



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MORFOANATOMIA DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE CINCO ESPÉCIES DE MALPIGHIACEAE

LETÍCIA SILVA SOUTO

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica),
Área de concentração: Morfologia e
Diversidade de Plantas.

BOTUCATU-SP

2011



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MORFOANATOMIA DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE
CINCO ESPÉCIES DE MALPIGHIACEAE

LETÍCIA SILVA SOUTO

PROF^A DR^A DENISE MARIA TROMBERT OLIVEIRA
ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica),
Área de concentração: Morfologia e
Diversidade de Plantas.

BOTUCATU-SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Souto, Letícia Silva.

Morfoanatomia de órgãos reprodutivos de cinco espécies de Malpighiaceae /
Letícia Silva Souto. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Denise Maria Trombert Oliveira

Capes: 20302037

1. Anatomia vegetal. 2. Malpighiaceae.

Palavras-chave: Anatomia; *Camarea*; Flor; Fruto; *Janusia*; *Mascagnia*;
Megagametogênese; Megasporogênese; Ontogênese; Semente; *Tetrapterys*;
Vascularização floral.

**“A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo de busca.”**

(Paulo Freire)

A Deus, que me ensinou a ser forte.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudo concedidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), do Instituto de Biociências, UNESP, câmpus de Botucatu.

Ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, UNESP, câmpus de Botucatu, pelas dependências e equipamentos utilizados.

À Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira, do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, agradeço por todos os anos de amizade e por ter me aceitado no doutorado mesmo sendo docente de outra instituição. A convivência com você me ensinou sobre ética, paciência, perfeccionismo, comprometimento e acima de tudo respeito e amor à arte de ensinar. Se no futuro, eu me tornar professora, é graças a você, que através do exemplo me mostrou a felicidade dessa profissão.

Ao Prof. Dr. Jorge Ernerto de Araújo Mariath, do Instituto de Biociências, UFRGS, por ter aceitado ser meu orientador no estágio *sandwiche* na UFRGS e ter se tornado meu amigo. Nos cinco meses em que estive com você, aprendi muito sobre ser pesquisador, sobre a importância de bons equipamentos, o cuidado com a metodologia, análise dos dados e ilustrações. Muito obrigada pela hospitalidade com que me recebeu e por ter aberto seu laboratório (LAVeg) com tanta disposição.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, na pessoa da Pró-Reitora Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge, pelo auxílio financeiro concedido para a realização do estágio *sandwiche* na UFRGS, em Porto Alegre-RS.

À Dra. Maria Candida Mamede, pela ajuda na escolha das espécies do projeto inicial de tese e pela identificação de algumas das espécies.

À Dra. Renata Sebastiani, pela ajuda nas coletas, pela identificação de algumas espécies e pelas discussões sobre a família Malpighiaceae.

À Profa. Dra. Rosana Romero e Profa. Dra. Neuza Maria de Castro, do Instituto de Biologia, UFU, pela ajuda na coleta de *Camarea linearifolia* na Serra da Canastra-MG; sem a ajuda de vocês, essa coleta não teria sido possível.

Ao Sr. Clemente José Campos, pelo auxílio nas coletas.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, que sempre foram dedicados a atender minhas solicitações.

Aos professores do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, câmpus de Botucatu, muito obrigada pela convivência e auxílio nas diferentes etapas deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado por me incentivar a realizar o estágio *sandwiche* e pela oportunidade de bolsa didática na disciplina de Morfologia Vegetal II.

À Profa. Dra. Marina Aparecida de Moraes Dallaqua, pela amizade, apoio e pelas oportunidades de ministrar aulas.

Aos professores da área de Sistemática Vegetal, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Prof. Dr. Luiz Roberto Hernandez Bicudo, Profa. Dra. Rita de Cássia Sindronia Maiomoni-Rodella e Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella, pelo convite à bolsa didática na disciplina de Sistemática Vegetal e Taxonomia de Angiospermas.

À Dra. Suzana Bissacot Barbosa, pela ajuda no herbário.

Aos professores da Morfologia Vegetal da UFRGS, Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos, Profa. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti e Profa. Dra. Maria Cecília de Chiara Moço, pela ajuda na confecção e análise do material do capítulo III.

Aos colegas de departamento Lígia, Paula, Luciana, Débora, Carol, Juliana Iassia, Jaqueline, Valdir, Tainara e Daniel, muito obrigada pelo convívio e amizade.

Aos colegas de laboratório Clívia, Daniela, João, Juliana Marzinek, Juliana Stahl, Pricila, Sérgio, Shelly, Tatiane e Yve, pela ajuda nas técnicas e procedimentos laboratoriais e pelas discussões sobre anatomia vegetal.

Aos amigos do LAVeg (Porto Alegre-RS), pelo auxílio com as novas técnicas e pela amizade, em especial à Érica, Adriano e Carla, por terem se tornado minha família enquanto estive em Porto Alegre; se não fosse por vocês eu não teria conseguido ficar tanto tempo longe da família de sangue.

Aos meus pais, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e do doutorado, principalmente durante a redação da tese.

À minha irmã Adriana e meus sobrinhos amados, Lucas e Miguel, por ter me distraído nos momentos difíceis, recarregando minhas forças para voltar à tese.

Ao meu amado Eduardo, muito obrigada pelo amor, amizade e acima de tudo paciência nos momentos difíceis, por ter entendido as horas de estresse e me ajudado em todos os momentos do doutorado.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	3
Introdução geral e Revisão de literatura.....	5
1. Família Malpighiaceae.....	6
2. Morfologia e anatomia de órgãos vegetativos.....	12
3. Morfologia e anatomia de órgãos reprodutivos.....	13
4. Tribo Gaudichaudieae.....	23
5. <i>Camarea</i> A.St.-Hil.....	24
6. <i>Janusia</i> A. Juss.....	25
7. <i>Mascagnia</i> Bert. ex Colla.....	26
8. <i>Tetrapteryx</i> A. Juss.....	26
9. Objetivos.....	27
Capítulo I – Vascularização floral de espécies de <i>Janusia</i> , <i>Mascagnia</i> e <i>Tetrapteryx</i> e seu valor na filogenia de Malpighiaceae.....	28
Resumo.....	31
Introdução.....	31
Material e métodos.....	33
Resultados.....	33
Discussão.....	37
Agradecimentos.....	39
Referências bibliográficas.....	39
Figuras.....	42
Capítulo II – Anatomia floral comparada de cinco espécies de Malpighiaceae.....	46
Resumo.....	48
Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados.....	50
Discussão.....	55
Agradecimentos.....	58
Referências bibliográficas.....	58
Figuras.....	63
Tabela.....	68
Capítulo III – Megasporogênese, megagametogênese e fecundação simples em <i>Janusia ochionii</i> : um caso de ausência de célula média em Malpighiaceae neotropical.....	69
Resumo.....	71
Introdução.....	72
Material e métodos.....	73
Resultados.....	74

Discussão.....	77
Agradecimentos.....	80
Referências bibliográficas.....	80
Figuras.....	83
Capítulo IV – Anatomia e ontogênese do pericarpo de espécies de <i>Janusia</i> , <i>Mascagnia</i> e <i>Tetrapteryx</i> e seu potencial uso filogenético em Malpighiaceae.....	87
Resumo.....	89
Introdução.....	89
Material e métodos.....	90
Resultados.....	91
Discussão.....	96
Agradecimentos.....	99
Referências bibliográficas.....	99
Figuras.....	102
Capítulo V – Estrutura e desenvolvimento de sementes em espécies de Malpighiaceae: perisperma como principal reserva para a embriogênese e outras considerações filogenéticas.....	106
Resumo.....	108
Introdução.....	108
Material e métodos.....	110
Resultados.....	110
Discussão.....	114
Agradecimentos.....	118
Referências bibliográficas.....	118
Figuras.....	121
Considerações finais.....	125
Referências bibliográficas.....	128

SOUTO, L.S. **MORFOANATOMIA DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE CINCO ESPÉCIES DE MALPIGHIACEAE**. 2011. 133P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - A família Malpighiaceae possui 1.200 espécies e 66 gêneros, com importância para as formações florestais e savânicas do Velho e do Novo Mundo. A origem monofilética da família é incontestável, entretanto seus táxons intrafamiliares ainda são bastante controversos e considerados artificiais por diversos autores. A morfologia floral de Malpighiaceae é bastante homogênea, mas os frutos possuem extrema diversidade, ocorrendo pericarpos deiscentes ou indeiscentes, carnosos ou secos. Embora caracteres morfológicos dos frutos sejam usados na delimitação de táxons dentro de Malpighiaceae, recentes estudos moleculares indicam a ocorrência de caracteres carpológicos homoplásticos. Assim, estudos minuciosos sobre os frutos da família têm grande potencial taxonômico. Além disso, a vascularização floral pode revelar passos evolutivos, anteriores à morfologia floral atual das espécies. Desta forma, a presente proposta tem como objetivos: 1) descrever, ontogeneticamente, a estrutura dos frutos e sementes de quatro espécies de Malpighiaceae, abrangendo os gêneros *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapteryx*; 2) caracterizar a anatomia floral das espécies do item anterior e de *Camarea linearifolia*, com ênfase em sua vascularização, buscando correlacionar esses aspectos com o significado evolutivo e ecológico das flores de Malpighiaceae; 3) relatar a esporogênese e gametogênese feminina de *Janusia ochionii*, investigando a provável ocorrência de apomixia. A vascularização floral encontrada nas espécies segue o padrão geral de número de traços vasculares, com exceção de *M. cordifolia*, onde a sépala aglandular recebe um traço vascular, mas compartilha os traços laterais das sépalas adjacentes, os quais se bifurcam. No ovário, não é emitido traço dorsal de carpelo, ocorrendo um complexo de procâmbio e meristema fundamental; *M. cordifolia*, possui conexão entre as glândulas da sépala anterior e das sépalas adjacentes. Em *T. chamaecerasifolia* e nas *Janusia*, a perda das glândulas da sépala anterior provavelmente se deu por redução. Apesar da homogeneidade morfológica, as flores estudadas variam anatomicamente, principalmente na epiderme de sépalas e pétalas, que devem refletir adaptações ao ambiente e à polinização. Outros caracteres variaram, mas apresentam constância dentro do gênero e tribo, podendo ser úteis taxonomicamente: a epiderme das glândulas calicinais que é formada por tricomas nas *Janusia* e *C. linearifolia*, e por células em paliçada nas demais; projeção do nucelo através da micrópila nas *Janusia* e *C. linearifolia*, e exposto em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*. *Mascagnia cordifolia* apresenta células com drusas próximo ao estômio, enquanto nas demais as drusas estão espalhadas pela antera. Após a meiose, a célula-mãe de megásporo origina um megásporo tetranucleado. Os núcleos do megásporo dividem-se mitoticamente originando um megagametófito 16-nucleado. Ocorre citocinese em três núcleos no polo micropilar, originando duas sinérgides e uma oosfera; os 13 núcleos restantes degeneram e são reabsorvidos. Não se forma célula média. Na fecundação, ocorre a descarga do conteúdo do tubo polínico em uma das sinérgides, com dois gametas masculinos, um deles que degenera. A ausência de célula média constitui registro inédito para Malpighiaceae, que forma célula média tetranucleada na maioria das espécies; a ausência representa um estado derivado na família, já que surge em tribo considerada derivada em análise molecular. O fruto maduro é esquizocárpico, formado por três samarídeos presos ao tórus piramidal. O exocarpo é unisseriado e, em *T. chamaecerasifolia*, as células são papilosas. O mesocarpo é dividido em duas regiões: o mesocarpo externo é formado por células isodiamétricas e o mesocarpo interno apresenta uma faixa de células lignificadas e alongadas tangencialmente; em *J. mediterranea*, as duas camadas mais internas do mesocarpo

interno são alongadas longitudinalmente. O endocarpo é parenquimático e fica reduzido a poucas camadas celulares, em função da compressão das camadas mais internas; em *T. chamaecerasifolia*, o endocarpo é formado por braquiesclereídes. A ala apresenta exocarpo unisseriado e mesocarpo aerenquimático. Alguns padrões estruturais podem ser reconhecidos como: exocarpo unisseriado, camadas mais externas do mesocarpo parenquimáticas e a presença de um tecido de células espessadas e lignificadas na porção interna do mesocarpo. A morfologia do endocarpo é variável e pode ser útil taxonomicamente. Os óvulos são subcampilótopos, crassinucelados, unitegmentados em *J. occhionii* e *J. mediterranea*, e bitegmentados em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*. O nucelo é abundante e projeta-se pela micrópila; próximo à calaza, apresenta células com aspecto meristemático, com divisões celulares que aumentam o volume do nucelo. No funículo, o obturador é constituído por tecido de aspecto secretor, que fica em contato direto com as células projetadas do nucelo. Durante o desenvolvimento seminal, a calaza amplia-se formando a paquicalaza; nas espécies bitegmentadas, os tegumentos concrecem. Nas *Janusia*, não há formação de endosperma, sendo o perisperma responsável pela manutenção da embriogênese; em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, forma-se endosperma nuclear escasso, que logo é celularizado e reabsorvido. A semente madura tem a testa colapsada, com a exotesta fenólica e a endotesta com espessamento em “U”. São sementes exalbuminosas, sendo o perisperma consumido. O embrião preenche toda a semente. A ausência de endospermas nas *Janusia* é esperada, tendo em vista o registro de que não ocorre formação de célula media em *J. occhionii*.

Palavras-chave: Anatomia; *Camarea*; Flor; Fruto; *Janusia*; *Mascagnia*; Megagametogênese;

Megasporogênese; Ontogênese; Semente; *Tetrapterys*; Vascularização floral

SOUTO, L.S. **MORPHOLOGY AND ANATOMY OF REPRODUCTIVE ORGANS FROM FIVE MALPIGHIACEAE SPECIES**. 2011. 133P. THESIS (DOCTOR THESIS) – INSTITUTE OF BIOSCIENCES, UNESP – SÃO PAULO STATE UNIVERSITY, BOTUCATU.

ABSTRACT – The family Malpighiaceae includes 1,200 species and 66 genera and has been important for forests and savannas from the Old and the New World. Its monophyletic origin is unquestionable; however, its intrafamilial *taxa* have still been controversial and considered artificial by several authors. The flower morphology of Malpighiaceae is quite homogeneous, but fruits present extreme diversity, with dehiscent or indehiscent, fleshy or dry pericarps. Although morphological traits of fruits have been used to delimit *taxa* within Malpighiaceae, recent molecular studies have indicated the occurrence of carpological homoplastic traits. Thus, detailed studies on Malpighiaceae fruits have great taxonomic potential. Furthermore, flower vascularization can reveal evolution steps prior to the current flower morphology of the species. Thus, the present work aimed to: 1) describe, ontogenetically, the structure of fruits and seeds from four Malpighiaceae species, including the genera *Janusia*, *Mascagnia* and *Tetrapteryx*; 2) characterize the flower anatomy of such species and *Camarea linearifolia*, highlighting their vasculature, in order to correlate these aspects with the evolutive and ecological meaning of Malpighiaceae flowers; 3) report female sporogenesis and gametogenesis in *Janusia occhionii*, investigating the probable occurrence of apomixis. The flower vasculature observed in the species follows the general pattern as to number of vascular traces, except for *M. cordifolia*, in which the non-glandular sepal receives one vascular trace but shares the lateral traces from adjacent sepals that bifurcate. In the ovary, the dorsal carpel trace is not emitted, occurring a complex of procambium and ground meristem; *M. cordifolia* presented conated glands from the anterior and adjacent sepals. In *T. chamaecerasifolia* and *Janusia* species, the anterior sepal lost their glands probably by reduction. Despite morphological homogeneity, the studied flowers anatomically changed, mainly in the epidermis of sepals and petals, which may indicate adaptations to the environment and to the pollination. Other traits changed but presented constancy within the genus and the tribe, making them useful taxonomically: the epidermis of calycinal glands, which is formed of trichomes in *Janusia* species and *C. linearifolia* and by palisade cells in the remaining ones; projection of the nucellus through the micropyle in *Janusia* species and *C. linearifolia*, and exposed in *M. cordifolia* and *T. chamaecerasifolia*. *Mascagnia cordifolia* shows cells with druses near the stomium, whereas in the remaining species the druses are scattered over the anther. After meiosis, the megaspore mother cell originates a tetranucleate megaspore. The nuclei of this megaspore divide mitotically, originating a 16-nucleate megagametophyte. Cytokinesis occurs in three nuclei in the micropylar pole, originating two synergids and one egg cell; the remaining 13 nuclei degenerate and are reabsorbed. The central cell is not formed. In the fertilization, the pollen tube has its content discharged into one of synergids, with two male gametes, one of which degenerates. The absence of central cell constitutes an unpublished record for Malpighiaceae, which forms tetranucleate central cell in most species; this absence represents a derived state in the family, since it appears in a tribe considered derived according to molecular analysis. The mature fruit is schizocarpic, formed by three samaras attached to the pyramidal torus. The exocarp is uniseriate and, in *T. chamaecerasifolia*, the cells are papillary. The mesocarp is divided into two regions: the outer mesocarp is formed of isodiametric cells and the inner mesocarp presents a zone of lignified and tangentially elongated cells; in *J. mediterranea*, the two innermost layers of the inner mesocarp are longitudinally elongated. The endocarp is parenchymatic and is restricted to few

cell layers due to the compression of the innermost layers; in *T. chamaecerasifolia*, the endocarp is formed of stone cells. The wing has uniseriate exocarp and aerenchymatic mesocarp. Some structural patterns can be recognized as: uniseriate exocarp, parenchymatic outermost layers of the mesocarp and presence of a tissue of cells thickened and lignified in the inner portion of the mesocarp. The morphology of the endocarp is variable and can be useful taxonomically. The ovules are subcampylotropous, crassinucellate, unitegmic in *J. occhionii* and *J. mediterranea*, and bitegmic in *M. cordifolia* and *T. chamaecerasifolia*. The nucellus is abundant and projects through the micropyle; near the chalaza, it presents cells of meristematic aspect, the divisions of which increase the nucellus volume. In the funiculus, the obturator is composed of a tissue presenting secretory aspect and direct contact with the cells projected from the nucellus. During seminal development, the chalaza enlarges and forms the pachychalaza; in bitegmic species, the integuments are concrescent. In *Janusia* species, there is no endosperm formation, and the perisperm is responsible for maintenance of embryogenesis; in *M. cordifolia* and *T. chamaecerasifolia*, a scarce nuclear endosperm is formed and soon cellularized and reabsorbed. The mature seed presents collapsed testa, phenolic exotesta and U-shaped thickening in the endotesta. Seeds are exalbuminous and the perisperm is consumed. The embryo occupies the whole seed. The absence of endosperm in *Janusia* species is expected, since the report of no central cell formation in *J. occhionii*.

Keywords: Anatomy; *Camarea*; Flower; Fruit; *Janusia*; *Mascagnia*; Megagametogenesis;

Megasporogenesis; Ontogeny; Seed; *Tetrapterys*; Flower vasculature.



**Introdução Geral e
Revisão Bibliográfica**

Tetrapteryx chamaecerasifolia

1. Família Malpighiaceae

Malpighiaceae é composta por 1.200 espécies, agrupadas em 66 gêneros (Judd et al. 2009) com distribuição tropical e subtropical (Anderson 1990). Suas espécies apresentam grande importância para as formações florestais e savânicas do Velho e do Novo Mundo (Vogel 1990), possuindo pelo menos 950 espécies em 47 gêneros endêmicos dos Neotrópicos. Apesar de sua importância também ser reconhecida no Velho Mundo, a maior diversidade em número de espécies está centrada na América do Sul (Judd et al. 2009).

A diversidade no continente americano é facilmente constatada pela representação das Malpighiaceae no cerrado. Segundo Mendonça et al. (1998), a família é abundante nos cerrados do Brasil, estando entre as dez mais bem representadas desse bioma.

Na família, podem-se encontrar árvores, arbustos, lianas e ervas perenes. As folhas são usualmente opostas, simples e inteiras, penínérveas, com duas ou mais glândulas no pecíolo ou na face abaxial do limbo; estípulas normalmente estão presentes (Judd et al. 2009). São característicos da família os tricomas tectores unicelulares, normalmente ramificados, em forma de T, V ou Y (Judd et al. 2009), embora trabalhos com órgãos reprodutivos tenham descrito também tricomas multicelulares, com a célula apical semelhante aos tricomas unicelulares mais frequentes no grupo (Souto & Oliveira 2005).

As inflorescências são determinadas, mas sempre parecendo indeterminadas, de posição terminal ou axilar. As flores apresentam organização uniforme na família; são bissexuais e bilaterais, com cinco sépalas, distintas a conatas na base, cinco pétalas distintas, unguiladas e fimbriadas (Vogel 1990). O cálice é caracterizado, principalmente, pela presença de glândulas produtoras de óleo na face abaxial de pelo menos quatro sépalas (Judd et al. 2009).

As glândulas do cálice são características das espécies do Novo Mundo, ocorrendo em cerca de 90% delas e são classificadas como elaióforos por secretarem óleo (Vogel 1990). Já nas espécies do Velho Mundo que apresentam as glândulas calicinais, estas secretam néctar, como é o caso de *Hiptage*, não estando relacionadas à atração de polinizadores (Vogel 1990).

Os grãos de pólen são 3-5-colporados ou 4-poliporados. O ovário é súpero, formado por três carpelos, com estiletos normalmente distintos e estigmas de morfologia variada; a placentação é axial e ocorre apenas um óvulo por lóculo (Judd et al. 2009). Seus frutos são variados, podendo ser deiscentes ou indeiscentes, carnosos ou secos (Anderson 1990). A semente apresenta embrião reto a curvo, com endosperma ausente na maturidade (Souto & Oliveira 2005, Souto & Oliveira 2008, Judd et al. 2009).

Malpighiaceae encontra-se em Malpighiales e seus maiores gêneros são: *Byrsonima*, *Heteropterys*, *Banisteriopsis*, *Tetrapteryx*, *Stigmaphyllon* e *Bunchosia* (Judd et al. 2009). A família é monofilética, fato comprovado tanto pela análise de caracteres morfológicos (Vogel 1990, Judd et al. 2009), quanto por análises filogenéticas moleculares (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001). Os principais caracteres morfológicos que corroboram a monofilia das Malpighiaceae estão relacionados às flores, que apresentam arquitetura bastante homogênea entre as espécies da família (Vogel 1990). Além disso, os caracteres de maior significado filogenético para o grupo são a forma dos estiletos e estigmas, a estrutura do pólen e o número cromossômico (Anderson 1977).

Apesar da monofilia das Malpighiaceae não ser contestada, a relação filogenética dos táxons intrafamiliares ainda é bastante confusa. Inicialmente, a família foi dividida por Niedenzu (1928) em duas subfamílias, baseadas principalmente na forma do receptáculo e na presença ou ausência de ala nos frutos. A primeira subfamília, denominada Planitorae, compreende as espécies com receptáculo achatado, frutos não alados e em geral, árvores e arbustos de distribuição neotropical. Já as espécies com receptáculo piramidal e frutos alados, dispersos anemocoricamente, de distribuição pantropical, foram agrupadas na subfamília Pyramidotorae, composta principalmente por lianas.

Para a delimitação em tribos e gêneros, as características dos frutos aparecem sempre como aspecto relevante. Niedenzu (1928) descreveu cinco tribos para a família, sempre utilizando características dos frutos e a ocorrência das espécies no Novo ou no Velho Mundo. Para a subfamília Planitorae, delimitou-se a tribo Malpighieae, com frutos drupóides, e a tribo Galphimieae, de frutos não alados. Já a subfamília Pyramidotorae foi dividida em três subfamílias: Hiraeae, com espécies cujos frutos apresentam ala lateral; Banisterieae, com frutos de alas dorsais; e Tricomarieae, cujos frutos não são alados mas apresentam cerdas.

Apesar de concordar com a classificação de Niedenzu (1928), Morton (1968) modificou os nomes das subfamílias para que ficassem de acordo com o Código de Nomenclatura Botânica, já que os mesmos faziam menção à morfologia do receptáculo; para as Pyramidotorae, o autor propôs o nome Gaudichaudioideae, enquanto que para a subfamília Planitorae, aplicou Malpighioideae, baseado no gênero *Malpighia*; trataram-se apenas de modificações nomenclaturais, sem qualquer alteração estrutural na classificação.

Outra organização foi proposta para a família por Hutchinson (1967). Nessa classificação, o autor não propôs subfamílias, mas dividiu a família em cinco tribos: Malpighieae, com frutos não alados, de superfície lisa; Tricomarieae, também com frutos não alados, mas de superfície com cerdas; Hiraeae, para espécies de frutos sincárpicos com ala

lateral; Banisterieae, incluindo aquelas de frutos sincárpicos com ala dorsal; e Gaudichaudieae, para as que possuem frutos apocárpicos, com alas de morfologia variada, e presença de flores dimórficas. A classificação de Hutchinson (1967) não é muito diferente da realizada por Niedenzu (1928) e esta continuou sendo a mais aceita.

Analisando a família, Anderson (1977) sugeriu a necessidade de modificação na estrutura de Malpighioideae. Para o autor, o grupo não seria monofilético e alguns gêneros deveriam ser retirados, entre eles *Malpighia*. O principal argumento do autor é de que, apesar de semelhantes, os frutos de *Malpighia* e de *Byrsonima*, ambos drupáceos, mostram-se diferentes em características marcantes, quando analisados com atenção, o que indica origem filogenética distinta.

Assim, Anderson (1977) propôs o nome Byrsonimoideae para a subfamília e excluiu dela seis gêneros (*Malpighia*, *Bunchosia*, *Dicella*, *Thryallis*, *Clonodia* e *Heladena*). A subfamília Gaudichaudioideae passou a se chamar Malpighioideae, por haver recebido o gênero *Malpighia*. O autor ainda dividiu a subfamília Byrsonimoideae em três tribos: Byrsonimeae (frutos indeiscentes, não se separando em mericarpos), Galphimieae (frutos que se separam em mericarpos secos, com uma semente cada, sendo os mericarpos dorsalmente deiscentes) e Acmanthereae (carpelos livres uns dos outros na flor, com estiletos ventrifixos, subapicais a quase basais). Apesar de ter alterado a classificação interna de Malpighiaceae, o autor não fez qualquer menção em seu trabalho sobre a divisão em tribos da subfamília Malpighioideae de Niedenzu (1928), nem publicou qualquer trabalho formal sobre uma nova classificação da subfamília em tribos.

Em seu sistema de classificação, Takhtajan (1997) reconheceu três subfamílias em Malpighiaceae: Malpighioideae, que inclui espécies com frutos não alados, de superfície lisa; Gaudichaudioideae, com espécies apocárpicas, frutos alados e flores dimórficas; Hiraeoideae, para os táxons sincárpicos e com frutos alados. A última subfamília ainda foi dividida em quatro tribos: Hiraeae, Banisterieae, Rhyncophoreae e Tricomarieae.

Tantas classificações diferentes apontam a complexidade na delimitação dos táxons infrafamiliares, sendo que divisões e agrupamentos existentes são baseados principalmente em caracteres macroscópicos dos frutos. A utilização de caracteres dos frutos tem se mostrado complicada, já que, desde o trabalho de Anderson (1977), foi possível verificar que análises superficiais levam a interpretações errôneas sobre homologias nos frutos. A partir de tais problemas, houve a necessidade de novos trabalhos, agora utilizando as novas técnicas de filogenia molecular, para elucidar as relações filogenéticas dentro da família.

Analisando a filogenia das Malpighiaceae, por meio de dados moleculares e morfológicos, Davis et al. (2001) afirmaram que vários táxons tradicionalmente agrupados são não monofiléticos e sugeriram uma nova classificação para a família. Estes autores não delimitaram novas tribos ou subtribos, mas agrupam as espécies em clados monofiléticos informais. O trabalho rejeitou a monofilia de Byrsonimoideae, indicando que os gêneros ali colocados pertencem aos clados Byrsonimóide e Mcvaughióide. Além disso, espera-se que novos estudos filogenéticos enquadrem o grupo das Galphimióides aos clados anteriormente citados. O gênero *Banisteriopsis* está agrupado no clado das Stigmaphylóides, em que a maior parte dos representantes possui mericarpo com ala dorsal dominante e espessada ao longo do bordo adaxial. Como é possível notar, características dos frutos ainda podem agrupar gêneros, embora seja necessário cuidado em sua utilização, adotando-se estudos mais minuciosos dos frutos, em detrimento das análises superficiais que levam em conta apenas o tipo de fruto formado.

Outra análise filogenética na família, simultânea à referida anteriormente, utilizou dados moleculares a partir de sequências *rbcL* e *matK* (Cameron et al. 2001). Segundo os autores, os dados moleculares indicaram que a família Malpighiaceae não pode ser dividida em um pequeno número de subfamílias ou tribos monofiléticas. Assim, estes autores também estabeleceram clados informais, neste caso três clados: Byrsonimóide, Hiraecóide e Banisterióide, sendo que apenas Banisterióide é monofilético. O trabalho verificou que, dos grupos estabelecidos por Niedenzu (1928), apenas a tribo Galphimieae é monofilética; Hiraeae e Banisterieae são parafiléticas, enquanto que Byrsonimeae é polifilética; os gêneros excluídos de Byrsonimoideae por Anderson (1977), realmente não são próximos filogeneticamente à *Byrsonima* e, portanto, continuam em clados distantes.

Ambos os trabalhos de filogenia que levam em consideração dados moleculares (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001) ressaltaram a importância de novos trabalhos para delimitar as relações entre os táxons da família, principalmente revisões dos gêneros que se mostraram não monofiléticos. Estudos detalhados dos caracteres morfológicos dos frutos também são necessários, já que esses dados sempre foram relevantes para a delimitação de táxons na família (Davis et al. 2001).

O sistema de polinização em Malpighiaceae também tem sido alvo de alguns estudos. Há trabalhos que enfocaram a fenologia e sistema de polinização da família, principalmente relacionados com as abelhas polinizadoras dessas espécies (Barros 1992, Sigrist & Sazima 2004, Teixeira & Machado 2000). A relação entre as abelhas e as flores de Malpighiaceae é muito importante, já que apenas as espécies do Novo Mundo apresentam glândulas de óleo e

isso pode significar uma coevolução com as espécies de abelhas coletoras de óleo do Novo Mundo (Anderson 1990).

Byrsonima sericea, por exemplo, floresce de outubro a fevereiro. Suas flores apresentam cinco pares de glândulas. Seus atributos florais enquadram as flores na síndrome de melitofilia (zigomorfia, cor amarela e antese diurna), havendo oferta de óleo como recompensa floral aos visitantes (Teixeira & Machado 2000), ao contrário do néctar que é mais comum. A espécie parece ser autoincompatível. As abelhas fêmeas coletam esse óleo e o oferecem como alimento para suas larvas (Vogel 1974, Teixeira & Machado 2000). As abelhas polinizadoras pertencem à família Anthophoridae, especialmente aos gêneros *Centris* e *Epicharis*, que utilizam as pernas anteriores e medianas para coleta do óleo, explorando todas as glândulas.

Segundo Vogel (1990), é comum no gênero *Byrsonima* a ocorrência de indivíduos com ausência de elaióforos numa mesma população com indivíduos que apresentam tais estruturas. A ausência de elaióforo em espécies do Novo Mundo parece ser uma redução das recompensas florais como estratégia de mimetismo, mantendo as visitas, mas diminuindo o gasto energético (Teixeira & Machado 2000).

As Malpighiaceae são hermafroditas, possuem antese diurna e alta viabilidade polínica (Sigrist & Sazima 2004, Costa et al. 2006). Segundo Costa et al. (2006), *Heteropterys alternifolia* e *Byrsonima* spp. são autoincompatíveis e *Stigmaphyllon paralias* é autocompatível. Os principais polinizadores são abelhas da tribo Centridini, sendo o óleo o principal recurso coletado. Para realizar a coleta do óleo, as abelhas pousam sobre os órgãos sexuais da flor, com a cabeça voltada para a pétala diferenciada; abraçam a flor com as pernas dianteiras e medianas posicionadas entre pétalas e raspam os elaióforos, usando os dois primeiros pares de pernas para extração do óleo. Ao coletar o óleo, as abelhas tocam a parte ventral do tórax nos estigmas e nas anteras, simultaneamente, realizando a polinização (Costa et al. 2006).

Estudando a polinização e a biologia reprodutiva de 12 espécies de Malpighiaceae, Sigrist & Sazima (2004) concluíram que as espécies estudadas são polinizador-dependente, sendo a autopolinização limitada pela hercogamia, protoginia e cutícula estigmática. Esta se rompe apenas em contato com as abelhas polinizadoras, tanto coletoras de óleo quanto de pólen, fazendo com que a superfície estigmática se torne apta à deposição de grãos de pólen.

A origem das Malpighiaceae ainda é incerta, existindo duas hipóteses para explicar seu aparecimento e diversificação: Hipótese Americana e Hipótese Gondwana. Segundo a primeira teoria, as Malpighiaceae teriam surgido no continente americano e os elaióforos

calicinais seriam uma apomorfia para a família. As espécies que ocorrem no Velho Continente teriam surgido a partir de dispersão do fruto de uma espécie americana, quando os dois continentes ainda eram próximos o suficiente para que isso ocorresse. Como as abelhas coletoras de óleo nas Malpighiaceae são exclusivas do continente americano, as espécies do Velho Mundo teriam perdido seus elaióforos. Outro argumento em favor desta hipótese é que a subfamília Byrsonimoide, que ocorre exclusivamente no continente americano, apresenta características consideradas ancestrais, como presença de representantes arbóreos e arbustivos (Anderson 1990), além de aparecer sempre nos clados basais nos estudos filogenéticos com uso de dados moleculares (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001).

A segunda hipótese é defendida por Vogel (1990). Segundo o autor, as Malpighiaceae surgiram no Gondwana, quando os continentes do Velho e Novo Mundo ainda se encontravam unidos. A espécie ancestral deveria apresentar flores não especializadas, sem elaióforos ou nectários, sendo o pólen a recompensa oferecida aos polinizadores. Com a separação dos continentes, as espécies americanas teriam desenvolvido os elaióforos nas sépalas, a partir de nectários extraflorais, semelhantes anatomicamente aos elaióforos, como resultado da coevolução com as abelhas coletoras de óleo.

Segundo Davis et al. (2001), as Malpighiaceae teriam surgido entre 75-65 milhões de anos, na América do Sul, e teriam alcançado o Velho Mundo através do Hemisfério Norte. Se a estimativa da idade de surgimento das Malpighiaceae estiver correta, a origem Gondwânica não pode ter ocorrido, visto que, há 75-65 milhões de anos, os continentes já haviam se separado.

Além disso, a posição dispersa dos gêneros do Velho Mundo, encontrada nas árvores filogenéticas de Davis et al. (2001), corroboram a Teoria Americana da origem da família; esses táxons seriam o resultado de não apenas um, mas de vários eventos independentes de dispersão, pelo menos sete segundo os autores.

Lombello & Forni-Martins (2003) estudaram a relação entre hábito, tipo de fruto e número básico de cromossomos de 35 gêneros de Malpighiaceae, representantes das duas subfamílias. Os autores encontraram a predominância de número cromossômico baseado em $X=5$ ou 10 na subfamília Malpighioideae, sempre relacionados às espécies de lianas com frutos alados, e $X=6$ para Byrsonimoideae, relacionado a espécies com outros hábitos e frutos sem ala. Considerando a origem monofilética da família, os autores admitiram a hipótese da derivação do hábito e tipo de fruto estar diretamente relacionada ao número cromossômico nas Malpighiaceae. Apesar de, recentemente, a família não ser mais dividida em duas subfamílias e sim em clados informais, os gêneros ainda incluídos em Byrsonimoideae *sensu*

Davis et al. (2001) e os gêneros do clado Galphimióide permanecem apresentando número cromossômico $X=6$, 12 ou 24, mostrando que essa característica é consistente para a subfamília Byrsonimoideae *sensu stricto* (Davis et al. 2001). Entretanto, não é possível afirmar se o número cromossômico $X=6$ ou múltiplos é ancestral ou derivado para a família.

2. Morfologia e anatomia de órgãos vegetativos

Estudos anatômicos são bem escassos para a família. Dentre os trabalhos com órgãos vegetativos, podem-se citar a anatomia de estômatos de *Byrsonima coccolobifolia* Kth., relacionando com a de *Annona coriaca* Mart., *Erythroxylum suberosum* St. Hil. e *Ouratea spectabilis* (Mart.) Engl., realizado por Beiguelman (1962) e a anatomia foliar de *Peixotoa hispidula* Juss. (Ferreira 1981).

Os estômatos de *Byrsonima coccolobifolia* são do tipo rubiáceo na classificação das células anexas, porém, em relação às células-guarda, são do tipo gramínea, por apresentarem forma de halteres (Beiguelman 1962).

A folha de *Peixotoa hispidula* apresenta pecíolo com sistema vascular, dispondo-se em cinco feixes vasculares próximo a sua inserção no caule e um único feixe próximo a base da lâmina foliar. Já a lâmina foliar é coberta por cutícula acentuada, assim como são frequentes tricomas tectores do tipo malpighiáceo. O mesofilo é tipicamente dorsiventral, com a ocorrência de estilóides no parênquima paliçádico (Ferreira 1981).

Outra característica vegetativa que tem sido estudada são as glândulas e nectários extraflorais, principalmente relacionando sua anatomia e produtos de secreção com as glândulas calicinais. Em *Galphimia brasiliensis* (L.) Adr. Juss. (Castro et al. 2001), as duas glândulas são semelhantes em forma e em secreção, que é de natureza lipídica e acumula-se no espaço subcuticular. Já em *Hiptage sericea* Hook. (Subramanian et al. 1990), as glândulas peciolares são semelhantes em forma às calicinais, mas a secreção, embora também se acumule no espaço subcuticular, é rica em açúcares e aminoácidos nas peciolares.

Possobom et al. (2010) estudaram as glândulas foliares de *Diplopterys pubipetala* utilizando-se microscopia ótica e eletrônica. As glândulas começam a secretar quando as folhas são jovens e continuam a produzir a secreção rica em glucose até que a folha complete sua expansão. A secreção é coletada por formigas que patrulham os ramos jovens vegetativos e reprodutivos. Através das análises as autoras constataram que as glândulas foliares têm ultraestrutura que as caracterizam como glândulas mistas, entretanto, funcionam como nectários, já que produzem secreção hidrofílica composta principalmente por açúcares.

3. Morfologia e anatomia de órgãos reprodutivos

Como já foi relatado, a morfologia das flores de Malpighiaceae é bastante homogênea, devido principalmente à sua coevolução com abelhas da tribo Centridini, coletoras de óleo (Anderson 1979). A morfologia floral na família foi descrita, principalmente, em trabalhos de taxonomia, em que o objetivo principal era descrever espécies e/ou gêneros (Anderson 1967, 1979, 1981, 1985, 1993, 1994, Gates 1982, Amorim 2002, 2004, Davis 2002). Entretanto, trabalhos com anatomia floral são extremamente escassos, e os poucos existentes têm seu foco especialmente centrado na anatomia das glândulas calicinais. Desta maneira, não se pode afirmar se ocorre na anatomia floral a mesma homogeneidade encontrada na morfologia.

Em Malpighiaceae, há ocorrência de flores cleistógamas nos gêneros *Camarea*, *Janusia*, *Aspicarpa* e *Gaudichaudia* (Mamede 1993), todos pertencentes à tribo Gaudichaudieae, os quais também formam flores casmógamas.

Por um longo período, as flores casmógamas e cleistógamas foram denominadas de flores dimórficas, entretanto esse termo se mostrou inadequado, pois também era utilizado para se referir às flores que apresentavam heterostilia (Uphof 1938). Kuhn (1867), então, propôs o termo *cleistogamismus*, derivado de *kleistos* (fechado) e *gamein* (união), para se referir a este tipo de diferenciação floral. Segundo Uphof (1938), as flores cleistógamas são aquelas em que ocorre fecundação do gameta feminino ainda no botão floral. As diferenças morfológicas entre as flores cleistógamas e casmógamas podem ser mínimas ou muito evidentes, dependendo do grupo vegetal analisado. Nas Malpighiaceae, essas flores são tão diferentes que é difícil determinar a qual grupo natural elas pertencem; as flores cleistógamas da família têm diferenças tão marcantes que as características florais típicas dos gêneros e até da família não são claramente observadas (Uphof 1938).

Laskowski & Bautista (1999) estudaram a anatomia floral de *Malpighia emarginata* DC. e verificaram que a sépala apresenta epiderme (da face adaxial) uniestratificada, com células de tamanho desigual, cutícula delgada e drusas, epiderme (da face) abaxial uniestratificada, de tamanho desigual, parede pouco espessada, cutícula delgada, estômatos paracíticos e pelos malpighiáceos. Seu mesofilo é compacto, de células isodiamétricas com cloroplastos, drusas e feixes vasculares de quatro ordens de complexidade. Ocorrem dez glândulas, com epiderme uniestratificada de células altas, parede e cutícula espessa, em paliçada, mesofilo de parênquima compacto, com células bem vacuolizadas, com drusas e três a cinco feixes vasculares. As pétalas têm epiderme (da face) adaxial com uma camada de células pequenas de parede delgada e cutícula fina, mesofilo compacto com células grandes, possuindo cloroplastos e drusas. Os feixes têm de duas ordens de complexidade. As duas

faces da epiderme possuem estômatos paracíticos e pelos malpighiáceos. O androceu é composto por dez estames, com filetes concrecidos basalmente, formando um tecido único. Um ou dois estames não se abrem, sendo inférteis. Os filetes apresentam epiderme unisseriada de células tabulares, de parede muito espessa, preenchido por tecido parenquimático compacto. As anteras são tetrasporangiadas, sendo que, na porção exterior das anteras, ocorre uma protuberância formada por uma camada de células epidérmicas grandes, de paredes espessas e protoplasma denso. O endotécio apresenta células sem protoplasto, com paredes espessadas perpendicularmente à superfície, aparentando uma rede de fibras anastomosadas. Cada um dos três estiletos tem epiderme unisseriada e é preenchido por tecido fundamental compacto, ocorrendo grandes drusas; na região central do pistilo, ocorrem linhas de tecido de transmissão. O estigma é do tipo comisural, formado por duas ou três camadas de células glandulares. O ovário tem epiderme externa unisseriada, mesofilo ovariano formado por tecido fundamental de células parenquimáticas e dois a três estratos de células alongadas, e epiderme interna unisseriada contornando cada lóculo.

Janusia guaranitica (St. Hil.) Juss. (Lorenzo 1981) apresenta flores casmógamas e cleistógamas, que foram analisadas em sua morfologia, anatomia e vascularização. Os dois tipos florais possuem diversas diferenças entre si, como o número de carpelos, três e dois respectivamente, e o número de estames; enquanto as flores casmógamas apresentam cinco estames férteis, as flores cleistógamas apresentam apenas um estame bastante reduzido. Além disso, as flores casmógamas são diclamídeas e as cleistógamas são monoclamídeas. As flores casmógamas apresentam cálice com cinco sépalas, das quais quatro possuem o que o autor chama de nectários, apesar de ressaltar que podem se tratar de elaióforos; esses “nectários” estão distribuídos aos pares, têm forma elíptica, possuem epiderme secretora com células epidérmicas altas, dispostas em paliçada, com cutícula bem desenvolvida; o restante da estrutura é preenchido por parênquima secretor, onde ocorrem idioblastos taniníferos. A corola é dialipétala e formada por cinco pétalas unguiculadas, com bordo ondulado. O androceu é formado por cinco estames alternipétalos e as anteras são basifixas, com duas tecas e deiscência longitudinal. O gineceu é formado por ovário súpero, composto por três carpelos unidos na porção basal. O estilete é único e ginobásico, sendo originado do carpelo oposto à sépala sem “nectários”. O estilete é maciço, mas existe um cordão central de tecido de transmissão que se comunica com um *compitum* ligando os três carpelos. O estigma é globoso e de superfície papilosa. Já a flor cleistógama apresenta perigônio calicino, com cinco tépalas pequenas e pubescentes, que persistem no fruto maduro. O único estame formado apresenta quatro sacos polínicos e um filamento curto. O gineceu é bicarpelar, gamocarpelar

na base e com os carpelos livres no ápice; não há formação de estilete e o estigma constitui-se de uma zona especializada na parede carpelar próximo ao estame.

A vascularização floral das flores de *J. guaranitica* também foi analisada por Lorenzo (1981). Segundo o autor, ocorre um anel vascular no pedúnculo da flor que emite cinco traços vasculares para o cálice. Na sequência, volta a se estabelecer o anel vascular e este emite mais cinco traços para a corola. Concomitantemente, é emitido um traço vascular para cada sépala, o qual vai irrigar cada par de “nectários”. No caso das flores cleistógamas, são emitidos de três a quatro traços para cada tépala. Logo após, ocorre a formação de cinco traços, que irão irrigar os cinco estames das flores casmógamas, ou dois traços que irão irrigar o único estame das cleistógamas. Por último, o anel vascular fragmenta-se e origina dois feixes laterais e dois ventrais para cada carpelo; estes últimos fundem-se aos pares formando os feixes ventrais no ovário de ambas as flores. São os feixes ventrais de cada carpelo que penetram o funículo e irrigam o óvulo.

Outro trabalho que merece destaque é o realizado por Mamede (1993). Neste trabalho, a autora descreveu a morfologia e anatomia das flores casmógamas e cleistógamas de *Camarea affinis*, bem como o desenvolvimento dos frutos originados dos dois tipos florais. Em *C. affinis*, também ocorrem cinco sépalas, quatro delas com um par de glândulas; as sépalas são compostas por epiderme unisseriada e o mesofilo apresenta várias camadas celulares, que diminuem gradativamente o número em direção ao bordo. As glândulas apresentam epiderme secretora com células altas e estreitas, em paliçada, e cutícula espessa; o restante das glândulas é preenchido por parênquima não secretor. As pétalas possuem nervura mediana mais espessa que a lâmina e recebem dois traços vasculares. O androceu é composto por quatro estames e dois estaminódios, concrecidos na base dos filetes. As anteras são dorsifixas, com duas tecas e deiscência longitudinal. Os sacos polínicos apresentam tamanho diferente entre si, com o mais externo maior que o mais interno. Os estaminódios apresentam-se preenchidos por parênquima, semelhante ao da pétala. Ocorrem três carpelos concrecidos na base, o estilete é único e ginobásico, originando-se do carpelo oposto à sépala sem glândula, o estigma é apical, capitado e papiloso. As flores cleistógamas apresentam cálice com cinco sépalas, todas sem glândulas, e não ocorre corola. Ocorre apenas um estame, com filete e antera bem reduzidos. Há dois carpelos, os quais são livres entre si, e não há estilete e estigma. Os óvulos são únicos nos lóculos e foi observada a formação de saco embrionário. Os dois tipos florais formam samarídeos idênticos morfologicamente.

Galphimia brasiliensis (Castro et al. 2001) tem flores zigomorfas, com cálice possuindo cinco sépalas com glândulas em posição marginal e suprabasal. A corola tem

quatro pétalas laterais ovais e uma posterior oblonga. O androceu tem dez estames com anteras oblongas. Gineceu tricarpelar e triovulado. O fruto é uma cápsula loculicida e septicida. Além das glândulas calicinais, também ocorre um par de glândulas nas folhas. As glândulas da folha e do cálice apresentam organização estrutural e ultraestrutural semelhantes. Elas são sésseis, em formato de taça com uma leve concavidade central; apresentam cutícula delgada e lisa, tecido secretor unisseriado, composto por células alongadas e justapostas em formato de paliçada, delimitando uma região central de células parenquimáticas subglandulares e o suprimento de feixes vasculares. Em microscopia eletrônica de transmissão, observa-se que as células secretoras apresentam abundância de ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndria, golgi, vesículas pequenas e translúcidas, plastídeos e um grande vacúolo contendo substâncias ergásticas. A secreção atinge o espaço apoplástico e se acumula abaixo da cutícula, sendo eliminado através de ruptura mecânica. Tanto nas glândulas calicinais quanto nas foliares, foi observada presença de óleo e os autores acreditam que essas glândulas evoluíram a partir de nectários, sendo ambas estruturas homólogas.

Hiptage sericea (Subramanian et al. 1990) possui tanto glândulas produtoras de óleo quanto nectários extraflorais. As glândulas calicinais produtoras de óleo são sésseis, brilhantes, amarelo-esverdeadas. Ocorrem duas glândulas em cada sépala, com exceção de uma sépala que é aglandular. Três regiões distintas podem ser identificadas nas glândulas lipídica: um tecido epitelial multicelular secretor, um tecido subepitelial e um parênquima subglandular com suprimento vascular.

Em *Diplopterys pubipetala* (Possobom 2008), a epiderme da glândula calicinal é unisseriada, constituída por células colunares dispostas em paliçada; a parede periclinal externa é espessa e contígua à cutícula. A glândula é preenchida por dois tecidos diferenciados: parênquima subepidérmico, com uma a três camadas de células pequenas, justapostas e com os vacúolos preenchidos por substância fenólica e o parênquima subjacente, vascularizado por xilema e floema, e composto por várias camadas celulares com espaços intercelulares amplos. A secreção acumula-se no espaço subcuticular, sendo detectada a presença de substâncias lipídicas. Além das glândulas calicinais, *D. pubipetala* apresenta glândulas nas pétalas e no conectivo (Possobom 2008). As glândulas da pétala posterior são vascularizadas e estruturalmente mais complexas do que as glândulas presentes nas pétalas laterais, que não apresentam vascularização. O conectivo apresenta superfície irregular e é constituído por células epidérmicas secretoras globulares. Todas as glândulas parecem desempenhar importantes papéis na polinização de *D. pubipetala*.

O desenvolvimento do megagametófito e a embriologia de *Hiptage madablota*, *Banisteria laurifolia* e *Stigmaphyllon aristatum* foram estudados por Subba Rao (1939). Essas espécies apresentaram arquespório múltiplo e o tecido nucelar maciço, que se projeta através do tegumento interno. Apenas uma célula-mãe de megásporo desenvolve-se, seu núcleo divide-se meioticamente dando origem ao megásporo com quatro núcleos livres, sem a formação de parede celular, cada núcleo fica posicionado num polo do megásporo, num arranjo em cruz, e então começam a se tornar visíveis vacúolos. Cada núcleo de megásporo divide-se duas vezes, formando um quarteto. O megagametófito apresenta 16 núcleos livres; um núcleo de cada grupo migra para o centro do megagametófito e ocorre celularização do megagametófito, que se apresenta, nesta fase, com quatro aparelhos oosféricos, e uma célula média com quatro núcleos, que se fundem e formam o núcleo secundário. Não ocorre diferenciação do aparelho oosférico funcional, sendo que sua identificação é possível devido à posição micropilar. Das espécies estudadas, *H. madablota* apresenta poliembrião pela proliferação de células calazais, sendo que os sacos embrionários das outras duas espécies acabam sendo degradados, já que não foi observada fecundação.

Cortini (1958), estudando *Malpighia fucata*, também observou um arquespório multicelular, com quatro a seis células arquesporiais, mas apenas uma célula desenvolvendo-se em célula-mãe de megásporo. No caso de *M. fucata*, também ocorre a formação de um megásporo tetranuclear, mas o desenvolvimento do megagametófito pode se apresentar de dois tipos, que o autor chamou de tipo *Penaea* e tipo *Malpighia*. O tipo *Penaea* é o mesmo descrito por Subba Rao (1939) para *Hiptage madablota*, *Banisteria laurifolia* e *Stigmaphyllon aristatum*. Já o tipo *Malpighia* difere do anterior por seus núcleos e, posteriormente, suas células terem arranjo bipolar ao invés do tetrapolar característico do tipo *Penaea*. O autor ainda destacou que a célula-mãe de megásporo parece permanecer em repouso por um longo período, antes de entrar no processo meiótico. Nessa espécie também só é possível identificar o aparelho oosférico funcional pela sua posição micropilar. As células formadas acabam degenerando e não foi observada fecundação; neste caso, a ausência da fecundação provavelmente se deve ao fato do exemplar utilizado para coletas ser proveniente do Horto Botânico de Firenze, onde a abelha polinizadora desta espécie não ocorre.

Os gêneros *Hiptage*, *Banisteria*, *Bunchosia* e *Stigmaphyllon*, estudados por Subba Rao (1937), apresentaram desenvolvimento do megagametófito do tipo *Lilium*, embora a descrição de seu desenvolvimento siga o padrão *Penaea* descrito por Cortini (1958) para *M. fucata*. Subba Rao (1937) ainda destacou que os três núcleos do aparelho oosférico não estão

bem organizados em sinérgides e oosfera e que, invariavelmente, todos os quatro grupos de células degeneram.

Ocorre poliembrionia em *Stigmatophyllum* e *Banisteria*, sendo comum para *Hiptage madablota*. Os embriões têm origem nucelar, como em *Aspicarpa*. Mesmo antes da fusão dos núcleos polares, duas ou mais células nucleares ao redor do saco embrionário dão origem a embriões, por meio de inúmeras divisões celulares. Sementes maduras apresentam dois ou três embriões, sendo que apenas um se desenvolve na germinação (Subba Rao 1937).

Outra espécie estudada foi *Malpighia puniceifolia* (Narasimhachar 1938); seu óvulo é semianátropo, com três ou quatro células arquesporais. Apenas uma delas torna-se célula-mãe de megásporo funcional, sendo que as demais degeneram. A célula-mãe de megásporo se divide meioticamente e desenvolve-se o saco embrionário do tipo *Lilium*; neste caso, o desenvolvimento também pode ser enquadrado no tipo *Penaea* descrito para *M. fucata* (Cortini 1958). Em *M. puniceifolia*, as células do megagametófito maduro também degeneram e não ocorre poliembrionia.

Os trabalhos que descreveram a megasporogênese e megagametogênese na família são restritos a poucos gêneros, são antigos e as imagens são, exclusivamente, desenhos em detalhe. O trabalho mais recente na área é o de Lorenzo (1981), que descreveu, entre outras coisas, o desenvolvimento do megagametófito de *J. guaranitica*, embora também ilustre os resultados com desenhos em detalhe. O arquespório multicelular dá origem a uma célula-mãe de megásporo que, por meiose, origina o megásporo tetranucleado. Ocorre vacuolização, empurrando os núcleos para a periferia, em disposição tetrapolar. As divisões mitóticas no megagametófito em desenvolvimento não são constantes e os megagametófitos apresentam um número muito variável de núcleos, com tamanhos que também variam; segundo o autor, a diferença nos tamanhos dos núcleos pode ser devida à sua ploidia, que seria maior devido à fusão entre núcleos do megagametófito. A única constante observada é a presença de quatro núcleos no polo micropilar, onde se diferenciam duas sinérgides e uma oosfera. O número restante de núcleos é variável, bem como o tamanho do núcleo da célula média. Também foram observados sacos embrionários em desorganização e a presença de fecundação. Apesar de não ser objetivo do trabalho, o autor destacou que os sacos embrionários das flores cleistógamas de *J. guaranitica* apresentaram os núcleos menos numerosos, quando comparados com as flores casmógamas, e que não foi observado estado de desorganização nesses megagametófitos. Nas flores cleistógamas, apesar da presença de embrião, não foi observada a fecundação, o que indicaria, segundo Lorenzo (1981), a origem apomítica do embrião.

Os gêneros da família que não pertencem à tribo Gaudichaudieae não possuem registro de cleistogamia, entretanto diversos trabalhos têm indicado a possível formação de embrião por meio de apomixia. Subba Rao (1939) relatou a ausência de fecundação, embora haja produção de embrião em *H. madablota*. A ocorrência de embrião formado por apomixia foi sugerida para *J. guaranítica* (Lorenzo 1981) e *Thryallis glauca* Kuntze (Singh 1959). Além disso, Souto & Oliveira (2008) identificaram a presença de zigoto embrionário em óvulos retirados de botões florais em *Banisteriopsis campestris*. No trabalho supracitado, as autoras não objetivaram identificar a origem do embrião formado, tendo sido destacada a importância de trabalhos futuros relacionados à embriologia *stricto sensu* de espécies de Malpighiaceae.

Os frutos de Malpighiaceae apresentam tipologia e morfologia bastante variada, ocorrendo frutos secos e carnosos, deiscentes e indeiscentes. Os padrões de evolução de fruto nas Malpighiaceae não são completamente entendidos. Apesar de terem sido muito usados na taxonomia familiar, os frutos têm causado problemas na construção de uma classificação infrafamiliar (Davis et al. 2001).

Frutos secos e indeiscentes, não alados, ocorrem em *Diacidia*, *Blepharandra*, *Burdachia*, *Gladonia*, *Acmanthera*, *Pterandra* e *Coleostachys* (Anderson 1977). *Banisteriopsis* (Gates 1982, Souto 2007), *Heteropterys* (Amorim 2002, 2004), *Mascagnia* (Anderson & Davis 2005), *Tetrapterys* (Cuatrecasas & Croat 1980), *Janusia* (Lorenzo 1981), *Camarea* (Mamede 1990), entre outros. Frutos secos com deiscência loculicida ocorrem, mas a deiscência não é suficiente para liberar a semente; nestes frutos, a base de cada mericarpo apresenta uma cavidade vazia ou preenchida por aerênquima. Esse tipo de fruto ocorre em *Galphimia*, *Verrucularia*, *Lophanthera* e *Spachea* (Anderson 1977). Nesses casos, é difícil determinar se o fruto é loculicida ou tardiamente loculicida, sendo necessário um exame mais detalhado desses gêneros para elucidar essa questão.

Já os frutos carnosos são característicos dos gêneros *Malpighia*, *Byrsonima* e *Bunchosia* (Anderson 1977). Tradicionalmente, esses três gêneros eram enquadrados na mesma subfamília, por apresentarem frutos drupóides (Niedenzu 1928). No entanto, apesar do tipo comum de fruto, os gêneros apresentam diferenças marcantes que indicam uma origem diversa. *Byrsonima* apresenta pirênio único formado pela junção dos três endocarpos, sendo seu pirênio muito similar ao fruto de *Blepharandra*, que é seco e não alado, do qual o fruto de *Byrsonima* deve ter se originado, desenvolvendo um tecido carnosos externo em resposta à pressão de seleção por pássaros pequenos. Já em *Malpighia*, encontram-se três pirênios separados, sem continuidade do endocarpo; além disso, há duas alélulas ou costelas longitudinais laterais, uma alélula ou costela dorsal e, normalmente, pequenas costelas

paralelas ou transversais em cada pirênio; isso indicaria a origem a partir de um fruto alado, provavelmente do gênero *Mascagnia*. *Bunchosia* tem dois ou três pirênios livres entre si e de parede cartilaginosa; segundo Anderson (1977), esse fruto certamente evoluiu a partir de outro ancestral que não o de *Byrsonima* ou *Malpighia*, representando outro caso de evolução paralela na família. Assim, os frutos carnosos devem ter surgido várias vezes durante a evolução das Malpighiaceae, provavelmente com o advento dos pequenos pássaros (Anderson 1977). Essa idéia é reforçada pelos dados moleculares já que em análises dessa natureza, os gêneros com frutos carnosos encontram-se aninhados em clados de frutos secos (Davis et al. 2001).

Para Davis et al. (2001), o fruto ancestral da família não deve ter apresentado ala e o aparecimento de frutos alados ocorreu bem na base da árvore filogenética de Malpighiaceae. Dentro do clado das Malpighioideae, as alas aparentemente têm sido perdidas em várias linhagens (Davis et al. 2001). Gêneros com frutos que apresentam pelos e cerdas vascularizados também aparecem em clados distintos na árvore da família, indicando que esse tipo de fruto apareceu, pelo menos, três vezes durante a diversificação da família (Davis et al. 2001). A maioria dos gêneros com frutos que possuem ala dorsal dominante apareceram na clado Stigmaphyllóide de Davis et al. (2001), mas a ala dorsal também apareceu em outros quatro clados.

Com isso, nota-se que tem sido dada muita importância para os caracteres similares dos frutos, que agora parecem ser homoplásticos, ou seja, apareceram independentemente mais de uma vez na evolução do grupo e evoluíram paralelamente.

Segundo Davis et al. (2001), análises detalhadas de morfologia e ontogênese de frutos, especialmente os considerados homoplásticos, são claramente necessárias para aumentar o entendimento da evolução das Malpighiaceae.

Como em todos os aspectos dos órgãos reprodutivos, são poucos os trabalhos que estudam os frutos e sementes da família em detalhe, a maioria deles incluindo espécies com interesse comercial, como é o caso da acerola, *Malpighia* sp. (Nacif et al. 1996, Laskowski & Bautista 1999, 2000, Costa et al. 2003) e do murici, *Byrsonima* sp. (Gusmão et al. 2006, Giraldo-Zuniga et al. 2006, Souto & Oliveira 2005).

Desses trabalhos, vale destacar o que teve como objetivo descrever a anatomia e ontogênese dos frutos de *M. emarginata* (Laskowski & Bautista 2000). Essa espécie apresenta fruto pequeno com exocarpo unisseriado, mesocarpo externo com 18 a 20 camadas de células parenquimáticas, mesocarpo interno formado por células pétreas isodiamétricas isoladas, ou grupos de esclereídes fibriformes, e endocarpo com duas ou três camadas de células

subepidérmicas que revestem a cavidade seminal, ocorrendo divisão anticlinal. Nos frutos médios, ocorre aumento no tamanho e número das células parenquimáticas do mesocarpo externo; no mesocarpo interno, observa-se maior diferenciação de esclereídes, que penetram no mesocarpo externo dando uma conformação de ala. Quando maduros, os frutos apresentam exocarpo unisseriado, mesocarpo externo com 28 a 31 camadas de células parenquimáticas grandes, mesocarpo interno esclerenquimático constituído, em cada carpelo, por esclereídes solitárias ovadas e abundantes esclereídes fibriformes em forma de “L”, dispostas umas sobre as outras em estratos irregulares que penetram no parênquima, formando um pirênio alado; o endocarpo tem células esclerenquimáticas formando duas a três camadas compactas, que limitam internamente a cavidade seminal. Nota-se que, na formação do pirênio, participam o mesocarpo interno, chamado pelos autores de meristema ventral, e a epiderme interna do carpelo.

O fruto de *Lophantera lactecens* Ducke, estudado por Paoli (1997), é derivado de um ovário súpero, tricarpelar e trilocular, que se torna esquizocárpico na maturidade, formado por três cocas. No ovário, a epiderme externa é unisseriada e cuticularizada, o mesofilo ovariano apresenta duas camadas de células achatadas, e a epiderme interna tem três camadas de células menores. Durante o desenvolvimento, não ocorrem alterações significativas na anatomia. Na maturidade, o fruto apresenta exocarpo unisseriado e cuticularizado; o mesocarpo é parenquimático, constituído por cerca de dez camadas de células grandes, apresentando drusas e laticíferos; a camada mais interna do mesocarpo é cristalífera, com cristais prismáticos; o endocarpo constitui-se de esclereídes e fibras de paredes espessadas, pontoadas e lignificadas.

Byrsonima intermedia A. Juss. tem ovário súpero, tricarpelar e trilocular, com um óvulo por lóculo e diferencia-se em um fruto tipo drupóide, carnoso, com pirênio lenhoso formando três lóculos. O fruto maduro apresenta exocarpo unisseriado; o mesocarpo externo parenquimático, ocorrendo esclereídes dispersas na região apical do fruto; é nessa camada que se encontra a suculência característica do fruto; no mesocarpo interno, ocorrem várias camadas de esclereídes alongadas em diversos sentidos; o endocarpo é multisseriado, com diversas camadas de esclereídes alongadas longitudinalmente. Assim, o pirênio do fruto é composto pelo mesocarpo interno e pelo endocarpo (Souto & Oliveira 2005).

Pela análise da estrutura e do desenvolvimento do pericarpo de três espécies de *Banisteriopsis* e de *Diplopterys pubipetala*, Souto (2007) corroborou a mudança de gênero de *D. pubipetala*, anteriormente pertencente a *Banisteriopsis*. Uma das características que diferencia os dois gêneros é a presença de três feixes vasculares ventrais na base do ovário das

espécies de *Banisteriopsis*, enquanto que *D. pubipetala* apresenta seis feixes ventrais na base do ovário. Outra característica marcante é a presença de *seed cushion* em *D. pubipetala*, estrutura inédita para Malpighiaceae, enquanto que as espécies de *Banisteriopsis* não apresentaram tal característica. O fruto das quatro espécies é esquizocárpico, formado por três samarídeos, cada um com uma ala dorsal, e *D. pubipetala* tem alélulas no núcleo seminífero. No núcleo seminífero, o exocarpo é unisseriado; o mesocarpo externo e médio, antes parenquimáticos, colapsam na maturidade; imersos no mesocarpo médio, ocorrem fibras gelatinosas; em *B. campestris*, o parênquima também se lignifica, constituindo uma camada contínua lignificada. O mesocarpo médio de *D. pubipetala* é formado por um maciço de células lignificadas e alongadas. O mesocarpo interno das *Banisteriopsis* possui células lignificadas e alongadas no sentido tangencial. Em *D. pubipetala*, as células são parenquimáticas e encontram-se totalmente comprimidas na maturidade. O endocarpo é multisseriado nas *Banisteriopsis* e torna-se espessado e lignificado, enquanto, em *D. pubipetala*, o endocarpo é formado pelo amplo aerênquima, o *seed cushion*, comprimido na maturidade. A ala é composta por exocarpo unisseriado, mesocarpo externo e mesocarpo médio, este aerenquimático.

Segundo Corner (1976), os óvulos de Malpighiaceae são únicos em cada lóculo, anátropos ou subcampilótropos, suspensos, bitegmentados e crassinucelados, e suas sementes são pequenas, com cerca de 3 a 6 mm de comprimento, de formato obcônico ou piriforme, mais ou menos exalbuminosas.

Como no caso dos frutos, poucas sementes de Malpighiaceae foram estudadas em detalhe, mostrando a importância de novos investimentos nessa área. As raras sementes estudadas apresentaram um padrão de tegumento bastante reduzido, porém com tégmen fibroso e o endotégmen esclerificado. Corner (1976) destacou que uma ou ambas características podem desaparecer na ontogênese tegumentar.

Lophantera lactecens (Paoli 1997) apresentou óvulos anátropos, bitegmentados e crassinucelados. Suas sementes são exalbuminosas e bitegmentadas, com testa unisseriada e tégmen diferenciado em exo, meso e endotégmen; os cotilédones são mucilaginosos.

Byrsonima intermedia possui óvulos subcampilótropos, bitegmentados, com nucelo projetado através da micrópila; hipóstase e epístase são observadas. A semente apresenta tegmentos e endosperma reduzidos. O embrião tem eixo hipocótilo-radícula contínuo, com dois cotilédones, enrolados em espiral (Souto & Oliveira 2005).

Os óvulos de *Banisteriopsis campestris*, *B. oxyclada*, *B. stellaris* e *Diplopterys pubipetala* (Souto & Oliveira 2008) são suspensos, subcampilótropos, bitegmentados e

crassinucelados. O tegumento interno é mais curto que o externo, que forma a micrópila. O nucelo é muito amplo e se projeta pela micrópila, ficando em contato direto com o obturador funicular. As sementes maduras das espécies de *Banisteriopsis* e de *Diplopterys* são pequenas, paquicalazais e exalbuminosas. O envoltório seminal encontra-se colapsado, distinguindo-se apenas a exotesta com compostos fenólicos e resíduos da vascularização; o embrião preenche toda a cavidade seminal e tem eixo embrionário reto e curto, com cotilédones carnosos bem desenvolvidos.

O óvulo de *Malpighia glabra* L., descrito por Nacif et al. (1996), é subcampilótropo e bitegmentado, sendo que apenas um ou dois óvulos dos três óvulos existentes no ovário desenvolvem sementes. A semente madura é exalbuminosa e sua testa não se especializa, podendo-se romper e expor o embrião, que preenche totalmente a cavidade seminal. Os cotilédones são foliáceos, ricos em proteínas e lipídeos; a plúmula é indiferenciada e o eixo hipocótilo-radícula é curto.

Malpighia emarginata (Laskowski & Bautista 2000) possui um óvulo por lóculo, anátropo, bitegmentado, crassinucelado, com funículo bem desenvolvido. O funículo apresenta epiderme uniestratificada, preenchido por tecido fundamental compacto e com um feixe vascular central. O tegumento externo é mais desenvolvido e cobre o interno. Segundo os autores, o gineceu apresenta caracteres considerados altamente especializados, como o desenvolvimento proeminente do tegumento externo do óvulo e vascularização restrita ao funículo.

Lorenzo (1981), ao estudar as flores e o desenvolvimento do megagametófito e fecundação de *J. guaranitica*, fez algumas considerações com relação às sementes. Segundo o autor, o endosperma é nuclear e completamente consumido durante a formação do embrião, portanto a semente torna-se exalbuminosa.

4. Tribo Gaudichaudieae

Desde Jussieu (1843), a tribo Gaudichaudieae é considerada um agrupamento natural, já que suas espécies apresentam redução do androceu, carpelos livres, unidos por um eixo central comum, e a ocorrência de flores casmógamas e cleistógamas muito semelhantes entre si na morfologia e capacidade de produzir frutos.

Os representantes desta tribo apresentam tendência ao hábito herbáceo, figurando suas espécies entre os membros menos lenhosos da família (Davis et al. 2001). Segundo Hutchinson (1967), fazem parte das Gaudichaudieae: *Aspicarpa*, *Camarea*, *Gaudichaudia*, *Janusia*, *Rosanthus* e *Schwannia*. Já de acordo com Anderson (1985), fazem parte da tribo os

gêneros *Aspicarpa*, *Fimbriaria*, *Gaudichaudia*, *Janusia*, *Peregrina* e *Schwannia*. Dada a relevância e maior atualidade dos trabalhos de Anderson, esta classificação será a adotada no presente trabalho.

Como já reconhecido desde Jussieu (1843), a monofilia da tribo Gaudichaudieae é facilmente reconhecida pelas características florais distintas e, mais recentemente, tem sido fortemente comprovada por análises filogenéticas a partir de sequências nucleotídicas cloroplásticas *ndf-F* e *trnl-F* (Davis et al. 2001) e análises usando sequências de *matK* e *rbcL*. (Cameron et al. 2001). Vale destacar que a tribo é a única que ainda é considerada monofilética, após a publicação das análises moleculares de Cameron et al. (2001) e Davis et al. (2001).

5. *Camarea* A.St.-Hil.

O gênero *Camarea* tem distribuição restrita à América do Sul, ocorrendo principalmente em áreas de campo, cerrado e campo rupestre (Mamede 1990).



Camarea linearifolia

Suas espécies são caracterizadas pelo hábito subarbustivo, com sistema subterrâneo do tipo xilopódio, pivotante ou rizoma; as folhas são simples, inteiras, de filotaxia oposta-cruzada, subopostas ou 3-4-verticiladas; ocorrem duas glândulas na base do limbo; as flores casmógamas são pedunculadas, apresentam cinco sépalas, quatro delas com glândulas, cinco pétalas amarelas, unguiculadas, sendo a pétala posterior mais ereta; o androceu é constituído por quatro estames férteis e dois estaminódios; o gineceu é tricarpelar, trilocular, com um óvulo por lóculo; os frutos são esquizocárpicos, indeiscentes, cada mericarpo podendo ou não apresentar ala dorsal (Mamede 1990).

Nas recentes análises moleculares (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001), espécies de *Camarea* não foram incluídas, de maneira que não é possível confirmar sua monofilia, ou identificar os gêneros mais próximos dentro da tribo Gaudichaudieae.

6. *Janusia* A. Juss.

Janusia é um gênero de Gaudichaudieae ainda não resolvido filogeneticamente. Entretanto, os estudos de filogenia com dados moleculares indicam que o gênero não é monofilético (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001). Em ambos os trabalhos, foram incluídas



Janusia mediterranea

quatro espécies de *Janusia*, duas espécies norte-americanas e duas espécies sul-americanas; as espécies simpátricas são irmãs filogeneticamente, entretanto esses dois agrupamentos não apareceram ligados nas árvores filogenéticas, demonstrando que o gênero *Janusia* não é



Janusia occhionii

monofilético (Cameron et al. 2001). Apesar de todas as análises das espécies norte-americanas não estarem diretamente ligadas às espécies sul-americanas, a monofilia de *Janusia* ainda não pode ser rejeitada, devendo haver mais investigações a respeito (Davis et al. 2001).

7. *Mascagnia* Bert. ex Colla

Mascagnia, como descrito primeiramente por Niedenzu (1928), é representado por um agrupamento heterogêneo de cerca de 100 espécies com frutos alados (Anderson & Davis 2005). Anderson (1980) descreveu o gênero como um dos mais diversos das Malpighiaceae, enquanto que análises filogenéticas moleculares têm demonstrado que o gênero é altamente polifilético (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001). No trabalho de Davis et al. (2001), as sete espécies de *Mascagnia* amostradas aparecem em, pelo menos, quatro clados distintos, indicando que *Mascagnia* necessita de urgente revisão taxonômica.



Mascagnia cordifolia

As espécies compreendidas em *Mascagnia* estão distribuídas do México até a Argentina, sendo que sua maior diversidade ocorre no Brasil (Anderson 2001). Seus frutos são sâmaras com alas membranosas e orbiculares (Anderson & Davis 2005). A espécie selecionada para este trabalho, *Mascagnia cordifolia*, foi incluída por Anderson & Davis (2005) em um grupo de cinco espécies sul-americanas que apresentam um par de glândulas na base do pecíolo, o “*Mascagnia cordifolia* group”, que representa um dos grupos dentro de *Mascagnia stricto sensu*.

8. *Tetrapteryx* A. Juss.

O gênero *Tetrapteryx* possui cerca de 90 espécies, distribuídas em regiões tropicais na América Central e América do Sul (Cuatrecasas & Croat 1980). A maioria das espécies são lianas com flores amarelas, fruto esquizocárpico formado por dois ou três samarídeos, em que



Tetrapteryx chamaecerasifolia

cada samarídeo apresenta uma ala dorsal estreita e quatro alas laterais formando um “X” (Cuatrecasas & Croat 1980).



Tetrapteryx chamaecerasifolia

9. Objetivos

A presente proposta constitui a continuidade de estudos prévios realizados durante a Iniciação Científica e o Mestrado com espécies de Malpighiaceae dos gêneros *Byrsonima* (*B. basiloba* e *B. intermedia*), *Banisteriopsis* (*B. campestre*, *B. oxyclada*, e *B. stellaris*) e *Diplopterys* (*D. pubipetala*), agora incluindo espécies de *Camarea* (*C. linearifolia*), *Janusia* (*J. mediterranea* e *J. occhionii*), *Mascagnia* (*M. cordifolia*) e *Tetrapteryx* (*T. chamaecerasifolia*).

O objetivo geral desta tese é realizar estudos morfológicos, anatômicos e ontogenéticos de órgãos reprodutivos com espécies de *Camarea*, *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapteryx* (Malpighiaceae). Especificamente, pretende-se:

1. Descrever a anatomia floral, com ênfase na vascularização, de cinco espécies de Malpighiaceae (*Camarea linearifolia*, *Janusia mediterranea*, *J. occhionii*, *Mascagnia cordifolia* e *Tetrapteryx chamaecerasifolia*), buscando correlacionar esses aspectos com o significado evolutivo e ecológico das flores de Malpighiaceae.
2. Descrever a megasporogênese, megagametogênese e fecundação de *Janusia occhionii*, identificando o padrão de desenvolvimento e esclarecendo a possível ocorrência de apomixia e a formação de endosperma.
3. Analisar a morfologia, anatomia e ontogênese dos frutos e sementes de *Janusia mediterranea*, *J. occhionii*, *Mascagnia cordifolia* e *Tetrapteryx chamaecerasifolia*, comparando-as entre si e com outras Malpighiaceae; a partir da análise destes dados, pretende-se verificar a existência de padrões estruturais no desenvolvimento dos frutos e sementes, bem como fornecer caracteres que auxiliem no entendimento da evolução do fruto na família.

Conforme estabelecido pelo Conselho do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos durante a execução deste Projeto de Doutorado foram reunidos em artigos científicos para publicação:

Capítulo I: Vascularização floral de espécies de *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapteryx* e seu valor na filogenia de Malpighiaceae. Redigido segundo as normas da *Plant Biology*.

Capítulo II: Anatomia floral comparada de cinco espécies de Malpighiaceae. Redigido segundo as normas da *Comptes Rendus Biologies*.

Capítulo III: Megasporogênese, megagametogênese e fecundação simples em *Janusia occhionii*: um caso de ausência de célula média em Malpighiaceae neotropical. Redigido segundo as normas de *Annals of Botany*.

Capítulo IV: Anatomia e ontogênese do pericarpo de espécies de *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapteryx* e seu potencial uso filogenético em Malpighiaceae. Redigido segundo as normas da *Flora*.

Capítulo V: Estrutura e desenvolvimento de sementes em espécies de Malpighiaceae: perisperma como principal reserva para a embriogênese e outras considerações filogenéticas. Redigido segundo as normas do *Australian Journal of Botany*.



Capítulo I

Mascagnia cordifolia

Research paper

Vascularização floral de espécies de *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapterys* e seu valor na filogenia de Malpighiaceae

L. S. Souto¹ & D. M. T. Oliveira^{2*}

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil

2 Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Título abreviado: Vascularização floral de Malpighiaceae

Palavras-chave

Janusia mediterranea, *Janusia occhionii*, *Mascagnia cordifolia*, *Tetrapterys chamaecerasifolia*, conação, redução, glândula calicinal

Correspondência

D.M.T. Oliveira, Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; telefone: 55-31-3409-2673; fax: 55-31-3409-2684. E-mail: dmtoliveira@icb.ufmg.br

RESUMO

Malpighiaceae é considerada monofilética, mas sua classificação intrafamiliar é conflitante. Gaudichaudieae é a única tribo que se mostra monofilética em análises moleculares. Análises de vascularização floral permitem identificar reduções, conações e adnações, podendo revelar passos evolutivos anteriores à morfologia floral atual, motivo pelo qual desperta grande interesse. Neste trabalho, analisou-se a vascularização floral de *Janusia ochionii*, *J. mediterranea* (Gaudichaudieae), *Mascagnia cordifolia* e *Tetrapterys chamaecerasifolia*, sendo o material processado usualmente para microscopia de luz. Observou-se o padrão geral, com três traços irrigando cada sépala e um traço cada pétala e estame; *M. cordifolia* constitui exceção, visto que a sépala aglandular recebe apenas um traço, mas compartilha os traços laterais das sépalas adjacentes. Não é emitido traço dorsal de carpelo, ocorrendo apenas células meristemáticas; são emitidos três complexos intercarpelares, que se dividem em seis feixes ventrais, exceto em *J. ochionii*; posteriormente, os dois feixes ventrais de cada carpelo fundem-se. O feixe ventral de cada carpelo migra completamente, irrigando o óvulo. *Mascagnia cordifolia* possui conação entre glândulas da sépala anterior e das adjacentes; em *T. chamaecerasifolia* e nas *Janusia*, houve redução das glândulas da sépala anterior. Tal perda das glândulas parece ter ocorrido, pelo menos, duas vezes durante a evolução das Malpighiaceae, já que este trabalho registra dois processos distintos, em grupos não relacionados, os quais culminam em aparência similar. A avaliação do número de glândulas calicinais e dos processos de redução nas espécies com menos de dez glândulas parece relevante para a compreensão da filogenia da família.

INTRODUÇÃO

A família Malpighiaceae é considerada monofilética, sendo esta condição confirmada tanto em estudos de base morfológica (Anderson 1979) quanto molecular (Chase *et al.* 1993; APG 2009). Já as relações filogenéticas dos táxons intrafamiliares são bastante controversas, existindo quatro classificações distintas (Niedenzu 1928; Hutchinson 1967; Anderson 1977; Takhtajan 1997).

Tradicionalmente, caracteres carpológicos foram usados na delimitação de subfamílias, tribos e gêneros. Contudo, estudos recentes demonstraram que nem sempre esses caracteres são confiáveis, principalmente quando as análises não levam em conta muitos detalhes.

Estudos filogenéticos com dados moleculares do início da década tentaram elucidar as relações taxonômicas na família (Cameron *et al.* 2001; Davis *et al.* 2001). Segundo estes, é difícil dividir Malpighiaceae em um número pequeno de subfamílias e tribos, sendo preferível reconhecer clados informais, não necessariamente monofiléticos.

Davis *et al.* (2001) dividiram a família em dois clados: Bysonimoideae e Malpighioideae, enquanto que Cameron *et al.* (2001) propuseram três clados informais: Byrsonimóide, Hiraeóide e Banisterióide. Em ambos os trabalhos, foram definidos muitos clados com fraco suporte e alguns gêneros encontram-se em posições conflitantes nos dois trabalhos, como é o caso do gênero *Tetrapteryx* A. Juss. O gênero é colocado por Davis *et al.* (2001) como irmão de espécies de *Mascagnia* Bert. ex Colla (*lato sensu*), *Jubelina* A. Juss. e *Hiptage* Gaertn., num clado denominado Tetrapteróide, dentro de Malpighioideae. Cameron *et al.* (2001), no entanto, colocaram *Tetrapteryx* como irmão de *Hiptage* e *Mascagnia anisopetala* Griseb., no clado Hiraeóide. Como o suporte para os clados em ambos os trabalhos é fraco, é possível que o gênero passe a ser enquadrado ainda em outro clado, após novas análises.

Mascagnia, gênero considerado o mais diverso da família (Anderson 1980), provavelmente é polifilético (Cameron *et al.* 2001; Davis *et al.* 2001). As sete espécies do gênero amostradas por Davis *et al.* (2001) apareceram em, pelo menos, quatro clados distintos. Novas análises taxonômicas têm revisto o grupo, considerando apenas a secção *Mascagnia* como parte monofilética do gênero (Anderson & Davis 2005). Nas análises filogenéticas moleculares, *Mascagnia sepium* Griseb. (representante da sect. *Mascagnia*) aparece em um clado não totalmente resolvido, que inclui também representantes dos gêneros *Triopteryx* A. Juss., *Rhynchophora* Arènes, *Malpighia* Plum ex L., *Triaspis* Burch. e *Caucanthus* Forssk. (Davis *et al.* 2001).

Tanto em Cameron *et al.* (2001) quanto em Davis *et al.* (2001), Gaudichaudieae é a única tribo tradicional que se mostrou monofilética, apesar de alguns de seus gêneros não serem monofiléticos, como é o caso de *Janusia* A. Juss. *Janusia linearis* Wiggins e *Janusia californica* Benth. são irmãs, *Janusia anisandra* (A. Juss.) Griseb. in Mart. e *Janusia mediterranea* (Vell.) W.R. Anderson também são intimamente ligadas, entretanto os dois grupos não são diretamente relacionados, não constituindo, portanto, grupo monofilético.

Diante da multiplicidade de interpretações e questões filogenéticas não esclarecidas, fica clara a necessidade de estudos adicionais que auxiliem no

entendimento dessas relações, tanto utilizando dados moleculares quanto, principalmente, dados morfológicos obtidos em análises detalhadas de anatomia e ontogênese.

A estrutura floral das Malpighiaceae é tida como bastante homogênea e, portanto, análises de suas pequenas variações podem ser úteis na delimitação dos táxons e esclarecimento de relações entre eles. Mais especificamente, a análise comparada da vascularização floral é útil ao permitir identificar reduções, conações e adnações (Puri 1951; Gifford & Foster 1989). Além disso, como a vascularização é mais conservada que a morfologia externa (Puri 1951), pode revelar passos evolutivos anteriores à morfologia floral atual das espécies.

Partindo-se desses pressupostos, o objetivo do trabalho foi analisar, comparativamente, a vascularização floral de espécies de Malpighiaceae, pertencentes aos gêneros *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapetrys*, fornecendo dados que possam esclarecer a posição filogenética das espécies e embasar futuros trabalhos filogenéticos com as Malpighiaceae.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas as seguintes espécies: *Janusia ochionii* W.R.Anderson, *Janusia mediterranea* (Vell.) W.R.Anderson, *Mascagnia cordifolia* (A.Juss.) Griseb e *Tetrapetrys chamaecerasifolia* A. Juss., pertencentes a Malpighiaceae. Ramos férteis foram herborizados e inseridos no Herbário BOTU ou SP, registrados sob os números R. Sebastiani et al. 306, BOTU 25.788, BOTU 25.787 e BOTU 25.789 respectivamente.

Amostras de botões florais foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940) e armazenadas em etanol 70%. Em seguida, foram desidratadas em série etílica e infiltradas em metacrilato (Paiva *et al.* 2011). As secções seriadas, obtidas com 8 μ m de espessura, foram coradas com Azul de Toluidina 0,05%, em tampão acetato, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964, modificado) e montadas em resina sintética.

Os resultados obtidos foram registrados digitalmente, utilizando-se câmera Olympus acoplada a microscópio de luz Olympus. Os diagramas foram produzidos sobre as fotomicrografias, utilizando-se o Corel Photo-Paint X14[®] (Corel Corporation).

RESULTADOS

Janusia mediterranea

Na base do receptáculo, a vascularização floral está organizada em um eustelo (Fig. 1A). Deste eustelo, é emitido um traço vascular para cada sépala (Fig. 1B). Em sequência, são emitidos outros dois traços para cada sépala, laterais aos já emitidos (Fig. 1C). Assim, cada sépala recebe três traços vasculares. Concomitantemente, observa-se a delimitação das glândulas calicinais (Fig. 1B-C).

Nesta altura, notam-se dois círculos vasculares (Fig. 1C-D), o externo composto pelos traços das sépalas, que se multiplicam, e o interno composto pelo eustelo original. Assim que essa configuração é visualizada, ocorre a emissão de um traço para cada uma das cinco pétalas (Fig. 1D).

Na sequência, começa a delimitação da unha de cada pétala, bem como a individualização das sépalas (Fig. 1E). São, então, emitidos seis traços vasculares, um para cada estame, e começa a ocorrer a delimitação dos estames e do contorno do ovário (Fig. 1F-G). Dos seis estames presentes, quatro estames ficam voltados para sépalas e dois para pétalas.

No ápice do receptáculo, são emitidos dois traços vasculares laterais e um complexo ventral intercarpelar por carpelo (Fig. 1G). Na região dorso-lateral de cada carpelo não se distingue um traço dorsal, mas ocorre um complexo pouco distinto, composto por procâmbio e meristema fundamental (Fig. 1G).

Na região mediana do ovário, o complexo ventral intercarpelar divide-se e os dois feixes ventrais de cada carpelo aproximam-se e fundem-se, formando três feixes ventrais no ovário, um por carpelo. Próximo ao ápice, os feixes ventrais migram inteiramente para o funículo (Fig. 1I), constituindo a vascularização do único óvulo em cada lóculo.

Um único estilete é formado, constituindo a continuidade do carpelo anterior; sua vascularização é composta pelos dois cordões procambiais laterais deste carpelo (Fig. 1J).

Janusia occhionii

A vascularização floral da base do receptáculo (Fig. 2A) e das sépalas (Fig. 2B) é similar a *J. mediterranea*, embora não sejam emitidos traços vasculares para a sépala posterior.

Na sequência, observa-se a delimitação das glândulas calicinais (Fig. 2C) e, concomitantemente, os três traços de cada sépala lateral aproximam-se e subdividem-se em um número variável de traços (Fig. 2C-E).

Como em *J. mediterranea*, notam-se dois círculos vasculares, o externo composto pelos traços das sépalas e o interno composto pelo eustelo original (Fig. 2E).

Quando a unha de cada pétala começa a delimitar-se, ocorre a emissão de um traço para cada uma das cinco pétalas (Fig. 2F). Nesse momento, são emitidos os traços laterais da sépala posterior juntamente com o traço das pétalas adjacentes, formando dois complexos (Fig. 2E).

A seguir, os traços vasculares das sépalas ramificam-se e alguns migram para a glândula (Fig. 2G), aspecto não registrado em *J. mediterranea*.

São, então, emitidos seis traços vasculares, um para cada estame (Fig. 2G-H). A partir daí, inicia-se a delimitação dos estames e do contorno do ovário (Fig. 2G-H).

No ápice do receptáculo, os últimos seis traços constituem os traços ventrais dos três carpelos (Fig. 2I). Na região dorsal de cada carpelo, não se distingue traço dorsal, mas ocorre um complexo celular pouco distinto, composto por procâmbio e meristema fundamental (Fig. 2I). O ovário individualiza-se e os lóculos ficam definidos.

Da região dorso-lateral meristemática de cada carpelo, destacam-se dois cordões procambiais que constituirão os feixes vasculares laterais de cada carpelo (Fig. 2I).

Posteriormente, na região mediana do ovário, os dois feixes ventrais de cada carpelo aproximam-se e fundem-se, como visto em *J. mediterranea*, formando os três feixes ventrais que migram inteiramente para o funículo, irrigando o óvulo.

O estilete forma-se como o de *J. mediterranea* (Fig. 2J).

Mascagnia cordifolia

Na base do receptáculo, verifica-se um sifonostelo central e distinguem-se os contornos das glândulas calicinais com pequenos traços vasculares independentes e em número variável (Fig. 3A).

Em seguida, são emitidos três traços vasculares para cada uma das quatro sépalas que apresentam pares de glândulas. A sépala anterior, que não apresenta glândula, recebe apenas um traço vascular, mas compartilha os traços laterais das sépalas adjacentes, que se bifurcam (Fig. 3B-C).

Ainda na base do botão, quando não se individualizaram os verticilos florais, são emitidos traços unitários para cada uma das cinco pétalas (Fig. 3D). Em seguida, dez traços vasculares são emitidos, um para cada estame (Fig. 3E). Cinco desses traços são antipétalos e cinco antissépalos.

Os traços vasculares laterais da sépala ramificam-se para a periferia (Fig. 3E-F), produzindo os vários pequenos traços, previamente descritos nas glândulas. Na região posterior da flor, ocorre uma pétala diferenciada, a qual se diferencia das demais por ter a unha mais calibrosa, não ocorrendo diferenças na sua vascularização (Fig. 3F-H).

Em seguida, dois traços vasculares laterais e um complexo ventral intercarpelar são emitidos por carpelo (Fig. 3F). Na região dorso-lateral de cada carpelo, não se distingue traço dorsal, mas ocorre um complexo celular pouco distinto, como o observado nas *Janusia* avaliadas. Na região mediana do botão floral, delinea-se o tubo estaminal, bem como começam a se individualizar os três carpelos e respectivos lóculos (Fig. 3G).

Segue-se a completa individualização das sépalas e pétalas (Fig. 3H).

Na região mediana do ovário, já individualizado, cada complexo ventral intercarpelar divide-se (Fig. 3G) e as porções de cada carpelo aproximam-se (Fig. 3H), fundindo-se a seguir, formando um feixe ventral para cada carpelo (Fig. 3I). O tubo estaminal fragmenta-se, por sua vez, dando origem a dez filetes, alternadamente antissépalos e antipétalos (Fig. 3I).

No ápice do ovário, o feixe ventral de cada carpelo migra para irrigar o óvulo. Os dois feixes laterais mais calibrosos migram e ocupam posição mais ventral (Fig. 3J).

Individualizam-se três estiletos; cada um apresenta os dois feixes oriundos dos traços laterais do carpelo (Fig. 3K).

Tetrapteryx chamaecerasifolia

A base do receptáculo tem contorno arredondado, embora irregular, e sua vascularização está organizada em um eustelo central (Fig. 4A). Logo em sequência, aumenta rapidamente o diâmetro e delinham-se os contornos das oito glândulas calicinais, já com traços vasculares numerosos e independentes (Fig. 4B).

Ocorre a emissão de três traços vasculares para cada sépala, quatro laterais biglandulares e uma anterior aglandular (Fig. 4C). São emitidos cinco novos traços a seguir, um para cada pétala; concomitantemente, distingue-se o contorno da unha de cada pétala (Fig. 4D-F).

Ao atingir as sépalas, os traços laterais dessas peças ramificam-se e projetam-se para as glândulas (Fig. 4D-E), migrando para baixo irrigando sua região inferior, constituindo os traços vistos nas glândulas na base do receptáculo (Fig. 4B).

Ocorre emissão de dez traços vasculares, um para cada estame, alternadamente antissépalos e antipétalos (Fig. 4G-H).

Na região mediana do botão floral, o tubo estaminal se individualiza e começa o delineamento dos três carpelos (Fig. 4I).

Os filetes individualizam-se na mesma altura em que ocorre o isolamento do ovário e surgimento dos lóculos (Fig. 4J). Nesse ponto, são formados dois feixes laterais em cada carpelo (Fig. 4J); na sequência, ocorre a formação de três complexos intercarpelares no ovário.

Na região mediana do ovário, cada complexo ventral intercarpelar divide-se e as partes de cada carpelo aproximam-se, fundindo-se e formando um feixe ventral para cada carpelo. Na região dorso-lateral de cada carpelo, observa-se o complexo celular pouco distinto, como registrado nas demais espécies (Fig. 4J-K).

No ápice do ovário, o feixe ventral de cada carpelo migra para irrigar o óvulo. Os dois feixes laterais mais calibrosos ramificam-se e ocupam a posição mais ventral (Fig. 4K).

Os três estiletos individualizam-se, sendo que cada um apresenta um número variável de feixes oriundos dos feixes laterais de cada carpelo (Fig. 4L).

DISCUSSÃO

A vascularização floral encontrada nas espécies estudadas segue o padrão mais geral, tanto nos verticilos protetores quanto no androceu, já que ocorrem três traços irrigando cada sépala e um traço para cada pétala e cada estame (Puri 1951; Gifford & Foster 1989).

De todos os aspectos analisados, a vascularização do gineceu e a relação entre o cálice e as glândulas calicinais despontam como os mais relevantes para a utilização em análises filogenéticas.

Com relação ao gineceu, o padrão básico de vascularização floral, descrito por Puri (1951) e Gifford & Foster (1989), considera a emissão de um traço vascular para cada carpelo, que irá originar o feixe dorsal, e mais dois traços por carpelo, constituindo os feixes ventrais. Nas espécies estudadas, contudo, não ocorre a emissão de traço dorsal, havendo, apenas, o adensamento de células meristemáticas, tanto do meristema fundamental quanto do procâmbio, que só se definirão tardiamente, durante o desenvolvimento do pericarpo, como relatado por Souto & Oliveira (Cap. IV, neste volume). Segundo as autoras, esse tecido meristemático irá formar as alas dos frutos

destas espécies, sendo, portanto, relevante ainda não haver feixe vascular diferenciado nessa região, na medida em que a presença apenas de células meristemáticas favorece a formação das alas pericárpicas.

Ainda com relação ao gineceu, *J. ochionii* forma seis traços que originam seis feixes ventrais, enquanto em *J. mediterranea*, *M. cordifolia* e *Tetrapterys* ocorre a formação de três complexos intercarpelares que, posteriormente, separam-se formando os seis feixes ventrais. A interpretação do sentido da formação de complexos vasculares intercarpelares é prejudicada pelo pequeno número de espécies registrado na literatura, de modo que ainda é difícil tirar conclusões sobre este tópico.

Aspectos do cálice e das glândulas a ele associadas variam entre as espécies e merecem atenção. Em *M. cordifolia*, observa-se o compartilhamento da vascularização entre a sépala anterior, que é aglandular, com as sépalas laterais adjacentes a ela. Esse compartilhamento de traços vasculares indica que houve conação entre as glândulas dessas sépalas, resultando na sépala aglandular. É possível que ancestrais recentes de *Mascagnia* exibam pares de glândulas nas cinco sépalas, tendo as glândulas da sépala anterior de *Mascagnia* fundido-se com as das sépalas adjacentes, tanto ao nível dérmico quanto fundamental, mantendo a vascularização lateral ainda compartilhada entre as sépalas; a presença deste traço bifurcado, compartilhado entre ambas, documenta a conação ocorrida. É usual que processos de conação ocorram primeiramente nos tecidos de revestimento e de preenchimento, atingindo, em momentos posteriores, os tecidos vasculares, o que é nitidamente observado em *M. cordifolia*. Segundo Fahn (1990), é comumente aceito que, durante o processo evolutivo, a fusão externa dos órgãos precede a dos tecidos internos, de modo que a fusão vascular representa o último estágio deste processo. A fusão filogenética é o processo que resulta na redução numérica de glândulas calicinais em certas Malpighiaceae, como o registro inédito aqui apresentado para *M. cordifolia*. Como *Mascagnia* é dos gêneros com posição taxonômica mais complexa em trabalhos filogenéticos (Cameron *et al.* 2001; Davis *et al.* 2001), o estudo de outras espécies do gênero é promissor para esclarecer a condição das glândulas calicinais em espécies de outros clados.

Já em *T. chamaecerasifolia* e nas espécies de *Janusia*, que também possuem quatro sépalas com pares de glândulas, não foi observado compartilhamento do tecido vascular entre peças do cálice. As cinco sépalas são irrigadas por três traços vasculares cada uma, incluindo a sépala anterior, aglandular. No caso destas espécies, a perda das glândulas da sépala anterior provavelmente se deu por redução das mesmas, ocorrida

em ancestrais mais distantes filogeneticamente, visto que não há sequer resquício da vascularização das glândulas suprimidas; trata-se de processo diverso da conação, observada em *M. cordifolia*.

Byrsonima Rich. Ex Kunth, considerado um dos gêneros basais de Malpighiaceae (Cameron *et al.* 2001; Davis *et al.* 2001), apresenta flores com cinco pares de glândulas calicinais, um par em cada sépala. A perda da glândula na sépala anterior pode ser vista, portanto, como um estado derivado. Acredita-se que a perda das glândulas da sépala anterior tenha ocorrido, pelo menos, duas vezes durante a evolução das Malpighiaceae, já que este trabalho registra dois processos distintos que culminam na mesma morfologia externa.

Com essa nova informação, a avaliação do número de glândulas calicinais e seu processo de redução, no caso das espécies com menos de dez glândulas, assume papel relevante para a compreensão da filogenia da família. Assim, análises desta característica em outros gêneros basais e derivados da família, incluindo os clados atualmente inconclusivos, tornam-se essenciais para o entendimento da evolução das glândulas nas Malpighiaceae, bem como de seu valor para análises filogenéticas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado de L.S. Souto e de Produtividade em Pesquisa (Processo nº 304716/2008-1) de D.M.T. Oliveira; à Dra. Maria Candida Henrique Mamede e à Dra. Renata Sebastiani, pela identificação das espécies.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.R. (1977) Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae. *Leandra*, **7**, 5-18.
- ANDERSON, W.R. (1979) Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. *Biotropica*, **11**, 219-223.
- ANDERSON, W.R. (1980) Notes on *Mascagnia* in South America. *Contributions from the University of Michigan Herbarium*, **14**, 17-23.
- ANDERSON, W.R. e DAVIS, C.C. (2005) The *Mascagnia cordifolia* group (Malpighiaceae). *Contributions from the University of Michigan Herbarium*, **24**, 33-44.

- APG III. (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**, 105-121.
- CAMERON, K.M., CHASE, M.W., ANDERSON, W.R. e HILLS, H.G. (2001) Molecular systematic of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal of Botany*, **88**, 1847-1862.
- CHASE, M.W., SOLTIS, D.E., OLMSTEAD R.G., MORGAN, D., LES, D.H., MISHLER, B.D., DUVALL, M.R., PRICE, R.A., HILLS, H.G., QIU, Y.L., KRON, K.A., RETTIG, J.H., CONTI, E., PALMER, J.D., MANHART, J.R., SYTSMA, K.J., MICHAELS, H.J., KRESS, W.J., KAROL, K.G., CLARK, W.D., HEDREN, M., GAUT, B.S., JANSEN, R.K., KIM, K.J., WIMPEE, C.F., SMITH, J.F., FURNIER, G.R., STRAUSS, S.H., XIANG, Q.Y., PLUNKETT, G.M., SOLTIS, P.S., SWENSEN, S., WILLIAMS, S.E., GADEK, P.A., QUINN, C.J., EGUIARTE, L.E., GOLENBERG, E., LEARN JR., G.H., GRAHAM, S.W., BARRETT, S.C.H., DAYANANDAN, S. e ALBERT, V.A. (1993) Phylogenetics of seed plants: analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**, 528–580.
- DAVIS, C.C., ANDERSON, W.R. e DONOGHUE, M.J. (2001) Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* e *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, **88**, 1830-1846.
- FAHN, A. (1990) *Plant anatomy*, 4th edn. Pergamon Press, Oxford.
- GIFFORD, E. M., e A. S. FOSTER. (1989) *Morphology and evolution of vascular plants*, 3rd edn. Freeman, New York.
- HUTCHINSON, J. (1967) *The genera of flowering plants*, 1st edn. Oxford University Press, Oxford: 2 v.
- JOHANSEN, D.A. (1940) *Plant microtechnique*, 1st edn. McGraw-Hill Book, New York.
- NIEDENZU, F. (1928) Malpighiaceae. In: A. Engler (Ed.) *Das Pflanzenreich IV*. **141**, 1-870 apud GATES, B. (1982) *Banisteriopsis, Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monographs*, **30**, 1-236.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. e MCCULLY, M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**, 368-373.
- PAIVA, E.A.S., PINHO, S.Z. e OLIVEIRA, D.M.T. (2011) Large plant samples: how to process for (2-hydroxyethyl)-methacrylate embedding? In: H. CHIARINI-

- GARCIA, R.C.N., MELO, (Eds). *Light microscopy: methods and protocols*. Methods in Molecular Biology, v. 689. Humana Press, Totowa: (no prelo).
- PURI, V. (1951) The role of floral anatomy in the solution of morphological problems. *The Botanical Review*, **17**, 471-553.
- TAKHTAJAN, A. (1997) *Diversity and classification of flowering plants*, 1st edn. Columbia University Press, New York.

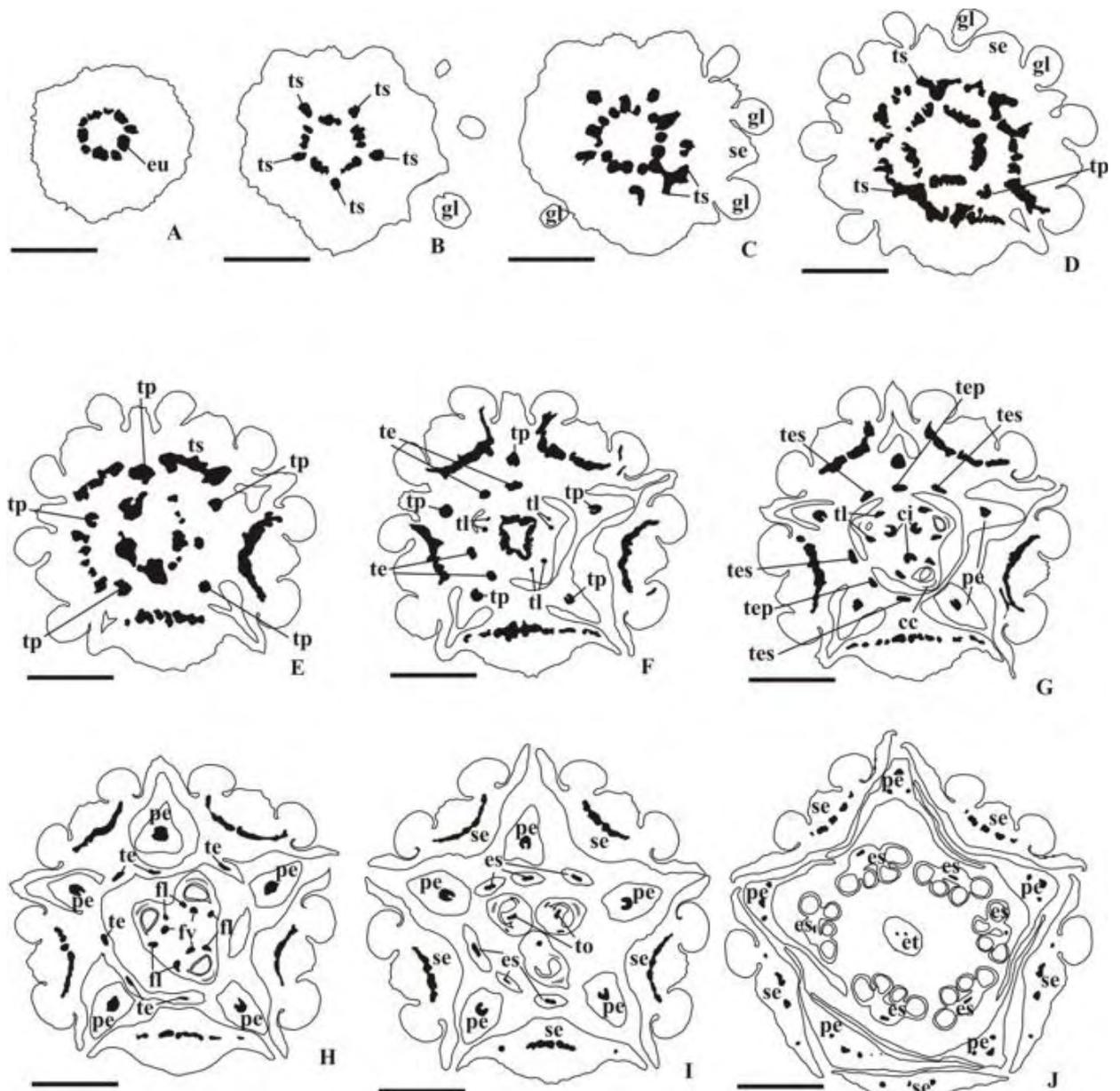


Fig. 1. Diagramas da vascularização de botões em pré-antese de *Janusia mediterranea*. (1A) Receptáculo com o eustelo intacto. (B) Início da emissão dos traços de sépala. (C) Começo de delimitação das glândulas calicinais e início da emissão dos traços laterais das sépalas. (D) Emissão dos traços das pétalas. (E) Traços de pétalas já individualizados e início da delimitação do contorno das pétalas. (F) Emissão dos traços de estame e traços laterais do carpelo. (G) Início da individualização de sépalas e pétalas, formação do complexo intercarpelar e complexo de células meristemáticas na região dorsal de cada carpelo. (H) Individualização do ovário e formação dos feixes ventrais. (I) Individualização dos estames e emissão do traço de óvulo. (J) Região apical do botão floral com as peças todas individualizadas e estigma único na região central. cc = complexo de células meristemáticas; ci = complexo intercarpelar; es = estame; et = estilete; eu = eustelo; fv = feixe ventral; gl = glândula; pe = pétala; se = sépala; te = traço de estame; tep = traço de estame antipétalo; tes = traço de estame antissépalo; tl = traço lateral do carpelo; to = traço de óvulo; tp = traço de pétala; ts = traço de sépala. Barras de escala: 500 μ m.

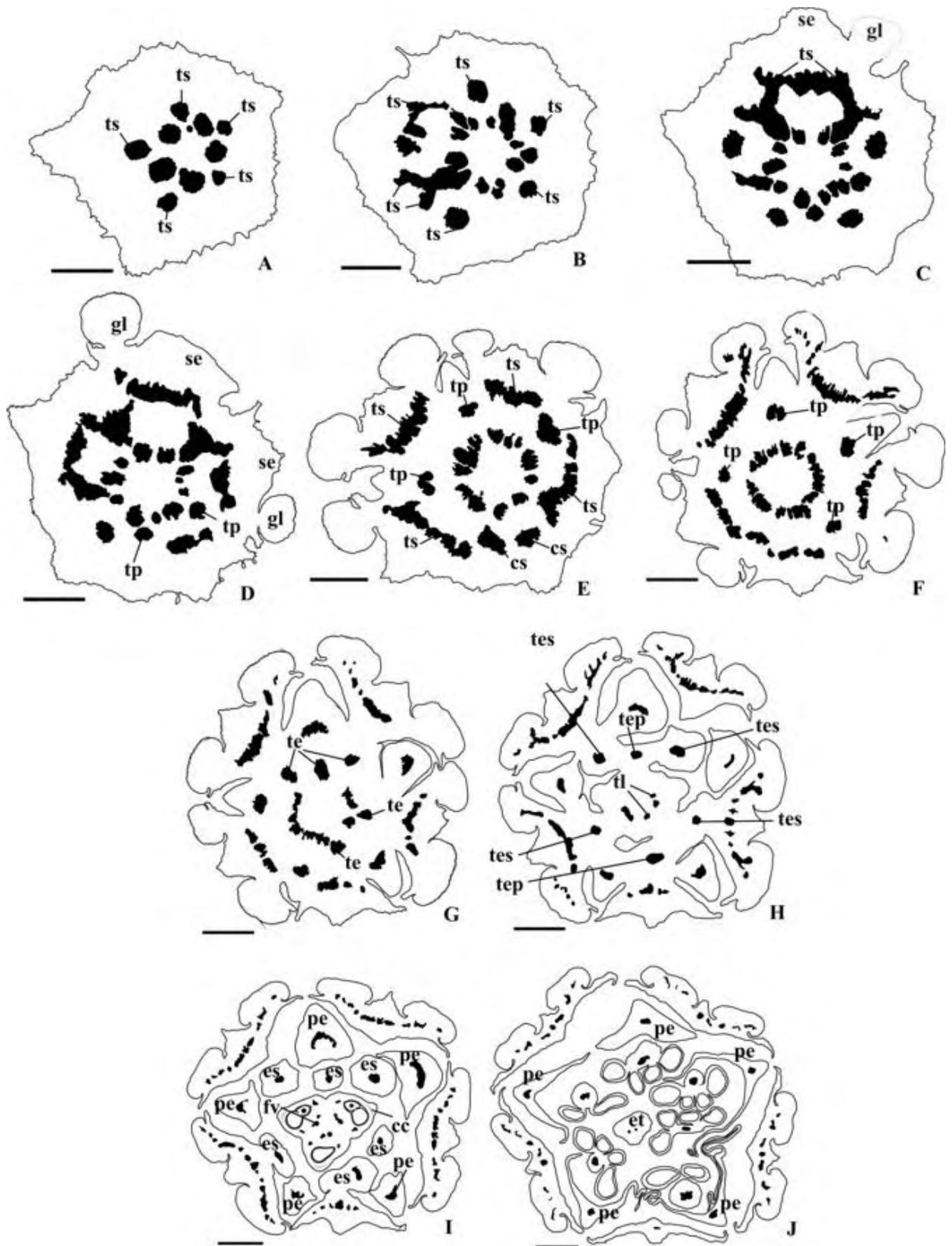


Fig.2. Diagramas da vascularização de botões em pré-antese de *Janusia oechionii*. (A-C) Emissão dos traços das sépalas. (D) Início da delimitação do contorno das sépalas e respectivas glândulas e emissão de traços de pétala. (E) Emissão de traço de pétala e complexo de sépala aglandular com as pétalas adjacentes. (F) Traços das sépalas e pétalas bem isolados. (G) Emissão dos traços dos estames. (H) Emissão dos traços de estame e lateral do carpelo. (I) Peças florais totalmente individualizadas. (J) Região apical do botão floral com o estilete. cc = complexo de células meristemáticas; cs = complexo vascular da sépala aglandular e sépala adjacente; es = estame; et = estilete; fv = feixe ventral; gl = glândula; pe = pétala; se = sépala; te = traço de estame; tep = traço de estame antipétalo; tes = traço de estame antissépalo; tl = traço lateral do carpelo; tp = traço de pétala; ts = traço de sépala. Barras de escala: 2 mm.

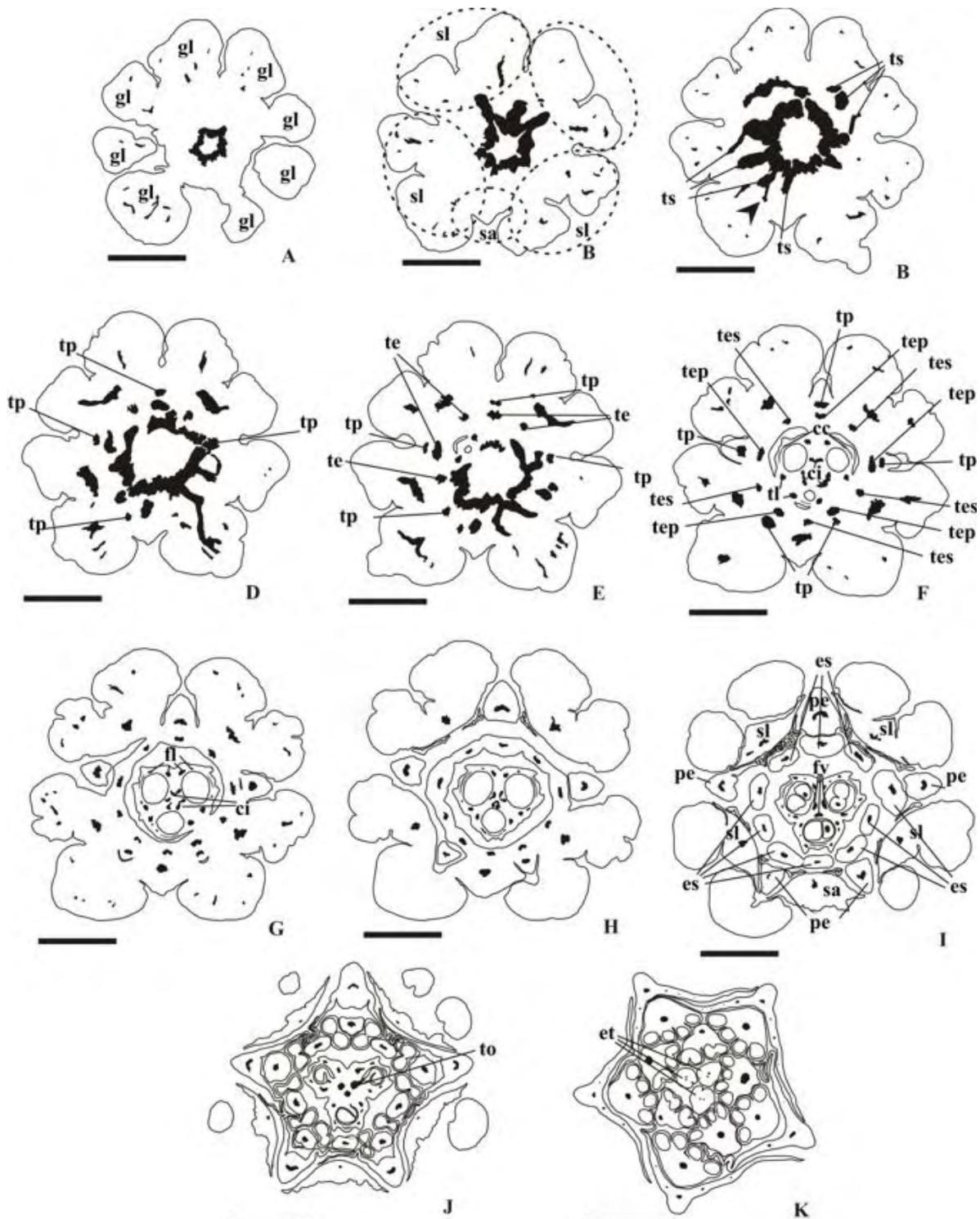


Fig. 3. Diagramas da vascularização de botões em pré-antese de *Mascagnia cordifolia*. (A) Receptáculo com o contorno das glândulas calicinais. (B) Início da emissão dos traços de sépala; as elipses tracejadas indicam a região aonde as sépalas laterais e anterior irão se individualizar. (C) Emissão dos traços para duas sépalas laterais e um traço para a sépala anterior; notar também a bifurcação do traço da sépala adjacente à que é aglandular (ponta de seta). (D) Início da emissão de traço de pétala. (E) Emissão de traço de estame. (F) Região de individualização de dois círculos de traços, o mais externo de pétala e sépala e o mais interno dos estames; notar também a emissão dos complexos intercarpelares, traços laterais e formação do complexo de células meristemáticas. (G) Individualização do ovário e separação dos complexos intercarpelares. (H) Pétalas e ovário individualizados. (I). Verticilos já individualizados; notar os três feixes ventrais no centro do ovário. (J) Emissão do traço do óvulo. (K) Região apical do botão floral, reconhecendo-se os dez estames e três estiletos. cc = complexo de células meristemáticas; ci = complexo intercarpelar; es = estame; et = estilete; eu = eustelo; fl = feixe lateral; fv = feixe vascular; gl = glândula; pe = pétala; sa = sépala anterior; sl = sépala lateral; te = traço de estame; tep = traço de estame antipétalo; tes = traço de estame antissépalo; tl = traço lateral do carpelo; to = traço de óvulo; tp = traço de pétala; ts = traço de sépala). Barras de escala: 2 mm.

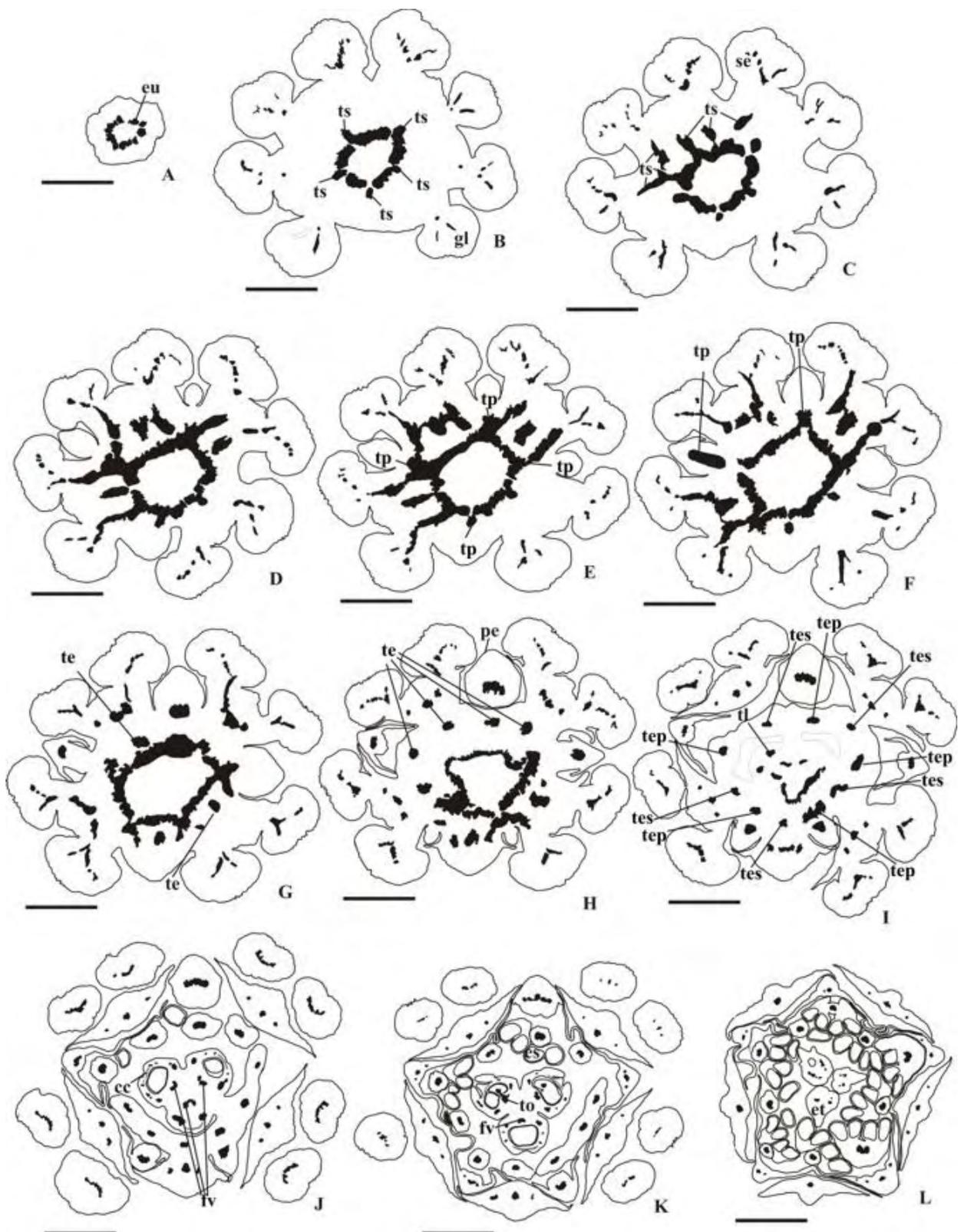


Fig. 4. Diagramas da vascularização de botões em pré-antese de *Tetrapteryx chamaecerasifolia*. (A) Pedicelo com eustelo intacto. (B) Receptáculo com o contorno das glândulas e emissão dos traços de sépala. (C-D) Emissão dos traços de sépala. (E-F) Emissão de traço de pétala. (G) Início da emissão dos traços de estame. (H) Começo da individualização das pétalas. (I) Região em que todos os traços de estame foram emitidos e começa a emissão dos traços laterais do carpelo. (J) A maior parte das sépalas, pétalas e estames está individualizada; notar os feixes ventrais de cada carpelo em processo de fusão. (K) Feixes ventrais já formados e emissão do traço de óvulo. (L) Região apical com cinco estames na altura da antera, cinco estames cortados no filete e três estiletos. cc = complexo de células meristemáticas; es = estame; et = estilete; eu = eustelo; fv = feixe ventral; gl = glândula; pe = pétala; se = sépala; te = traço de estame; tep = traço de estame antipétalo; tes = traço de estame antissépalo; tl = traço lateral do carpelo; to = traço de óvulo; tp = traço de pétala; ts = traço de sépala. Barras de escala: 2 mm.



Capítulo II

Camarea linearifolia

Anatomia floral comparada de cinco espécies de Malpighiaceae

Letícia Silva Souto^a e Denise Maria Trombert Oliveira^{b,1}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 510, Rubião Junior, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil

^b Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

* Autor para correspondência.

Endereços de e-mail: lesouto@gmail.com (L.S. Souto), dmtoliveira@icb.ufmg.br (D.M.T. Oliveira)

RESUMO

Flores de Malpighiaceae apresentam morfologia homogênea, pouco se conhecendo sobre possíveis variações anatômicas. Este trabalho objetivou verificar se a homogeneidade morfológica é repetida anatomicamente, em flores de *Camarea linearifolia*, *Janusia mediterranea*, *Janusia occhionii*, *Mascagnia cordifolia* e *Tetrapteryx chamaecerasifolia*. Verificou-se interessante gama de variações anatômicas, principalmente na epiderme de sépalas e pétalas, que parecem refletir adaptações ambientais e à polinização. Outros caracteres são constantes dentro de um mesmo gênero ou da tribo, podendo ser aplicáveis taxonomicamente: a epiderme das glândulas calicinais, formada por tricomas nas *Janusia* e *C. linearifolia* (Gaudichaudieae) e por células em paliçada nas demais; projeção do nucelo através da micrópila, nas *Janusia* e em *C. linearifolia*, sendo apenas exposto em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*. Em *M. cordifolia*, há drusas próximas ao estômio, enquanto, nas demais, estão dispersas pela antera; a presença de drusas pode ser relacionada ao enfraquecimento da lamela mediana e à deiscência das anteras.

Palavras-chave: *Camarea linearifolia*, *Janusia mediterranea*, *Janusia occhionii*, *Mascagnia cordifolia*, *Tetrapteryx chamaecerasifolia*, glândula calicinal, anatomia floral

1. Introdução

Malpighiaceae é uma família de plantas tropicais e subtropicais, com aproximadamente 1.250 espécies e 71 gêneros [1]. Suas espécies são abundantes nos ambientes onde ocorrem [2,3], principalmente no continente americano, onde ocorrem 44 gêneros e 800 espécies [1].

Espécies de Malpighiaceae apresentam morfologia variável, principalmente em relação ao hábito e ao tipo de fruto, conquanto a morfologia das flores é considerada bastante homogênea [4]. Tais flores possuem cinco sépalas com um par de glândulas calicinais em cada sépala, ou nas quatro sépalas laterais, cinco pétalas livres e unguiculadas, com a pétala posterior geralmente diferenciada, androceu tipicamente com dez estames e gineceu tricarpelar, trilocular, com um óvulo por lóculo [5]. Segundo Anderson [4], essa uniformidade de caracteres florais pelas Malpighiaceae está relacionada à pressão de seleção exercida pelas abelhas polinizadoras da tribo Centridini, que ocorreu durante o período de irradiação da família.

Devido a essa homogeneidade morfológica floral, os caracteres dessa natureza não costumam ser usados na taxonomia da família. Há apenas um grupo delimitado por caracteres florais, a tribo Gaudichaudieae, que é caracterizada por apresentar flores casmógamas e cleistógamas, androceu reduzido, número de estiletos reduzido, carpelo distinto e carpóforo [6]. Análises filogenéticas a partir de sequências nucleotídicas cloroplásticas [7, 8] indicaram que Gaudichaudieae é a única tribo tradicionalmente descrita que é monofilética em Malpighiaceae, o que pode indicar que certos caracteres florais podem ser significativos para a filogenia da família.

Trabalhos com anatomia floral de espécies de Malpighiaceae são escassos na literatura [9, 10, 11] e, portanto, não há dados que permitam verificar se, anatomicamente, as flores são tão homogêneas quanto morfológicamente.

Assim, é proposta deste trabalho analisar a anatomia floral de cinco espécies de Malpighiaceae, pertencentes a dois dos três clados informais estabelecidos por Cameron et al. [7], verificando o nível de homogeneidade estrutural entre estas flores.

2. Material e Métodos

Foram coletadas as seguintes espécies de Malpighiaceae: *Camarea linearifolia* A.St.-Hil., coletada na Serra da Canastra, Minas Gerais; *Janusia mediterranea* (Vell.) W.R.Anderson, coletada em Jundiaí, São Paulo; *Janusia occhionii* W.R. Anderson, coletada em Avaré, São Paulo; *Mascagnia cordifolia* (A.Juss.) Griseb coletada em São Manuel, São Paulo; *Tetrapteryx chamaecerasifolia* A. Juss., coletada em Botucatu, São Paulo, Brasil. *Camarea linearifolia*, *J. mediterranea* e *J. occhionii* são representantes da tribo Gaudichaudieae e estão inseridas no clado das Banisterioides. *Mascagnia cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* são pertencentes ao clado Hiraeoides. Ramos férteis foram herborizados e inseridos no Herbário BOTU e no Herbário SP.

As características morfológicas foram descritas e ilustradas a partir de amostras de 50 unidades de botões florais e flores em antese, coletados aleatoriamente de, no mínimo, cinco indivíduos de cada espécie.

Para o estudo anatômico, amostras dos botões florais e das flores em antese foram fixadas em FAA 50 [12] e armazenadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas em metacrilato [13], seccionadas em micrótomo rotativo, coradas com Azul de Toluidina 0,05% em tampão acetato, pH 4,7 [14, modificado] e montadas em resina sintética.

O material foi analisado macroscopicamente, em estereomicroscópio e em microscópio fotônico, sendo os resultados registrados por meio de fotografias obtidas com máquina Canon acrescida de macro, fotomicrografias preparadas em fotomicroscópio Olympus com câmara digital acoplada, diagramas e desenhos em detalhe, estes elaborados com auxílio de câmara clara acoplada a estereomicroscópio.

3. Resultados

As flores de *Camarea linearifolia* (Fig. 1), *Janusia mediterranea* (Fig. 2), *Janusia occhionii* (Fig. 3), *Mascagnia cordifolia* (Fig. 4) e *Tetrapteryx chamaecerasifolia* (Fig. 5) são vistosas, pentâmeras, zigomorfas, diclamídeas e heteroclamídeas.

O cálice é formado por cinco sépalas, com as quatro laterais apresentando um par de glândulas abaxiais (Fig. 6-7). Em *M. cordifolia*, têm-se a impressão de que todas as sépalas possuem glândulas, porque as glândulas das sépalas adjacentes à sépala anterior, que é aglandular, concrestem com a base desta sépala (Fig. 6).

A epiderme da sépala é unisseriada em ambas as faces (Fig. 8-12); na face abaxial, as células são menores que as da face adaxial em *J. mediterranea* (Fig. 10), maiores em *J. occhionii* e *M. cordifolia* (Fig. 11) e de tamanho semelhante em *C. linearifolia* e *T. chamaecerasifolia* (Fig. 12). A face abaxial apresenta tricomas tectores, com exceção de *C. linearifolia* (Fig. 12). Na face adaxial, ocorrem tricomas tectores nas espécies de *Janusia*, idioblastos fenólicos em *T. chamaecerasifolia* e *M. cordifolia* e idioblastos contendo substâncias pécticas em *C. linearifolia* (Fig. 12). Em geral, as células epidérmicas apresentam parede pectocelulósica pouco espessada, são vacuoladas, com citoplasma escasso e núcleo visível (Fig. 10-12).

O mesofilo das sépalas é parenquimático (Fig. 8-13) e, na nervura central, varia de poucas camadas celulares, cerca de sete em *C. linearifolia*, a muitas camadas (20 a 30) nas demais espécies. O mesofilo de *C. linearifolia*, *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* é homogêneo, com pequenos espaços intercelulares e células de parede delgada, citoplasma escasso e grande vacúolo (Fig. 8 e 12); são encontrados idioblastos fenólicos (Fig. 12) e cristalíferos contendo drusas. Já nas espécies de *Janusia*, é possível distinguir duas regiões: adjacente à face adaxial da epiderme, observa-se de uma (próximo à margem) a cinco (na região mediana) camadas de células com paredes pécticas ligeiramente espessadas, de aspecto colenquimatoso e conteúdo hialino (Fig. 13); o restante do mesofilo é composto por parênquima com células que

tendem a isodiamétricas, entre as quais ocorrem muitas células fenólicas (Fig. 13) e alguns idioblastos com drusa. A vascularização é composta por um arco aberto de feixes centrais próximos, de maior calibre (Fig. 8-9 e 13), e dois a quatro feixes menores laterais (Fig. 8).

As glândulas calicinais são sésseis (Fig. 9 e 14-15), longas e estreitas nas espécies de *Janusia* (Fig. 14 e 18), mais curtas e largas nas demais espécies (Fig. 15-16). A região de contato com a sépala é ampla, exceto em *J. mediterranea* e *J. occhionii* onde ocorre uma reentrância (Fig. 18). A epiderme é secretora e formada por células altas e estreitas, arranjadas em paliçada (Fig. 18), na periferia das glândulas e por tricomas secretores unicelulares, de formato sinuoso, na região mediana (Fig. 18-19). Em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, as células são altas e estreitas, arranjadas em paliçada em toda a extensão da glândula (Fig. 16-17), sendo que algumas células da região mediana têm a parede periclinal externa ligeiramente projetada (Fig. 17). Nas cinco espécies, as células epidérmicas têm parede celular péctica e delgada, revestida externamente por cutícula espessa, o conteúdo celular é denso e o núcleo é visível (Fig. 17 e 19). A secreção é lipídica e acumula-se no espaço entre a parede periclinal externa e a cutícula.

Em *J. mediterranea* e *T. chamaecerasifolia*, o restante da glândula é preenchido por parênquima com pequenos espaços intercelulares e células isodiamétricas, vacuoladas e de parede delgada, ocorrem idioblastos cristalíferos (drusas) e inúmeros idioblastos fenólicos (Fig. 17-19); em *T. chamaecerasifolia*, observam-se plastídeos nas células do parênquima glandular. Nas demais espécies, são observadas duas regiões de parênquima, uma adjacente à epiderme secretora, composta por até duas camadas celulares em *C. linearifolia*, de duas a três em *M. cordifolia* e até quatro camadas celulares em *J. occhionii*, de células pequenas, hialinas, justapostas (Fig. 16-17). A segunda região é composta por parênquima de células maiores, de formato mais irregular, arranjadas mais frouxamente, deixando pequenos espaços intercelulares (Fig. 16-17); nesta região ocorrem drusas e idioblastos fenólicos (Fig. 17), estes mais abundantes em *J. occhionii*.

O suprimento vascular é composto por um número variável de feixes de pequeno calibre nas cinco espécies (Fig. 15-16). Em *C. linearifolia*, *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, os feixes apresentam xilema voltado para a face abaxial e floema voltado para a adaxial, disposição inversa ao encontrado no limbo da sépala.

As pétalas são vistosas e unguiculadas (Fig. 1-5), amarelas em *T. chamaecerasifolia*, *C. linearifolia* e *J. occhionii*, rosadas em *M. cordifolia*, e de branca a rosada em *J. mediterranea*. Das cinco pétalas, a posterior é maior (Fig. 1-5). Na unha, a secção transversal é triangular (Fig. 20), exceto em *C. linearifolia*, que apresenta a face adaxial plana e a abaxial obtusa (Fig. 21). Em *C. linearifolia* e *M. cordifolia*, a margem é lisa (Fig. 1 e 4), enquanto nas *Janusia* e em *T. chamaecerasifolia* é fimbriada (Fig. 2-3 e 5).

A epiderme é unisseriada em ambas as faces (Fig. 22-26), onde ocorrem tanto células comuns quanto papilas. A distribuição de células, seu formato e conteúdo variam tanto entre as faces quanto entre as espécies (Tabela 1).

O mesofilo é formado por parênquima aerífero, com células de parede delgada, altamente vacuoladas (Fig. 22-26), entre as quais ocorrem idioblastos com drusas. Próximo à margem do limbo, as camadas celulares do mesofilo diminuem em número (Fig. 27) podendo estar ausentes. Observa-se uma nervura de maior calibre na região mediana do limbo (Fig. 28) e vários feixes menores, inseridos no mesofilo (Fig. 23 e 25-26).

Não ocorre diferença anatômica significativa entre a pétala posterior, mais espessa, e as demais, sendo a diferença representada apenas pelo número de camadas celulares no mesofilo.

O androceu é variável, formado por quatro estames férteis (três com filetes concrecidos e um livre) e dois estaminódios em *C. linearifolia* (Fig. 1), por seis estames férteis nas duas *Janusia* (Fig. 2-3) e por dez estames férteis em *M. cordifolia* (Fig. 4) e *T. chamaecerasifolia* (Fig. 5). Nos estames férteis, os filetes possuem epiderme unisseriada (Fig. 29), com parede ligeiramente espessa, envolvendo parênquima fundamental com idioblastos fenólicos; um feixe vascular é visível na região central (Fig. 29); em *T. chamaecerasifolia* e nas *Janusia*, o feixe é do tipo colateral, ocorrendo muitas células de parênquima, (Fig. 30). Já em *C. linearifolia* e *M. cordifolia*, o feixe é anficrival (Fig. 31), ocorrendo uma bainha fenólica nesta última. Em *M. cordifolia*, há pequena extensão na base em que se observa o concrecimento dos filetes.

A antera é biteca e tetrasporangiada (Fig. 32-34). Em botões jovens, o conectivo é revestido por epiderme unisseriada (Fig. 32-34), a qual é fenólica em *J. mediterranea*, *J. occhionii* (Fig. 33) e *M. cordifolia* (Fig. 34), e é preenchido por parênquima com poucos espaços intercelulares, havendo um feixe vascular. Em *M. cordifolia*, ocorrem

cerca de quatro camadas de células fenólicas ao redor do feixe do conectivo (Fig. 34); nas *Janusia* (Fig. 33) e em *C. linearifolia*, são observados idioblastos fenólicos, principalmente ao redor do feixe vascular, mais escassos em *C. linearifolia*. Em todas as espécies são observados estômatos.

Na antera jovem, os estratos parietais estão constituídos pela epiderme unisseriada, uma camada subepidérmica precursora do endotécio, camadas médias (até três nas *Janusia* e em *C. linearifolia*, duas em *T. chamaecerasifolia* e uma em *M. cordifolia*) e pelo tapete (Fig. 35). A epiderme possui células muito pequenas, de parede celular delgada, conteúdo hialino e os núcleos são visíveis (Fig. 35). A camada precursora do endotécio apresenta células volumosas, vacuoladas e com núcleo grande e bem visível nessa fase (Fig. 35). As camadas médias apresentam células pequenas e alongadas periclinalmente (Fig. 35). O tapete é secretor e suas células são as maiores da parede da antera, com citoplasma muito denso, pequenos vacúolos, observando-se até três núcleos por célula, e um a dois nucléolos por núcleo (Fig. 35). Em *M. cordifolia*, uma a duas células adjacentes ao estômio começam a formar drusas (Fig. 34). A microsporogênese segue um padrão bem característico nas espécies estudadas. Nesta fase, o tecido esporogênico é composto por células-mãe de micrósporos com características típicas (Fig. 35-36). Cada célula-mãe de micrósporo (Fig. 36) divide-se meioticamente, sendo que a segunda fase da divisão meiótica é simultânea (Fig. 37), formando uma tétrade tetraédrica de micrósporos (Fig. 38).

A antera de desenvolvimento intermediário apresenta os estratos parietais modificados (Fig. 39). No conectivo, a camada adjacente à epiderme apresenta células altas e ligeiramente delgadas com espessamento parietal filiforme irregular. A epiderme começa a ser comprimida, as células do endotécio são ampliadas radialmente e começam a espessar a parede de maneira filiforme e irregular (Fig. 39); as células das camadas médias apresentam-se comprimidas e as células do tapete começam a ser reabsorvidas (Fig. 39). Neste momento, os grãos de pólen encontram-se individualizados, observando-se a formação do microgametófito e a microgametogênese; a parede polínica já se encontra bem desenvolvida (Fig. 39).

Durante a deiscência das anteras, o conectivo de *J. mediterranea*, *J. occhionii* e *C. linearifolia* permanece semelhante ao estágio anterior, embora as células parenquimáticas apresentem-se colapsadas (Fig. 40-41). *Mascagnia cordifolia* apresenta epiderme fenólica, duas a três camadas de células com espessamento parietal que se continuam com o endotécio maduro e camadas fenólicas ao redor do feixe vascular. Já o

conectivo de *T. chamaecerasifolia* apresenta uma camada de células com espessamento parietal, contínuo com o endotécio (Fig. 40) e as células parenquimáticas mostram indícios de morte celular. Na antera deiscente, apenas o endotécio permanece distinto na parede da antera, com o típico espessamento parietal (Fig. 42). As demais camadas são consumidas ou ficam colapsadas (Fig. 42). O grão de pólen maduro é bicelular, esférico em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* (Fig. 43), e de formato esférico a cubóide em *C. linearifolia*, *J. mediterranea* e *J. occhionii* (Fig. 44).

O estaminódio de *C. linearifolia* tem filete similar ao dos estames férteis, com antera modificada, mais ampla e de aspecto lobado e irregular (Fig. 45). Apresenta epiderme unisseriada com células papilosas, com impregnação de compostos fenólicos, sendo preenchido por poucas células parenquimáticas que delimitam grandes lacunas (Fig. 45-46). No conectivo, há um feixe vascular amplo e de aspecto laxo, com muitas células parenquimáticas tanto no xilema quanto no floema (Fig. 45).

O ovário é súpero, tricarpelar e trilocular, com carpelos parcialmente concrecidos, com a porção apical é livre (Fig. 47-48). A epiderme externa é unisseriada, com células tendendo a cubóides (49-50) e tricomas tectores em toda a extensão (Fig. 49), exceto em *C. linearifolia*, em que o ovário é glabro (Fig. 50). O mesofilo ovariano possui cerca de seis (*J. mediterranea*), quatro a cinco (*J. occhionii*), quatro (*C. linearifolia*) e de cinco a sete (*M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*) camadas de células de aparência mais hialina, comparando-se com a epiderme; são observadas divisões celulares em diversos planos e, em *J. occhionii*, a camada mais interna do mesofilo é alongada periclinalmente em secção transversal (Fig. 49). A epiderme interna, inicialmente unisseriada (Fig. 49), já apresenta divisões periclinais em alguns pontos, tornando-se multisseriada (Fig. 50). O tórus é parenquimático (Fig. 48), com muitos idioblastos fenólicos e drusas. Na região mediana o ovário é irrigado por três feixes ventrais e seis laterais, dois por carpelo (Fig. 48); os feixes dorsais não são diferenciados, encontrando-se uma faixa de células meristemáticas, procambiais e de meristema fundamental, nesta região.

Há apenas um óvulo por lóculo (Fig. 48), que é subcampilótropo e crassinucelado; é unitegmentado e com o nucelo projetado através da micrópila em *J. mediterranea*, *J. occhionii* e *C. linearifolia* (Fig. 51), sendo bitegmentado e com o nucelo exposto sem se projetar em *T. chamaecerasifolia* e *M. cordifolia* (Fig. 52).

Em *C. linearifolia*, *J. mediterranea* e *J. occhionii*, o estilete é único, ginobásico e se prende a um dos carpelos. Em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* (Fig. 47)

ocorrem três estiletes terminais, cada um ligado a um dos carpelos do ovário. O estilete é maciço, delimitado por epiderme unisseriada, e preenchido por parênquima (Fig. 53). Na região central do estilete ocorre o tecido de transmissão, com células menores, de conteúdo mais denso, de parede e citoplasma com aspecto mucilaginoso (Fig. 53-54). O tecido de transmissão é contínuo do(s) estigma(s) até os três lóculos do ovário, que apresentam um *compitum* na região apical, interligando-os.

O estigma é formado por células colunares, frouxamente arrançadas, e de aspecto secretor (Fig. 55), que se continuam com o tecido de transmissão.

4. Discussão

Nas sépalas, a epiderme é relativamente homogênea entre as espécies estudadas, entretanto podem-se detectar algumas diferenças entre elas. *Camarea linearifolia* foi a única espécie estudada que apresentou idioblastos pécticos, enquanto que *T. chamaecerasifolia* e *M. cordifolia* formaram idioblastos fenólicos. Em relação ao mesofilo, podem-se agrupar as espécies em dois padrões, sendo que *C. linearifolia*, *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* apresentam mesofilo homogêneo, formado por apenas parênquima fundamental, característica também descrita para *Malpighia emarginata* por Laskowski & Bautista [15]; já nas espécies de *Janusia*, chama a atenção a ocorrência de região colenquimatoso, característica inédita para Malpighiaceae.

As flores analisadas apresentam quatro pares de glândulas calicinais, produtoras de óleo [2, 3], dispostas na face abaxial das sépalas laterais. Cerca de 90% das espécies tropicais de Malpighiaceae apresentam glândulas produtoras de óleo, e grande parte delas apresenta quatro pares dessas glândulas [3]. Entretanto, na família, também é possível encontrar espécies com cinco pares de glândulas [16, 17], e com número variável de glândulas na mesma espécie como em *Banisteriopsis muricata* e *Heteropterys intermedia* [18, 19].

Neste trabalho, a epiderme secretora das glândulas calicinais varia de células epidérmicas em paliçada, em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, a tricomas unicelulares nas espécies de Gaudichaudieae (*C. linearifolia*, *J. mediterranea* e *J. ochionii*). Outras Malpighiaceae como *Camarea affinis* [10] e *Galphimia brasiliensis* [20] também possuem epiderme com células em paliçada. Com relação à homogeneidade do mesofilo, o caráter não é conservado já que espécies do mesmo gênero, *J. mediterranea* e *J. ochionii*, mostram-se distintas nesta característica.

É interessante notar que, nas glândulas calicinais de três das espécies analisadas (*C. linearifolia*, *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*), ocorrem feixes colaterais com a posição de xilema e floema invertida, demonstrando que são feixes descendentes. Souto & Oliveira (Capítulo I, neste volume) comprovaram que os feixes encontrados nas glândulas são provenientes de ramificação dos traços de sépala, na porção apical da glândula, que a irrigam até próximo à base.

Chama a atenção a grande variação estrutural entre sépalas e pétalas, tanto na espessura de seus limbos quanto na densidade celular verificada. O investimento da planta em ambas as estruturas denota claramente seu tempo de funcionalidade, considerando-se a efemeridade das pétalas e o caráter do cálice, que é persistente no fruto até sua maturidade.

No que tange às características anatômicas, as pétalas são mais variáveis, principalmente na epiderme, observando-se variação tanto entre as faces da epiderme quanto entre as espécies analisadas. Como a variação é muito grande, os caracteres dessa natureza não apresentam potencial taxonômico, mas podem refletir adaptações relacionadas à atração de polinizadores, como as papilas que conferem aspecto aveludado aos órgãos em que ocorrem, ou ao próprio ambiente, como é o caso da presença ou ausência de cutícula.

A análise detalhada do androceu revela estrutura relativamente uniforme entre todos os estames férteis avaliados, especialmente nos filetes. Em anteras jovens, os estratos parietais tendem a ser muito homogêneos, variando apenas o número de camadas médias. É interessante destacar, contudo, a ocorrência de drusas junto ao estômio de *M. cordifolia*; cristais de oxalato de cálcio, frequentemente drusas, têm sido relacionados com a dinâmica de regulação do cálcio na planta [21, 22, 23] e essa regulação é de extrema importância no mecanismo de abertura da antera, tendo em vista que a imobilização de cálcio nos cristais pode ser relacionada ao enfraquecimento da lamela mediana na região, culminando na separação de células no estômio e na consequente deiscência da antera, especialmente em *M. cordifolia*, espécie em que os cristais são formados junto ao estômio. Apesar de não se observarem drusas no estômio das demais espécies, esses cristais ocorrem na antera e no conectivo, o que indica a possibilidade de ocorrência de processo similar.

Em anteras de tabaco, Sanders et al. [24] relataram dois conjuntos de células especializadas na deiscência da antera, o estômio, conjunto de células epidérmicas onde irá ocorrer a abertura da antera, e células agrupadas subepidérmicas, altamente

especializadas, que acumulam oxalato de cálcio na forma de cristais e que participam no processo de morte celular, levando a união dos dois sacos polínicos em um único compartimento [24]. Esse tecido tem vida curta e, após sua morte, forma-se uma massa de drusas ou ráfides de oxalato de cálcio [25]. Tal agrupamento subepidérmico é característico de Solanaceae [25], mas é muito semelhante às células acumuladoras de drusas encontradas em *M. cordifolia*.

Em trabalhos com anatomia de Malpighiaceae, independente do órgão analisado, o oxalato de cálcio é observado na forma de cristais do tipo drusa [11, 15, 17, 20, 26-27], indicando que esse tipo de cristal é conservado na família e parece ser de ocorrência generalizada em todas as espécies de Malpighiaceae.

Na literatura, os compostos fenólicos são comumente relacionados à proteção das plantas em ambientes com alta pressão de herbivoria. Entretanto, os compostos fenólicos compreendem uma classe muito ampla de substâncias, como os flavonóides, taninos, ligninas, antocianinas, entre outros [28, 29], os quais, portanto, desempenham papéis muito diversos na planta. Especialmente em órgãos florais, esta classe de compostos pode apresentar papéis diferentes, dependendo do verticilo em que se encontram. Swain [30] relatou que a presença de tanino protege as plantas contra possíveis ataques de microrganismos, e no caso das espécies estudadas, os compostos fenólicos encontrados nos verticilos férteis, androceu e gineceu, devem pertencer a esse grupo, atuando na defesa contra patógenos. Apesar de não terem sido realizados testes para detecção específica de antocianinas, os compostos fenólicos das pétalas devem ser deste grupo, dada a coloração avermelhada observada nos órgãos e ao fato de estarem relacionados a atração de polinizadores.

A análise do gineceu das espécies em estudo revela uniformidade nas características gerais, como número de carpelos, de lóculos e de óvulos por lóculo. A presença de uma região de comunicação entre os lóculos, denominado *compitum* por Carr & Carr [31], nas espécies que apresentam três estiletos distintos, possibilita o crescimento de tubos polínicos que atinjam os três lóculos, mesmo que apenas um estigma tenha sido polinizado. Além disso, os tubos polínicos podem crescer até um lóculo que não é correspondente ao estigma sobre o qual o pólen germinou. Raciocínio similar é aplicável às espécies com estilete único, unido a um dos carpelos; através do *compitum*, o óvulo de cada um dos três carpelos pode ser fecundado.

Segundo Carr & Carr [31], o gineceu pode ser classificado como apocárpico (quando os carpelos são independentes), pseudossincárpico (carpelos unidos, mas sem

formação de *compitum*) ou eussincárpico (carpelos unidos e com *compitum*). No caso das espécies estudadas, apesar do gineceu ser apenas em parte da extensão do próprio ovário concrecido, a ocorrência do *compitum* interliga os três lóculos, tornando o gineceu funcionalmente eussincárpico.

Os óvulos de *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* são semelhantes aos já descritos na literatura, tanto quanto ao tipo de óvulo, de nucelo e por serem bitegmentados [26-27, 32]. Já os óvulos das duas espécies de *Janusia* e de *C. linearifolia* apresentam apenas um tegumento, como descrito para outras espécies desses gêneros como *J. guaranitica* [9] e *C. affinis* [10]. A ocorrência de óvulos unitegmentados em todas essas espécies pode indicar que essa característica é uma sinapomorfia da tribo Gaudichaudieae. Entretanto, para confirmar essa interpretação, são necessárias análises de óvulos dos demais gêneros da tribo, bem como de gêneros-irmãos, verificando sua constância em todos os gêneros e a exclusividade de sua presença na tribo.

Analisando a anatomia floral das espécies estudadas nesta proposta, é possível observar que, apesar de ocorrer uma homogeneidade na morfologia das flores, no que tange à sua anatomia ocorre grande variação na estrutura, principalmente nas sépalas, pétalas e óvulos. Alguns caracteres mostram uma constância dentro do mesmo gênero e tribo, de modo que podem ser úteis taxonomicamente, como o número de tegumentos no óvulo, a projeção do nucelo através da micrópila e a morfologia das células epidérmicas secretoras presentes nas glândulas calicinais. Entretanto outros caracteres, como a morfologia das células epidérmicas das pétalas e sépalas, variam enormemente e devem representar adaptações aos polinizadores e/ou ao ambiente, não sendo aplicáveis à resolução de problemas filogenéticos na família.

Agradecimentos

As autoras agradecem a Dra. Maria Cândida Mamede e Dra. Renata Sebastiani, pela identificação das espécies; à CAPES e ao CNPq, pelas bolsas de doutorado concedidas à primeira autora. D.M.T. Oliveira também agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

Referências

- [1] W.R. Anderson, Malpighiaceae. Botany of the Guiana Highland – Part XI, Memoires of the New York Botanical Garden 32 (1981) 21–305.
- [2] W.R. Anderson, The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology, Memoirs of the New York Botanical Garden 64 (1990) 210–224.
- [3] S. Vogel, History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology, Memoirs of the New York Botanical Garden 55 (1990) 130–142.
- [4] W.R. Anderson, Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae, Biotropica 11 (1979) 219–223.
- [5] W.S. Judd, C.S. Campbell, E.A. Kellog, P.F. Stevens, Plant Systematics: a phylogenetic approach, Sinauer Associates, Sunderland, 1999.
- [6] J. Hutchinson, The genera of flowering plants, 2 v., Oxford University Press, Oxford, 1967.
- [7] K.M. Cameron, M.W. Chase, W.R. Anderson, H.G. Hills, Molecular systematic of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences, American Journal of Botany, 88 (2001) 1847–1862.
- [8] C.C Davis, W.R. Anderson, M.J. Donoghue, Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* e *trnl-F* nucleotide sequences, American Journal of Botany 88 (2001) 1830–1846.
- [9] E. Lorenzo, Sobre la inflorescência, morfologia floral y embriologia de *Janusia guaranitica* (Malpighiaceae), Kurtziana 14 (1981) 101–124.
- [10] M.C.H. Mamede, Estudo comparativo de flores casmógamas e cleistógamas e de frutos de *Camarea affinis* St.-Hill. (Malpighiaceae), Acta Botanica Brasilica 7 (1993) 21–31.
- [11] L.E. Laskowski, D. Bautista, Características anatómicas y desarrollo del fruto del semeruco (*Malpighia emarginata* DC.), Ernstia 10 (2000) 105–115.

- [12] D.A. Johansen, Plant microtechnique, McGraw-Hill Book, New York, 1940.
- [13] E.A.S. Paiva, S.Z. Pinho, D.M.T. Oliveira, Large plant samples: how to process for (2-hydroxyethyl)-methacrylate embedding? in: H. Chiarini-Garcia, R.C.N. MELO (Eds.), Light microscopy: methods and protocols, Methods in Molecular Biology, v.689, Humana Press, Totowa, NJ, 2011, no prelo.
- [14] T.P. O'Brien, N. Feder, & M.E. McCully, Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O, Protoplasma 59(1964) 368–373.
- [15] L.E. Laskowski, D. Bautista, Características anatómicas de la flor del semeruco (*Malpighia marginata* DC.), Ernstia 9 (1999) 19–36.
- [16] W.R. Anderson, Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae, Leandra 7 (1977) 5–18.
- [17] A.A.S. Paoli, Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophantera lactescens* Ducke (Malpighiaceae), Revista Brasileira de Sementes 19 (1997) 238–244.
- [18] M. Sazima, I. Sazima, Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oil-producing Malpighiaceae, Botanica Acta 102 (1989) 106–111.
- [19] M.R. Sigrist, M. Sazima, Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system, Annals of Botany 94 (2004) 33–41.
- [20] M.A. Castro, A.S. Vega, M.E. Múlgura, Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae), American Journal of Botany 88 (2001) 1935–1944.
- [21] G.M. Volk, V.J. Lynch-Holm, T.A. Kostman, L.J. Goss, V.R. Franceschi, The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves, Plant Biology 4 (2002) 34–45.
- [22] P.A. Nakata, Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants, Plant Science 164 (2003) 901–909.

- [23] E.A.S. Paiva, S.R. Machado, Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (2005) 147–153.
- [24] P.M. Sanders, A.Q. Bui, B.H. Le, R.B. Goldberg, Differentiation and degeneration of cells that play a major role in tobacco anther dehiscence, *Sexual Plant Reproduction*, 17 (2005) 219–241.
- [25] H.P. Burrieza, M.P. López-Fernández, V. Láinez, T. Montenegro, S. Maldonado, On the nature and origin of the oxalate package in *Solanum sisymbriifolium* anthers, *Protoplasma* 247 (2010) 45–56.
- [26] L.S. Souto, D.M.T. Oliveira, Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Revista Brasileira de Botânica* 28 (2005) 697–712.
- [27] L.S. Souto, D.M.T. Oliveira, Morfoanatomia e ontogênese das sementes de espécies de *Banisteriopsis* C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae), *Acta Botanica Brasilica* 22 (2008) 733–740.
- [28] H. Heldt, *Plant Biochemistry*, 3rd ed., Elsevier Academic Press, San Diego, 2004.
- [29] W. Vermerris, R. Nicholson, *Phenolic compound biochemistry*, Springer, The Netherlands, 2008.
- [30] T. Swain, *Tanins and lignins*, in: G.A. Rosenthal, D.H. Janzen (Eds.), *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*, Academic Press, New York, 1979, pp. 657–674.
- [31] S.M.G. Carr, D.J. Carr, The functional significance of syncarpy, *Phytomorphology* 11 (1961) 249–256.
- [32] E.J.H. Comer, *The seeds of dicotyledons*, 2v, University Press, Cambridge, 1976.

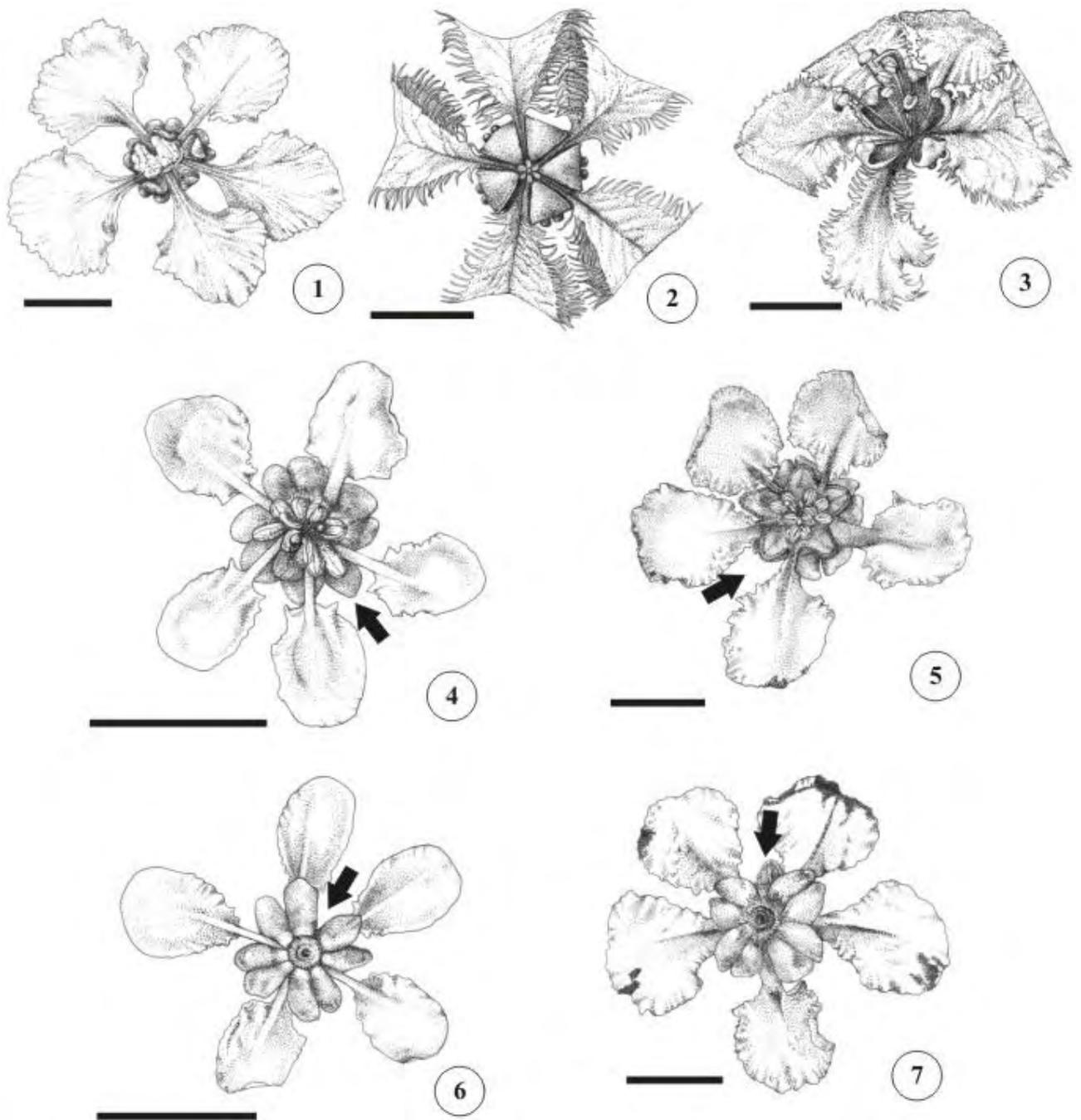


Fig. 1-7. Flores em antese. (1-5) Vista frontal. (1) *C. linearifolia*. (2) *J. mediterranea*. (3) *J. occhionii*. (4) *M. cordifolia*. (5) *T. chamaecerasifolia*. (6-7) Vista posterior. (6) *M. cordifolia*. (7) *T. chamaecerasifolia*. Seta: sépala anterior aglandular. Barras de escala: 5 mm.

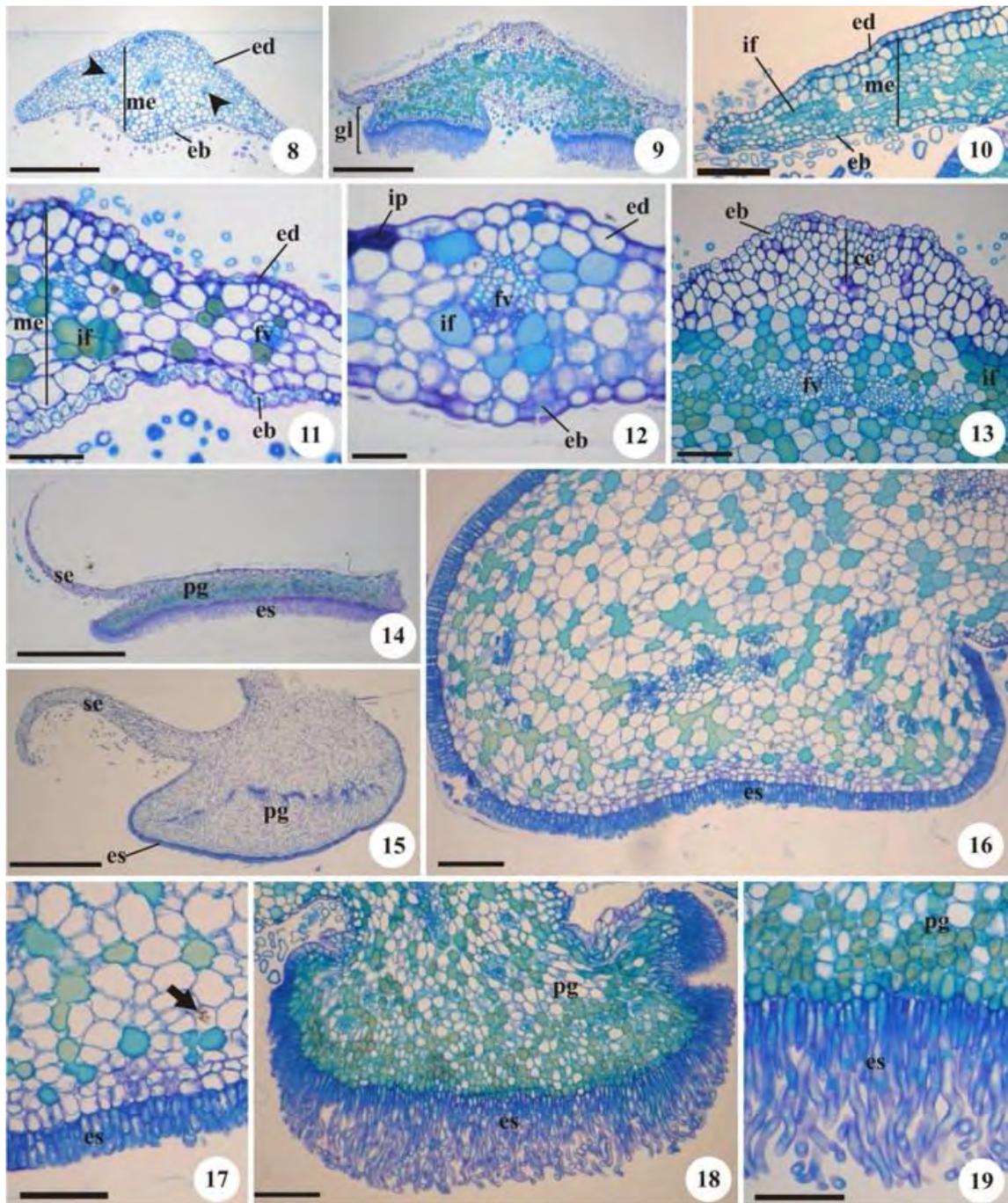


Fig. 8-19. Sépala das cinco espécies estudadas em seções transversais (8-13, 16-19) e longitudinais (14-15). (8) Sépala anterior de *T. chamaecerasifolia* (ponta de seta: feixe vascular). (9) Sépala lateral de *J. occhionii* com glândula. (10) Detalhe de sépala de *J. mediterranea*, mostrando as células da face abaxial menores que as adaxiais, com tricomas em ambas as faces. (11) Detalhe da sépala de *J. occhionii*, com as células da face abaxial maiores que as adaxiais. (12) Sépala de *C. linearifolia*, com as células similares em ambas as faces. (13) Detalhe da nervura central da sépala de *J. occhionii*, mostrando o mesofilo heterogêneo com células colenquimatosas. (14) Sépala de *J. occhionii*; notar a glândula calicinal longa e estreita. (15) Sépala de *T. chamaecerasifolia*, com glândula calicinal mais curta e larga. (16-17) Glândula calicinal de *M. cordifolia*; observar as células epidérmicas em paliçada e o parênquima glandular dividido em duas regiões, com drusas (seta). (18-19) Glândula calicinal de *J. mediterranea*; notar a epiderme glandular formada por tricomas secretores e o parênquima glandular homogêneo. cc: células colenquimatosas; eb: epiderme da face abaxial; ed: epiderme da face adaxial; es: epiderme secretora; fv: feixe vascular; gl: glândula calicinal; if: idioblasto fenólico; ip: idioblasto péctico; me: mesofilo; pg: parênquima glandular; se: sépala. Barras de escala: 2 mm (14-15), 500 µm (8-9), 150 µm (10, 16, 18), 100 µm (11, 13, 17, 19), 50 µm (12).

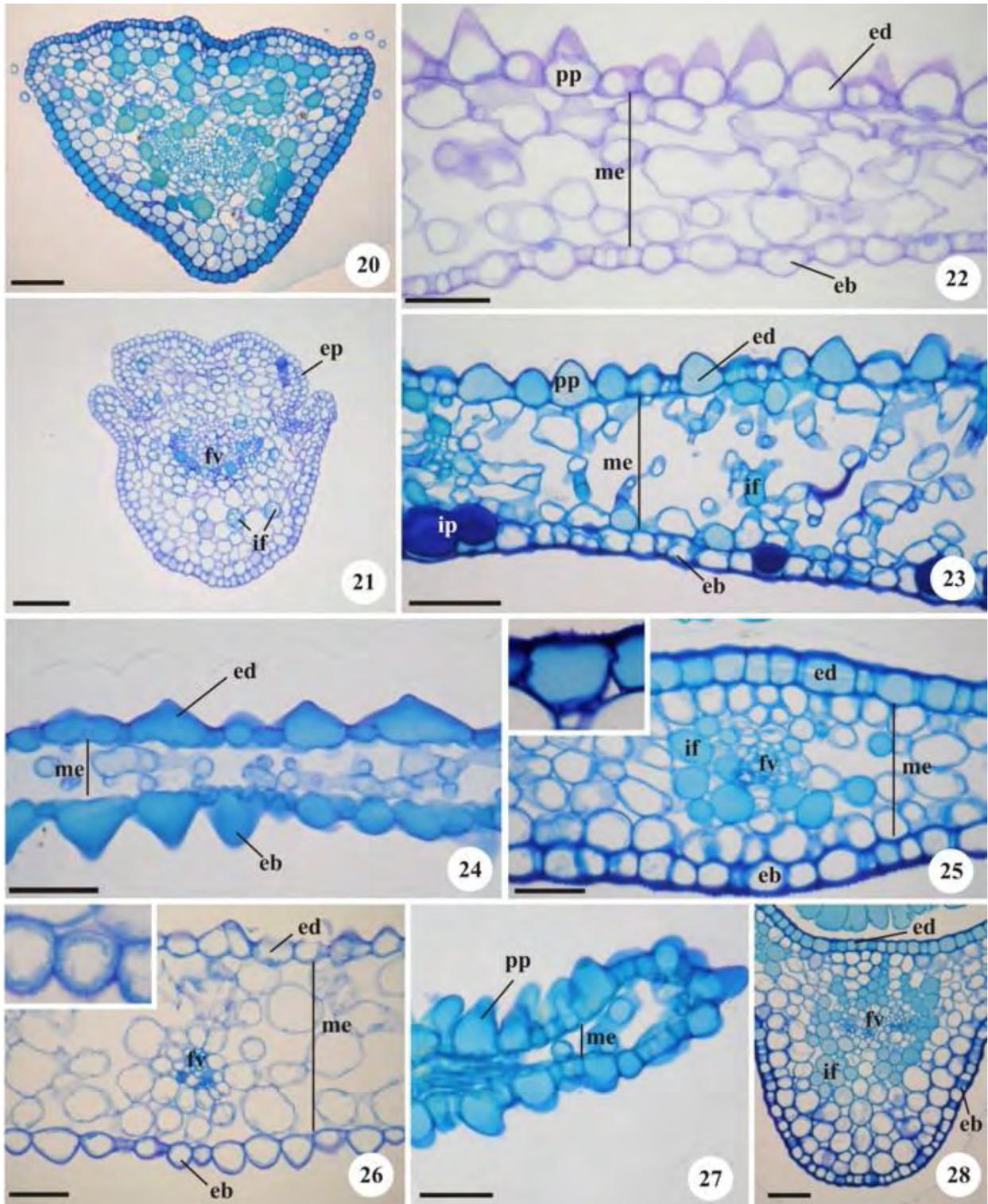


Fig. 20-28. Pétalas das cinco espécies estudadas em seções transversais. (20-21) Vista geral da unha de *J. ochionii* e *C. linearifolia* respectivamente. (22-25) Epiderme e mesofilo na região mediana do limbo. (22) *C. linearifolia*. (23) *J. mediterranea*. (24) *J. ochionii*. (25) *M. cordifolia*; no detalhe, notar a cutícula ornamentada. (26) Limbo de *T. chamaecerasifolia*, com detalhe da epiderme mostrando ornamentação na cutícula. (27) Detalhe do bordo do limbo de *J. mediterranea*, mostrando mesofilo delgado. (28) Detalhe da nervura central do limbo de *M. cordifolia*, mostrando o feixe vascular. eb: epiderme na face abaxial; ed: epiderme na face adaxial; ep: epiderme; fv: feixe vascular; if: idioblasto fenólico; ip: idioblasto péctico; me: mesofilo; pp: papila. Barras de escala: 100 μm (20-21, 23, 28), 50 μm (22, 25-27), 20 μm (24).

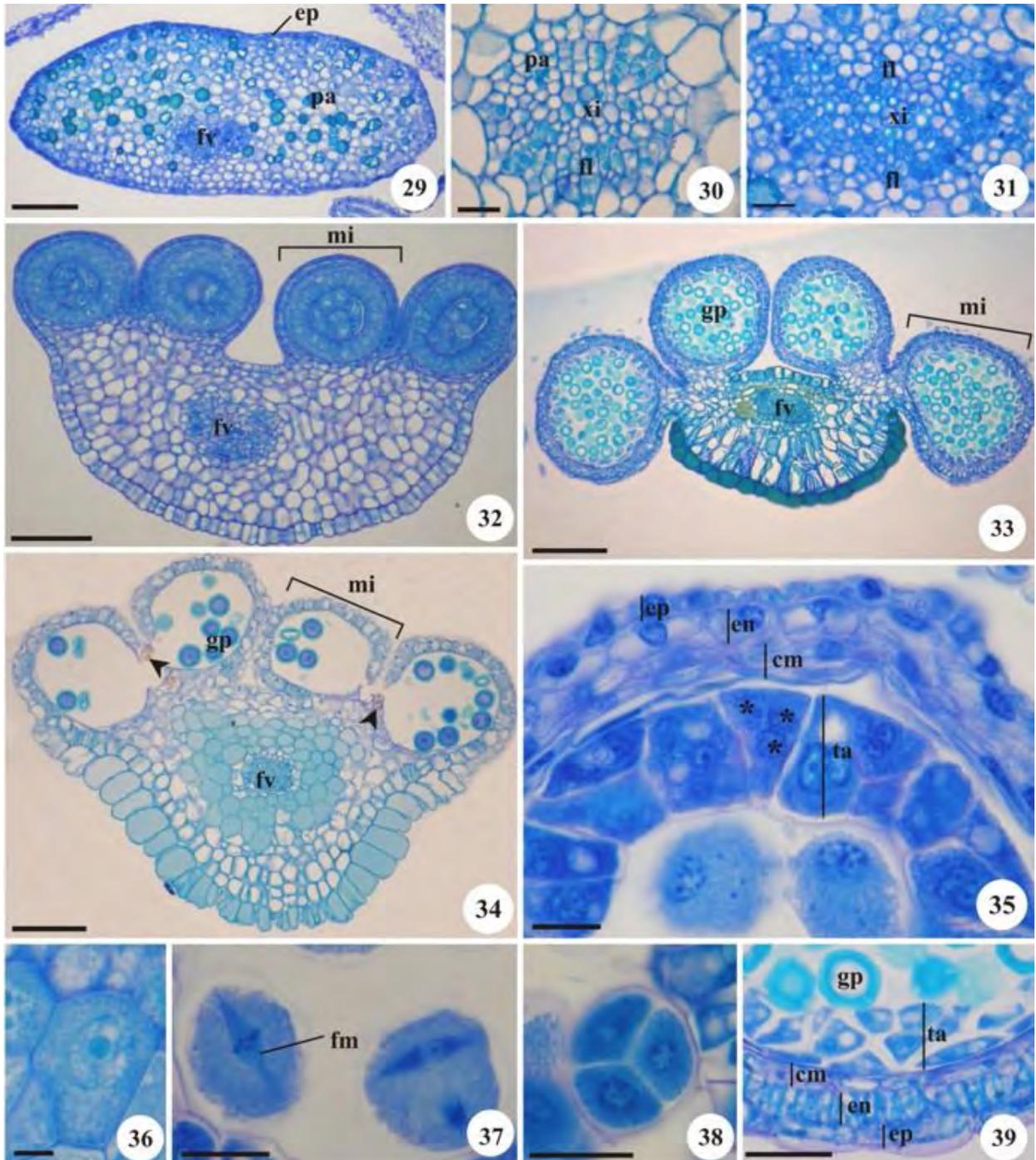


Fig. 29-39. Estames de botões florais em secções transversais. (29) Filete de *C. linearifolia*. (30) Feixe vascular colateral de *T. chamaecerasifolia*. (31) Feixe vascular anicrival de *M. cordifolia*. (32-34) Aspecto geral da antera de *T. chamaecerasifolia*, *J. occhionii* e *M. cordifolia* respectivamente; as pontas de seta indicam as drusas na região interna ao estômio. (35) Detalhe das camadas parietais da antera de *J. mediterranea* (asterisco: núcleos em célula do tapete). 36. Detalhe da célula-mãe de micrósporo de *M. cordifolia*. (37) Duas células-mãe de micrósporo em final de meiose, mostrando que a segunda divisão meiótica é simultânea em *J. mediterranea*. (38) Tétrade tetraédrica de micrósporos de *J. mediterranea*. (39) Detalhe das camadas parietais da antera de botão em pré-antese de *J. occhionii*. cm: camadas médias; en: endotécio; ep: epiderme; fm: fuso meiótico; fl: floema; fv: feixe vascular; gp: grão de pólen; mi: microsporângio; pa: parênquima; ta: tapete; xi: xilema. Barras de escala: 150 μ m (32-34), 100 μ m (29), 50 μ m (39), 20 μ m (30-31, 35, 37-38), 10 μ m (36).

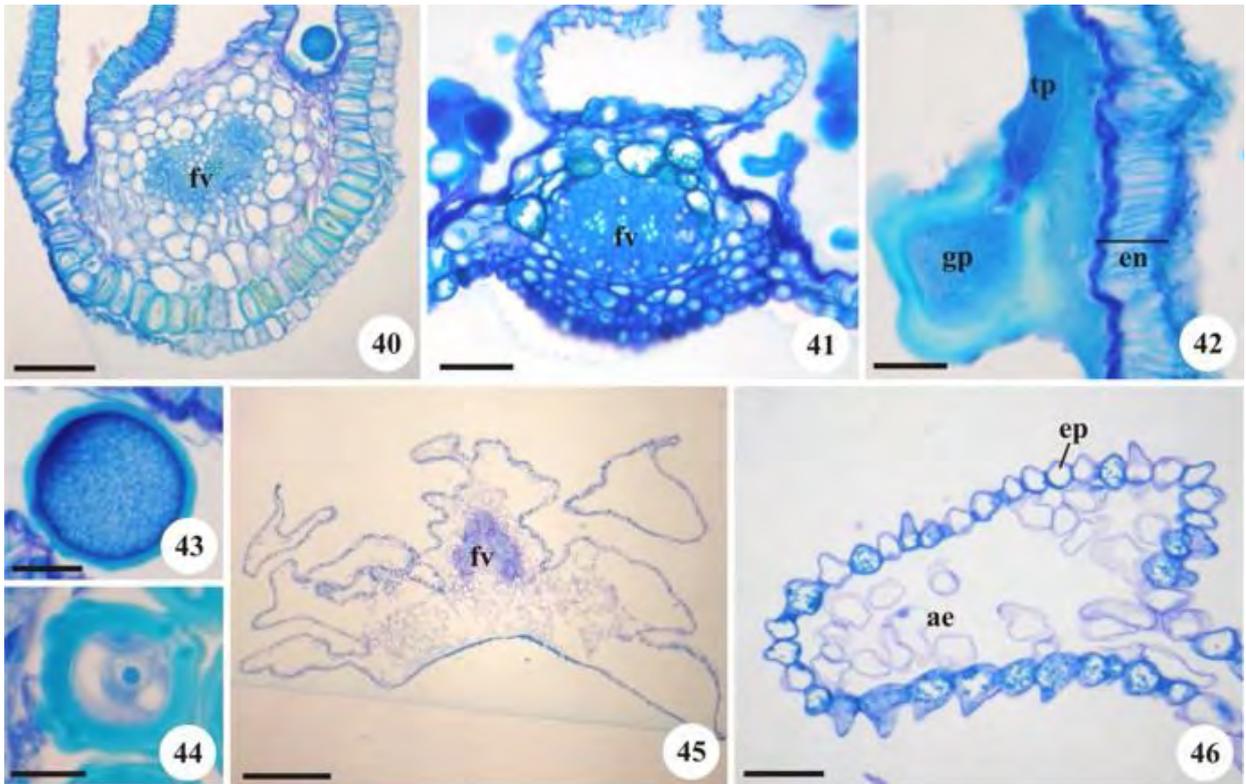


Fig. 40-46. Anteras deiscantes e grãos de pólen em seções transversais. (40) Conectivo de *T. chamaecerasifolia*. (41) Conectivo de *J. occhionii*. (42) Detalhe da parede da antera de *J. mediterranea*; notar que apenas o endotécio é distinguível, com espessamento parietal, e que o grão de pólen maduro está germinando. (43) Grão de pólen de *T. chamaecerasifolia* com formato esférico. (44) Grão de pólen poligonal de *J. mediterranea*. (45-46) Antera lobada do estaminódio de *C. linearifolia*. ae: aerênquima; en: endotécio; ep: epiderme; fv: feixe vascular; gp: grão de pólen; tp: tubo polínico. Barras de escala: 500 µm (45), 100 µm (40), 50 µm (41, 46), 20 µm (42-44).

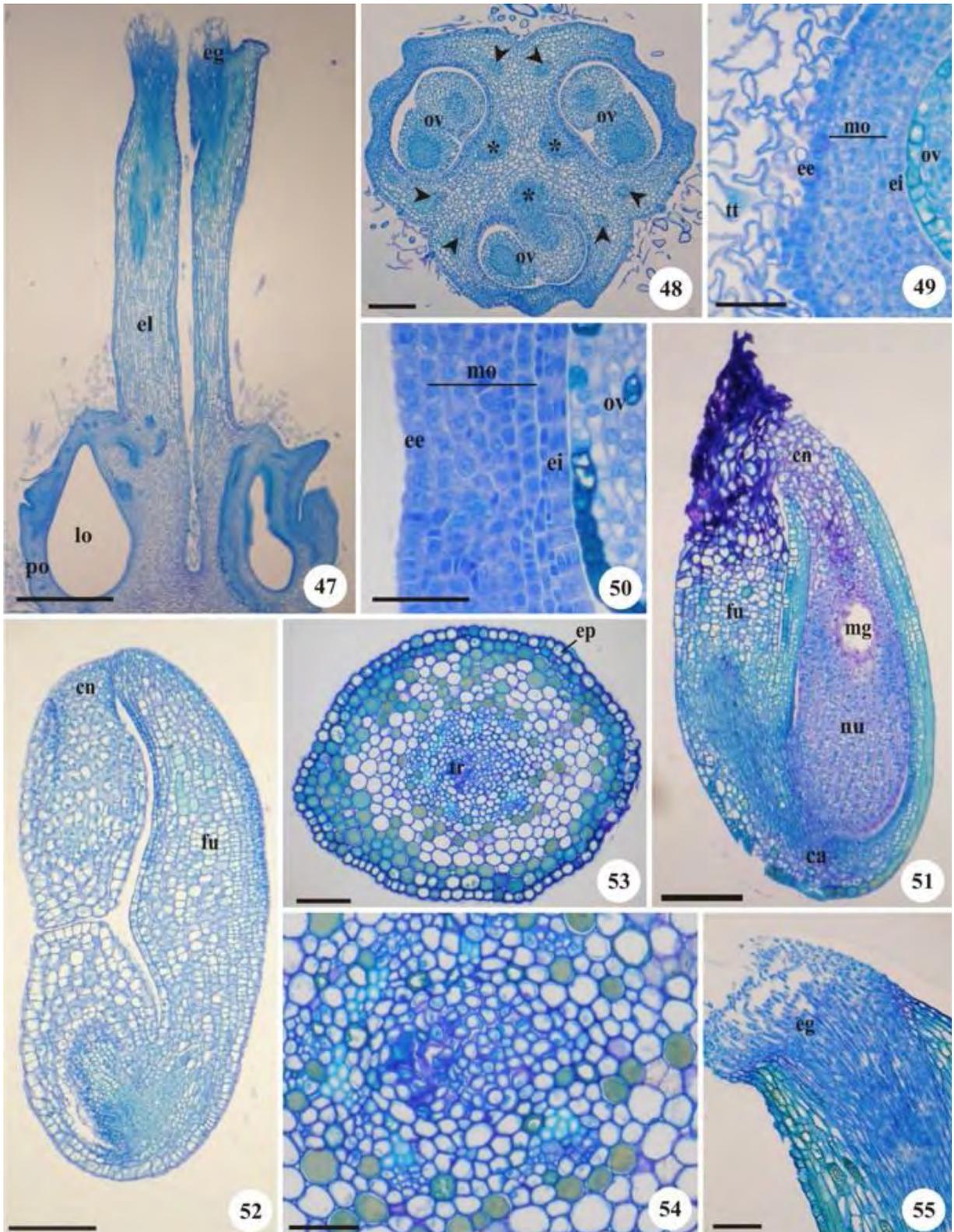


Fig. 47-55. Gineceu em seções longitudinais (47, 51-52, 55) e transversais (48-50, 53-54). (47) Vista geral do ovário *T. chamaecerasifolia*, mostrando a base concrecida e o ápice livre. (48) Ovário de *M. cordifolia*, mostrando um óvulo por lóculo; observar a vascularização, composta por seis feixes laterais (pontas de seta) e três feixes ventrais (asteriscos). (49) Detalhe da parede ovariana de *J. ochionii*; notar grande quantidade de tricomas tectores na epiderme externa e epiderme interna ainda unisseriada. (50) Parede ovariana de *C. linearifolia*; notar epiderme interna já multisseriada. (51) Óvulo de *J. mediterranea*. (52) Óvulo de *M. cordifolia*. (53-54) Estilete de *J. mediterranea*, mostrando tecido de transmissão na região central. 55. Detalhe do estigma de *J. mediterranea*. ca: calaza; cn: células nucelares projetadas; ee: epiderme externa; eg: estigma; ei: epiderme interna; el: estilete; ep: epiderme; fu: funículo; lo: lóculo; mg: megagametófito; mo: mesofilo ovariano; nu: nucelo; ov: óvulo; po: parede ovariana; tr: tecido de transmissão; tt: tricoma tector. Barras de escala: 500 μ m (47), 150 μ m (48, 51-52), 100 μ m (53, 55), 50 μ m (49, 54), 20 μ m (50).

Tabela 1

Aspectos anatômicos das células epidérmicas das espécies de Malpighiaceae estudadas.

Face	Características	<i>Camarea linearifolia</i>	<i>Janusia mediterranea</i>	<i>Janusia ochionii</i>	<i>Mascagnia cordifolia</i>	<i>Tetrapteryx chamaecerasifolia</i>
Adaxial	Tipos celulares	Células comuns e papilas	Células comuns e papilas	Na nervura central, células comuns e papilas; no restante, somente papilas	Células comuns, com parede externa reta a convexa	Células comuns convexas e papilas
	Ornamentação de cutícula	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
	Parede periclinal externa	Sem ornamentação	Sem ornamentação	Sem ornamentação	Ornamentada, com pequenas projeções agudas	Ornamentada, com pequenas projeções agudas
	Impregnações	Ausente	Fenólica	Fenólica	Fenólica	Ausente
Abaxial	Tipos celulares	Células comuns	Células comuns	Na nervura central, células comuns e papilas; no restante, somente papilas	Células comuns	Células comuns e papilas
	Cutícula	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
	Parede periclinal externa	Reta a convexa	Levemente convexa	Convexa na nervura central	Reta	Convexa
	Impregnações	Ausente	Idioblastos pécticos e fenólicos	Fenólica	Fenólica	Ausente



Capítulo III

Original Article

Megasporogênese, megagametogênese e fecundação simples em *Janusia occhionii*: um caso de ausência de célula média em Malpighiaceae neotropical

Letícia Silva Souto¹, Jorge Ernesto de Araujo Mariath² e Denise Maria Trombert Oliveira^{1,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, ² Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil e ³ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Título resumido: Megasporogênese, megagametogênese e fecundação simples de *Janusia occhionii*

* Para correspondência. E-mail dmtoliveira@icb.ufmg.br

1 • *Introdução e objetivos:* A megagametogênese em Malpighiaceae, descrita para
2 raras espécies, é aproximadamente do tipo Penaea e tem sido sugerida a formação de
3 embriões apomíticos em certas espécies. Nosso objetivo é detalhar a megasporogênese,
4 megagametogênese e fecundação em *Janusia occhionii* (Gaudichaudieae), esclarecendo
5 a origem do embrião e discutindo todo o processo de formação do megagametófito no
6 contexto evolutivo das Malpighiaceae; pretende-se comparar, ainda, o megagametófito
7 maduro com o de espécie externa a Gaudichaudieae, tribo considerada derivada na
8 família.

9 • *Métodos:* Foram analisados 90 óvulos de *Janusia occhionii*, que foram fixados,
10 incluídos e seccionados em micrótomato rotativo. Também foram analisados óvulos de
11 *Banisteriopsis stellaris*.

12 • *Resultados-chave:* Após a meiose, a célula-mãe de megásporo origina um
13 megásporo tetranucleado. Os núcleos do megásporo dividem-se mitoticamente,
14 originando um megagametófito 16-nucleado. Essas divisões não são concomitantes,
15 encontrando-se megagametófitos com seis a 16 núcleos livres. Ocorre citocinese em três
16 núcleos no polo micropilar, originando duas sinérgides e a oosfera. Os 13 núcleos
17 restantes degeneram e são reabsorvidos, de modo que não se forma célula média. A
18 fecundação ocorre quando há a descarga do conteúdo do tubo polínico em uma das
19 sinérgides, com os dois gametas masculinos, um deles que degenera. O megagametófito
20 de *B. stellaris* é composto por 16 núcleos, ocorre celularização de doze células na
21 periferia da estrutura, formando-se uma célula tetranucleada no centro do
22 megagametófito, a célula média.

23 • *Conclusões:* Não é possível enquadrar a megagametogênese de *J. occhionii* no
24 tipo Penaea, devido à degeneração de treze núcleos. O registro de ausência de célula
25 média é inédito para Malpighiaceae, que possui célula média tetranucleada em todas as
26 espécies previamente registradas na literatura. Esta ausência representa um estado
27 derivado na família, ocorrendo em tribo considerada derivada em análises moleculares.
28 Com a fecundação simples e a ausência de formação de endosperma, a função de
29 nutrição é transferida para o nucelo, abundante no óvulo.

30

31 **Palavras-chave:** *Janusia occhionii*, *Banisteriopsis stellaris*, célula média,
32 megasporogênese, megagametogênese, Malpighiaceae, fecundação simples.

INTRODUÇÃO

Janusia occhionii é uma espécie herbácea escandente, de flores amarelas vistosas, pertencente à tribo Gaudichaudieae (Malpighiaceae). A tribo é a única comprovadamente monofilética em Malpighiaceae, seja em análises com dados morfológicos (Hutchinson, 1967), seja utilizando-se dados moleculares (Cameron *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2001); é caracterizada por redução nos elementos do androceu, estilete ginobásico único e presença de flores casmógamas e cleistógamas.

Analisando *Janusia guaranitica*, Lorenzo (1981) ressaltou que o embrião das flores cleistógamas da espécie devem ser originados de forma apomítica, já que não foi verificada a fecundação e as anteras dessas flores não se abrem.

Os demais gêneros da família não possuem registro de cleistogamia, entretanto diversos trabalhos têm indicado a possível formação de embrião por meio de apomixia, como em *Hiptage madablota* Gaertn., *Banisteria laurifolia* L. e *Stigmaphyllon aristatum* Lindl. (Subba Rao, 1939), *Thryallis glauca* Kuntze (Singh, 1959) e *Peixotoa reticulata* Griseb. (Anderson, 1982).

Poucas espécies da família foram estudadas em relação ao desenvolvimento do megásporo e do megagametófito, sendo que os raros trabalhos encontrados na literatura são antigos e apresentam descrições sucintas (Subba Rao, 1937, 1939; Narasimhachar, 1938; Cortini, 1958; Lorenzo 1981). Apesar da escassez de informações, os processos de formação do esporo e gameta feminino nas Malpighiaceae parecem ser bastante homogêneos.

Nos gêneros *Hiptage*, *Banisteria*, *Stigmaphyllum* e *Bunchosia* (Schurhoff, 1924 *apud* Subba Rao, 1937), é frequente ocorrerem muitas células arquesporais, mas apenas uma delas desenvolve a função de célula-mãe de megásporo (Subba Rao, 1937). Todos os gêneros estudados até agora apresentam desenvolvimento tetraspórico, com formação de megagametófito 16-nucleado. O desenvolvimento do megagametófito foi descrito como *Lilium* para os gêneros *Hiptage*, *Banisteria*, *Stigmaphyllum*, *Bunchosia* (Subba Rao, 1937) e *Malpighia puniceifolia* (Narasimhachar, 1938), como *Penaea* para *Malpighia fucata* (Cortini, 1958) e *Janusia guaranitica* (Lorenzo, 1981) e como *Malpighia* também para *Malpighia fucata* (Cortini, 1958). Vale destacar o relato de dois tipos de desenvolvimento para *Malpighia fucata*, para quem Cortini (1958) descreveu um novo tipo de desenvolvimento, denominado *Malpighia*, para diferenciar megagametófitos bipolares em contraste com o gametófito tetrapolar característico do tipo *Penaea*.

1 Em todas as espécies registradas na literatura, ocorre a formação de quatro
2 grupos de três células, dispostas no polo calazal, micropilar e equatorialmente, e uma
3 célula média com quatro núcleos que se fundem; esta célula média é formada por um
4 núcleo originário de cada um dos grupos de células periféricas. O aparelho oosférico,
5 localizado no polo micropilar, pode ou não ser diferenciado dos demais três grupos de
6 células (Subba Rao, 1937; Narasimhachar, 1938; Cortini, 1958; Lorenzo, 1981).

7 Lorenzo (1981) descreveu a ocorrência de desorganização nos núcleos durante o
8 desenvolvimento do megagametófito de *Janusia guaranítica*, espécie em que há número
9 variável de núcleos por megagametófito, bem como ocorrem núcleos de tamanhos
10 diferentes.

11 Tendo em vista as diversas peculiaridades do sistema de reprodução em espécies
12 de Malpighiaceae e a falta de detalhamento de suas etapas, a presente proposta tem por
13 objetivo estudar a megasporogênese e a megagametogênese de *Janusia occhionii*,
14 visando a determinar o tipo de esporo e a origem do embrião formado. Por outro lado,
15 pretende-se discutir o processo de formação do megagametófito no contexto evolutivo
16 das Malpighiaceae, comparando-se a estrutura do megagametófito de *J. occhionii* com a
17 de espécie externa à tribo Gaudichaudieae.

18 MATERIAL E MÉTODOS

19 Foram coletadas cerca de 100 amostras de botões florais em diversas fases de
20 desenvolvimento e flores em antese e pós-antese, provenientes de cinco indivíduos de
21 *Janusia occhionii*, pertencentes a uma população natural de cerrado do município de
22 Avaré, SP, Brasil. Ramos com flores e frutos foram herborizados e inseridos no
23 Herbário BOTU sob o número 25.788, como documento taxonômico. As amostras
24 foram fixadas na mistura de Karnovsky (Karnovsky, 1965), ou em solução de
25 glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (McDowell e
26 Trump, 1976).

27 Em seguida, as amostras fixadas foram dissecadas, isolando-se os óvulos, que
28 foram desidratados em série etílica, infiltrados e incluídos em 2-hidroxietil-metacrilato
29 (Historesina Leica[®]). As secções seriadas foram obtidas com auxílio de micrótomo de
30 rotação, com 6µm de espessura. As lâminas obtidas foram coradas com Azul de
31 Toluidina 0,05%, pH 4,4 (Feder e O'Brien, 1968) ou Azul de Toluidina 0,05% pH4,7
32 (O'Brien *et al.*, 1964, modificado), montadas em resina sintética. Após observação, o
33 material foi documentado por meio de microscópio Leica DMR-HC com câmera Leica
34

1 DFC 500 acoplada. Para caracterizar a distribuição dos núcleos no megagametófito,
2 foram avaliados 90 óvulos.

3 Para descrição da fecundação foi adotada a terminologia proposta por Cocucci
4 (1995).

5 Óvulos de *Banisteriopsis stellaris* também foram fixados e processados segundo
6 os protocolos relatados, de modo a permitir a análise da variabilidade dos
7 megagametófitos de Malpighiaceae, comparando-se espécie da tribo Gaudichaudieae (*J.*
8 *occhionii*) e externa à tribo (*B. stellaris*).

9

10

RESULTADOS

11

Megasporogênese

12

13

14

15

16

Uma única célula arquesporial desenvolve-se no início da formação do óvulo (Fig. 1A), sendo identificada pelo seu tamanho, muito maior em relação às demais células nucleares, bem como a dimensão avantajada do núcleo (Fig. 1A-B). Nesta fase, é possível observar que a célula arquesporial encontra-se interna a duas a três camadas de células nucleares em relação à superfície (Fig. 1A-B).

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

A célula arquesporial inicia o acúmulo de polissacarídeos em pequenas vesículas, precursoras do vacúolo (Fig. 1B). Em seguida, aumenta de volume e inicia-se a meiose, sendo possível observar o adensamento dos cromossomos e o nucléolo ainda intacto, porém com sinais de desestruturação da membrana nuclear (Fig. 1C). Ao final da primeira fase da meiose, são observados dois núcleos bem constituídos, com membrana nuclear, em uma única célula (Fig. 1D); ainda se observam as pequenas vesículas com conteúdo polissacarídico (Fig. 1D), sendo que essas, aos poucos, coalescem formando um único vacúolo central, que afasta os núcleos para os polos calazal e micropilar da célula. Após a constituição do vacúolo único, ocorre a segunda fase da meiose, ao final da qual se observa um cenócito com quatro núcleos livres, constituindo o megásporo maduro (Fig. 1E-F).

28

29

30

A polarização dos núcleos no megásporo é variável, encontrando-se de unidades tetrapolarizadas (Fig. 1E-F) a unipolarizadas.

31

Megagametogênese

32

33

34

O megagametófito é de origem tetraspórica. O esporo tetranucleado amplia seu volume, devido principalmente, ao aumento do vacúolo central, ao mesmo tempo em que cada um dos quatro núcleos se divide mitoticamente, originando um cenócito 8-

1 nucleado (Fig. 2A-D). Subsequentemente, os oito núcleos dividem-se mitoticamente,
2 originando um megagametófito unicelular e 16-nucleado (Fig. 2E-M). Embora todos os
3 núcleos dividam-se como mencionado, as análises indicam que essas mitoses não são
4 simultâneas, sendo encontrados megagametófitos com seis a 16 núcleos.

5 A disposição dos núcleos no megagametófito não segue um único padrão. Dos
6 óvulos observados, 57,78% apresentam o megagametófito tetrapolarizado, com os
7 núcleos periféricamente, com disposição em cruz. Em 22,22% dos óvulos analisados, o
8 megagametófito é bipolar, com os núcleos concentrados no polo calazal e no micropilar.
9 Também é possível observar um padrão tripolar em 17,78% dos casos, onde ocorrem
10 núcleos no polo micropilar, no polo calazal e em uma das laterais. Em 2,22%, os
11 núcleos ficam restritos à região micropilar, caracterizando o megagametófito unipolar.

12 Logo após a formação dos 16 núcleos, ocorre a citocinese em três dos núcleos
13 voltados para o polo micropilar, originando o aparelho oosférico, composto por duas
14 sinérgides e pela oosfera (Fig. 2N-O). Em alguns megagametófitos, também ocorre
15 celularização em núcleos laterais e no polo calazal, mas essa característica não é
16 constante e ocorre apenas em 33,37% dos megagametófitos observados.

17 Devido ao grande vacúolo central do cenócito, o citoplasma propriamente dito se
18 restringe ao polo micropilar, onde se diferencia, por citocinese, o aparelho oosférico. As
19 duas sinérgides, inicialmente, apresentam citoplasma abundante, com um único vacúolo
20 localizado na metade calazal da célula, e núcleo volumoso, esférico, com nucléolo
21 central e com cromátides pouco condensadas, localizado no polo micropilar das
22 sinérgides (Fig. 2N-O). Uma das sinérgides encontra-se paralela ao maior eixo do
23 megagametófito, enquanto que a outra fica orientada num ângulo de 90° em relação à
24 primeira. A oosfera dispõe-se atrás das sinérgides, com o núcleo próximo ao limite
25 lateral do megagametófito; sua morfologia é semelhante à das sinérgides (Fig. 2O).
26 Nesta fase, observam-se os 13 núcleos restantes, dispostos na periferia de uma grande
27 célula que compõe o restante do megagametófito.

28 A partir deste momento, os núcleos livres da célula calazal começam a degenerar
29 (Fig. 3A-C), processo evidenciado morfológicamente pelo contorno irregular e pela
30 picnose (Fig. 3D-E). Concomitantemente, aumentam as dimensões dos vacúolos das
31 células do aparelho oosférico, de maneira que tais células ocupam a metade micropilar
32 do megagametófito (Figs 3F-G). Nas sinérgides, desenvolve-se o aparelho fibrilar,
33 observável desde a porção micropilar do megagametófito até o limite com a célula
34 calazal.

1 Em *J. occhionii*, não ocorre migração de núcleos para a região central do
2 megagametófito, não havendo a formação de célula média, já que todos os núcleos
3 externos ao aparelho oosférico degeneram.

4 Durante a fecundação, foi observado o acoplamento, com a chegada do tubo
5 polínico ao topo nucelar, seu crescimento em direção ao megagametófito por entre as
6 células nucleares, que tornam seu caminho sinuoso. O tubo polínico atinge o
7 megagametófito em posição apical ou ligeiramente lateral. A partir daí, tem início a
8 cópula, com o aparecimento de uma dilatação na porção apical do tubo que está em
9 contato com o aparelho fibrilar da sinérgide e formação do tubo copulador. Este penetra
10 a sinérgide e se prolonga alcançando cerca de um terço do comprimento da mesma (Fig.
11 4A). O tubo copulador apresenta parede espessa e formato alongado, com a extremidade
12 assemelhando-se a uma agulha. Ocorre a descarga do conteúdo do tubo, mesclando os
13 protoplastos da sinérgide e do tubo polínico. É visível a desorganização celular da
14 sinérgide penetrada, quando comparada à sinérgide intacta, visto que não se reconhece a
15 delimitação vacuolar e seu núcleo torna-se picnótico. Apesar dos indícios de morte
16 celular da sinérgide e do tubo, percebem-se íntegros os dois gametas masculinos,
17 reconhecendo-se também o núcleo da sinérgide penetrada e o núcleo do tubo polínico
18 (Fig. 4B). Nesses últimos, nota-se o início de desorganização nuclear, caracterizado
19 pelo formato irregular, tendendo a triangular, e pela resposta picnótica. É possível
20 observar também que a descarga polínica rompe a sinérgide na região de contato com a
21 célula calazal do megagametófito, permeando o citoplasma em direção à oosfera e
22 estabelecendo o caminho por onde um dos gametas segue e completa a fecundação
23 desta célula, produzindo o zigoto embrionário (Fig. 4C). O segundo gameta masculino
24 não é funcional, degenerando a seguir, em conjunto com a célula calazal do
25 megagametófito, na qual não ocorre a formação do núcleo secundário em *J. occhionii*.

26 Esta situação de ausência de célula média diferenciada no megagametófito não é
27 constante em Malpighiaceae, conforme se pode observar em *Banisteriopsis stellaris*.
28 Nesta espécie, o megagametófito maduro é também formado por 16 núcleos, contudo
29 organizado em 13 células. Nos polos do megagametófito, são formados quatro grupos,
30 de três células cada. Em todos eles, as células apresentam estrutura semelhante. O
31 aparelho oosférico corresponde ao grupo de três células que se diferenciam no polo
32 micropilar, podendo ser identificado apenas pela posição, já que não apresenta
33 características estruturais distintivas dos demais grupos de células. Na região central do
34 megagametófito, observa-se a célula média, bem ampla e vacuolada, apresentando

1 quatro núcleos bem distintos (Fig. 4D), os quais posteriormente se fundem, compondo o
2 núcleo secundário que será fecundado, paralelamente à oosfera.

4 DISCUSSÃO

5 A tribo Gaudichaudieae, único grupo monofilético da família, é considerada
6 derivada em Malpighiaceae segundo dados moleculares (Cameron *et al.*, 2001); diversas
7 sinapomorfias indicam sua monofilia, tais como androceu reduzido e estilete único
8 (Mamede e Mayo, 1992). Estas premissas indicam que devem ocorrer outros caracteres
9 derivados em espécies de Gaudichaudieae (como *Janusia occhionii*), quando
10 comparadas com *Hiptage*, *Banisteria*, *Stigmaphyllon*, *Thryallis*, *Peixotoa*, *Bunchosia* e
11 *Malphigia*, gêneros pertencentes aos demais clados (Cameron *et al.*, 2001; Davis *et al.*,
12 2001).

13 O padrão de desenvolvimento do megagametófito encontrado em *J. occhionii*
14 não pode ser enquadrado nos tipos pré-estabelecidos na literatura. O padrão mais
15 próximo é *Penaea* (Maheshwari, 1950) porém, na espécie aqui estudada, ocorre
16 degeneração da maioria dos núcleos do megagametófito, além de variação na
17 polarização dos núcleos, características incompatíveis com o tipo *Penaea*.

18 Apesar da ocorrência de tetrasporia em todas as espécies de Malpighiaceae
19 registradas na literatura, observam-se variações no desenvolvimento do
20 megagametófito. Essas alterações ficam evidenciadas pela ocorrência de desordem
21 nuclear, presença de núcleos de tamanhos distintos e a ocorrência de megagametófitos
22 tetrapolarizados e bipolarizados, registrados apenas para *Janusia guaranitica* (Lorenzo,
23 1981), e também tripolarizados e unipolarizados, documentados neste trabalho para *J.*
24 *occhionii*. Diante disso, embora as Malpighiaceae tenham megagametófitos
25 generalizadamente tetraspóricos, pode-se concluir que sua polaridade é muito variável
26 (de um a quatro polos), pois está condicionada à morte celular das células não
27 componentes do aparelho oosférico, ou seja, células micropilares do megagametófito.

28 A hipótese mais aceita atualmente para a origem do megagametófito é a de que
29 as angiospermas primitivas teriam um megagametófito com quatro células (oosfera,
30 duas sinérgides e a célula média), todas haplóides (Williams e Friedman, 2004). Esse
31 conjunto constituiria o módulo básico, a partir do qual todos os outros tipos de
32 megagametófitos se desenvolveram. O tipo *Polygonum*, o mais comum entre as
33 angiospermas, teria se originado pela duplicação desse módulo. No caso dos

1 gametófitos de origem tetraspórica, acredita-se que ocorreu uma quadruplicação desse
2 mesmo módulo.

3 Entretanto, não há na literatura trabalhos que descrevam a megagametogênese
4 em gêneros basais de Malpighiaceae, não sendo possível, portanto, estabelecer se o
5 desenvolvimento de origem tetraspórica é uma sinapomorfia do grupo ou se o mesmo se
6 originou durante a diversificação da família. Assim, estudos do desenvolvimento dos
7 gametófitos femininos em espécies basais de Malpighiaceae, como as do gênero
8 *Byrsonima* (Davis *et al.*, 2001), constituiriam interessantes ferramentas para esclarecer
9 essa questão e a relação filogenética da polarização do megagametófito em
10 Malpighiaceae.

11 Uma característica instigante é a degeneração de núcleos que ocorre durante a
12 maturação do megagametófito. Num primeiro momento, parece não fazer sentido o
13 investimento energético na produção de 16 núcleos, seguido da degeneração da maioria
14 deles. Entretanto, seguindo a proposta de Stebbins (1974), de que a evolução segue as
15 linhas de menor resistência, o que se percebe é um processo de economia de energia,
16 desde a esporogênese, com a formação de um único esporo com quatro núcleos, até o
17 gametófito, com a priorização apenas do aparelho oosférico. Visto que a esporogênese
18 tem se mostrado invariável nas espécies de Malpighiaceae até agora estudadas (todas
19 são tetraspóricas), as alterações evolutivas aqui constatadas em *Janusia* ocorrem na fase
20 gametofítica, com a redução da diferenciação final dos módulos produzidos, de quatro
21 para apenas um, aquele que se localiza no polo micropilar. Embora signifique economia
22 energética e redução da fase gametofítica, este evento culmina, por outro lado, na
23 ausência de formação da célula média e de seu núcleo secundário, que seria o
24 responsável pela posterior formação do endosperma.

25 Visto que todas as espécies de Malpighiaceae descritas na literatura apresentam
26 célula média composta por quatro núcleos que se fundem, como documentado aqui para
27 *B. stellaris*, a ausência de célula média em *J. occhionii* poderia ser questionada como
28 artefato de técnica, que teria dificultado sua visualização. Porém, essa hipótese é
29 afastada, já que foram analisadas 90 repetições e, durante o desenvolvimento seminal,
30 não se constata a formação de endosperma para a referida espécie (Souto e Oliveira,
31 Capítulo V, neste volume); assim, a ausência de diferenciação da célula média explica a
32 ausência de produção de endosperma.

33 Em *B. stellaris*, espécie externa a Gaudichaudieae que apresenta célula média,
34 Souto e Oliveira (2008) descreveram o desenvolvimento seminal da espécie e relataram

1 a ocorrência de endosperma, embora formado em pequena proporção. Portanto, a
2 presença de célula média, documentada para *B. stellaris*, está de acordo com a
3 ocorrência de endosperma, mesmo que escasso, que é descrita na literatura para esta
4 espécie e generalizada para as Malpighiaceae (Corner 1976).

5 O desenvolvimento das sementes de Malpighiaceae não apresenta grandes
6 variações, sendo que todas as espécies estudadas até hoje, externas a Gaudichaudieae,
7 apresentam formação de endosperma (Nacif *et al.*, 1996; Paoli, 1997; Laskowski e
8 Bautista, 2000; Souto e Oliveira, 2005, 2008) e devem, portanto, apresentar a célula
9 média no megagametófito maduro. O trabalho de Lorenzo (1981) relatou a
10 megagametogênese de outra espécie de *Janusia*. Segundo o autor, *J. guaranítica*
11 apresenta megagametófito maduro variável, mas apresentando sempre quatro núcleos no
12 polo micropilar: dois originam as sinérgides, um deles origina a oosfera, e o outro
13 núcleo corresponde à célula média, sendo sua ploidia variável, dependendo do número
14 de núcleos que se fundem para formá-la. O atual estudo com *J. occhionii* não corrobora
15 as observações de Lorenzo (1981), embora as diferenças encontradas entre os dois
16 estudos possam ser devidas a variações entre as espécies. Entretanto, acredita-se que tais
17 diferenças sejam devidas às dificuldades de observação do material, já que o referido
18 autor não dispunha das atuais técnicas de fixação, nem de cortes delgados o bastante
19 para segura observação do material, nem mesmo de colorações mais específicas. A
20 ausência da célula média e, por consequência, do endosperma em *J. occhionii* não gera
21 prejuízos à semente, já que os óvulos de Malpighiaceae possuem nucelo abundante
22 (Corner, 1976; Paoli, 1997; Souto e Oliveira, 2005), que prolifera durante o
23 desenvolvimento do embrião (Souto e Oliveira, Capítulo V, neste volume), atuando
24 como tecido nutritivo seminal, papel convencionalmente realizado pelo endosperma.
25 Trata-se, portanto, de uma redução estrutural, de um megagametófito, inicialmente 16-
26 celular, para um megagametófito tricelular no momento da fecundação.

27 Como consequência desta redução, ocorre a transferência de função de nutrição
28 do novo esporófito em desenvolvimento, do endosperma para o perisperma, resultante
29 do nucelo amplo, já existente no óvulo (vide Souto e Oliveira, Capítulo V, neste
30 volume). Embora as Angiospermas sejam caracterizadas pela dupla fecundação (Favre-
31 Duchartre, 1984), a ocorrência de fecundação simples em *J. occhionii* pode ser
32 considerada uma reversão neste grupo. A existência prévia do amplo tecido nucelar
33 assemelha-se ao endosperma primário das Gimnospermas, onde o tecido de nutrição do
34 esporófito jovem também é formado antes da fecundação. No entanto, diferente do que

1 ocorre nas Gimnospermas, na espécie estudada o nucelo prolifera intensamente após a
2 fecundação e, portanto, o maior investimento energético em sua produção ocorre
3 exclusivamente se o processo de fecundação for efetivado e o embrião produzido.
4 Assim, a ausência da célula média e do endosperma pode ser entendida como uma
5 característica derivada nas Gaudichaudieae. A condição em que o nucelo, já abundante
6 no óvulo, é ampliado durante o desenvolvimento seminal, torna-se uma situação
7 vantajosa sobre a dupla fecundação; na fecundação única de *J. occhionii*, há economia
8 da energia que seria usada para a formação da célula média, com a garantia de um
9 tecido de nutrição, produzido apenas por novas mitoses nucleares, que ocorrem apenas
10 após a fecundação da oosfera.

11

12

AGRADECIMENTOS

13 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
14 (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
15 (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado de L.S. Souto; ao CNPq, também pelas
16 bolsas de Produtividade em Pesquisa de D.M.T. Oliveira e J.E.A. Mariath; à Pró-
17 Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pelo
18 financiamento que permitiu a realização de atividades na Universidade Federal do Rio
19 Grande do Sul; à Dra. Maria Candida Henrique Mamede e à Dra. Renata Sebastiani,
20 pela identificação das espécies.

21

22

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 23 **Anderson C. 1982.** A monograph of the genus *Peixotoa* (Malpighiaceae). *Contributions*
24 *of the University of Michigan Herbarium* **15**: 1–92.
- 25 **Cameron KM., Chase MW, Anderson WR, Hills HG. 2001.** Molecular systematic of
26 Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal*
27 *of Botany* **88**: 1847–1862.
- 28 **Cocucci AE. 1995.** *El proceso sexual en Angiospermas*, 2nd edn. Córdoba: Academia
29 Nacional de Ciencias.
- 30 **Corner E.J.H. 1976.** *The seeds of dicotyledons*. Cambridge: University Press. Vol. 2.
- 31 **Cortini C. 1958.** Sviluppo del gametofito femminile in *Malpighia fucata* ker-Gawl.
32 (Malpighiaceae). *Caryologia* **10**: 42–56.

- 1 **Davis CC, Anderson WR, Donoghue MJ. 2001.** Phylogeny of Malpighiaceae:
2 evidence from chloroplast *ndhF* e *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of*
3 *Botany* **88**: 1830–1846.
- 4 **Favre-Duchartre M. 1984.** Homologies and phylogeny. In: Johri BM, ed. *Embryology*
5 *of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag, 697–734.
- 6 **Feder N, O'Brien TP. 1968.** Plant microtechnique, some principles and new methods.
7 *American Journal of Botany* **55**: 123–142.
- 8 **Hutchinson J. 1967.** *The genera of flowering plants*. Oxford: Oxford University Press.
9 Vol. 2.
- 10 **Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for
11 use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- 12 **Laskowski LE, Bautista D. 2000.** Características anatómicas y desarrollo del fruto del
13 semeruco (*Malpighia emarginata* DC.). *Ernstia* **10**: 105–115.
- 14 **Lorenzo E. 1981.** Sobre la inflorescência, morfología floral y embriología de *Janusia*
15 *guaranitica* (Malpighiaceae). *Kurtziana* **14**: 101–124.
- 16 **Mamede MCH, Mayo SJ. 1992.** A cladistic analysis of the genus *Camarea*
17 (Malpighiaceae). *Kew Bulletin* **47**: 491–501.
- 18 **Maheshwari P. 1950.** *An introduction to the embryology of angiosperms*. New York:
19 MacGraw Hill.
- 20 **McDowell E, Trump B. 1976.** Histological fixatives for diagnostic light and electron
21 microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **100**: 405–414.
- 22 **Nacif SR, Guardia MC, Moraes PLR. 1996.** Morfologia e anatomia das sementes de
23 acerola (*Malpighia glabra* L. – Malpighiaceae). *Revista Ceres* **43**: 597–610.
- 24 **Narasimhachar SG. 1938.** Megasporogenesis and female gametophyte in *Malpighia*
25 *puncifolia* Linn. *Current Science* **6**: 507–509.
- 26 **O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls
27 by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- 28 **Paoli AAS. 1997.** Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophantera lactescens*
29 Ducke (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Sementes* **19**: 238–244.
- 30 **Singh B. 1959.** Studies in the family Malpighiaceae. 1. The morphology of *Thryallis*
31 *glauca* Kuntze. *Horticultural Advanced* **3**: 1–19.

- 1 **Stebbins GL. 1974.** *Flowering Plants: evolution above the species level*. Cambridge:
2 The Belknap Press of Harvard University Press.
- 3 **Souto LS, Oliveira DMT. 2005.** Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de
4 *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **28**:
5 697–712.
- 6 **Souto LS, Oliveira DMT. 2008.** Morfoanatomia e ontogênese das sementes de
7 espécies de *Banisteriopsis* C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae).
8 *Acta Botanica Brasilica* **22**: 733–740.
- 9 **Subba Rao AM. 1937.** A note on the development of the female gametophytes of some
10 Malpighiaceae and polyembryony in *Hiptage madablota*. *Current Science* **6**: 280–
11 282.
- 12 **Subba Rao AM. 1939.** Studies in the Malpighiaceae: I. Embryo-sac development and
13 embryogeny in the genera *Hiptage*, *Banisteria* and *Stigmaphyllum*. *Journal of the*
14 *Indian Botanical Society* **18**: 146–156.
- 15 **Williams JH, Friedman WE. 2004.** The four-celled female gametophyte of *Illicium*
16 (Illiciaceae; Austrobaileyales): implications for understanding the origin and early
17 evolution of monocots, eumagnolids and eudicots. *American Journal of Botany* **91**:
18 332–351.

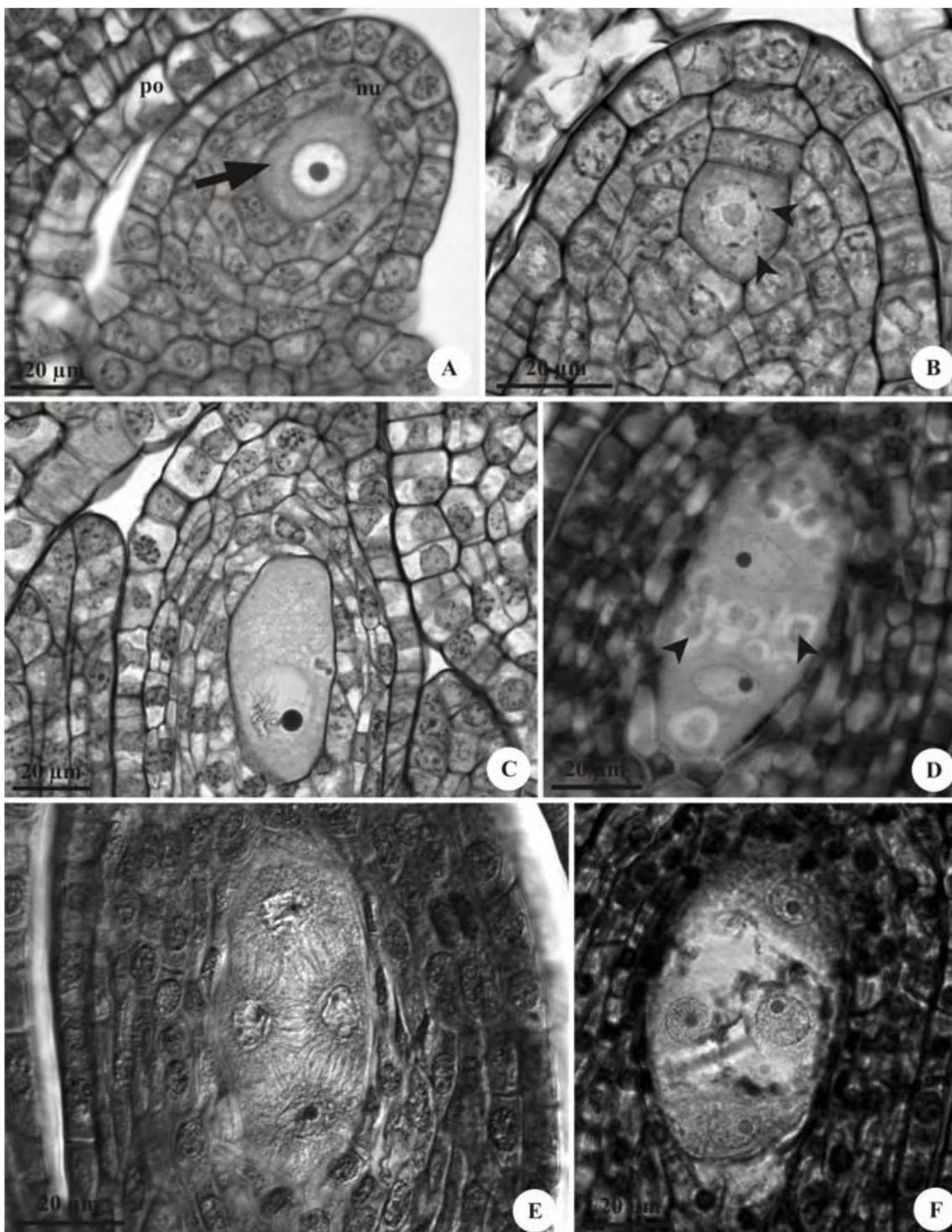


FIG. 1. Megasporogênese de *Janusia ockionii* (secções longitudinais). (A) Detalhe do óvulo, mostrando célula arquesporrial (seta) com núcleo com cromátide pouco condensada e nucléolo bem evidente. (B) Célula arquesporrial com início de acúmulo de substâncias pécticas (ponta de seta). (C) Célula-mãe de megásporo; notar o adensamento de cromossomos e nucléolo ainda visível. (D) Final da primeira fase da meiose, com dois núcleos em um cenócito; notar as vesículas com substâncias pécticas (ponta de seta). (E) Fase final da meiose, com os quatro núcleos formados, ainda sendo possível observar os fusos meióticos. (F) Montagem proveniente de duas secções, mostrando o megásporo maduro com quatro núcleos em um cenócito; notar o citoplasma na periferia e um amplo vacúolo central contendo substância péctica. (nu: nucléolo, po: parede ovariana).

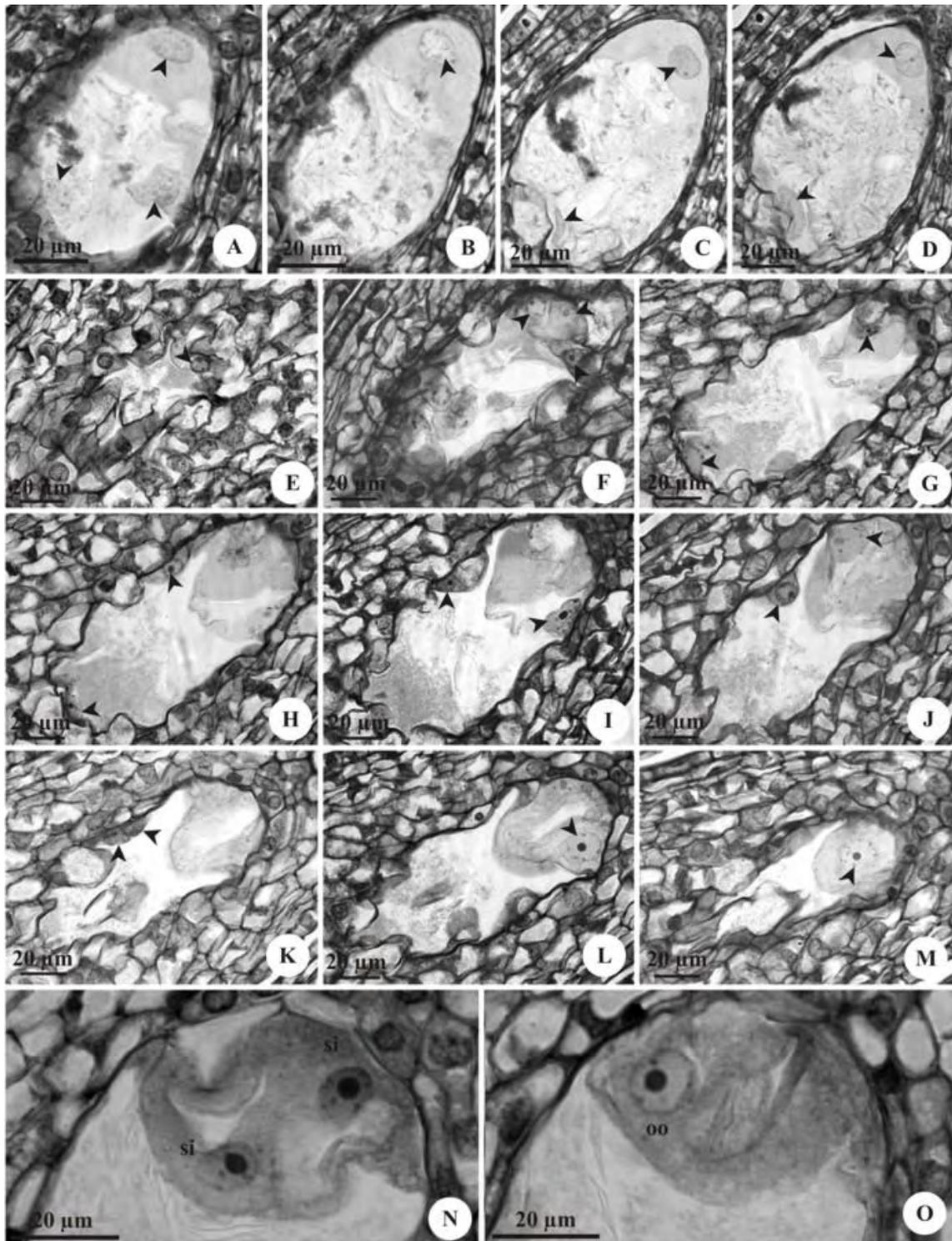


FIG. 2. Megagametogênese de *Janusia occhionii* (secções longitudinais). (A-D) Secções seriadas de megagametófito em desenvolvimento, após a primeira divisão mitótica, com oito núcleos livres (pontas de seta) em uma ampla célula com vacúolo central. (E-M) Secções seriadas de megagametófito em desenvolvimento, após a segunda divisão mitótica, apresentando 16 núcleos livres (pontas de seta); notar o início de formação de parede celular nas células do pólo micropilar. (N-O) Aparelho oosférico imaturo; notar a disposição em 90° de uma sinérgide em relação à outra, fazendo com que o núcleo de uma delas pareça estar em posição calazal. (oo: oosfera; si: sinérgide).

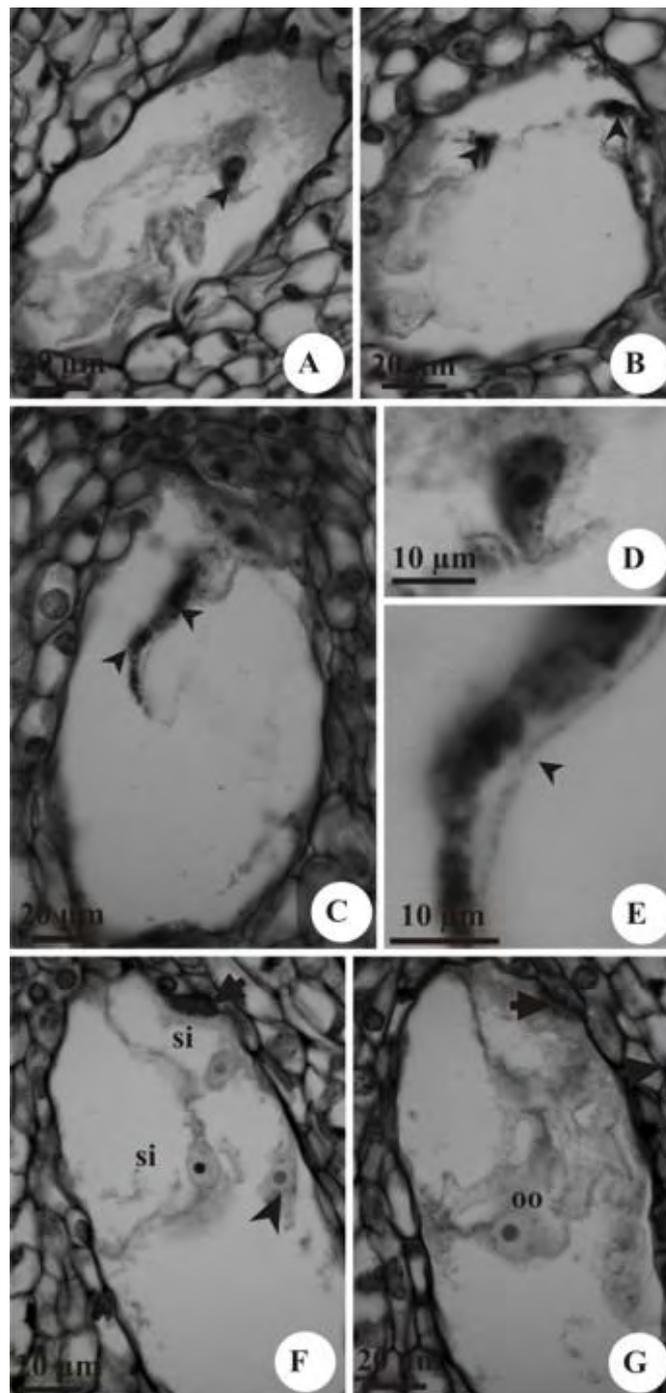


FIG. 3. Megagametófitos maduros de *Janusia occhionii* (secções longitudinais). (A) Megagametófito com núcleo em início de desarranjo, evidenciado por seu formato irregular (ponta de seta). (B-C) Megagametófito com núcleos picnóticos em maior grau de degeneração, com formato irregular (pontas de seta). (D) Detalhe de núcleo e início degeneração, com formato triangular. (E) Detalhe de um núcleo picnótico (ponta de seta) em estágio avançado de degeneração. (F-G) Aparelho oosférico maduro, com as duas sinérgides, a oosfera e um núcleo que ainda não entrou no processo de picnose (ponta de seta); notar o aparelho fibrilar das sinérgides (setas). (oo: oosfera; si: sinérgide).

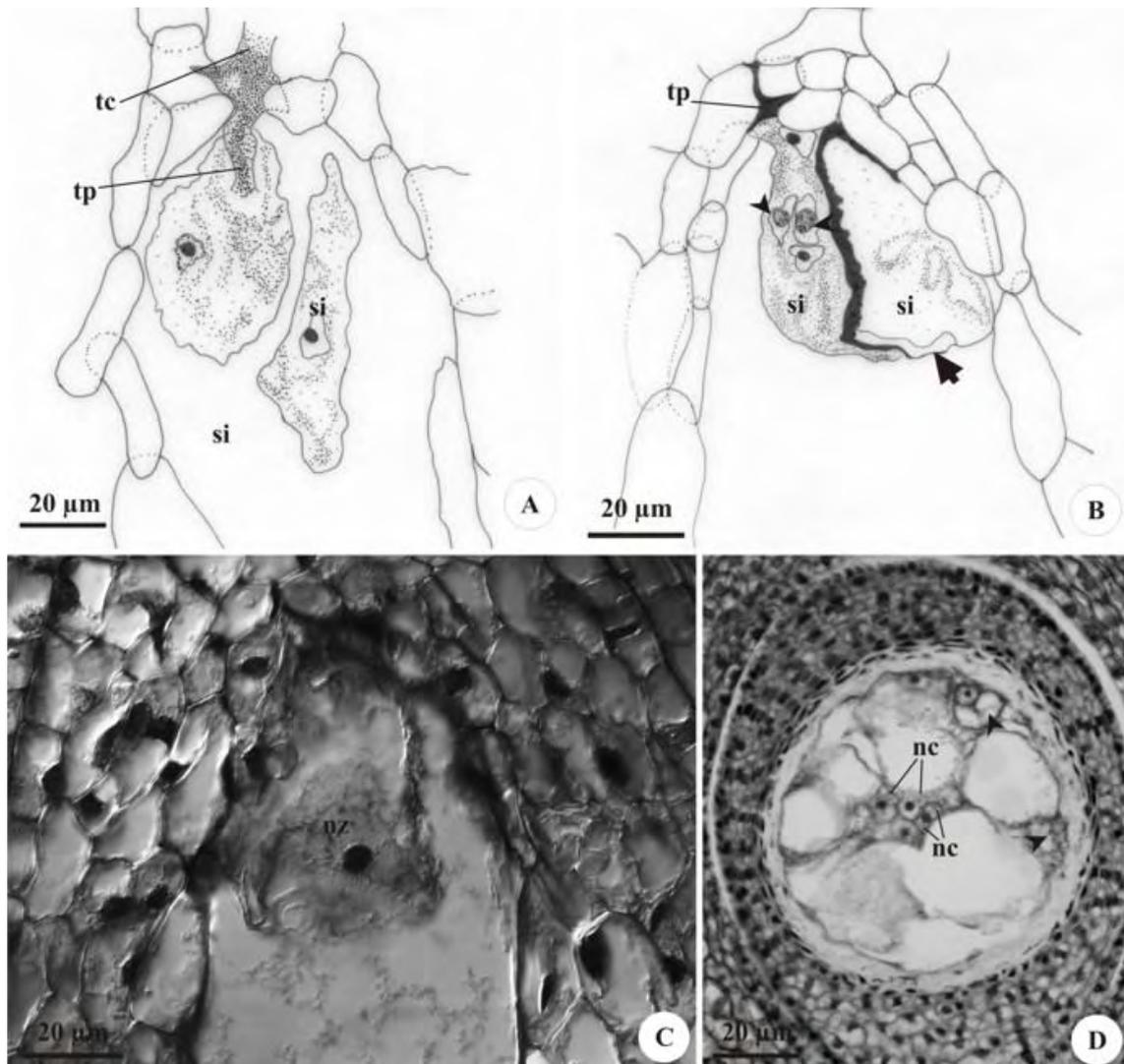


FIG. 4. Megagametófitos maduros de *Janusia occhionii* e de *Banisteriopsis stellaris* (secções longitudinais). (A) Desenho em detalhe do megagametófito em processo de fecundação; notar o tubo polínico produzindo o tubo copulador, a sinérgide penetrada com o seu núcleo já em início de degeneração e a segunda sinérgide intacta. (B) Desenho em detalhe do momento da fecundação, com a sinérgide penetrada apresentando os dois gametas masculinos (pontas de seta), bem como seu núcleo e o núcleo da célula vegetativa do tubo polínico em início de degeneração, evidenciado por seu formato irregular; a oosfera encontra-se atrás das sinérgides, sendo possível observar apenas sua porção mais calazal (seta). (C) Detalhe da oosfera fecundada. (D) Megagametófito maduro de *Banisteriopsis stellaris*, mostrando os quatro núcleos da região central, que irão formar o núcleo secundário da célula média; também é possível observar algumas células que formam os grupos periféricos (pontas de seta). (nc: núcleo da célula média; nz: núcleo do zigoto embrionário; si: sinérgide; tc: tubo copulador; tp: tubo polínico).



Capítulo IV

Tetraapterys chamaecerasifolia

Anatomia e ontogênese do pericarpo de espécies de *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapteryx* e seu potencial uso filogenético em Malpighiaceae

Letícia Silva Souto^a e Denise Maria Trombert Oliveira^{b,2}

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil*

^b *Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

² Autor para correspondência.

Endereços de e-mail: lesouto@gmail.com (L.S. Souto), dmtoliveira@icb.ufmg.br (D.M.T. Oliveira).

RESUMO

Malpighiaceae possui espécies com tipologia de frutos extremamente variada, sendo as características carpológicas tradicionalmente utilizadas na delimitação de táxons. Atualmente se sabe que ocorre muita homoplasia nos caracteres carpológicos e por isso análises detalhadas desses frutos são importantes. O objetivo desta proposta foi descrever a anatomia e ontogênese dos frutos de *Janusia mediterranea*, *J. occhionii*, *Mascagnia cordifolia*, *Tetrapterys chamaecerasifolia*, buscando padrões comuns na família. Para tanto, flores e frutos foram coletados e processados nas técnicas usuais em anatomia vegetal. O ovário jovem apresenta epiderme externa unisseriada; mesofilo com duas regiões distintas, o externo com células isodiamétricas e interno com células alongadas tangencialmente; epiderme interna unisseriada, mas com divisões periclinais dispersas. O fruto maduro é esquizocárpico, formado por três samarídeos presos ao tórus piramidal. O exocarpo é unisseriado, em *T. chamaecerasifolia*, as células são papilosas. O mesocarpo externo é formado por células isodiamétricas e o mesocarpo interno é formado uma faixa de células lignificadas e alongadas tangencialmente; em *J. mediterranea*, as duas camadas mais internas do mesocarpo interno são alongadas longitudinalmente. O endocarpo é parenquimático e fica reduzido a poucas camadas celulares; em *T. chamaecerasifolia*, o endocarpo é formado por braquiesclereides. A ala apresenta exocarpo unisseriado e mesocarpo aerenquimático. Malpighiaceae parece apresentar exocarpo unisseriado, camadas mais externas do mesocarpo parenquimáticas e a presença de um tecido de células espessadas e lignificadas na porção interna do mesocarpo. A morfologia do endocarpo é variável e pode ser útil taxonomicamente.

Palavras-chave: *Janusia mediterranea*, *J. occhionii*, *M. cordifolia*, *T. chamaecerasifolia*, fruto, desenvolvimento.

Introdução

Malpighiaceae compreende 66 gêneros e 1.200 espécies de plantas que produzem frutos extremamente variados (Judd et al., 2009). São encontrados frutos carnosos e secos, deiscentes e indeiscentes, alados ou não, com presença ou ausência de cerdas, que podem ser vascularizadas ou não (Anderson, 1977).

Devido a essa grande variação, a delimitação dos gêneros, de tribos e subfamílias, tradicionalmente, foi baseada em sua morfologia, primeiramente separando espécies produtoras de frutos alados daquelas com frutos não alados (Niedenzu, 1928).

Estudos posteriores, embasados em dados estruturais com análise mais detalhada dos frutos (Anderson, 1977), bem como análises filogenéticas com dados moleculares (Cameron et al., 2001; Davis et al., 2001) têm demonstrado que esses agrupamentos, baseados principalmente na tipologia dos frutos, não são naturais. A maior parte das tribos e subfamílias de Malpighiaceae, reconhecidas por Niedenzu (1928), Takhtajan (1997) e Hutchinson (1967), não é monofilética, indicando que frutos semelhantes evoluíram independentemente em várias linhagens (Davis et al., 2001). Esse é o caso dos frutos carnosos, cujas espécies foram colocadas em várias tribos, após Anderson (1977) verificar que os frutos apresentavam peculiaridades distintivas marcantes. Com as análises de Davis et al. (2001), verificou-se que tais espécies realmente pertenciam a clados distintos; acredita-se que os frutos carnosos tenham evoluído três vezes durante a diversificação das Malpighiaceae. Situação similar acontece com outras características do fruto, como presença ou ausência de alas, alélulas e de emergências vascularizadas.

Todos esses caracteres são homoplásticos em Malpighiaceae, visto que evoluíram independentemente, mais de uma vez, no grupo. Segundo Davis et al. (2001), análises detalhadas de morfologia e ontogênese de frutos, especialmente envolvendo os caracteres considerados homoplásticos, são claramente necessárias para permitir o entendimento da evolução das Malpighiaceae.

Análises anatômicas e de desenvolvimento dos frutos da família são escassas (Paoli, 1997; Laskowski e Bautista, 2000; Souto e Oliveira, 2005; Souto, 2007), de maneira que não se sabe até que ponto a anatomia dos frutos pode auxiliar no delineamento dos táxons e no entendimento da evolução do fruto no grupo.

Diante dessas considerações, o objetivo deste trabalho foi descrever a anatomia e ontogênese dos frutos de quatro espécies de Malpighiaceae produtoras de frutos alados, pertencentes aos gêneros *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapterys*, comparando-as entre si e com os trabalhos existentes na literatura, inclusive buscando detectar a ocorrência de padrões comuns na família e que podem apresentar interesse filogenético.

Material e Métodos

Quatro espécies de Malpighiaceae foram coletadas: *Janusia mediterranea* (Vell.) W.R.Anderson, *Janusia ochionii* W.R.Anderson, *Mascagnia cordifolia* (A.Juss.) Griseb e *Tetrapterys chamaecerasifolia* A. Juss.; ramos em fase reprodutiva foram herborizados e inseridos no Herbário BOTU ou no Herbário SP: *J. mediterranea* (R.

Sebastiani et al. 306), *J. occhionii* (BOTU 25.788), *M. cordifolia* (BOTU 25.787) e *T. chamaecerasifolia* (BOTU 25.789).

Para a análise morfológica e anatômica, foram coletadas, de cerca de cinco indivíduos, amostras de 50 unidades de flores e frutos, em diversas fases do desenvolvimento para cada espécie, nos municípios de Jundiá (*J. mediterranea*), Avaré (*J. occhionii*), São Manuel (*M. cordifolia*) e Botucatu (*T. chamaecerasifolia*), estado de São Paulo, Brasil. A nomenclatura utilizada para descrever os frutos e sementes foi baseada em Roth (1977) e Barroso et al. (1999).

Para o estudo anatômico, amostras das flores e frutos foram fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940), sendo posteriormente armazenadas em etanol 70%. O laminário foi confeccionado a partir de material seccionado a mão livre e em micrótomo. Para o laminário permanente, as amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas em 2-hidroxietil-metacrilato Leica[®] (Paiva et al., 2011), seccionadas em micrótomo rotativo com 8-10 µm de espessura, coradas com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien et al., 1964, modificado) e montadas em resina sintética.

Foram realizados testes histoquímicos, a partir de seções a mão livre de material fresco ou fixado, submetidas aos seguintes corantes e/ou reagentes: vermelho de rutênio, para identificar polissacarídeos diversos e pectinas (Jensen, 1962); floroglucinol acrescido de ácido clorídrico, para evidenciar paredes lignificadas (Sass, 1951); Sudan IV, para a localização de substâncias lipídicas; lugol, para a detecção de amido; cloreto férrico, acrescido de carbonato de sódio, para verificar a ocorrência de compostos fenólicos (Johansen, 1940).

O laminário foi analisado em microscópio fotônico, sendo os resultados registrados por meio de fotografias obtidas com câmera Canon acrescida de macro, fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio Olympus com câmara digital acoplada, diagramas e desenhos em detalhe, estes ilustrados com auxílio de câmara clara acoplada a estereomicroscópio Carl Zeiss.

Resultados

Estágio inicial de desenvolvimento

Nos botões florais das quatro espécies em estudo, observa-se ovário súpero (Fig. 1A), tricarpelar e trilocular, cada lóculo com um óvulo apenas (Fig. 1B). Os carpelos são concrecidos na região basal, deixando os ápices livres (Fig. 1A).

A organização estrutural é típica de ovários jovens, com epiderme externa

unisseriada, apresentando tricomas tectores em desenvolvimento, mesofilo pouco diferenciado, composto por tecido fundamental e procâmbio, e epiderme interna inicialmente unisseriada (Fig. 1C-F). O mesofilo ovariano possui espessura variável, observando-se cerca de seis camadas fundamentais em *J. mediterranea* (Fig. 1C), quatro a cinco em *J. occhionii* (Fig. 1D), cinco a sete em *M. cordifolia* (Fig. 1E), sete a nove em *T. chamaecerasifolia* (Fig. 1F), espécie em que ocorrem mitoses em planos variados. Na epiderme interna, iniciam-se divisões periclinais dispersas (Fig. 1F). A vascularização do ovário é composta por três feixes ventrais e seis laterais, não se distinguindo os dorsais (Fig. 1B). O tórus é parenquimático e apresenta muitos idioblastos fenólicos e drusas.

Embora muitas divisões celulares sejam reconhecidas no ovário de botões pré-antese e flores em antese das quatro espécies, a epiderme externa permanece unisseriada, formada por células pequenas e alongadas anticlinalmente, com conteúdo denso e núcleo evidente, observando-se numerosas divisões anticlinalis (Fig. 2A-D). Tricomas tectores em formação e já diferenciados ocorrem em toda a epiderme (Fig. 2A-I). Há tricomas unicelulares (Fig. 2E, G) e multicelulares (Fig. 2F, H); os unicelulares, quando diferenciados, são grandes e a célula se ramifica na base, conferindo o formato de “T” (Fig. 2E, G); já os tricomas multicelulares apresentam pedúnculo multicelular e multisseriado, além de uma célula apical maior, bifurcada em “T” (Fig. 2F, H). Em ambos os tricomas, a célula ramificada apresenta parede celular secundária de aspecto verrucoso (Fig. 2E), ocorrendo lignificação na maturidade.

Pode-se dividir o mesofilo em duas regiões: o mesofilo externo é caracterizado por apresentar até quatro camadas de células isodiamétricas, com conteúdo mais hialino que o das células epidérmicas, de núcleo evidente (Fig. 2A-B). Nesta região, encontram-se idioblastos fenólicos e cristalíferos, em pequena densidade em *J. mediterranea*; o mesofilo interno possui células alongadas tangencialmente, compondo cerca de quatro camadas em *J. mediterranea* (Fig. 2A), três em *J. occhionii* (Fig. 2B), de uma a duas em *M. cordifolia* (Fig. 2C) e de uma a três em *T. chamaecerasifolia* (Fig. 2D).

Nas espécies de *Janusia*, a epiderme interna passa por intensa proliferação, podendo-se contar, nesta fase, com até oito camadas celulares em *J. occhionii*, espécie em que o número de camadas é homogêneo ao redor de todo o lóculo (Fig. 2B); em *J. mediterranea*, há cerca de quatro camadas na região voltada para o tórus e para a lateral do carpelo (Fig. 2A), e 14 camadas voltadas na região dorsal do carpelo. As células são alongadas periclinalmente e encontram-se empilhadas refletindo a atividade do

meristema adaxial (Fig. 2A). Em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, a epiderme interna também se divide, mas são formadas até três camadas celulares (Fig. 2C-D). Em *J. occhionii*, encontra-se de uma a duas camadas de células fenólicas incompletas entre o mesofilo interno e a epiderme interna (Fig. 2B).

A região dorsal de cada carpelo de *J. mediterranea* e *J. occhionii* apresenta uma projeção, enquanto, em *Mascagnia*, forma-se uma grande projeção sobre a qual se desenvolve outra menor. Em *T. chamaecerasifolia*, são produzidas quatro projeções dispostas em “X”, formando-se uma menor sobre o cruzamento dessas quatro. Todas as projeções são compostas pela epiderme externa e mesofilo externo, com células bem pequenas de aspecto meristemático.

O tórus abriga numerosas divisões celulares em diversos sentidos, sendo sua delimitação para os carpelos pouco evidente (Fig. 2I). Não há modificação na vascularização previamente descrita, com exceção da vascularização de *M. cordifolia*, em que se formam de duas a três camadas de células fenólicas ao redor dos feixes vasculares (Fig. 2J).

Fruto em desenvolvimento

O exocarpo permanece unisseriado (Fig. 3A-B), ainda com muitas divisões anticlinais, que acomodam o crescimento do fruto (Fig. 3A). Os tricomas tectores continuam sendo produzidos. Em *T. chamaecerasifolia*, as células do exocarpo tornam-se papilosas (Fig. 3B).

O mesocarpo se amplia, tanto pela divisão celular quanto pelo aumento no volume das células, que agora se apresentam vacuoladas e com núcleo pequeno (Fig. 3A-B), embora divisões celulares esparsas ainda sejam visíveis.

O mesocarpo externo é composto por quatro a seis (*J. mediterranea*), três a cinco (*J. occhionii*), três a sete (*M. cordifolia*) e de seis a oito (*T. chamaecerasifolia*) camadas de células parenquimáticas isodiamétricas, bem vacuoladas, de citoplasma reduzido e núcleo conspícuo (Fig. 3A-B), entre as quais se encontram cordões procambiais e feixes vasculares. O fruto cresce, principalmente, pelo aumento no tamanho das células dessa região e pelo afastamento destas, o que acarreta a presença de pequenos espaços intercelulares (Fig. 3B), que se tornam mais conspícuos; idioblastos fenólicos são encontrados nessa região.

No mesocarpo interno, as células têm menor lúmen e são alongadas oblíqua e tangencialmente (Fig. 3A-B, D). A parede celular dessas células começa a se espessar e lignificar.

No endocarpo das *Janusia*, as células aumentam de tamanho e tornam-se vacuoladas (Fig. 3A, C). Nas demais espécies, o endocarpo apresenta de uma a três camadas de células ligeiramente alongadas longitudinalmente (Fig. 3B, D), sendo que, na região voltada para o feixe dorsal e na região próxima ao funículo, o número de camadas é maior, podendo chegar a nove. Com o crescimento da semente na cavidade seminal, estas células são comprimidas (Fig. 3E).

Observa-se um meristema na extremidade distal das projeções dorsais, fazendo com que o comprimento destas se amplie, dando origem às alas dos frutos (Fig. 3F). As alas jovens são compostas pelo exocarpo unisseriado e pelo mesocarpo externo (Fig. 3G). O exocarpo possui células bem pequenas a princípio (Fig. 3G), que se dividem e, ao final desta fase, aumentam em tamanho; tricomas tectores são observados também na ala, similares aos do núcleo seminífero. O mesocarpo externo é multisseriado, com células parenquimáticas de arranjo inicialmente compacto (Fig. 3G), que se afastam umas das outras à medida que a ala cresce. Imersos no mesocarpo, observam-se inúmeros cordões procambiais que, gradualmente, diferenciam feixes vasculares.

No tórus, torna-se evidente a delimitação dos carpelos (Fig. 3H), região onde ocorrem células parenquimáticas menores. Nas duas espécies de *Janusia*, são diferenciados agrupamentos de braquiesclereídes no tórus (Fig. 3I), mais frequentes em *J. occhionii*, além de numerosos idioblastos fenólicos.

Fruto maduro

O fruto maduro é esquizocárpico, formado por três samarídeos que se desprendem do tórus piramidal. Nas *Janusia*, cada samarídeo apresenta uma ala dorsal (Fig. 4A-B); em *J. occhionii*, observa-se um apêndice na base do fruto (Fig. 4B). Em *M. cordifolia*, cada samarídeo possui uma grande ala circular lateral, que contorna o núcleo seminífero (Fig. 4C-D), e uma alélula dorsal (Fig. 4C). Já em *T. chamaecerasifolia*, cada samarídeo apresenta quatro alas laterais bem desenvolvidas e um número variável de alélulas na região dorsal (Fig. 4E).

Nas quatro espécies, os estiletos são persistentes (Fig. 4B, 4D-E); na dispersão, o estilete, único nas *Janusia*, fica preso a um dos samarídeos (Fig. 4B).

O exocarpo permanece unisseriado (Fig. 4F-4L), com presença de tricomas tectores unicelulares e multicelulares, em maior densidade no núcleo seminífero que na ala. No núcleo seminífero, o exocarpo de *T. chamaecerasifolia* tem as células papilosas (Fig. 4I) com a parede periclinal externa ornamentada, finamente estriada (Fig. 4L); nas duas espécies de *Janusia* e em *M. cordifolia*, as células têm a parede periclinal externa levemente convexa (Fig. 4F-H).

O mesocarpo é dividido em duas regiões: no mesocarpo externo não ocorre aumento no número de camadas, as células permanecem isodiamétricas, com pequenos espaços intercelulares, observando-se idioblastos fenólicos (Fig. 4F-I); o mesocarpo interno é formado uma faixa de células lignificadas e alongadas oblíqua e tangencialmente (Fig. 4F-I). Em *J. mediterranea*, as duas camadas mais internas do mesocarpo interno são alongadas mais longitudinalmente (Fig. 4F); estas células têm parede espessa, com lúmen muito reduzido (Fig. 4F-I) e a parede celular apresenta a porção externa lignificada e a interna péctica (Fig. 4F). Essa faixa de células tem o contorno externo irregular, com algumas protuberâncias que podem ser observadas na superfície do núcleo seminífero.

Na região próxima ao tórus, as células do mesocarpo externo também são lignificadas.

O endocarpo é parenquimático e fica reduzido a poucas camadas celulares, pela compressão das camadas mais internas, decorrente do crescimento da semente (Fig. 4F-H). Em *T. chamaecerasifolia*, o endocarpo é formado por uma a três camadas de braquiesclereídes, com parede espessa intensamente lignificada (Fig. 4I).

Na dispersão, o pericarpo desidrata intensamente, os tecidos parenquimáticos colapsam, sendo distinguíveis apenas as células lignificadas.

A ala apresenta exocarpo unisseriado (Fig. 4J), com células de parede delgada, com exceção da parede periclinal externa de *T. chamaecerasifolia*, que é ligeiramente mais espessa (Fig. 4K) e tem cutícula com estriação delgada, similar à do núcleo seminífero (Fig. 4L). Internamente, a ala é composta apenas pelo mesocarpo externo (Fig. 4J-K); suas células são braciformes, delimitando grandes espaços intercelulares (Fig. 4J-K, M), ocorrendo também idioblastos fenólicos e cristalíferos; em *J. mediterranea*, o mesocarpo externo apresenta uma camada subepidérmica de células mais próximas sem espaços intercelulares (Fig. 4J). Os feixes vasculares colaterais ficam distribuídos em duas fileiras mais próximas ao exocarpo, ambas apresentando o xilema voltado para o interior da ala (Fig. 4J), visto que são provenientes de ambas as

valvas. Os feixes de maior calibre possuem bainha parenquimática que pode apresentar extensão até o exocarpo.

O tórus é constituído por um conjunto de células parenquimáticas e idioblastos fenólicos irregularmente distribuídos (Fig. 4N); nas espécies de *Janusia*, também ocorrem agrupamentos de braquiesclereídes. Na região de contato com os samarídeos, ocorrem células parenquimáticas pequenas e levemente achatadas, que constituem a região de fragilidade (Fig. 4O), a partir da qual ocorrerá a separação dos samarídeos.

Discussão

Os padrões de evolução do fruto nas espécies de Malpighiaceae não são completamente simples (Davis et al., 2001). Apesar de terem sido frequentemente usados na delimitação dos táxons intrafamiliares (Niedenzu, 1928; Hutchinson, 1967; Takhtajan, 1997), as análises moleculares atuais têm evidenciado que a morfologia do fruto não é suficiente para construir uma classificação intrafamiliar (Davis et al., 2001). A diversificação extrema que ocorreu nos frutos de Malpighiaceae está relacionada à forte seleção pelo meio ambiente e pelo mecanismo de dispersão, levando a altos níveis de homoplasia entre caracteres morfológicos das espécies da família, especialmente os frutos (Cameron et al., 2001).

Hoje, acredita-se que as primeiras Malpighiaceae teriam frutos não alados, mas que a ala teria aparecido bem na base da árvore filogenética da família, sendo que sua perda teria acontecido em várias linhagens distintas (Davis et al., 2001).

As alélulas, presentes nos frutos de *T. chamaecerasifolia* e *M. cordifolia*, são idênticas anatomicamente às alas laterais principais dos respectivos frutos. Comparando-se as alas e alélulas aqui relatadas com as de outros frutos descritos na literatura (Souto, 2007), nota-se um padrão comum para o desenvolvimento dessas estruturas. As alas e alélulas de Malpighiaceae são constituídas por exocarpo unisseriado e mesocarpo aerenquimático. Como as alélulas têm estrutura similar à da ala, é possível que, evolutivamente, alélulas tenham se ampliado e constituído alas, bem como alas podem ter sido reduzidas a alélulas em algumas linhagens. As árvores filogenéticas da família ainda apresentam vários clados com baixo suporte, motivo pelo qual não se compreende, ainda, a relação entre alguns gêneros; também é controversa a posição relativa de certos gêneros, entre eles *Tetrapterys* (Cameron et al., 2001; Davis et al., 2001), não sendo possível estabelecer corretamente as relações das alélulas com as alas observadas em frutos de outros gêneros.

Uma característica que chama a atenção nos frutos estudados é a presença de fibras com a porção interna da parede secundária pécica e porção externa da parede lignificada; tais fibras assemelham-se às fibras gelatinosas encontradas no lenho de tração das angiospermas (Mauseth, 1988). Nos frutos, as fibras gelatinosas têm outro sentido, já que o núcleo seminífero não sofre forças mecânicas de tração. A presença de fibras gelatinosas em frutos é pouco registrada, mas não é exclusiva das espécies aqui estudadas; sua presença já foi relatada em outros frutos secos de Malpighiaceae por Souto (2007) e em frutos carnosos de Annonaceae (Galastri, 2008). Acredita-se que, no fruto, seu papel esteja associado à retenção de água no pericarpo, de modo a favorecer o desenvolvimento da semente.

Os frutos de *J. mediterranea*, *J. occhionii*, *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* são esquizocárpicos, o que significa que, apesar de oriundos de gineceus sincárpicos, cada carpelo dá origem a um samarídeo preso ao tórus que, na maturidade, individualiza-se e desprende-se, sendo dispersado pelo vento. Na região limítrofe entre cada samarídeo e o tórus, observa-se uma faixa de células parenquimáticas, de tamanho pequeno e parede celular delgada, bem como a presença de conjuntos de braquiesclereídes de parede espessa, estas presentes nas espécies de *Janusia*. Este conjunto de características é semelhante ao aparelho de deiscência encontrado em frutos secos deiscentes, em que ocorre um tecido mecânico, que exerce uma força que gera a abertura do fruto, e uma região de fragilidade, pela qual o fruto se abre, composta por células parenquimáticas (Souza, 1993; Pietrobon e Oliveira, 2004). No caso das espécies estudadas, o tórus na maturidade fica rígido pela presença das braquiesclereídes, assim como o núcleo seminífero das sâmaras que também tem células lignificadas; a presença de parênquima entre essas células espessadas constitui a linha de fragilidade. Com a passagem do vento, agente dispersor desses frutos, as células parenquimáticas rompem-se e o samarídeo é dispersado.

Poucos frutos de Malpighiaceae foram estudados em detalhes, podendo-se citar duas espécies carnosas, *Malpighia glabra* (Laskowski e Bautista, 2000) e *Byrsonima intermedia* (Souto e Oliveira, 2005), *Lophantera lactecens* (Paoli, 1997), com fruto formado por três mericarpos secos e indeiscentes, e quatro espécies com frutos esquizocárpicos, formados por três samarídeos, *Banisteriopsis campestris*, *B. oxyclada*, *B. stellaris* e *Diplopterys pubipetala* (Souto, 2007). Todas as espécies acima citadas apresentam exocarpo unisseriado, independente do tipo de fruto formado. Essa característica parece ser constante na família, já que os frutos aqui estudados também

possuem exocarpo unisseriado, independentemente das relações filogenéticas entre eles; todas as espécies suprarreferidas encontram-se em clados bem distintos na árvore filogenética das Malpighiaceae, sendo *Byrsonima* um dos gêneros mais basais e *Janusia* dos mais derivados (Cameron et al., 2001). Segundo Davis et al. (2001) a tribo Gaudichaudieae, que abrange o gênero *Janusia*, não é posicionada entre os clados mais derivados, entretanto, tal posição filogenética pode ser contestada utilizando-se características morfológicas como redução do androceu, hábito trepador e presença de flores dimórficas (Mamede, 1993).

As camadas mais externas do mesocarpo em geral são parenquimáticas (Paoli, 1997; Laskowski e Bautista, 2000; Souto e Oliveira, 2005; Souto, 2007), constituindo o tecido carnosos de *Malpighia glabra* (Laskowski e Bautista, 2000) e *B. intermedia* (Souto e Oliveira, 2005). No caso dos frutos secos, esse tecido fica colapsado no momento em que o fruto está apto à dispersão, como o observado neste trabalho e também verificado por Paoli (1997) e Souto (2007).

Outra característica que parece constante é a presença de um tecido de células espessadas e lignificadas na porção interna do mesocarpo. Tal característica é encontrada nas espécies aqui estudadas e em todas as espécies de Malpighiaceae descritas na literatura (Paoli, 1997; Laskowski e Bautista, 2000; Souto e Oliveira, 2005; Souto, 2007), com exceção de *Diplopterys pubipetala* (Souto 2007), que apresenta as camadas mais internas do mesocarpo parenquimáticas. Em *D. pubipetala*, Souto (2007) destacou que o mesocarpo interno está em contato com um *seed cushion* bem amplo, havendo continuidade entre esses tecidos, o que explicaria a ausência de lignificação mesocárpica.

Souto (2007) registrou que os frutos de *Banisteriopsis* e de *D. pubipetala* apresentam uma camada intermediária no mesocarpo; em *Banisteriopsis*, tal camada é composta por células parenquimáticas, entremeadas com grupos de células lignificadas, enquanto que é toda lignificada em *Diplopterys*. Nas espécies aqui estudadas, embora também produtoras de samarídeos, não há diferenciação de camada entre o mesocarpo externo e o interno. Quanto ao endocarpo, podem-se detectar três padrões estruturais: as células endocárpicas podem ser esclerenquimáticas e lignificadas, padrão encontrado nas duas espécies carnosas registradas na literatura, *Byrsonima intermedia* (Souto e Oliveira, 2005) e *Malpighia glabra* (Laskowski e Bautista, 2000), e em certos pericarpos secos, como em *L. lactecens* (Paoli, 1997) e em *Banisteriopsis* (Souto, 2007); o endocarpo pode, ainda, ser formado por um pequeno número de células

alongadas, mas não lignificadas, como registrado neste trabalho para *Mascagnia cordifolia*; por último, o endocarpo pode proliferar durante a ontogênese do pericarpo, dando origem a um tecido aerenquimático, que compõe o *seed cushion*, padrão encontrado em *D. pubipetala* (Souto, 2007) e observado em três das espécies aqui analisadas (*J. mediterranea*, *J. occhionii* e *T. chamaecerasifolia*). Como *Byrsonima*, consensualmente, faz parte do grupo de gêneros mais basais de Malpighiaceae (Cameron et al., 2001) e trabalhos com outras Rosídeas indicam que estratos esclerenquimáticos mais amplos constituem condição ancestral em frutos (Fahn e Zohary 1955; Pate e Kuo, 1981), os resultados sugerem que o endocarpo das primeiras Malpighiaceae seria lignificado e que o aparecimento do *seed cushion* ocorreu pelo menos três vezes na diversificação da família, nos clados que incluem *Tetrapterys*, *Diplopterys* e *Janusia*. A presença de *seed cushion* permite que os pericarpos de frutos lignificados (mesmo no caso dos frutos carnosos que apresentam a porção interna do lignificada) diferenciem-se antes do crescimento da semente, que se desenvolve mais paulatinamente, já que a mesma pode ampliar suas dimensões comprimindo os espaços intercelulares ou mesmo as células volumosas, conforme já sugerido por Roth (1977).

Apesar do número de espécies com frutos detalhadamente estudados ainda ser pequeno, identificam-se alguns padrões estruturais comuns às Malpighiaceae. Além disso, as características do endocarpo, por variarem bastante, mostram-se promissoras para auxiliar no entendimento da evolução dos frutos na família. Assim, novos trabalhos de ontogênese pericárpica são interessantes e devem ampliar a amostragem genérica em Malpighiaceae, visto que têm potencial para ajudar a resolver as questões filogenéticas ainda pendentes na família.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado de L.S. Souto e de Produtividade em Pesquisa (Processo nº 304716/2008-1) de D.M.T. Oliveira, bem como pelo auxílio financeiro (Processo nº 475498/2008-9); à Dra. Maria Candida Henrique Mamede e à Dra. Renata Sebastiani, pela identificação das espécies; à Dra. Rosana Romero, pelo auxílio em coletas.

Referências

- Anderson, W.R., 1977. Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae. *Leandra* 7, 5–18.
- Barroso, G.M., Morim, M.P., Peixoto, A.L., Ichaso, C.L.F., 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Editora UFV, Viçosa.
- Cameron, K.M., Chase, M.W., Anderson, W.R., Hills, H.G., 2001. Molecular systematic of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *Am. J. Bot.* 88, 1847–1862.
- Davis, C.C., Anderson, W.R., Donoghue, M.J., 2001. Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* e *trnL-F* nucleotide sequences. *Am. J. Bot.* 88, 1830–1846.
- Fahn, A., Zohary, M., 1955. On the pericarpial structure of the legumen, its evolution and relation to dehiscence. *Phytomorphology* 5, 99–111.
- Galastri, N.A., 2008. Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dioica* A. St.-Hil., *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Hutchinson, J., 1967. The genera of flowering plants, vol. 2. Oxford University Press, Oxford.
- Jensen, W.A., 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman, San Francisco.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., 2009. Plant Systematics: a phylogenetic approach, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Laskowski, L.E., Bautista, D., 2000. Características anatómicas y desarrollo del fruto del semeruco (*Malpighia emarginata* DC.). *Ernstia* 10, 105–115.
- Mamede, M.C.H., 1993. Estudo comparativo de flores casmógamas, cleistógamas e de frutos de *Camarea affinis* St. Hil. (Malpighiaceae). *Acta Bot. Bras.* 7, 21–31.
- Mauseth, J.D., 1988. Plant anatomy. Benjamin Cummings, Menlo Park.

- Niedenzu, F., 1928. Malpighiaceae. In: Engler, A., Das Pflanzenreich IV 141, 1–870
apud Gates, B., 1982, *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). Flora Neotrop.
Monograph. 30, 1–236.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell
walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373.
- Paiva, E.A.S., Pinho, S.Z., Oliveira, D.M.T., 2011. Large plant samples: how to process
for (2-hydroxyethyl)-methacrylate embedding? In: Chiarini-Garcia, H., Melo,
R.C.N., Eds. Light microscopy: methods and protocols, *Methods in Molecular
Biology*, v. 689. Humana Press, Totowa, no prelo.
- Paoli, A.A.S., 1997. Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophantera lactescens*
Ducke (Malpighiaceae). *Rev. Bras. Sementes* 19, 238–244.
- Pate, J.S., Kuo, J., 1981. Anatomical studies of legume pods – a possible tool in
taxonomic research. In: Polhill, R.M., Raven, P.H., Eds., *Advances in Legume
Systematics*. Kew, Royal Botanic Garden, pp. 903–912.
- Pietrobon, R.C.V., Oliveira, D.M.T., 2004. Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo
de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Rev. Bras.
Bot.* 27, 767–779.
- Roth, I., 1977. Fruits of Angiosperms. *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebrüder
Borntraeger, Berlin.
- Sass, J.E., 1951. *Botanical microtechnique*. Iowa State University, Ames.
- Souto, L.S., 2007. Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de espécies de
Banisteriopsis C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae). Dissertação
de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Souto, L.S., Oliveira, D.M.T., 2005. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de
Byrsonima intermedia A. Juss. (Malpighiaceae). *Rev. Bras. Bot.* 28, 697–712.
- Souza, L.A., 1993. Morfo-anatomia do desenvolvimento do fruto de *Acacia paniculata*
Willd. (Leguminosae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 36, 851–871.
- Takhtajan, A., 1997, *Diversity and classification of flowering plants*, Columbia University Press, New
York.

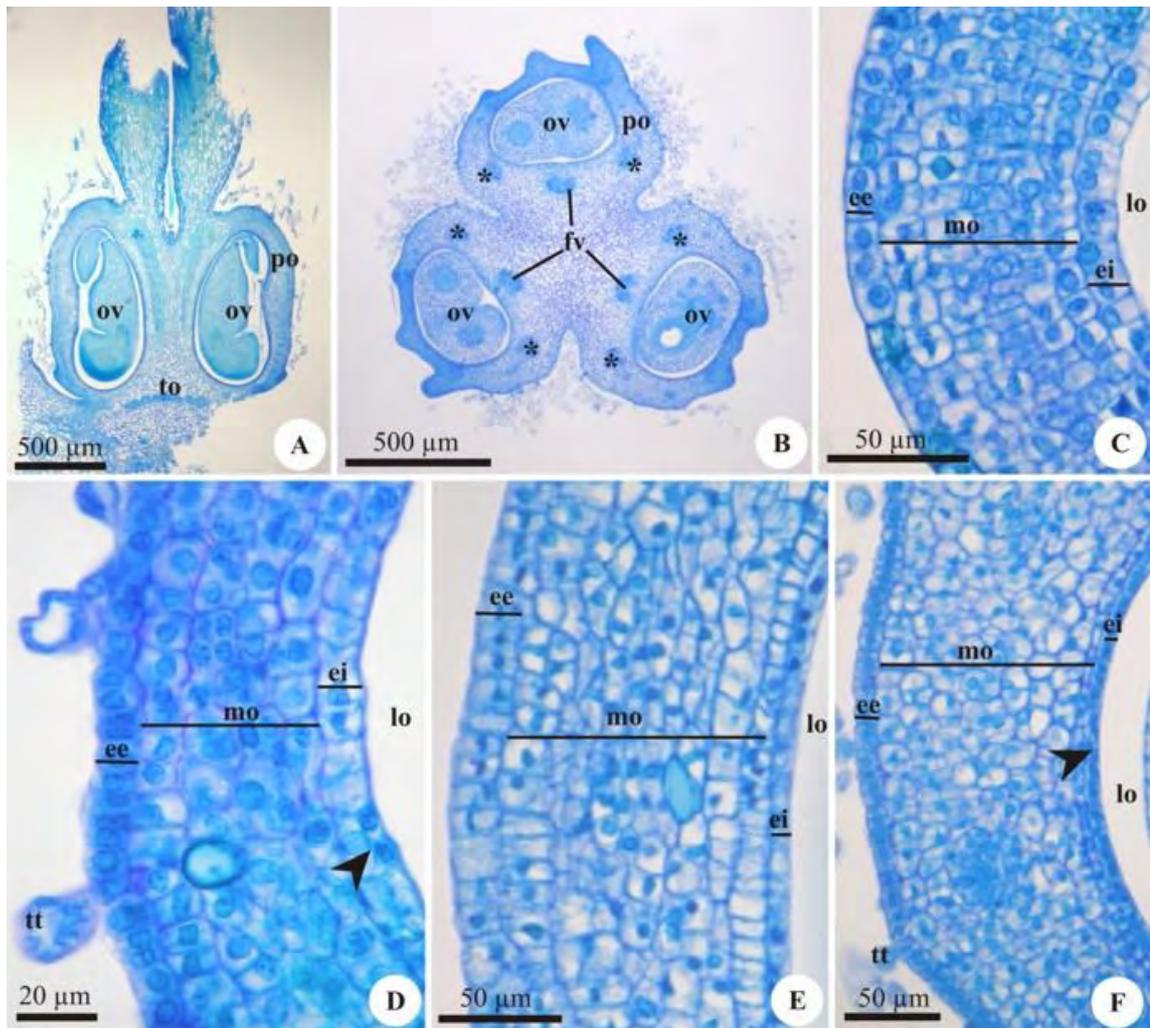


Fig. 1. Ovários retirados de botões florais. Secção longitudinal (A); secções transversais (B-F). (A) Vista geral do ovário de *Mascagnia cordifolia*, mostrando os carpelos concrecidos na base e porção mediana, livres no ápice. (B) Ovário de *Tetrapteryx chamaecerasifolia* com os três feixes vasculares ventrais bem evidentes, bem como os seis feixes laterais calibrosos (asteriscos). C-F. Detalhes da parede ovariana de *Janusia mediterranea*, *Janusia occhionii*, *Mascagnia cordifolia* e *Tetrapteryx chamaecerasifolia* respectivamente; observar a epiderme externa unisseriada, mesofilo ovariano com número de camadas variável dependendo da espécie e epiderme interna unisseriada, iniciando divisões periclinais (ponta de seta). (ee: epiderme externa, ei: epiderme interna, fv: feixe ventral, lo: lóculo, mo: mesofilo ovariano, ov: óvulo, po: parede ovariana, to: tórus, tt: tricoma tector).

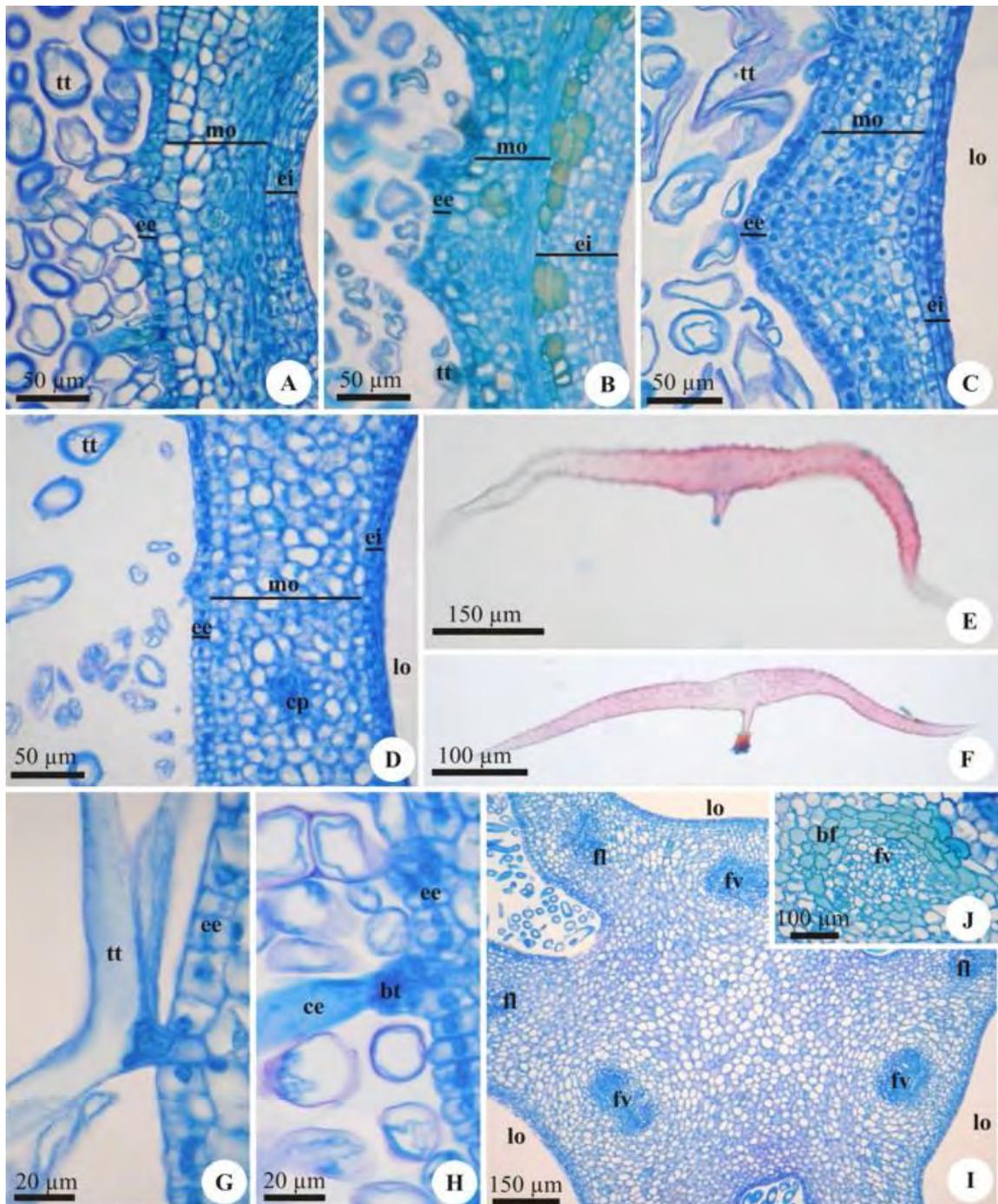


Fig. 2. Ovários retirados de flores em antese de *Janusia mediterranea* (A), *J. occhionii* (B, G-H), *Mascagnia cordifolia* (C, J) e *Tetrapteryx chamaecerasifolia* (D-F, I). Secções transversais. (A-D) Parede ovariana, mostrando epiderme externa unisseriada, mesofilo ovariano (duas regiões mais distintas em *Janusia mediterranea* e *Janusia occhionii*) e epiderme interna multisseriada. (E-F) Aspecto geral de tricoma tector unicelular e pluricelular respectivamente. (G) Detalhe de tricoma tector unicelular, mostrando a inserção na epiderme. (H) Detalhe de tricoma pluricelular, com base multisseriada. (I) Região do tórus; notar a presença dos feixes ventrais e laterais. (J) Detalhe de feixe ventral com bainha fenólica. (bf bainha fenólica, bt: base do tricoma tector, ce: célula apical do tricoma tector, cp: cordão procambial, ee: epiderme externa, ei: epiderme interna, fl: feixe vascular lateral, fv: feixe vascular ventral, lo: lóculo, mo: mesofilo ovariano, tt: tricoma tector).

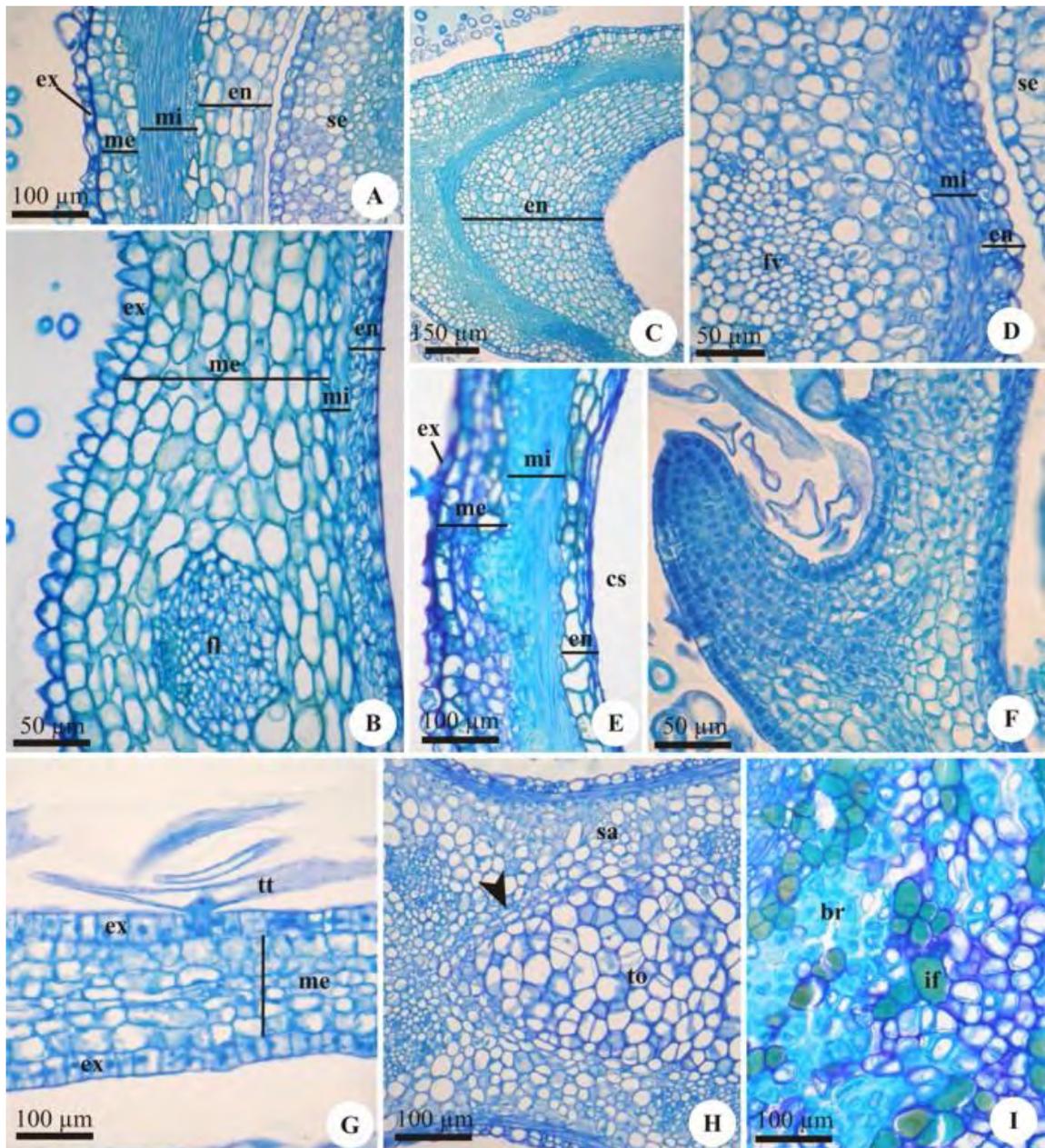


Fig. 3. Frutos em desenvolvimento de *Janusia occhionii* (A, E, I), *Tetrapteryx chamaecerasifolia* (B), *Janusia mediterranea* (C) e *Mascagnia cordifolia* (D, F-H). Secção longitudinal (B); secções transversais (A, C-I). (A) Aspecto geral de pericarpo com exocarpo unisseriado, mesocarpo externo parenquimático, mesocarpo interno com células alongadas e endocarpo multisseriado. (B) Aspecto geral de pericarpo; notar o exocarpo com células papilosas e o amplo feixe vascular no mesocarpo externo. (C) Detalhe do endocarpo multisseriado e amplo. (D) Detalhe do endocarpo com poucas camadas celulares. (E) Pericarpo em estágio mais avançado de desenvolvimento; notar o endocarpo comprimido. (F) Região de projeção dorsal, que origina a ala. (G) Detalhe da ala jovem, constituída apenas pelo exocarpo unisseriado e mesocarpo externo. (H) Limite entre o tórus e o samarídeo; observar o tecido de fragilidade pelo qual ocorrerá a separação do samarídeo (ponta de seta). (I) Tórus parenquimático com idioblastos fenólicos e braquiesclereídes. (br: braquiesclereíde, cs: cavidade seminal, en: endocarpo, ex: exocarpo, fl: feixe lateral, fv: feixe ventral, if: idioblasto fenólico, me: mesocarpo externo, mi: mesocarpo interno, sa: samarídeo, se: semente, to: tórus, tt: tricoma tector).

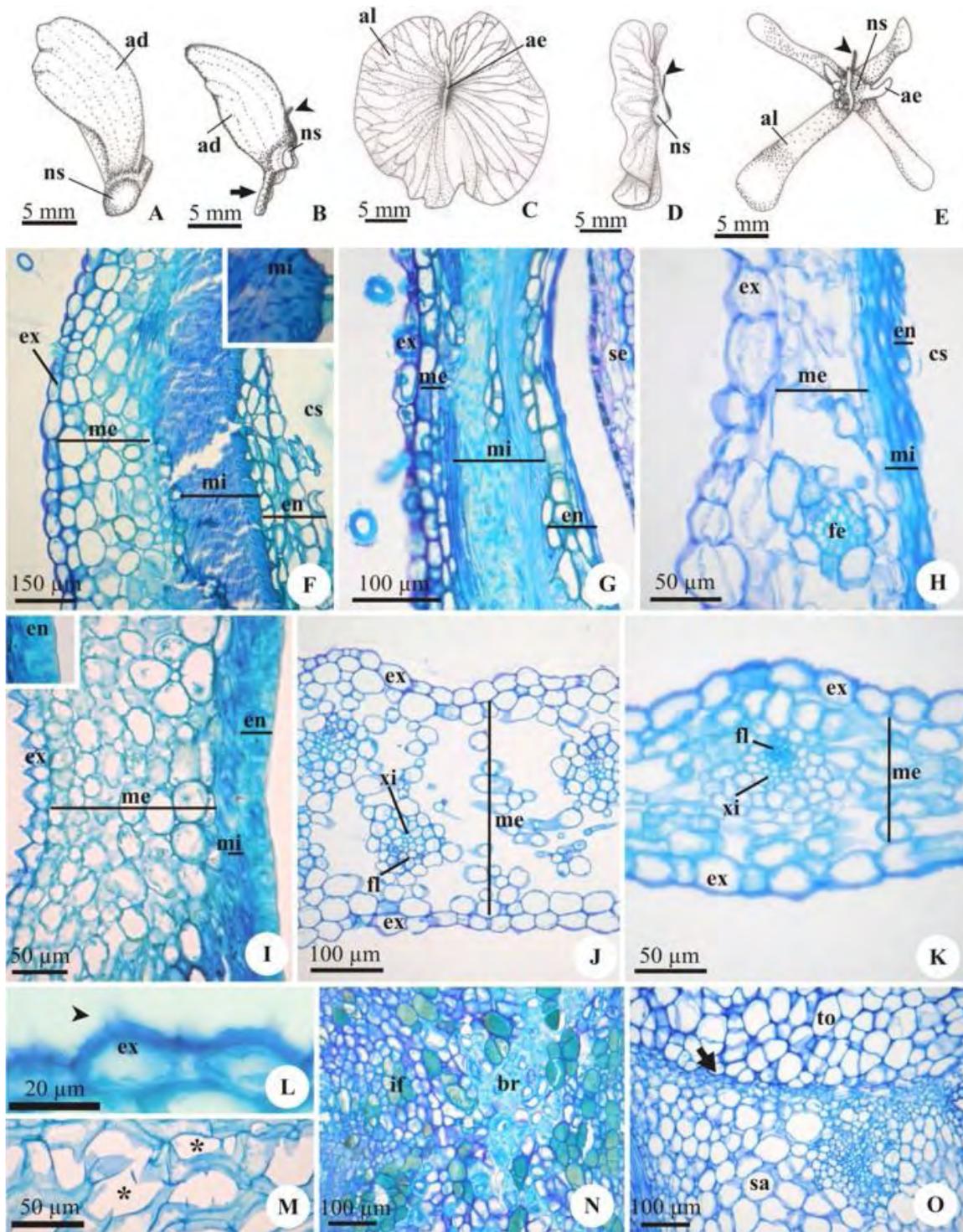


Fig. 4. Frutos maduros de *Janusia mediterranea* (A, F, J, M), *Janusia occhionii* (B, G, N-O), *Mascagnia cordifolia* (C-D, H) e *Tetrapteryx chamaecerasifolia* (E, I, K-L). (A-E) Aspecto geral de samarídeos em vista lateral (A-B, D), frontal (C) e dorsal (E); as pontas de seta indicam os estiletes persistentes e a seta aponta o apêndice basal do fruto. (F-I) Pericarpo maduro do núcleo seminífero. (J) Ala formada por exocarpo e mesocarpo externo aerenquimático. (K) Detalhe de ala, próximo à margem. (L) Detalhe da figura anterior, destacando o exocarpo; notar a ornamentação de cutícula (ponta de seta). (M) Detalhe do mesocarpo externo da ala em secção longitudinal; notar lacunas (asteriscos). (N) Detalhe do tórus, mostrando idioblastos fenólicos e braquiesclereídes. (O) Detalhe da região de separação entre o tórus e o samarídeo; notar o tecido de separação, formado por células parenquimáticas pequenas (seta). (ad: ala dorsal, ae: alélula, al: ala lateral, br: braquiesclereíde, cs: cavidade seminal, en: endocarpo, ex: exocarpo, fe: feixe vascular, fl: floema, if: idioblasto fenólico, me: mesocarpo externo, mi: mesocarpo interno, ns: núcleo seminífero, sa: samarídeo, se: semente, to: tórus, xi: xilema).



Capítulo V

Tetraapterys chamaecerasifolia

**Estrutura e desenvolvimento de sementes em espécies de Malpighiaceae:
perisperma como principal reserva para a embriogênese e outras considerações
filogenéticas**

Letícia Silva Souto^A e Denise Maria Trombert Oliveira^{B,C}

^A *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de
Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil*

^B *Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

^C *Autor para correspondência. E-mail: dmtoliveira@icb.ufmg.br*

Título resumido – Ontogênese seminal de Malpighiaceae

Resumo. Óvulos de Malpighiaceae apresentam nucelo abundante, enquanto o endosperma é escasso, havendo um registro de ausência de célula média em *Janusia ochionii* W.R.Anderson. Neste trabalho, avaliou-se o desenvolvimento de sementes de Malpighiaceae (*Janusia mediterranea* (Vell.) W.R.Anderson, *J. ochionii*, *Mascagnia cordifolia* (A.Juss.) Griseb e *Tetrapterys chamaecerasifolia* A. Juss.), visando principalmente a identificar o desenvolvimento de endosperma. Sementes foram coletadas e processadas usualmente para microscopia de luz. Os óvulos são subcampilótopos, crassinucelados, unitegmentados nas *Janusia* e bitegmentados em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*. O nucelo é abundante e projeta-se pela micrópila, ficando em contato com obturador funicular. Durante o desenvolvimento, forma-se uma paquicalaza e, nas espécies bitegmentadas, os tegumentos concrecem; forma-se o perisperma, por divisões nucelares e por vacuolização. Nas espécies de *Janusia*, não se forma endosperma; em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, o endosperma é nuclear, escasso e efêmero. A semente madura tem a exotesta fenólica e a endotesta com espessamento em “U”; é exalbuminosa, sendo o perisperma consumido, de modo que o embrião preenche toda a semente. A ausência de endosperma nas *Janusia*, registro inédito deste trabalho, é esperada, havendo relato de ausência de célula média em *J. ochionii*. Discute-se a ausência de endosperma como condição derivada nas Malpighiaceae.

Introdução

Nas Angiospermas, em contraste com Gimnospermas, o endosperma é formado simultaneamente ao embrião, como resultados da dupla fecundação (Werker 1997). Sua principal função é a nutrição do embrião durante o seu desenvolvimento, seja nas fases mais iniciais, seja nas fases mais adiantadas da ontogênese (Maheshwari 1950; Vijayaraghavan e Prabhakar 1984), bem como durante a germinação (Werker 1997).

Apesar de sua importância e da vantagem evolutiva que trouxe para as angiospermas, o endosperma pode estar ausente em algumas famílias, havendo registro para Podostemaceae, Trapaceae e Orchidaceae (Johri *et al.* 1992).

Enquanto o endosperma é tido como fonte de nutrição para o embrião ou até mesmo reserva seminal quando está presente na semente madura, o nucelo tem seu papel fundamental durante o desenvolvimento do megagametófito, já que é a partir dele que se formam as células arquesporiais (Bouman 1984). Ocorre grande diversidade nucelar, havendo desde nucelos reduzidos, nos óvulos tenuinucelados, até nucelos

extremamente abundantes, como os encontrados em Malpighiaceae e Euphorbiaceae (Corner 1976), famílias em que, além de abundante, o nucelo apresenta-se projetado através da micrópila.

A família Malpighiaceae pertence à ordem Malpighiales (APG III 2009), tem distribuição tropical e subtropical, com cerca de 1.200 espécies e 60 gêneros (Anderson 1990). Suas espécies apresentam características bastante variadas em relação ao hábito e tipo de fruto, embora apresentem morfologia floral bastante conservada. Características de sementes da família foram ainda pouco estudadas, principalmente por exibirem estrutura razoavelmente homogênea e por não apresentarem, até o momento, potencial para aplicação em análises filogenéticas. Sementes de Malpighiaceae foram descritas por Corner (1976) como bitegmentadas, embora os tegumentos sejam não multiplicativos; o nucelo amplia-se e preenche a semente, sendo comprimido pelo embrião e pelo endosperma, o qual é absorvido em sua maior parte. Não há referência a respeito da formação de perisperma em sementes de Malpighiaceae, embora o amplo nucelo seja comumente referido. O perisperma é registrado para sementes de grupos basais de Angiospermas, como Nymphaeales, mas ocorre também em numerosas famílias mais derivadas, principalmente de Caryophyllales (Werker 1997). Para Corner (1976), a presença de perisperma na semente é condição ancestral e Werker (1997) destacou que sementes exclusivamente perispérmicas são bastante raras.

Souto e Oliveira (2005, 2008) estudando espécies de *Byrsonima*, *Banisteriopsis* e *Diplopterys*, relataram a ocorrência de sementes com nucelo abundante que, durante o desenvolvimento da semente, aumenta sua abundância, tanto por divisões celulares quanto por avolumamento dessas células; paralelamente, as autoras destacaram que o endosperma formado nessas sementes é escasso e efêmero. Além disso, iniciativa recente de Souto e Oliveira (Capítulo III, neste volume) relatou a ausência da célula média e de dupla fecundação em *Janusia occhionii*, o que torna interessante a análise da sequência do desenvolvimento seminal.

Diante dessas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ontogênese de sementes de Malpighiaceae, verificando a formação de endosperma na família e elucidando outros aspectos do desenvolvimento seminal de espécies de *Janusia*, *Mascagnia* e *Tetrapteryx*. Incluíram-se duas espécies de *Janusia*, em função do gênero ser enquadrado na tribo Gaudichaudieae, única tribo reconhecida como monofilética em Malpighiaceae, considerada derivada na família (Cameron *et al.* 2001).

Material e Métodos

Quatro espécies de Malpighiaceae foram coletadas no estado de São Paulo, Brasil: *Janusia mediterranea* (Vell.) W.R.Anderson (coletada em Jundiaí), *Janusia occhionii* W.R.Anderson (coletada em Avaré), *Mascagnia cordifolia* (A.Juss.) Griseb (coletada em São Manuel) e *Tetrapterys chamaecerasifolia* A. Juss. (coletada em Botucatu). Ramos de plantas em fase reprodutiva foram herborizados e inseridos no Herbário BOTU ou SP, sob os números R. Sebastiani et al. 306, BOTU 25788, BOTU 25787 e BOTU 25789, respectivamente.

Para a análise estrutural foram coletadas amostras de 50 unidades de flores e frutos em diversas fases do desenvolvimento, para retirada dos óvulos e sementes; amostraram-se cerca de cinco indivíduos. A nomenclatura utilizada para descrever as sementes foi baseada em Corner (1976) e Werker (1997).

As amostras de óvulos e sementes foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940), sendo posteriormente armazenadas em etanol 70%. As amostras foram, então, desidratadas em série etílica, infiltradas em 2-hidroxi-etil-metacrilato, segundo as modificações propostas por Paiva *et al.* (2011); foram seccionadas em micrótomo rotativo, coradas com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964, modificado) e montadas em resina sintética.

Foram realizados testes histoquímicos, a partir de secções a mão livre de material fresco ou fixado, submetidas aos seguintes corantes e/ou reagentes: vermelho de rutênio, para identificar polissacarídeos diversos e pectinas (Jensen 1962); floroglucinol acrescido de ácido clorídrico, para evidenciar paredes lignificadas (Sass 1951); Sudan IV, para a localização de substâncias lipídicas; lugol, para a detecção de amido; cloreto férrico, acrescido de carbonato de sódio, para verificar a ocorrência de compostos fenólicos (Johansen 1940); azul mercúrio de bromofenol, para identificação de proteínas (Mazia *et al.* 1953).

O laminário foi analisado em microscópio fotônico, sendo os resultados registrados por meio de fotografias obtidas com máquina Canon acrescida de macro e fotomicrografias preparadas em fotomicroscópio Olympus com câmara digital acoplada.

Resultados

Óvulo

Os óvulos das espécies estudadas são inseridos em placentação axial no ovário, unitariamente e na porção apical de cada carpelo, de maneira que ficam pêndulos (Fig.

1a). Os óvulos são subcampilótopos e crassinucelados (Fig. 1b-e), unitegmentados em *J. mediterranea* e *J. occhionii* (Fig. 1b-c) e bitegmentados em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* (Fig. 1d-e). Ocorre constrição equatorial no óvulo de *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, sendo as porções voltadas para o polo calazal e micropilar mais largas que a região central (Fig. 1d-e); esta característica é mais pronunciada em *M. cordifolia* (Fig. 1d).

O tegumento externo (ou o único) é formado por até seis camadas celulares na calaza e três camadas próximas à micrópila; na maior extensão do óvulo, este tegumento apresenta-se com quatro camadas celulares nas *Janusia* (Fig. 1f), três em *M. cordifolia* (Fig. 1g) e de três a quatro em *T. chamaecerasifolia*. A epiderme externa é composta por células com contorno retangular em secção longitudinal, volumosas, de parede delgada e conteúdo fenólico (Fig. 1f-g), exceto em *T. chamaecerasifolia*; o mesofilo é formado por células de formato similar à epiderme, menores, também apresentando paredes delgadas, com citoplasma hialino e núcleo evidente (Fig. 1f-g); a epiderme interna é unisseriada, com células ainda menores (Fig. 1f), cubóides em *J. occhionii* e ligeiramente mais altas que largas em *J. mediterranea*. Em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, a epiderme interna não é distinguível do mesofilo e, em algumas regiões, também é difícil distingui-la do tegumento interno (Fig. 1g). Nas espécies bitegmentadas, o tegumento externo é mais longo que o interno e, portanto, apenas ele delimita o poro micropilar. Vários idioblastos com cristais do tipo drusa ocorrem indiscriminadamente nos tegumentos.

O tegumento interno possui de uma a cinco camadas celulares (Fig. 1g), sendo mais comum encontrarem-se três camadas em *T. chamaecerasifolia* e quatro em *M. cordifolia*. As células da epiderme externa e do mesofilo são semelhantes, volumosas, com secção longitudinal quadrangular, mais ou menos alongada, com citoplasma hialino e núcleo bem evidente; a epiderme interna apresenta células menores, mais cubóides, também com núcleo evidente (Fig. 1g).

O nucelo é muito abundante e projeta-se pela micrópila (Fig. 1b-e), sendo que a projeção é mais acentuada em *J. mediterranea* (Fig. 1h). As células do nucelo têm estrutura diferenciada dependendo da região em que se encontram, podendo ser descritas três regiões (Fig. 1h-k). Na região que se projeta pela micrópila, incluindo a porção próxima, envolta pelo tegumento na região micropilar, as células são volumosas em *J. mediterranea* (Fig. 1h) e *M. cordifolia*, e de tamanho médio em *J. occhionii* e *T. chamaecerasifolia*; são células com parede delgada, citoplasma hialino e núcleo

evidente (Fig. 1h). Na região mediana, as células são menores em *J. mediterranea* e *M. cordifolia*, e volumosas em *J. occhionii* e *T. chamaecerasifolia*; a parede celular é pectocelulósica e o citoplasma é limitado à periferia da célula, que apresenta um único vacúolo central, sendo o núcleo evidente (Fig. 1i); é nessa região que se encontra o megagametófito em desenvolvimento e as células nucelares adjacentes a ele aparentam estar em apoptose, com núcleo degenerando e parede celular muitas vezes rompida, além de se observarem resíduos celulares que confirmam a lise (Fig. 1i). A terceira região, próxima à calaza, apresenta células com aspecto meristemático, justapostas umas às outras, havendo numerosas divisões celulares (Fig. 1j-k). Próximo da antese, as células nucelares da região mediana no polo micropilar espessam irregularmente a parede, ocorrendo o depósito de substâncias pécticas (Fig. 1c).

Em todas as espécies estudadas, observa-se a presença de hipóstase (Fig. 1j), reconhecida pela impregnação fenólica nas paredes das células entre calaza e nucelo, a qual é mais inconspícua em *T. chamaecerasifolia* (Fig. 1k).

Durante o desenvolvimento do óvulo, o megagametófito apresenta seu desenvolvimento, sendo possível observar núcleos livres e as células do aparelho oosférico (Fig. 1c), oosfera e duas sinérgides, voltadas para o polo micropilar.

O funículo é longo, espesso e revestido por epiderme unisseriada (Fig. 1a-e) que, eventualmente, pode ser fenólica. Seu preenchimento é feito por tecido parenquimático, com idioblastos fenólicos e drusas, ocorrendo apenas um feixe vascular (Fig. 1a-e). Próximo à região de inserção do funículo na parede ovariana, ocorre um conjunto de células alongadas e estreitas, de formato irregular, parede péctica espessa e citoplasma denso, que acumula substâncias pécticas (Fig. 1b-d, l-m). Esse tecido de aspecto secretor fica em contato direto com as células projetadas do nucelo (Fig. 1l, m), sendo variável em extensão nas espécies estudadas, maior em *J. mediterranea* (Fig. 1l), bem amplo em *J. occhionii* e mais restrito em *M. cordifolia* (Fig. 1m) e *T. chamaecerasifolia*.

Semente em desenvolvimento

A semente permanece subcampilótropa, com calaza ampla e rafe indistinta já no início do desenvolvimento, visto que não há concrecimento entre o tegumento externo e o funículo (Fig. 2a-d).

A região calazal amplia-se, formando uma paquicalaza (Fig. 2a-f). Nesta, o número de camadas fundamentais é ampliado e observa-se a vascularização seminal, que é espessa e irregular (Fig. 2e-f).

Os tegumentos não são multiplicativos, não se dividindo periclinalmente; assim, o número de camadas tegumentares permanece o mesmo do óvulo (Fig. 2g-h). Nas espécies bitegmentadas, durante o desenvolvimento da semente, os tegumentos concrestem de maneira que não é possível individualizá-los (Fig. 2h). Deste modo, as sementes de todas as espécies estudadas são ou tornam-se unitegmentadas. A exotesta permanece fenólica (Fig. 2i). As células da mesotesta em desenvolvimento aumentam de volume e afastam-se ligeiramente, formando pequenos espaços intercelulares; as células possuem parede delgada, citoplasma pouco denso e núcleo evidente (Fig. 2i). A endotesta continua sendo formada por células pequenas, mas ocorre um espessamento “U”, nas paredes periclinal interna e anticlinais (Fig. 2i); próximo da maturação, ocorre lignificação das paredes espessadas.

A semente amplia seu tamanho, principalmente devido ao aumento de volume do nucelo (Fig. 2a-d), que se dá por divisões celulares na região calazal e por vacuolização das demais células nucelares, constituindo o perisperma. Suas células apresentam formato irregular, parede delgada, citoplasma escasso e núcleo evidente (Fig. 3a); as células da periferia do perisperma são menores e apresentam citoplasma mais denso (Fig. 3a). Nas espécies de *Janusia*, não se forma nenhum endosperma (Figs. 2a-b, 3b-c). Em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, forma-se o endosperma nuclear (Fig. 2c-d), que não se multiplica muito (Fig. 3d) e logo é celularizado (Fig. 3e-g). Deste modo, a reserva para o crescimento da semente é fornecida, principalmente, pelo perisperma em todas as espécies.

O zigoto embrionário divide-se, produzindo embrião que passa, nitidamente, pelas fases globular (Fig. 3d), cordiforme (Fig. 3e-f) e em torpedão (Fig. 3g). Até o início da fase de torpedão, é possível observar o suspensor, este formado por uma célula muito volumosa e vacuolada (Fig. 3d).

Semente madura

A semente madura é pequena e tem cor amarelo-escura, é falciforme em *J. mediterranea* (Fig. 4a), piriforme em *J. occhionii* (Fig. 4b), alongada e ligeiramente achatada em *M. cordifolia* (Fig. 4c) e globosa em *T. chamaecerasifolia* (Fig. 4d).

Na maturidade, a testa encontra-se colapsada, sendo possível observar apenas a exotesta fenólica e a endotesta com espessamento em “U” (Fig. 4c). Nas regiões paquicalazais, também fica visível a vascularização (Fig. 4e). A semente é exalbuminosa, sendo o perisperma totalmente consumido durante o crescimento do

embrião (Fig. 4c-e); em alguns pontos, é possível encontrar resíduos de células perispérmicas não consumidas.

O embrião preenche toda a semente e é reto em *M. cordifolia* (Fig. 4c), curvo nas *Janusia* (Fig. 4b) e curvo e dobrado em *T. chamaecerasifolia* (Fig. 4d-e). O eixo hipocótilo-radícula é curto (Fig. 4b-d) e os dois cotilédones são carnosos e volumosos (Fig. 4e); nas *Janusia*, um dos cotilédones é mais longo e se dobra sobre o outro (Fig. 4b). O embrião apresenta protoderme unisseriada, de células pequenas, cubóides, com parede delgada, citoplasma denso e núcleo evidente (Fig. 4f). O meristema fundamental é composto por células mais volumosas que as da protoderme (Fig. 4f), com parede celular delgada, citoplasma denso e núcleos visíveis. Imersos no meristema fundamental, ocorrem cordões procambiais de pequeno calibre.

O eixo embrionário é composto por radícula e hipocótilo curtos, sendo a distinção entre as duas porções inconspícua (Fig. 4d). O nó cotiledonar é estreito e o epicótilo é indistinto (Fig. 4b). A plúmula é indiferenciada, apresentando apenas o promeristema apical caulinar (Fig. 4b-d).

A reserva seminal é composta por lipídeos e proteínas, sendo encontrada no eixo embrionário e nos cotilédones.

Discussão

Os óvulos das espécies estudadas são crassinucelados e apresentam um grande volume de nucelo que se projeta pela micrópila, mesmo que em pequena extensão, como é o caso de *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*. Esta característica é constante na família Malpighiaceae (Lorenzo 1981, Souto e Oliveira 2005, 2008) e já havia sido destacada na caracterização da família, feita por Corner (1976). A projeção do nucelo pela micrópila também ocorre em óvulo de Euphorbiaceae (Corner 1976; De-Paula 2010).

Todas as sementes de Malpighiaceae, cuja ontogênese foi investigada até o momento, apresentaram formação de endosperma (Nacif *et al.* 1996; Paoli 1997; Lorenzo 1981; Souto e Oliveira 2005, 2008), assim como o observado neste trabalho para *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*. Nessas espécies, o endosperma é formado, embora não prolifere muito e seja consumido nas primeiras fases de desenvolvimento do embrião. Os trabalhos existentes na literatura sobre ontogênese seminal na família Malpighiaceae levam a crer que a presença de endosperma escasso e reabsorvido precocemente é característica comum para a família. Corner (1976) já apresentou esta generalização para Malpighiaceae.

No entanto, Souto *et al.* (Capítulo III, neste volume) relataram, para *Janusia occhionii*, a ausência de formação de célula média e, conseqüentemente, a ocorrência de fecundação simples, entre um gameta masculino e a oosfera; embora tenham analisado apenas até a fecundação, os autores sugeriram não haver formação de endosperma na referida espécie. Os dados de desenvolvimento seminal aqui apresentados corroboram o registro da ausência de célula média feito pelos autores supracitados, já que não foi observada a formação de endosperma, nem mesmo em pequena quantidade em *J. occhionii*, como parece ser o comum para a família. Apesar de não haver estudo de gametogênese para *J. mediterranea*, a ausência de endosperma encontrada neste trabalho indica que nesta espécie também não ocorre formação de célula média e há fecundação simples.

A ausência de formação de endosperma é rara e observada em poucas famílias, como é o caso de Podostemaceae, Trapaceae e Orchidaceae (Johri *et al.* 1992). Em Trapaceae e Orchidaceae, o endosperma pode ser formado, mas ocorrem poucas divisões e os núcleos-filhos logo degeneram. Já em Podostemaceae, não ocorre a formação do núcleo primário do endosperma, mas os autores não mencionam a ausência da célula média, como registrado para *J. occhionii*. O que ocorre nesta espécie e, provavelmente, em *J. mediterranea*, aproxima-se do processo que ocorre em Podostemaceae; como as famílias não são relacionadas filogeneticamente, esta condição deve ter evoluído independentemente.

Janusia pertence à tribo Gaudichaudiae e é um gênero reconhecido como derivado nas análises moleculares de Cameron *et al.* (2001). Assim, a ausência de produção de endosperma pode ser considerada derivada para a família, já que espécies mais basais, como *Malpighia glabra* (Nacif *et al.* 1996), *Byrsonima intermedia* (Souto e Oliveira 2005), *Banisteriopsis campestris*, *B. oxyclada*, *B. stellaris*, *Diplopterys pubipetala* (Souto e Oliveira 2008) e *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, relatadas neste trabalho apresentam formação de endosperma. Além de Souto *et al.* (Capítulo III, neste volume), a literatura registra apenas um trabalho sobre megagametófito de espécie de Gaudichaudieae, *J. guaranitica*, este realizado por Lorenzo (1981); o autor relata a presença de célula média e de dupla fecundação, bem como a presença de endosperma. Levando-se em conta esses resultados, a ausência de endosperma não seria uma autapomorfia do gênero. Entretanto, seria interessante a realização de outros trabalhos com outras espécies do gênero e da tribo, já que o trabalho de Lorenzo (1981) não contava com as técnicas que se dispõe atualmente e todos os resultados são ilustrados

apenas com desenhos, que dificultam novas interpretações sobre os dados. Com estudos adicionais será possível saber se a ausência de formação do endosperma ocorreu apenas em um grupo de espécies dentro do gênero, no gênero como um todo ou em outros gêneros da tribo.

Nas espécies de *Janusia* aqui estudadas e mesmo em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, que apresentam formação de endosperma escasso, fica claro que o papel de nutrição para o embrião foi transferido para o nucelo e seu sucessor na semente, o perisperma. Essa transferência é óbvia nas *Janusia*, mas também pode ser reconhecida nas demais espécies, em que o endosperma é escasso e transitório. Nas *Janusia*, o perisperma fornece nutrição para o embrião desde o início de seu desenvolvimento, enquanto que, em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, o endosperma compartilha, inicialmente, este papel; ainda precocemente, quando o endosperma é consumido, o perisperma passa a fornecer a nutrição necessária.

Segundo Coe (1954), as células do nucelo podem se romper para fornecer nutrição para o desenvolvimento do megagametófito. No caso das espécies aqui estudadas, também se reconheceram sinais de lise nas células perispérmicas ao redor do embrião, que também se rompem, fornecendo, desta maneira, os nutrientes necessários ao embrião.

A hipóstase é frequentemente encontrada em óvulo e sementes, ocorrendo em 81 famílias de dicotiledôneas segundo Von Teichman e Van Wyk (1991); os autores não incluíram Malpighiaceae em seu levantamento. Ocorre grande variabilidade na estrutura da hipóstase dependendo da espécie (Bouman 1984) e, portanto, as funções que se atribui a esta estrutura também são variadas. Uma das prováveis funções seria a de economia de água (Goebel 1933), ou ainda de estocagem de metabólitos como os taninos e tornar o óvulo mais resistente ao ataque de patógenos (Von Teichman 1988), bem como fornecer proteção ao embrião (Von Teichman e Van Wyk 1991). Segundo Von Teichman e Van Wyk (1991), a hipóstase pode ser enquadrada como *lato sensu* e *stricto sensu*, de acordo com sua estrutura. As sementes das espécies aqui estudadas enquadram-se no tipo *lato sensu*, que é frequentemente encontrado em associação com calaza extensa, como é o caso das espécies paquicalazais deste trabalho. Além da associação com a calaza ampla, a hipóstase também é associada pelos autores a outros caracteres considerados ancestrais, como óvulos bitegmentados, crassinucelados, com endosperma nuclear e plantas de hábito lenhoso.

Embora Von Teichman e Van Wyk (1991) tenham relacionado a presença de hipóstase ao aparecimento de outros caracteres ancestrais, Corner (1976) considerou a hipóstase e a paquicalaza como inovações que ocorreram em várias famílias paralelamente. Em Malpighiaceae, a presença de paquicalaza também foi registrada em três espécies de *Banisteriopsis* e em *D. pubipetala* (Souto e Oliveira 2008), mas não foi encontrada em *Byrsonima intermedia* (Souto e Oliveira 2005) e em *Lophantera lactecens* (Paoli 1997); em *M. glabra* (Nacif *et al.* 1996), ocorreu emissão de traços pós-calazais, embora os autores não se refiram à presença de paquicalaza. A paquicalaza poderia atuar como um tipo de reservatório para metabólitos, vindos do feixe vascular e de regiões adjacentes à calaza, mas também poderia conferir proteção (Batygina 2002). A formação da paquicalaza é encontrada tanto em táxons primitivos quanto derivados, e deve ter surgido muitas vezes no curso da evolução, podendo significar adaptações para dispersão e germinação (Batygina 2002). Como foi documentada apenas em algumas espécies de Malpighiaceae, a paquicalaza deve ter aparecido durante a diversificação da família, em mais de uma linha filogenética.

Um aspecto que chama a atenção nos óvulos analisados é a presença do obturador funicular, o mais comum entre os que ocorrem no óvulo (Batygina 2002). Trata-se de um tecido secretor, com células epidérmicas alongadas do ovário ou óvulo que apresenta função de guiar e favorecer o crescimento do tubo polínico, da parede ovariana até a micrópila (Johri *et al.* 1992). É comum que as células do obturador sejam secretoras (Johri *et al.* 1992; Batygina 2002), o que parece ser o caso das espécies deste trabalho, mais evidentemente nas *Janusia*. Parece ocorrer uma gradação na elaboração estrutural e extensão do obturador dessas espécies, sendo que *M. cordifolia* é a que apresenta o obturador com menor extensão e com células menos diferenciadas, *T. chamaecerasifolia* mostra ainda pequena extensão e diferenciação, *J. occhionii* tem obturador bem desenvolvido e de aspecto secretor, caso também de *J. mediterranea*, cujo obturador é o maior.

Em suma, comparando-se as quatro espécies estudadas, é nítido que as sementes das *Janusia* apresentam estados de caracteres derivados, se comparadas com as sementes de *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, como a redução para a condição unitegmentada já no óvulo, o obturador maior e elaborado e a ausência do endosperma. Esses dados corroboram a posição mais derivada das *Janusia*, em relação a *Mascagnia* e *Tetrapteryx*, encontrada por Cameron *et al.* (2001), embora não permitam, dada a pequena amostragem de espécies, tecer considerações relativas à controversa posição

filogenética destes dois últimos gêneros, ainda não resolvida mesmo nas análises moleculares.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado de L.S. Souto e de Produtividade em Pesquisa (Processo nº 304716/2008-1) de D.M.T. Oliveira, bem como pelo auxílio financeiro (Processo nº 475498/2008-9); à Dra. Maria Candida Henrique Mamede e à Dra. Renata Sebastiani, pela identificação das espécies.

Referências

- Anderson WR (1990) The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **64**, 210–224.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 105–121.
- Batygina TB (2002) ‘Embryology of flowering plants: terminology and concepts.’ Vol 1. (Oxford e IBH Publishing: New Delhi)
- Bouman F (1984) The ovule. In ‘Embryology of angiosperms’. (Ed. BM Johri) pp.123–157. (Springer-Verlag: Berlin)
- Cameron KM, Chase MW, Anderson WR, Hills HG (2001) Molecular systematic of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal of Botany* **88**,1847–1862.
- Coe GE (1954) Distribution of carbon¹⁴ in ovules of *Zephyranthes drummondii*. *Botanical Gazette* **115**, 342–346.
- Corner EJH (1976) ‘The seeds of dicotyledons.’ Vol 2. (University Press: Cambridge)
- De-Paula OC (2010) Morfologia e desenvolvimento floral em *Croton* L. e *Astraea* Klotzsch (Euphorbiaceae *sensu stricto*). Tese de doutorado, não publicada, Universidade Estadual Paulista.

- Goebel K (1933) Organographie der Pflanzen, insbesondere der archegoniaten und samenpflanzen **10**, 1379–2078 *apud* Batygina TB (2002) ‘Embryology of flowering plants: terminology and concepts.’ Vol 1. (Oxford e IBH Publishing: New Delhi)
- Jensen WA (1962) ‘Botanical histochemistry: principles and practice.’ (W.H. Freeman: San Francisco)
- Johansen DA (1940) ‘Plant microtechnique.’ (McGraw-Hill Book: New York)
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS (1992) ‘Comparative embryology of angiosperms.’ Vol 1. (Springer-Verlag: Berlin)
- Lorenzo E (1981) Sobre la inflorescência, morfologia floral y embriologia de *Janusia guaranítica* (Malpighiaceae). *Kurtziana* **14**, 101–124.
- Maheshwari P (1950) ‘An introduction to the embryology of angiosperms.’ (McGraw Hill: New York)
- Mazia D, Brewer PA, Albert M (1953) The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin* **104**, 57–67.
- Nacif SR, Guardia MC, Moraes PLR (1996) Morfologia e anatomia das sementes de acerola (*Malpighia glabra* L. – Malpighiaceae). *Revista Ceres* **43**, 597–610.
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**, 368–373.
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT (2011) Large plant samples: how to process for (2-hydroxyethyl)-methacrylate embedding? In ‘Light microscopy: methods and protocols.’ (Eds H Chiarini-Garcia, RCN Melo) no prelo. (Methods in Molecular Biology, v. 689. Totowa: Humana Press)
- Paoli AAS (1997) Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophantera lactescens* Ducke (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Sementes* **19**, 238–244.
- Sass JE (1951) ‘Botanical microtechnique.’ (Ames: Iowa State University)

- Souto LS, Oliveira DMT (2005) Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **28**, 697–712.
- Souto LS, Oliveira DMT (2008) Morfoanatomia e ontogênese das sementes de espécies de *Banisteriopsis* C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* **22**, 733–740.
- Vijayaraghavan MR, Prabhakar K (1984) The endosperm. In 'Embryology of Angiosperms.' (Ed. BM Johri) pp. 319–376. (Springer-Verlag: Berlin)
- Von Teichman I (1988) Notes on the ontogeny and structure of the seed-coat of *Sclerocarya birrea* (Richard) Hochst. Subsp. *caffra* (Sonder) Kokwaro (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **98**, 153–158.
- Von Teichman I, Van Wyk AE (1991) Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. *Botanical Journal of the Linnean Society* **105**, 211–237.
- Werker E (1997) 'Seed anatomy.' (Gebrüder Borntraeger: Berlin)

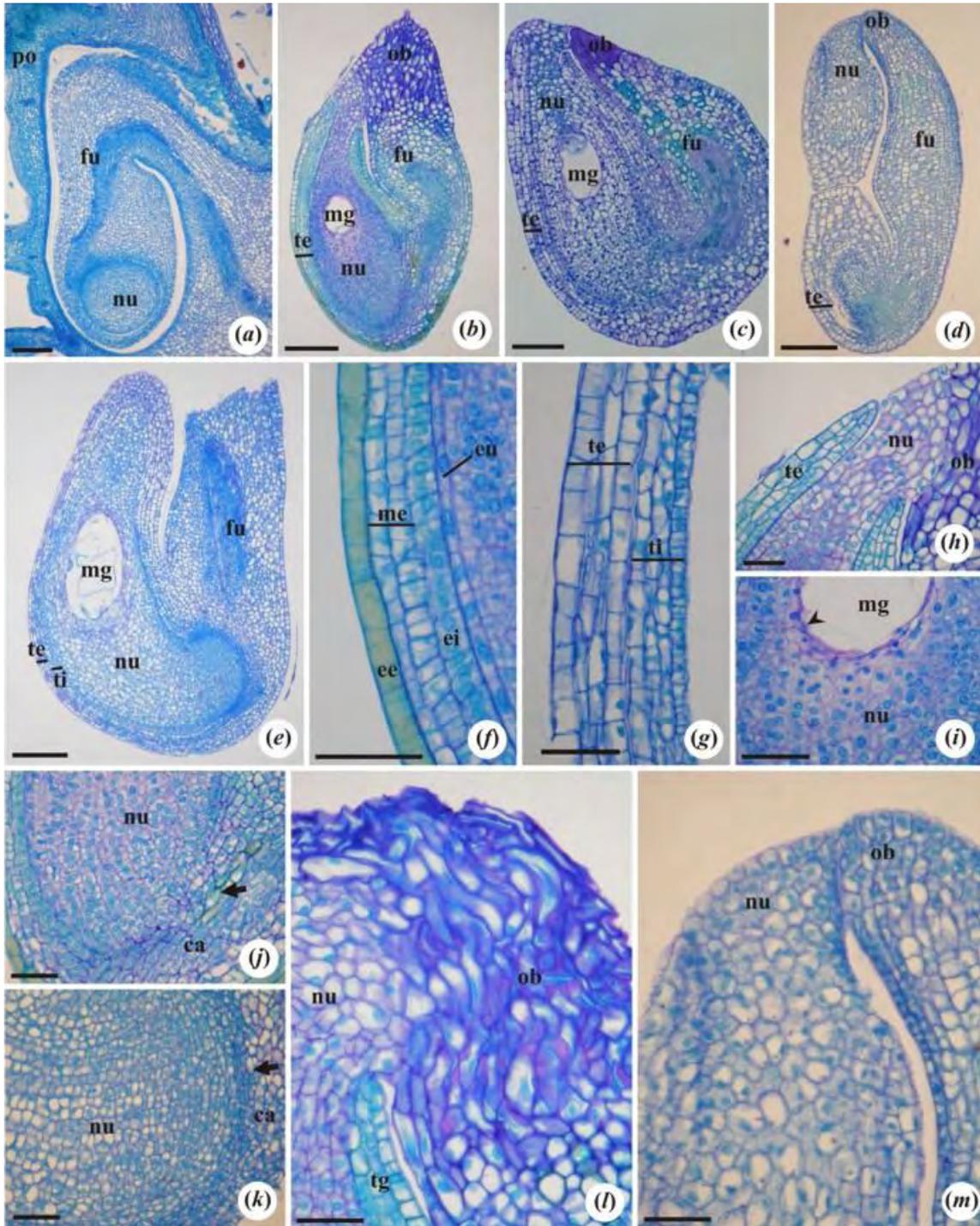


Fig. 1. Óvulos de *Tetrapterys chamaecerasifolia* (a, e, l), *Janusia mediterranea* (b, f, h-k, m), *J. occhionii* (c) e *Mascagnia cordifolia* (d, g, n). Seções longitudinais. (a) Vista geral do carpelo, mostrando o óvulo pêndulo e único, em placentação axial. (b-e) Óvulos subcampilótropos das espécies estudadas; notar a constrição mediana em *M. cordifolia* (d) e *T. chamaecerasifolia* (e). (f) Detalhe do tegumento único das espécies de *Janusia*. (g) Detalhe dos tegumentos externo e interno das espécies bitegumentadas. (h) Região micropilar do óvulo, com células nucleares projetando-se pela micropila. (i). Região mediana do nucelo; notar as células nucleares em reabsorção ao redor do megagametófito (ponta de seta). (j-k) Região calazal do nucelo, com numerosas divisões celulares, onde se distingue a hipóstase (seta). (l-m) Detalhe do obturador, com células em contato direto com as células nucleares projetadas. ca, calaza; ei, epiderme interna do tegumento; ee, epiderme externa do tegumento; eu, epiderme nucelar; fu, funículo; me, mesofilo do tegumento; mg, megagametófito; nu, nucelo; ob, obturador; po, parede ovariana; te, tegumento externo; ti, tegumento interno. Barras de escala = 150 μ m (a-b, d-e), 100 μ m (c) e 50 μ m (f-m).

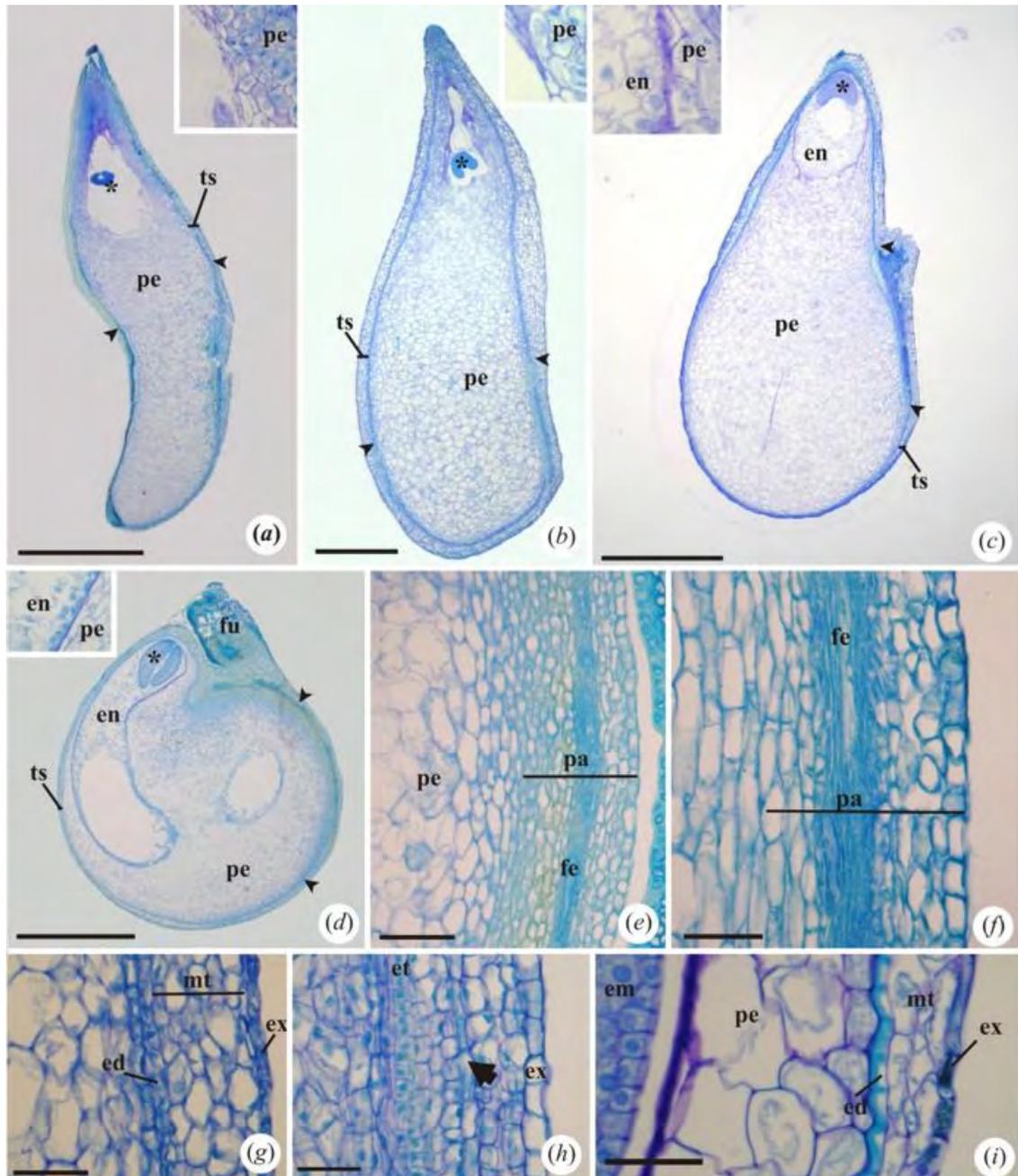


Fig. 2 Sementes em desenvolvimento de *Janusia mediterranea* (a), *J. occhionii* (b, g, i), *Mascagnia cordifolia* (c, h) e *Tetrapterys chamaecerasifolia* (d-f). Secções longitudinais. (a-d) Vista geral, mostrando o nucelo amplo e o embrião no início da ontogênese (*); notar a região paucicalazal (entre as pontas de seta) e o endosperma nos destaques das figuras, ausente em (a-b) e presente do tipo nuclear em (c-d). (e-f) Detalhe da paucicalaza. (g) Envoltório das espécies unitegumentadas. (h) Envoltório das espécies bitegumentadas; observar os tegumentos colapsando (seta). (i) Tegumento em fase mais avançado do desenvolvimento, com exotesta fênolica, mesotesta com células vacuoladas e endotesta com espessamento em “U”. ed, endotesta; em, embrião; en, endosperma; et, endotégmen; ex, exotesta; fe, feixe vascular; fu, funículo; mt, mesotesta; pa, paucicalaza; pe, perisperma; ts, testa. Barras de escala = 2 mm (a, c-d), 500 µm (b), 100 µm (e) e 50 µm (f-i).

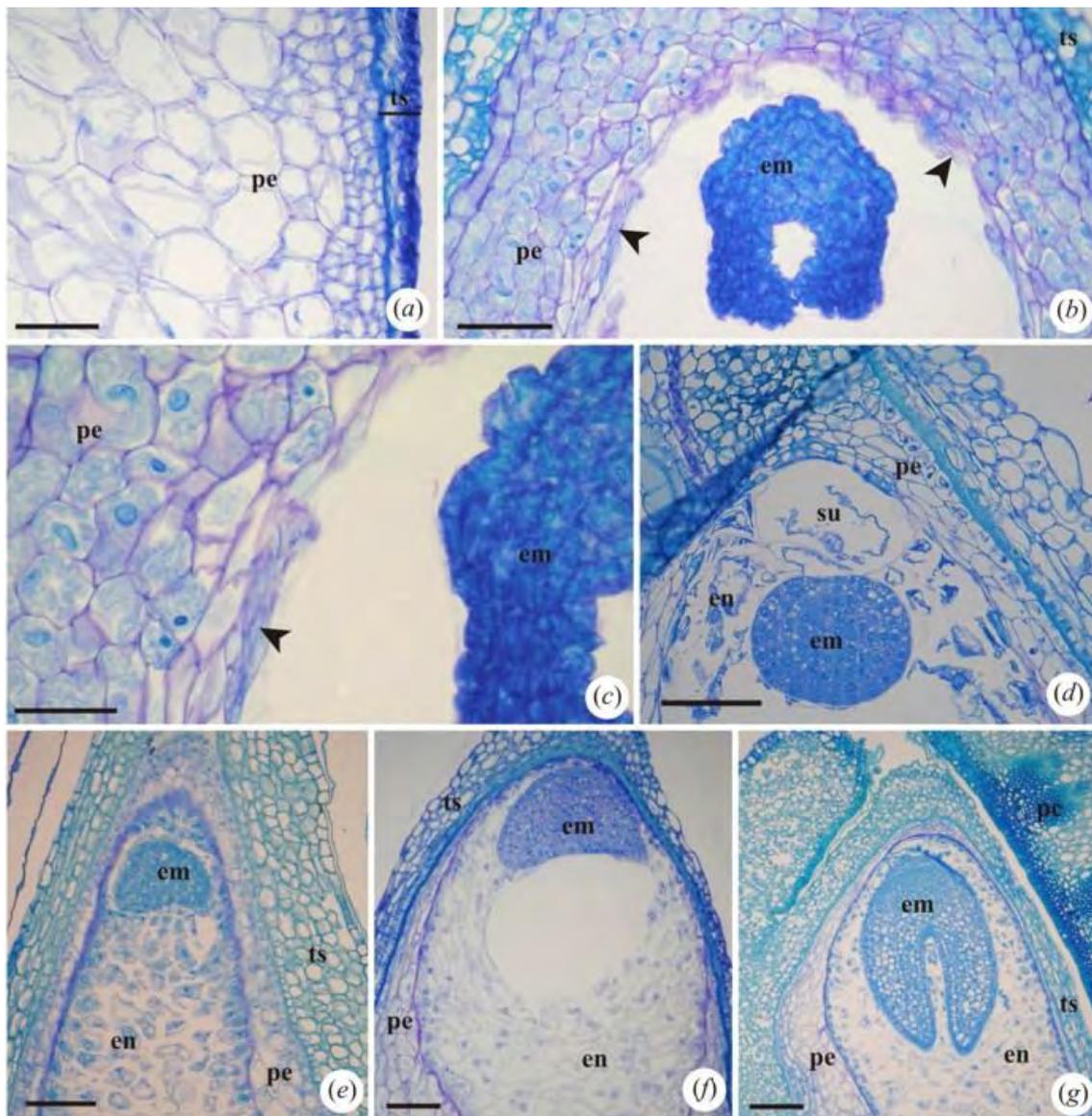


Fig. 3. Sementes em desenvolvimento de *Mascagnia cordifolia* (a, d, f), *Janusia mediterranea* (b-c) e *Tetrapteryx chamaecerasifolia* (e, g). Secções longitudinais. (a) Detalhe do perisperma, com células pequenas na periferia e maiores no centro, recoberto pela testa. (b) Embrião em torpedo e perisperma em reabsorção próximo ao embrião (ponta de seta). (c) Detalhe da figura anterior, destacando a ausência de endosperma e as células do nucelo em lise (ponta de seta). (d) Detalhe do embrião globular, ligado ao suspensor unicelular; notar o endosperma escasso. (e-g) Embrião cordiforme e em torpedo das espécies que apresentam endosperma. em, embrião; en, endosperma; pc, pericarpo; pe, perisperma; su, suspensor; ts, testa. Barras de escala = 150 μm (f-g), 100 μm (a-b, d-e) e 50 μm (c).

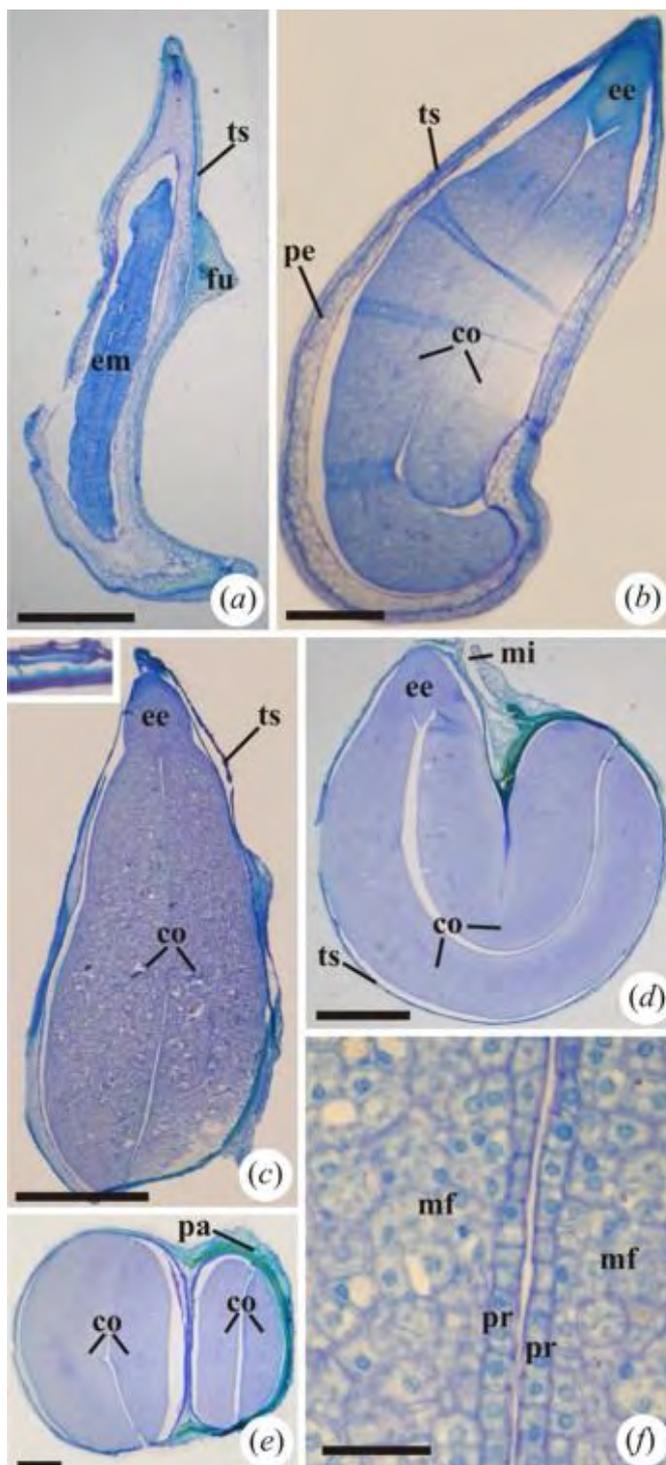


Fig. 4. Semente madura de *Janusia mediterranea* (a), *Janusia ochionii* (b, f), *Mascagnia cordifolia* (c) e *Tetrapteryx chamaecerasifolia* (d-e). Secções longitudinais (a-d); secção transversal (e-f). (a-d) Vista geral. (e) Vista geral da semente, mostrando os cotilédones dobrados sobre si. (f) Detalhe do cotilédone, mostrando protoderme e meristema fundamental. co, cotilédone; ee, eixo embrionário; em, embrião; fu, funículo; mf, meristema fundamental; mi, micrópila; pa, paucicalaza; pe, perisperma; pr, protoderme; ts, testa. Barras de escala: 2 mm (a, c), 1 mm (d), 500 μ m (b, e) e 50 μ m (f).



Considerações finais

Mascagnia cordifolia

Utilizando-se a análise da vascularização floral, foi possível observar dois processos distintos que levaram a perda do par de glândulas calicinais na sépala anterior: em *M. cordifolia*, a perda ocorreu por conação com as glândulas das sépalas adjacentes, enquanto que, nas *Janusia* e em *T. chamaecerasifolia*, a perda se deu por simples redução da estrutura. Com isso, pode-se indicar que a perda das glândulas calicinais da sépala anterior ocorreu em, pelo menos, dois momentos distintos durante a evolução das Malpighiaceae.

As flores das cinco espécies analisadas apresentaram grande variação na anatomia, ao contrário do que é relatado para a morfologia floral das Malpighiaceae, considerada bastante homogênea. As maiores variações ocorreram nas sépalas e pétalas e devem refletir adaptações das espécies ao ambiente e à polinização. Já algumas características dos óvulos e a morfologia das glândulas calicinais apresentam constância dentro do mesmo gênero e tribo, de modo que podem ser úteis taxonomicamente.

Um dado inédito para Malpighiaceae foi a constatação de ausência de célula média e a ocorrência de fecundação simples em *J. occhionii*. Tal característica foi, mais uma vez, confirmada durante a análise da ontogênese seminal da referida espécie, que realmente não apresentou formação de endosperma. Em *J. mediterranea*, também não foi observada produção de endosperma e, em *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia*, apesar do endosperma nuclear ser formado, ele rapidamente é celularizado e reabsorvido, sendo de pequena dimensão e efêmero. Nas espécies estudadas, o nucelo, já abundante no óvulo, divide-se e amplia-se, constituindo o perisperma, tecido que nutre a semente durante toda a embriogênese. Com isso, foi possível constatar a transferência de função de nutrição do embrião em formação, do endosperma para o perisperma. O registro de perisperma também é novo para a família, apesar do nucelo abundante ser corriqueiramente referido na literatura para espécies de Malpighiaceae.

A redução que ocorre no megagametófito de *J. occhionii*, que na maturidade apresenta apenas três células, é uma condição derivada na família, que parece se restringir a clados mais derivados como é o caso da tribo Gaudichaudieae; esta redução pode ser interpretada como economia de energia durante o processo de gametogênese feminina desta espécie.

Analisando o pericarpo de *J. mediterranea*, *J. occhionii*, *M. cordifolia* e *T. chamaecerasifolia* e comparando os resultados com a literatura, foi possível observar padrões estruturais comuns na família: exocarpo unisseriado, mesocarpo externo parenquimático (carnoso nos frutos drupáceos e colapsado na maturidade nos frutos secos), mesocarpo interno com células espessadas e lignificadas. Também foi possível detectar que a estrutura do

endocarpo tem potencial para uso taxonômico, já que ocorrem três padrões estruturais nessa região.

Os caracteres estruturais dos órgãos reprodutivos de *Camarea linearifolia*, *Janusia mediterranea*, *J. occhionii*, *Mascagnia cordifolia* e *Tetrapterys chamaecerasifolia* apresentaram dados ainda inéditos para Malpighiaceae, padrões estruturais nas sementes e frutos, abrindo novas possibilidades para o estudo estrutural como base para o entendimento da filogenia das Malpighiaceae.



Referências Bibliográficas

Camarea linearifolia

- AMORIM, A.M. 2002. Five new species of *Heteropterys* (Malpighiaceae) from Central and South America. *Brittonia* 54:217-232.
- AMORIM, A.M. 2004. A new species of *Heteropterys* (Malpighiaceae) from semideciduous forest of Bahia, Brazil. *Brittonia* 56:143-146.
- ANDERSON, C. 2001. Novelties in *Mascagnia* (Malpighiaceae). *Brittonia* 53:405-415.
- ANDERSON, W.R. 1967. *Banisteria* Adr. Juss. *Taxon* 16:472-474.
- ANDERSON, W.R. 1977. Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae. *Leandra* 7:5-18.
- ANDERSON, W.R. 1979. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. *Biotropica* 11:219-223.
- ANDERSON, W.R. 1980. Notes on *Mascagnia* in South America. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 14:17-23.
- ANDERSON, W.R. 1981. *Barnebya*, a new genus of Malpighiaceae from Brazil. *Brittonia* 33:275-284.
- ANDERSON, W.R. 1985. *Peregrina*, a genus new of Malpighiaceae from Brazil and Paraguay. *Systematic Botany* 10:303-307.
- ANDERSON, W.R. 1990. The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 64:210-224.
- ANDERSON, W.R. 1993. The identity of *Stigmaphyllon dichotomum* (L.) Griseb. (Malpighiaceae). *Brittonia* 45:34-38.
- ANDERSON W.R. 1994. New species of *Hiraea* (Malpighiaceae) from the Guianas and adjacent Brazil. *Brittonia* 46:126-133.
- ANDERSON, W.R. & DAVIS, C.C. 2005. The *Mascagnia cordifolia* group (Malpighiaceae). *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 24:33-44.
- BARROS, M.A.G. 1992. Fenologia da floração, estratégias reprodutivas e polinização de espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* Rich (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 52:343-353.

- BEIGUELMAN, B. 1962. Considerações sobre a morfologia dos estomas de *Annona coriacea* Mart., *Byrsonima coccolobifolia* Kth., *Erythroxylum suberosum* St. Hil. e *Ouratea spectabilis* (Mart.) Engl. *Revista Brasileira de Biologia* 22:115-124.
- CAMERON, K.M., CHASE, M.W., ANDERSON, W.R. & HILLS, H.G. 2001. Molecular systematic of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal of Botany* 88:1847-1862.
- CASTRO, M.A., VEGA, A.S. & MÚLGARA, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Glaphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). *American Journal of Botany* 88:1935-1944.
- CORNER, E.J.H. 1976. The seeds of dicotyledons. Cambridge, University Press. 2v.
- CORTINI, C. 1958. Sviluppo del gametofito femminile in *Malpighia fucata* Ker-Gawl. (Malpighiaceae). *Caryologia* 11:42-56.
- COSTA, C.B.N., COSTA, J.A. & RAMALHO, M. 2006. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29:103-114.
- COSTA, C.C., PAVANI, M.C.M.D., MORO, F.V. & PERECIN, D. 2003. Viabilidade de sementes de acerola (*Malpighia emarginata* DC): avaliação da vitalidade dos tecidos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25:532-534.
- CUATRECASAS, J. & CROAT, T.B. 1980. Flora of Panama (Part VI. Family 93. Malpighiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 67:851-945.
- DAVIS C.C., 2002. *Madagasikaria* (Malpighiaceae): a new genus from Madagascar with implications for floral evolution in Malpighiaceae. *American Journal of Botany* 89:699-709.
- DAVIS, C.C., ANDERSON, W.R. & DONOGHUE, M.J. 2001. Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* e *trnl-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 88:1830-1846.
- FERREIRA, G.L. 1981. Anatomia foliar de *Peixotoa hispidula* A. Juss. (Malpighiaceae). *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 25:45-53.
- GATES, B. 1982. *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monographs* 30:1-236.

- GIRALDO-ZUNIGA, A.D., ARÉVALO-PINEDO, A., REZENDE, J.R., SILVA C.S. & MONTEIRO, J.A. 2006. Drying kinetics for murici (*Byrsonima crassifolia*) fruit. *Journal of Food Processing and Preservation* 30:699-705.
- GUSMÃO, G., VIEIRA, F.A. & FONSECA JÚNIOR, E.M. 2006. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). *Cerne* 12:84-91.
- HUTCHINSON, J. 1967. *The genera of flowering plants*. Oxford, Oxford University Press. 2v.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 2009. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. 2ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- JUSSIEU, A. 1843. Monographie de la familie das Malpighiacées. *Archs. Mus. Natn. Hist.*, Paris, 3:5-151, 255-616 *apud* MAMEDE, M.C.H. 1993. Estudo comparativo de flores casmógamas e cleistógamas e de frutos de *Camarea affinis* St.-Hil. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 7:21-31.
- KUHN, M. 1867. Einige Bemerkungen über *Vandellia* und den Blütendimorphismus. *Botanische Zeitung* 25:65-67 *apud* UPHOF, J.C.T. 1938. Cleistogamic flowers. *Botanical Review* 4:21-49.
- LASKOWSKI, L.E. & BAUTISTA, D. 1999. Características anatómicas de la flor del semeruco (*Malpighia emarginata* DC.). *Ernstia* 9:19-36.
- LASKOWSKI, L.E. & BAUTISTA, D. 2000. Características anatómicas y desarrollo del fruto del semeruco (*Malpighia emarginata* DC.). *Ernstia* 10:105-115.
- LOMBELLO, R.A. & FORNI-MARTINS, E.R. 2003. Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. *Acta Botanica Brasilica* 17:171-178.
- LORENZO, E. 1981. Sobre la inflorescencia, morfología floral y embriología de *Janusia guaranitica* (Malpighiaceae). *Kurtziana* 14:101-124.
- MAMEDE, M.C.H. 1990. Revisão do gênero *Camarea* Saint-Hilaire (Malpighiaceae). *Hoehnea* 17:1-34.
- MAMEDE, M.C.H. 1993. Estudo comparativo de flores casmógamas, cleistógamas e de frutos de *Camarea affinis* St. Hil. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 7:21-31.
- MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA JÚNIOR, M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E. 1998. Flora vascular do cerrado. *In*

- Cerrado: ambiente e flora (S.M. Sano & S.P. Almeida, eds.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p.289-556.
- MORTON, C.V. 1968. A typification of some subfamily, seccional, and subseccional names in the family Malpighiaceae. *Taxon* 17:314-324.
- NACIF, S.R., GUARDIA, M.C. & MORAES, P.L.R. 1996. Morfologia e anatomia das sementes de acerola (*Malpighia glabra* L. – Malpighiaceae). *Revista Ceres* 43:597-610.
- NARASIMHACHAR, S.G. 1938. Megasporogenesis and female gametophyte in *Malpighia puniceifolia* Linn. *Current Science* 6:507-509.
- NIEDENZU, F. 1928. Malpighiaceae. *In Das Pflanzenreich IV* (A. Engler) 141:1-870 *apud* GATES, B. 1982. *Banisteriopsis, Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monographs* 30:1-236.
- PAOLI, A.A.S. 1997. Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophantera lactescens* Ducke (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Sementes* 19:238-244.
- POSSOBOM, C.C.F. 2008. Estrutura e função das glândulas florais e dos nectários foliares em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis (Malpighiaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- POSSOBOM, C.C.F., GUIMARÃES, E. & MACHADO, S.R. 2010. Leaf glands act as nectaries in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae). *Plant biology* 12:863-870.
- SIGRIST, M.R. & SAZIMA, M. 2004. Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany* 94:33-41.
- SINGH, B. 1959. Studies in the family Malpighiaceae. 1. The morphology of *Thryallis glauca* Kuntze. *Hort. Adv.* 3:1-19.
- SOUTO, L.S. 2007. Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de espécies de *Banisteriopsis* C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- SOUTO, L.S. & OLIVEIRA, D.M.T. 2005. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 28:697-712.

- SOUTO, L.S. & OLIVEIRA, D.M.T. 2008. Morfoanatomia e ontogênese das sementes de espécies de *Banisteriopsis* C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 22: 733-740.
- SUBBA RAO, A.M. 1939. Studies in the Malpighiaceae: I. Embryo-sac development and embryogeny in the genera *Hiptage*, *Banisteria* and *Stigmaphyllon*. *Journal of the Indian Botanical Society* 18:146-156.
- SUBBA RAO, A.M. 1937. A note on the development of the female gametophytes of some Malpighiaceae and polyembryony in *Hiptage madablota*. *Current Science* 8:280-282.
- SUBRAMANIAN, R.B., ARUMUGASAMY, K. & INAMDAR, J.A. 1990. Studies in the secretory glands of *Hiptage sericea* (Malpighiaceae). *Nordic Journal of Botany* 10:57-62.
- TAKHTAJAN, A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. New York, Columbia University Press.
- TEIXEIRA, L.A.G & MACHADO, I.C. 2000. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 14:347-357.
- UPHOF, J.C.T. 1938. Cleistogamic flowers. *Botanical Review* 4:21-49.
- VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Tropische und subtropische Pflanzenwelt* 7: 283-547 *apud* BUCHMANN, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:343-369.
- VOGEL, S. 1990. History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55:130-142.