclusive ocorrer na mesma flor. Todavia, os resultados aqui adquiridos diferem da descrição feita por Sakane & Shepherd (1986), principalmente para o número, tipo e distribuição do coléteres em *A. puberula*. Anatomicamente, os coléteres calicinais apresentaram o mesmo padrão histológico descrito para a família, sem visualização de laticíferos, idioblastos e feixes vasculares, normalmente ausentes em coléteres calicinais. A ausência de vascularização, segundo Woodson & Moore (1938) é uma característica predominante em coléteres calicinais em espécies de Apocynaceae, sendo mais comum em coléteres foliares. O pedúnculo do coléter não é secretor, presente nas três espécies, é mais longo em *A. puberula*. Esta variação também pode ter importância taxonômica para o reconhecimento de *A. puberula*, pois é um caráter que se mantém nesta espécie. Como os coléteres calicinais estão em atividade secretora após o desenvolvimento floral, com suas secreções constituídas por substâncias hidro e lipofílicas, variáveis entre as espécies estudadas, provavelmente eles desempenham a função de combater agentes patógenos na flor, como descrito por Demarco (2008). A variação dos tipos de substâncias entre as espécies pode ser decorrente do estágio de desenvolvimento em que estas estruturas foram avaliadas. Para esta comprovação seria necessário um estudo histoquímico em diferentes estágios de desenvolvimento dos coléteres calicinais em futuros estudos. A diferença morfológica da corola em *Allamanda* já havia sido reportada como caráter de separação entre as espécies por Sakane & Scheperd (1886) e neste estudo também se confirmou sua

importância taxonômica. Na região interna da corola os tricomas unicelulares infra e suprastaminais apresentam morfologia distinta entre eles. Seria necessário um estudo ontogenético para averiguar se há uma origem comum entre estes dois tipos de tricomas. A ausência de ornamentação em tricomas suprastaminais é um caráter usado por Alvarado-Cárdenas & Ochoterena (2007) para separar *Allamanda* dos demais gêneros em Plumerieae, sendo útil para a taxonomia do gênero. O estudo do androceu também trouxe novidades entre as espécies, principalmente em relação aos apêndices apicais das anteras que são variáveis quanto a sua morfologia e, por consequência, representam potenciais caracteres para o reconhecimento de espécies. Em relação às demais estruturas do androceu, as espécies apresentam caracteres mais constantes, como estames epipétalos e alternos aos lobos da corola, filetes curtos e ornamentados por tricomas, porém, estes tricomas podem estar distribuídos ou agrupados próximos às anteras dependendo da espécie. As anteras tetrasporangiadas, apresentam apêndices basais estéreis que variam em relação ao seu comprimento entre as espécies, demonstrando que, ao contrário de Sakane & Shepherd (1986), as anteras têm um relativo potencial taxonômico. A lignificação homogênea em todo o endotécio está apenas relacionada ao processo de sustentação do androceu na flor e na deiscência das anteras, comum em anteras com deiscência rimosa, mantendo o gênero em Rauvolfioideae, subfamília que tem como característica a ausência de lignificação relacionada ao processo de guia para o polinizador. Em *Allamanda* a presença de um anel nectarífero contornando o ovário, é comum em espécies de Rauvolfioideae. Este órgão também apresenta valor taxonômico, como descrito por Sakane & Shepherd (1986) por apresentar-se íntegro ou pentalobado. Todavia, a descrição feita por estes autores diferem dos resultados do presente estudo no que se refere ao tipo de nectário encontrado em *A. laevis* e *A. cathartica*. Possivelmente a leve pentalobação em *A. cathartica* tenha levado a interpretação do tipo linear por aqueles autores. Contudo, as invaginações profundas observadas em posição oposta à sutura carpelar em *A. laevis* são bem visíveis, mas não foram relatadas por Sakane & Shepherd (1986). Uma possível explicação para a divergência dos resultados entre aqueles autores e o presente estudo se deva a metodologia utilizada. Sakane & Shepherd (1986) utilizaram análises de excidatas para a obtenção dos seus resultados que pode ter prejudicado em suas interpretações e o presente estudo fez-se uso de análises morfoanatômica de material coletado e fixado em FAA que são técnicas mais meticulosas.

Outra variação importante é a distribuição dos estômatos na superfície nectarífera. Dois padrões de distribuição ocorrem nas espécies analisadas, e geralmente, os estômatos se concentram na porção mais apical do nectário, mas podem sofrer variações de acordo com o ambiente, principalmente em relação ao seu número. Em relação ao gineceu, a morfologia do ovário não constitui um bom caráter taxonômico infragenérico por apresentar variação morfológica dentro de uma mesma espécie. Contudo, apenas *A. laevis* é provida de estômatos em toda a superfície ovariana e isso a distingue das demais espécies. A cabeça do estilete não forma ginostégio, isto é, em nenhuma região há a presença de retináculo, mantendo o gênero em Rauvolfioideae, pois é uma sinapormofia da subfamília. A suposta presença de retináculo sugerida por Allorge (1978) e Gomes (2008) possivelmente deve-se à proximidade dos tricomas da cabeça do estilete com os tricomas do filete e pela viscosidade da secreção estilar que funciona como adesivo entre os tricomas. Estruturalmente, a cabeça do estilete é similar nas quatro espécies, construída por dois apêndices apicais conspícuos e não secretores, um corpo principal com um núcleo parenquimático, revestido por um anel de tricomas apical secretor, tricoma medianos secretores e um anel basal formado por células epidérmicas justapostas não secretoras, mais projeções parenquimáticas e região receptiva localizada abaixo do anel basal. Diferente do que havia sido descrito por Fallen (1985), o anel apical possui atividade secretora. Este anel é bem desenvolvido em *Allamanda*, sendo o único gênero com esta característica dentro da tribo. O anel basal, assim como os apêndices apicais, também pode ser útil para a taxonímia das espécies, porém sua variação morfológica é muito sutil. A secreção mista, tanto hidro quanto lipofílica dos tricomas secretores da cabeça do estilete, não só auxiliam no transporte de pólen, como também podem atuar no combate a proliferação de agentes patógenos por apresentarem compostos lipídicos que são agentes microbicidas, similares aos encontrados em coléteres calicinais. Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo corroboram para a manutenção deste gênero na subfamília Rauvolfioideae por demonstrar que as espécies não apresentam especialização na lignificação das anteras e por não formarem ginostégio, um dos objetivos principais de projeto. Este estudo também evidenciou a presença de polimorfismo, principalmente no apêndice apical da antera, coléteres calicinais, nectário e apêndices apicais da cabeça do estilete entre as espécies, trazendo novos dados morfoanatômicos para a separação interespecífica das espécies avaliadas e para o melhor conhecimento do gênero, e principalmente, para auxiliar

em futuros estudos filogenéticos de Plumerieae. Ajudando assim na circunscrição de *Allamanda* que ainda permanece inserto dentro da tribo, demonstrando que a junção de diferentes metodologias de estudo se complementa e traz maior riqueza de informações.

Referências

- Alvarado-Cárdenas, L. O. & Ochoterena, H. 2007.** A phylogenetic analysis of the *Cascabela-Thevetia* species complex (Plumerieae, Apocynaceae) based on morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94:298-323.
- Demarco, D. 2008.** Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécie de Asclepieae (R. BR.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de S.P. (Tese de doutorado). Universidade Estadual de Campinas, S.P.
- Fallen, M.E. 1985.** The ginecial Development and Systematic Position of *Allamanda* (Apocynaceae).
- Sakane, M. & Shepherd, G. J. 1986.** Uma revisão do genero *Allamanda* L. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 9:125-149.
- Simões, A. O., Castro, M. De M. & Kinoshita, L.S. 2006.** Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:387-398
- Woodson Jr, R.E. & Moore, J.A. 1938.** The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceous flowers.