

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

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

Recebido em 09/04/2009. Aceito em 15/09/2009

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

Palavras-chave: *Passiflora*, tipos aperturais, pseudopérculo, opérculo, palinologia

ABSTRACT – (Aperture types of pollen grains of *Passiflora* L. species (Passifloraceae)). Palynological studies reveal a wide variation in shape, number and types of apertures in *Passiflora* pollen grains. This study aimed to characterize pollen grain apertures of eleven species of *Passiflora* from Rio Grande do Sul state and two species from Santa Catarina state (Brazil), belonging to three of the four subgenera now recognized: *Astrophea*, *Decaloba* and *Passiflora*. Several techniques of light and scanning electron microscopy were employed. *Passiflora haematostigma* (*Astrophea*) has 6-colporate pollen grains with three lalongate endoapertures. *Passiflora alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea* and *P. edulis* (*Passiflora*) have 6-colpate pollen grains, with fusion of ectoapertures pairs in the apocolpium. *Passiflora actinia*, *P. elegans* and *P. tenuifila* (*Passiflora*) have pollen grains with 6 to 12 colpi, also fused in pairs. *Passiflora misera*, *P. morifolia*, *P. suberosa* and *P. truncata* (*Decaloba*) have 6-colporate operculate pollen grains, with differences in endoaperture size and operculum width. *Passiflora capsularis* (*Decaloba*) has 12-colporate pollen. The main palynological terms and synonyms in the literature are discussed.

Key words: *Passiflora*, aperture types, pseudoperculum, operculum, palynology

Introdução

Passiflora L. é o maior dos gêneros de Passifloraceae, com cerca de 530 espécies (Feuillet & MacDougal 2007). No Brasil, Cervi (2006) refere um total de, aproximadamente, 140 espécies validamente descritas para o gênero. Este gênero apresenta uma classificação bastante complexa, com a distinção de 23 subgêneros (Killip 1938; Escobar 1989). Recentemente, a delimitação dos níveis infragenéricos é questionada num contexto de análises filogenéticas baseadas também em seqüências gênicas. Feuillet & MacDougal (2003) propõem, com base na morfologia externa e características ecológicas das espécies, uma nova classificação infragenérica para *Passiflora*, reduzindo o número de subgêneros para apenas quatro: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L. Esta proposta tem sido parcialmente confirmada por estudos de filogenia molecular (Muschner *et al.* 2003; Yockteng & Nadot 2004; Muschner 2005; Souza-Chies *et al.* 2005; Hansen *et al.* 2006).

Do ponto de vista palinológico, Passifloraceae mostra-se uma família bastante interessante, pois os grãos de

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

¹ Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora

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

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

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

Após as publicações de Presting (1965) e Spirlet (1965), poucos estudos foram realizados com grãos de pólen de Passifloraceae. Destacam-se, entre eles, o de Amela García *et al.* (2002), no estudo da microesporogênese, microgametogênese e morfologia polínica de seis espécies de *Passiflora* da Argentina; Araújo & Santos (2004), com o estudo morfológico de 12 espécies de *Passiflora* da Bahia, estabelecendo três tipos polínicos entre as espécies estudadas; Milward-de-Azevedo *et al.* (2004), com a descrição polínica de oito espécies de *Passiflora*, subgênero *Decaloba*; e Barrios *et al.* (2005), com a caracterização de 121 espécies de *Passiflora* e duas espécies de *Dilkea* Mast. e aplicação da morfologia polínica à nova classificação infragenérica de *Passiflora*.

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

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

Materiais e métodos

Foram estudadas as seguintes espécies, cujo material testemunho das populações estudadas está depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN). Segue a relação do material estudado: subgênero *Astrophea* (DC.) Mast.: *Passiflora haematostigma* Mart. ex Mast. – BRASIL. Santa Catarina: Santa Rosa de Lima, 07-IX-2007, fl., *G.A. Dettke & A. Silvério* 70 (ICN); São Martinho, 31-X-2007, fl., *L.F. Lima & G.A. Dettke* 512 (ICN); subgênero *Decaloba* (DC.) Rehb.: *P. capsularis* L. – BRASIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre,

30-X-2007, fl., *G.A. Dettke* 65 (ICN); Sapiranga, 11-II-2008, fl. fr., *G.A. Dettke* 97 (ICN); Maquiné, 14-II-2008, fl. fr., *G.A. Dettke* 102 (ICN); *P. misera* Kunth – BRASIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 30-X-2007, fl., *G.A. Dettke* 64 (ICN); Guaíba, 27-IX-2007, fl. fr., *G.A. Dettke* 81 (ICN); *P. morifolia* Mast. – BRASIL. Rio Grande do Sul: Augusto Pestana, 18-IV-2008, fl., *S.M. Kerpel s.n.* (ICN159142); *P. suberosa* L. – BRASIL. Rio Grande do Sul: Guaíba, 28-IX-2007, fl., *G.A. Dettke* 60 (ICN); Guaíba, 27-XI-2007, fl. fr., *G.A. Dettke* 84 (ICN); Porto Alegre, 22-I-2008, fl. fr., *G.A. Dettke* 95 (ICN); Porto Alegre, 11-IX-2007, fl. fr., *G.A. Dettke* 75 (ICN); Osório, 06-IX-2007, fl., *G.A. Dettke* 73 (ICN); *P. truncata* Regel – BRASIL. Santa Catarina: Santa Rosa de Lima, 01-XI-2007, fl. fr., *L.F. Lima & G.A. Dettke* 520 (ICN); e subgênero *Passiflora* L.: *P. actinia* Hook. – BRASIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 22-X-2007, fl., *G.A. Dettke* 63 (ICN); *P. alata* Curtis – BRASIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 23-XI-2007, fl., *G.A. Dettke* 85 (ICN); Guaíba, 15-VI-2007, fl., *G.G. Souza* 01 (ICN); *P. amethystina* J.C. Mikan – BRASIL. Rio Grande do Sul: Osório, 06-XI-2007, fl., *G.A. Dettke* 74 (ICN); *P. caerulea* L. – BRASIL. Santa Catarina: Lages, 01-XI-2007, fl. fr., *G.A. Dettke* 67 (ICN); Rio Grande do Sul: Guaíba, 28-IX-2007, fl., *G.A. Dettke* 62 (ICN); Osório, 06-XI-2007, fl., *G.A. Dettke* 72 (ICN); *P. edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg. – BRASIL. Rio Grande do Sul: Osório, 06-XI-2007, fl., *G.A. Dettke* 76 (ICN); Torres, 14-XI-2008, fl., *G.A. Dettke* 215 (ICN); *P. elegans* Mast. – BRASIL. Rio Grande do Sul: Guaíba, 28-IX-2007, fl., *G.A. Dettke* 59 (ICN); *P. tenuifila* Killip – BRASIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 29-XI-2007, fl. fr., *G.A. Dettke* 87 (ICN).

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

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), parte das anteras fixadas foi desidratada em série crescente de etanol, transferida para acetona 100% e processadas em secador de ponto crítico. As anteras foram montadas em fita adesiva metálica sobre suportes de alumínio e fraturadas (com uso de pinça de ponta fina) para a observação dos grãos de pólen. Parte do pólen acetolisado, após lavagem, foi ressuscitado em água destilada. Uma gota da solução foi transferida para a superfície de 1 cm² de filme fotográfico (previamente exposto à luz e revelado), sobre o lado da emulsão, e aderido em suportes de alumínio. O filme fotográfico foi seco em estufa aquecida a 60°C. Os grãos de pólen, secos e aderidos sobre o filme fotográfico, foram recobertos com fita adesiva, sendo esta rapidamente removida, em um único movimento, obtendo-se grãos de pólen fraturados (Claugher 1986). O material foi recoberto com 10 a 15 nm de ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6060, sob 10 kV.

Resultados e discussão

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

Entre as espécies estudadas, verifica-se a existência de três grandes grupos ou “tendências”, baseados na morfologia

polínica, cujas espécies representam os três subgêneros, *Astrophea*, *Passiflora* e *Decaloba*, conforme classificação de Feuillet & MacDougal (2003).

A espécie representante do subgênero *Astrophea*, *P. haematostigma*, possui grãos de pólen 6-colporados, com 3 endoaberturas alongadas (Figs. 1-6, Tab. 1). As ectoaberturas encontram-se arranjadas aos pares, mas não apresentam fusões na região do apocolpo. Esta espécie apresenta pontopérculo, de acordo com a definição de Erdtman (1952), também utilizada por Punt *et al.* (2007). Nesta espécie, os pontopérculos, juntamente com a região do apocolpo, formam uma estrutura trirradiada, como assinalado por Araújo & Santos (2004) para outra espécie do subgênero *Astrophea* (*P. rhamnifolia* Mast.). Cada endoabertura está associada a duas ectoaberturas pareadas (Figs. 4-6), conforme também descrito para *P. rhamnifolia* (Araújo & Santos 2004).

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

O que Presting (1965) denomina de opérculo primário corresponde ao que Erdtman (1952) chama de pontopérculo, cujo conceito foi utilizado posteriormente por Spirlet (1965) e Araújo & Santos (2004). Assim, estes termos podem ser considerados sinônimos, dando-se preferência para a utilização do termo pontopérculo, que se encontra mais difundido na literatura (Punt *et al.* 2007) e gera menos confusão que o emprego do termo opérculo primário, já que também existem, na literatura, os termos opérculo secundário e opérculo. Outro termo utilizado para a descrição destes grãos de pólen é geminicolpado (Amela García *et al.* 2002) (ou geminicolporado, no caso), referindo-se à disposição pareada das aberturas (Fig. 4) e sinonimizado por Punt *et al.* (2007) como pontopérculo.

As espécies estudadas do subgênero *Passiflora* (Figs. 7-15, Tab. 1) apresentam tipo de abertura distinto de *P. haematostigma*. Nestas espécies, observa-se a fusão de colpos na região do apocolpo. *P. alata* (Fig. 8), *P. caerulea* (Fig. 10), *P. amethystina* (Fig. 11) e *P. edulis* apresentam grãos de pólen 6-sincolpados (seis colpos fundidos aos pares na região do apocolpo). *P. actinia* apresenta de 10 a 12 colpos; *P. elegans* e *P. tenuifila* (Fig. 14) apresentam de 8 a 10 colpos, pantoaperturados, com aberturas fundidas aos pares

(Figs. 13 e 14). Nestas espécies, não foram encontradas endoaberturas, seja em microscopia óptica de campo claro como em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de grão acetolisados e fraturados (Fig. 12).

De acordo com Presting (1965), estes grãos de pólen têm origem a partir de grãos de pólen 6-colporados (como os de *P. haematostigma*), nos quais as ectoaberturas se fusionam aos pares no apocolpo. Em relação às endoaberturas, observa-se uma clara tendência, segundo o autor, de tornarem-se reduzidas ou desaparecerem por completo. Após a fusão, partes do mesocolpo são delimitadas por estas aberturas e estas regiões são denominadas de pseudopérculos (*die Pseudopercula*), pois funcionam como opérculos durante a germinação dos grãos de pólen sobre o estigma e, frequentemente, se desprendem nas preparações palinológicas (Fig. 11). Contudo, na realidade, são originalmente mesocolpos. Para Presting (1965), de forma inexplicável, o número de pseudopérculos pode chegar a 12 (representando 24 aberturas fundidas aos pares), distribuídos uniformemente por toda a esporoderme. Spirlet (1965) explica a formação deste tipo polínico por meio de fusões longitudinais e também transversais dos colpos.

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

Quanto ao tipo de aberturas, há divergências na literatura. Este estudo concorda com Spirlet (1965), Huynh (1972), Amela García *et al.* (2002) e Araújo & Santos (2004), quanto à presença de colpos nestas espécies. Presting (1965) apresenta *P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. edulis* com aberturas colporoidadas. Barrios *et al.* (2005) caracterizam o subgênero *Passiflora* (em 76 espécies analisadas) com aberturas colporoidadas. Discordamos destes autores neste estudo, no que se refere às aberturas, pois colporóides não foram observados para as espécies deste subgênero.

As espécies do subgênero *Passiflora*, assim como *P. haematostigma*, possuem pontopérculos (*sensu* Erdtman 1952 e Punt *et al.* 2007) ou opérculos primários (*sensu* Presting 1965). Nas espécies que apresentam, de forma constante, três aberturas (*P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. edulis*) este termo é apropriado para as descrições e não gera confusões. Entretanto, para as demais espécies (*P. actinia*, *P. elegans* e *P. tenuifila*), nos quais é difícil o reconhecimento exato dos pontopérculos, propomos a utilização do termo mesocolpo para toda a região entre os pseudopérculos (Figs. 13-15).

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

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

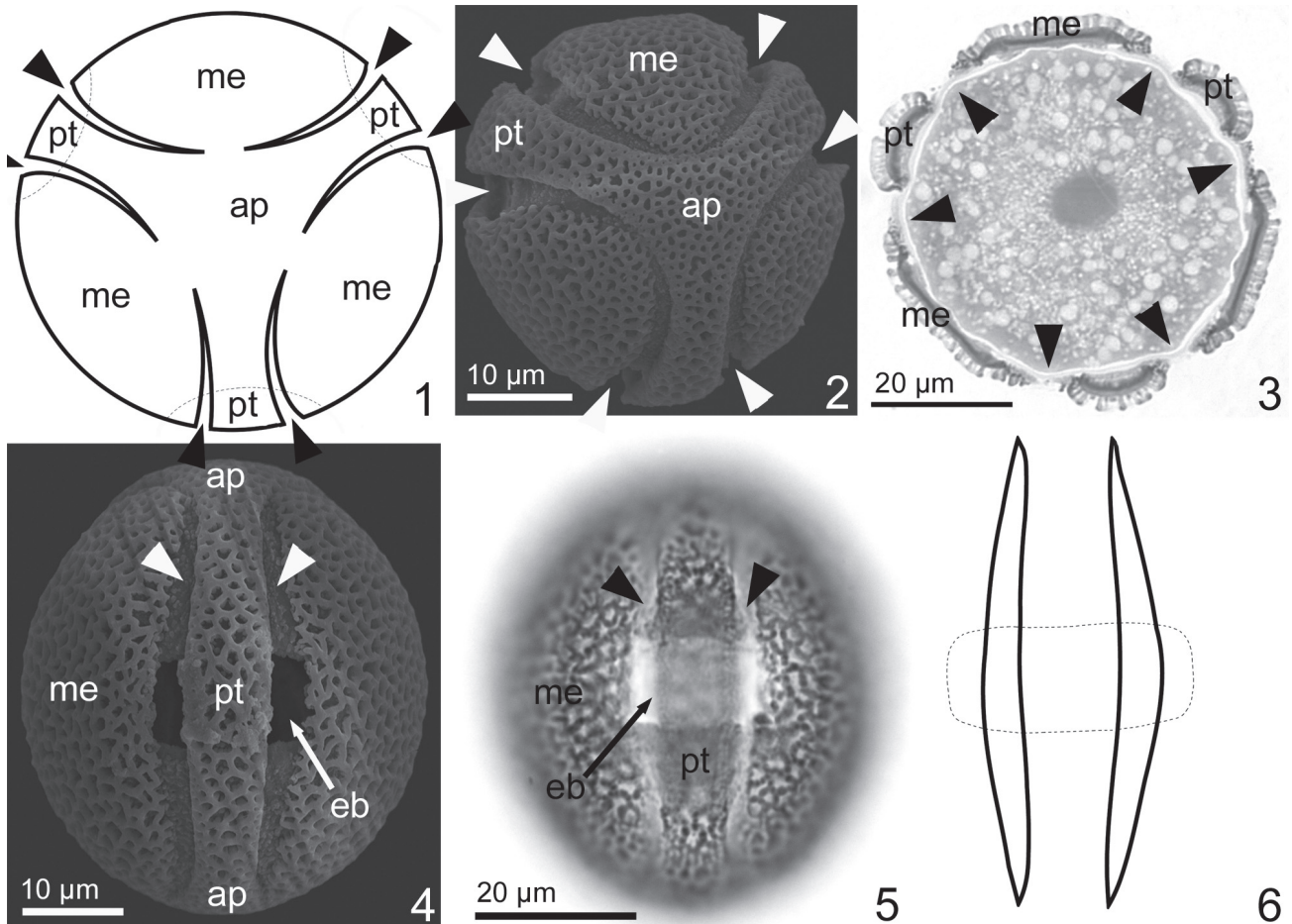
* com opérculos sobre as aberturas.

As espécies do último subgênero estudado, *Decaloba* (Figs. 16-34), possuem uma característica peculiar que as une como grupo, mas que se apresenta derivada em algumas espécies e não muito fácil de ser visualizada: a presença de opérculos. *P. misera* (Figs. 17-18), *P. morifolia*, *P. suberosa* (Figs. 19-21) e *P. truncata* (Figs. 24-26) apresentam grãos de pólen 6-colporados, com opérculos sobre as aberturas (Figs. 16-26). *P. suberosa* eventualmente apresenta os colpos fusionados aos pares na região do apocolpo (Fig. 20). *P. capsularis* apresenta grãos 12-colporados (Figs. 27-34), com estreitas faixas de exina sobre algumas aberturas (Figs. 30-31). *P. suberosa* apresenta grandes endoaberturas sob os opérculos (Fig. 22a), de difícil visualização em microscopia óptica, mas evidentes na análise em MEV de material acetolisado, quando os opérculos caem (Fig. 23). *P. misera* e *P. morifolia* apresentam endoaberturas relativamente menores e opérculos largos (Fig. 22b), ao passo que em *P. truncata* estas endoaberturas são pequenas e os opérculos, sobre elas, são estreitos (Figs. 22c, 24-26).

Presting (1965) afirma, em sua teoria sobre a evolução das aberturas dos grãos de pólen de Passifloraceae, que os grãos de pólen descritos acima e característicos de espécies atualmente pertencentes à *Decaloba*, têm origem a partir de grãos 6-colporados (novamente como os de *P. haematostigma*), mas que sobre as aberturas houve a formação de estreitas faixas de ectexina, que, progressivamente, tornaram-se mais largas até a caracterização de um opérculo, que o autor denomina de opérculo secundário (*die*

Sekundäropercula), diferenciando-o do opérculo primário (formado anteriormente e ainda presente nestes grãos de pólen). O opérculo secundário, tal como se apresenta nestas espécies, corresponde ao próprio conceito de opérculo (*operculum*) de Wodehouse (1935), adotado por Punt et al. (2007). Assim, este termo é aconselhado em lugar de opérculo secundário para a caracterização destes tipos de aberturas. Devido à dificuldade de diferenciar, nestes grãos de pólen, as áreas de pontopérculos ou opérculo primário (3) das de mesocolpo (3), com larguras bastante próximas, empregou-se para estas regiões unicamente o termo mesocolpo (Figs. 17, 21 e 24). Outra característica que comprova que esta parte da esporoderme é um opérculo é a estruturação diferenciada da exina nesta região. *Passiflora misera* e *P. suberosa* apresentam diferenças entre a nexina presente nos opérculos e mesocolpos. Em *P. misera*, na região do opérculo (local da endoabertura), a nexina 2 é menos espessa que aquela encontrada nos mesocolpos (Fig. 18). Já em *P. suberosa* (Fig. 19), observa-se uma densidade diferenciada na coloração da nexina 1 (corada com Azul de Toluidina), entre opérculo e mesocolpo (mais denso), sugerindo uma constituição química e/ou estrutural diferenciada.

A partir dos grãos 6-colporados, operculados, podem surgir novas formas, mais complexas, e cuja interpretação das partes resultantes torna ainda mais importante o conhecimento sobre a origem e evolução das aberturas nessa família. Esta nova forma é representada neste estudo por *P. capsularis*. Nesta espécie, além da presença dos opérculos,



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

as extremidades de cada abertura se unem, aos pares, com as extremidades da abertura vizinha, tal como acontece nas espécies do subgênero *Passiflora* analisadas neste estudo, delimitando um pseudopérculo. Assim, têm-se como estruturas resultantes três pontopérculos, seis opérculos e três pseudopérculos (Figs. 27 e 28). No entanto, embora Presting (1965) tenha denominado as regiões de pseudopérculo em *P. capsularis*, o mesmo não se enquadra totalmente no conceito do autor, pois representa somente a união das ectoaberturas, enquanto que a endexina mantém estas regiões fortemente unidas e, funcionalmente, não é um opérculo, como facilmente visualizado nas preparações palinológicas, onde não há o desprendimento desta região.

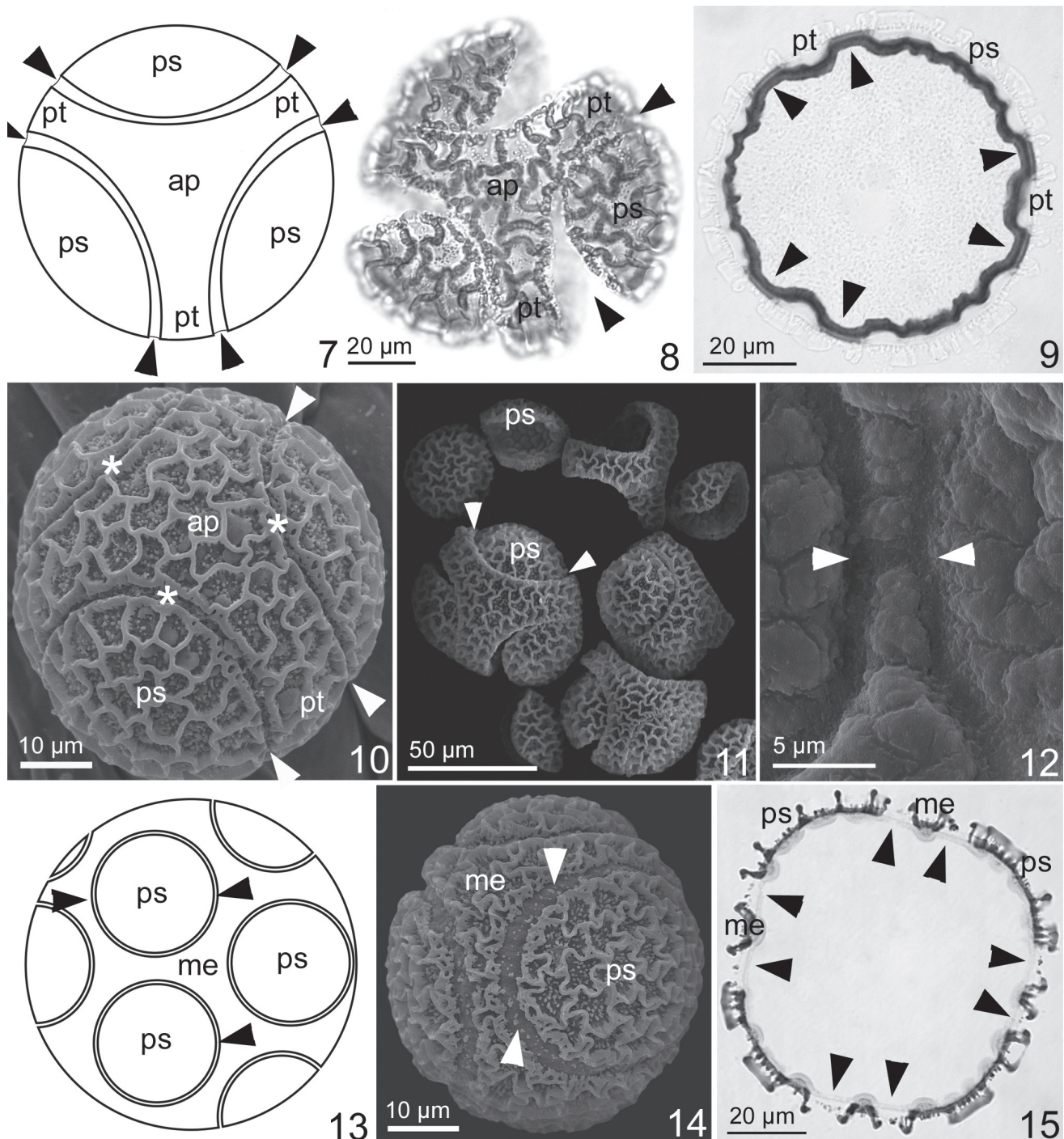
Da mesma forma, os opérculos de *P. capsularis* não se desprendem após a acetólise, indicando que algo mantém estas estruturas presas no restante da esporoderme. A razão se revela quando visualizada a superfície interna do grão de pólen, próxima das endoaberturas (Fig. 32). Nesta região, são depositadas faixas de endexina (nexina 2) que, como resultado, individualizam duas endoaberturas (Fig. 34), uma

de cada lado do opérculo e prendem o opérculo ao restante da sexina. Assim, no grão de pólen de *P. capsularis*, há 12 endoaberturas e o opérculo não é uma estrutura funcional, separando duas ectoaberturas (e consequentemente há 12 ectoaberturas), local onde o tubo polínico irá germinar. Em grãos de pólen acetolisados (Fig. 33), esta individualização não pode ser facilmente observada em microscopia óptica de campo claro, destacando a importância do uso de outros métodos de análise, como a microscopia eletrônica de varredura. Uma seção semifina do grão de pólen mostra claramente, para esta espécie, a existência de 12 regiões onde a intina é mais espessa e saliente (Fig. 29), demarcando as aberturas, contraponto com somente seis regiões observadas em *P. suberosa* (Fig. 19). Além disso, as regiões correspondentes aos opérculos em *P. capsularis* não possuem a estrutura da esporoderme diferenciada das demais regiões (Fig. 29).

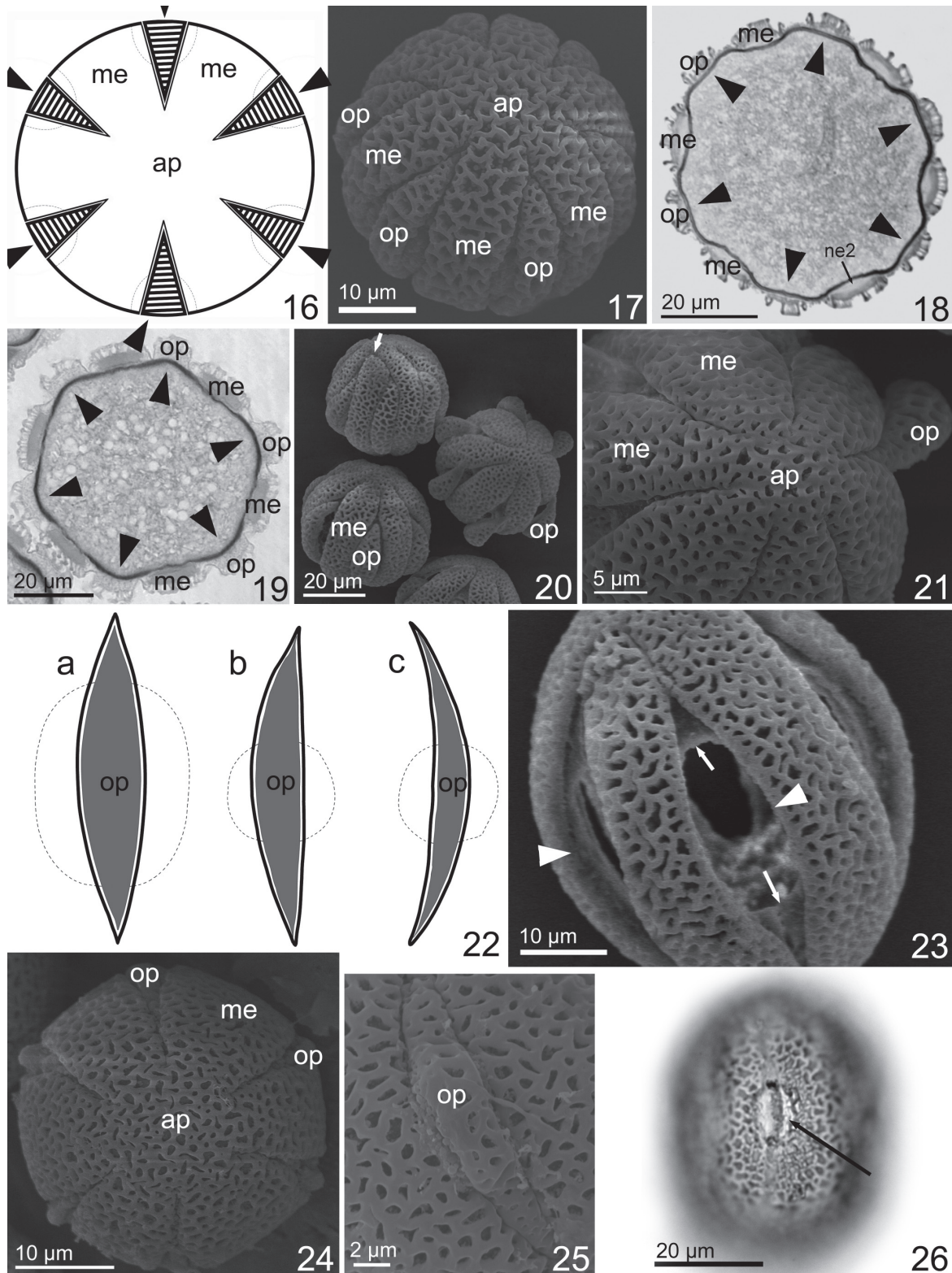
Com relação ao número e tipo de abertura, há consenso entre as descrições polínicas para *P. capsularis* (Presting 1965; Huynh 1972; Milward-de-Azevedo *et al.* 2004). O mesmo não ocorre com as demais espécies. *Passiflora mi-*

sera, *P. morifolia* e *P. suberosa* são descritas por Presting (1965) e *P. suberosa* por Huynh (1972) como possuindo grãos de pólen 6-colporados, com opérculos, concordando com os resultados apresentados para as espécies analisadas

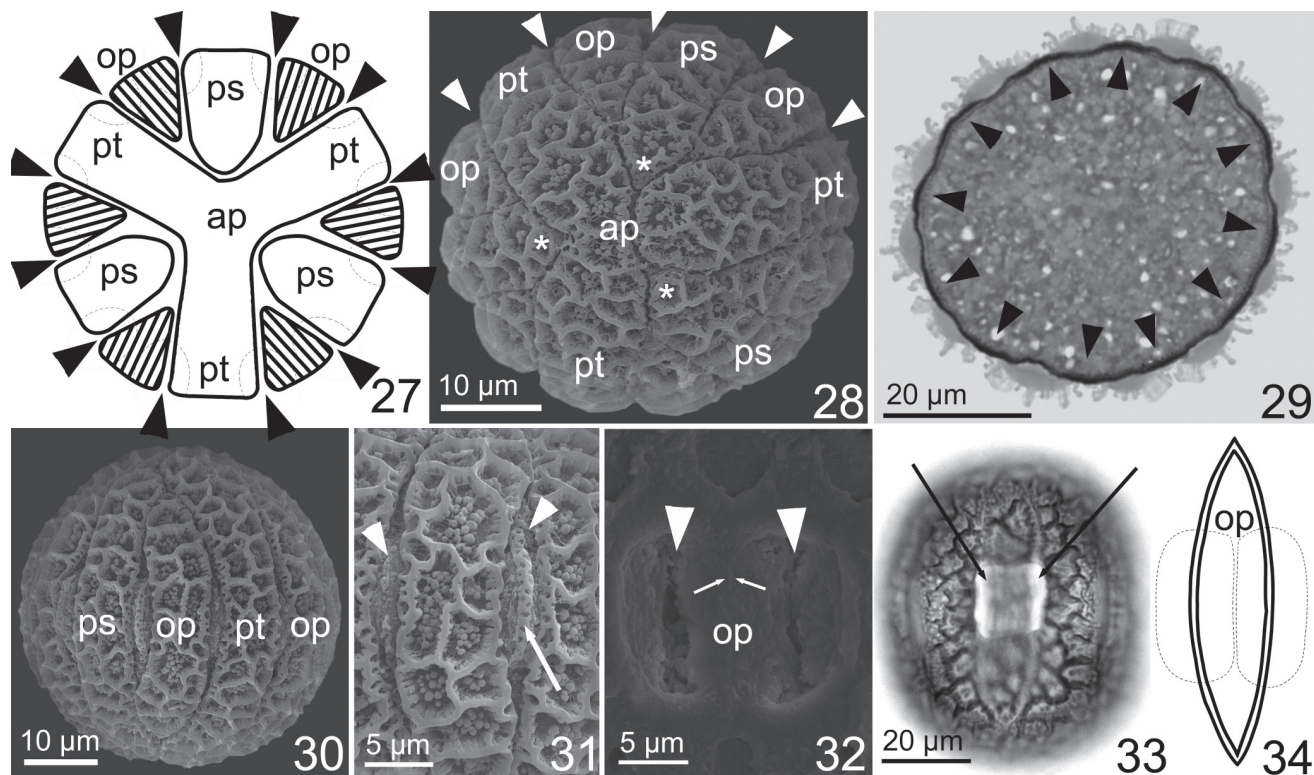
neste estudo. Araújo & Santos (2004) descrevem o pólen de *P. misera* e *P. suberosa*, em microscopia óptica de campo claro, como 6-colpados. A presença de endoaberturas foi confirmada, neste estudo, para estas espécies, embora



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



Figuras 16-26. Estrutura das aberturas dos grãos de pólen de *Passiflora* L. - subgênero Decaloba. 16. Esquema de um grão de pólen 6-colporado operculado, em vista polar (opérculos hachurados). 17. Grão de pólen de *P. misera* em vista polar inclinada (microscopia eletrônica de varredura - MEV). 18-19. Seção semifina do grão de pólen, no nível da zona equatorial, de *P. misera* (18) e *P. suberosa* (19), mostrando a posição dos opérculos e aberturas (microscopia óptica de campo claro). 20. Grãos de pólen acetolisados de *P. suberosa*, mostrando opérculos parcialmente desprendidos e fusão parcial no apocolpo (seta) (MEV). 21. Grãos de pólen acetolisados de *P. suberosa*, mostrando o apocolpo em detalhe (MEV). 22. Esquema das endoaberturas do grão de pólen de *P. suberosa* (a), *P. misera* e *P. morifolia* (b) e *P. truncata* (c). 23. Grão de pólen de *P. suberosa* sem os opérculos, mostrando a endoabertura (setas) (MEV). 24. Grão de pólen de *P. truncata*, em vista polar (MEV). 25. Detalhe do opérculo do grão de pólen de *P. truncata* (MEV). 26. Grão de pólen acetolisado de *P. truncata*, mostrando endoabertura (seta) (microscopia óptica de campo claro). Abreviaturas: ap, apocolpo; me, mesocolpo; ne2, nexina 2; op, opérculo. Pontas de setas, aberturas. Linhas pontilhadas, delimitação das endoaberturas.



Figuras 27-34. Estrutura das aberturas dos grãos de pólen de *Passiflora* L. - subgênero *Decaloba* (*P. capsularis*). 27. Esquema de um grão de pólen 12-colporado, em vista polar (opérculos hachurados). 28. Grão de pólen, em vista polar (microscopia eletrônica de varredura - MEV). 29. Seção semifina do grão de pólen, com 12 indicadas (setas), no nível da zona equatorial (microscopia óptica de campo claro). 30. Grão de pólen em vista equatorial (MEV). 31. Detalhe do mesocolpo, mostrando uma estreita faixa de exina sobre uma das aberturas (seta) (MEV). 32. Detalhe da superfície interna, mostrando duas endoaberturas, separadas por uma estreita deposição de nexina 2 (entre as setas finas), em grão de pólen acetolisado e fraturado (MEV). 33. Grão de pólen acetolisado, mostrando a localização das endoaberturas (setas) (microscopia óptica de campo claro). 34. Esquema da ectoabertura e endoaberturas, com base na interpretação das Fig. 32-33. Abreviações: ap, apocolpo; op, opérculo; ps, pseudopérculo; pt, pontopérculo. Pontas de setas, aberturas. *, fusão das aberturas no apocolpo. Linhas pontilhadas, delimitação das endoaberturas.

sejam de difícil visualização em *P. suberosa*. Em *P. misera*, são bastante evidentes em técnicas simples de microscopia óptica. Barrios *et al.* (2005) descrevem os grãos de pólen do subgênero *Decaloba* como 6 ou 12-colporados, não discriminando as espécies.

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

Com relação ao número de aberturas, a discordância é ainda maior e gerada por um grave equívoco na interpretação da teoria de Presting (1965), além de um conflito com a própria definição de abertura utilizado por Punt *et al.* (2007). Amela García *et al.* (2002) e Milward-de-Azevedo *et al.* (2004) interpretam cada uma das laterais dos opérculos como uma abertura, que estariam

fusionadas nas extremidades, de modo que estes grãos de pólen possuiriam 12 aberturas. Milward-de-Azevedo *et al.* (2004), inclusive, utiliza o termo pseudopérculo para a região entre as aberturas (correspondente ao opérculo). Como ressaltado, neste estudo e por Presting (1965), a presença de 12 aberturas nos grãos de pólen de *Passiflora* somente ocorre quando há deposição de endexina na superfície interna do opérculo. Assim, esta estrutura se funde ao restante da exina e não mais se desprende durante o crescimento do tubo polínico. Entre as 106 espécies de *Passiflora* analisadas por Presting (1965) (aproximadamente 20% das espécies do gênero), somente quatro são caracterizadas como 12-colporadas: *P. capsularis*, *P. hahnii* (E. Fourn.) Mast., *P. pohlii* Mast. e a maioria dos grãos de pólen de *P. biflora* Lam., indicando que a presença de 12 aberturas é uma característica rara para o gênero.

Considerando-se a análise da teoria de Presting (1965) e Spirlet (1965) sobre a origem das aberturas, os quais afirmam que a fusão das ectoaberturas ocorre somente entre as extremidades da abertura de um par com a extremidade de uma abertura do par vizinho, a utilização do termo pseudopérculo por Amela García *et al.* (2002) e Milward-de-Azevedo *et al.*

al. (2004) parece ser equivocada, já que as “aberturas” de um mesmo par, interpretadas por esses autores, estariam fusionadas entre si.

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

Este estudo torna evidente a importância da utilização de várias técnicas de microscopia para a análise dos tipos de aberturas, especialmente nesse gênero tão diverso do ponto de vista palinológico, como *Passiflora*. A uniformização dos termos por parte dos autores torna-se essencial para que os dados gerados nos estudos palinológicos possam ser utilizados em estudos taxonômicos e filogenéticos. A interpretação equivocada de estruturas, como o número e tipos de aberturas, podem comprometer a confecção de chaves polínicas, como a apresentada por Milward-de-Azevedo *et al.* (2004), onde estas características são utilizadas para a entrada na chave.

Conforme a nova classificação infragenerica de *Passiflora* (Feuillet & MacDougal 2003), este estudo apóia a existência de duas linhas principais de desenvolvimento das aberturas em *Passiflora*, correspondente aos subgêneros *Passiflora*, com tendência à fusão dos colpos aos pares, delimitando pseudopérculos circulares e distribuídos uniformemente ao longo do grão, e o subgênero *Decaloba*, com o desenvolvimento de opérculos sobre os cólporos e também com tendências de fusões de aberturas em poucas espécies. O subgênero *Astrophea* possui aberturas mais próximas, morfológicamente, às descritas para o subgênero *Passiflora*, indicando a proximidade filogenética destes dois subgêneros, como já apontado por Muschner (2005) e Hansen *et al.* (2006).

Agradecimentos

Os autores agradecem a Renan Theodor Dettke, pela confecção dos desenhos esquemáticos dos grãos de pólen, e à bióloga Érica Duarte, pela revisão do abstract. Agradecemos, também, à Profa. Dra. Maria Luisa Lorscheitter, pela leitura crítica do manuscrito e sugestões. Agradecemos, finalmente, aos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) do Departamento de Botânica, Instituto de Bociências, UFRGS e Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS, onde o trabalho foi executado.

Referências bibliográficas

Amela García, M.T.; Galati, B.G. & Anton, A.M. 2002. Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 139: 383-394.

- Araújo, R.C.M. & Santos, F.A.R. 2004. Palinologia de espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus, série Ciências Biológicas** 4(1/2): 37-42.
- Barrios, L.; Caetano, C.M.; Cardoso, C.I.; D’Eeckenbrugge, G.C.; Arroyave, J.A. & Olaya, C.A. 2005. Caracterización del pollen de especies de los géneros *Passiflora* e *Dilkea*. **Acta Agronômica** 54(3): 19-23.
- Cervi, A.C. 2006. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem** 16: 1-5.
- Claugher, D. 1986. Pollen wall structure, a new interpretation. **Scanning Electron Microscopy** 1: 291-299.
- Erdtman, G. 1952. **Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms**. Waltham, Chronica Botanica Co.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift** 39: 561-564.
- Escobar, L.K. 1989. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 76: 877-885.
- Faegri, K. & Iversen, J. 1964. **Textbook of pollen analysis**. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Feuillet, C. & MacDougal, J.M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** 13: 34-38.
- Feuillet, C. & MacDougal, J.M. 2007. Passifloraceae. Pp. 270-281. K. Kubitzki (Ed.) **The families and genera of vascular plants**. Vol. 9. Berlin, Springer.
- Fischer, H. J. 1890. **Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Pollenkörner**. Breslau, Fritzsche, J. 1837. Über den Pollen. **Mémoires des Savants Étrangers**. Vol.3. Petersburg.
- Gerrits, P.O. & Smid, L. 1983. A new, less polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132: 81-85.
- Hansen, A.K.; Gilbert, L.E.; Simpson, B.B.; Downie, S.R.; Cervi, A.C. & Jansen, R.K. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31(1): 138-150.
- Huynh, K.L. 1972. Étude de l’arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de dones cytologiques – IV Le genre *Passiflora*. **Pollen et Spores** 14: 51-60.
- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry - principles and practice**. San Francisco, W.H.Freeman and Company.
- Killip, E. 1938. The American species of Passifloraceae. **Field Museum of Natural History, Botanical Series** 19: 1-613.
- Milward-De-Azevedo, M.A.; Gonçalves-Esteves, V. & Baumgratz, J.F. 2004. Palinotaxonomia das espécies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 27(4): 655-665.
- Mohl, H. 1834. **Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Gewächse: Über den Bau und die Formen der Pollenkörner**. Bern, Chr. Fischer und Comp.
- Muschner, V.C. 2005. **Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Muschner, V.C.; Lorenz, A.P.; Cervi, A.C.; Bonatto, S.L.; Souza-Chies, T.T.; Salzano, F.M. & Freitas, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90(8): 1229-1238.
- O’Brien, T.P. & McCully, M.E.. 1981. **The study of plant structure - principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty.
- Presting, D. 1965. Zur morphologie der Pollenkörner der Passifloraceen. **Pollen et Spores** 7: 193-247.
- Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S. & Le Thomas, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of paleobotany and Palynology** 143: 1-81.
- Roland, J.C. & Vian, B. 1991. General preparation and staining of thin sections. Pp.1-66. In: J.L HALL & C. HAWES (Eds.) **Electron Microscopy of Plant Cells**. London, Academic Press.
- Souza-Chies, T.T.; Yockteng, R. & Nadot, S. 2005. Systématique moléculaire comparée en France et au Brésil du genre *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Cahiers Agricultures** 14(2): 209-215.

- Spirlet, M.L. 1965. Utilisation taxonomique des grains de pollen de Passifloracées. **Pollen et Spores** 7: 249-301.
- Thanikaimoni, G. 1986. Pollen apertures: form and function. Pp. 119-136. *In*: S. Blackmore & I.K. Ferguson (Eds.) **Pollen and Spores: form and function**. London, Academic Press.
- Wodehouse, R.P., 1935. **Pollen Grains. Their structure, identification and significance in science and medicine**. New York, McGraw-Hill.
- Yockteng, R. & Nadot, S. 2004. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*nepGS*). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31: 379-396.