Bianca de Azevedo Brasil

Ciclo de vida, fenologia e anatomia floral de *Pilostyles* (Apodanthaceae – Rafflesiaceae *s.l.*): subsídios para um posicionamento filogenético da família Apodanthaceae

Life cycle, phenology and floral anatomy of *Pilostyles* (Apodanthaceae - Rafflesiaceae *s.l.*): phylogenetic position allowances for Apodanthaceae family

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Dr. Gregório Ceccantini

São Paulo

2010

BRASIL, Bianca de Azevedo

Ciclo de vida, fenologia e anatomia floral de *Pilostyles* (Apodanthaceae – Rafflesiaceae *s.l.*): subsídios para um posicionamento filogenético da família Apodanthaceae

163 páginas

Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Pilostyles,* 2. Planta parasita, 3. Anatomia vegetal. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

COMISSÃO JULGADORA:

_____ _____

Prof (a). Dr(a). Prof (a). Dr (a).

_____

Prof. Dr. Gregório C. T. Ceccantini

Orientador

À minha família,

meus reais orientadores,

base sem a qual nada seria possível

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual minha estadia em São Paulo, cidade da qual sou espécie exótica, seria economicamente inviável.

Agradeço aos meus primeiros orientadores (no sentido pleno da palavra) – Eliane D. Heuser (PUCRS) e Jorge E. A. Mariath (UFRGS), que fizeram germinar em mim amor e curiosidade infinda pela ciência da botânica. Aos antigos colegas de laboratório, espécimes raros: Jônatas e Mariana (população PUCRS), Adriana, Adriano, Érica, Fernanda, Jaqueline, Juliana, Natividad e Sônia (população UFRGS).

Ao orientador Gregório C. T. Ceccantini, não só por oferecer-me oportunidade de estudar em uma das maiores universidades do país, mas também por me apresentar ao mundo encantador das plantas parasitas. Obrigada por sempre confiar na minha capacidade de trabalho.

Aos docentes do Departamento de Botânica da USP, em especial às perfumadas flores Nanuza Luiza de Menezes, Verônica Angyalossy e Gladys Flávia Melo de Pinna, pelo exemplo de profissionais responsáveis e pelo acréscimo de conhecimentos valiosos para a minha carreira profissional, e ao professor Gilberto Kerbauy e sua equipe, pelo auxílio nos experimentos de germinação *in vitro.*

À professora Teresa Terrazas, da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por me acolher e orientar durante intercâmbio realizado na Cidade do México, e ao professor Guillermo Angeles, do Instituto de Ecologia de Xalapa (INECOL), pelo apoio e simpatia incríveis.

Às técnicas Gisele e Tássia, pela paciência com que sempre me prestaram auxílio e pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, parceiros e amigos: André, Bruna, Cairo, Celina, Cristiane, Flávia, Giuliano, Guilherme, Gustavo, Luiz, Marcelo, Marlene, Paula, Pedro, Ricardo e Viviane. Obrigada pelo intercâmbio de experiências, preciosas discussões e principalmente pela cumplicidade.

À amiga Marina Lia Toscano pelas suas valiosas contribuições, sejam elas críticas ou elogios, que melhoraram em muito o texto final da dissertação, e à amiga Lara, pela ajuda na confecção dos mapas de ocorrência das espécies estudadas.

À minha família *sensu lato* em São Paulo, meus amigos e colegas de república (antigos e atuais): Caroline, João Carlos Manuel, Karin, Marcos, Mathieu, Nora, Patrícia, Pedro, Tamiris e Zoumague. Muito obrigada por fazerem parte do meu cotidiano, pelos momentos inesquecíveis e de grande aprendizado passados e pelos muitos outros que virão. Continuo com vocês!

Um agradecimento especial à minha família *sensu stricto* – Getúlio (*in memorian*), Lélia e Daniela – meus reais orientadores, responsáveis pela minha identidade. Vocês foram, são e sempre serão minha base, alicerce sem o qual nada seria possível. Amo vocês incondicionalmente.

Muito obrigada!

Bianca de Azevedo Brasil

ÍNDICE

PREFÁCIO 1

INTRODUÇÃO GERAL 4

Referências Bibliográficas 12

CAPÍTULO I – CICLO DE VIDA E FENOLOGIA 15

Introdução 16

Material e Métodos 20

Resultados 28

Discussão 39

Conclusões 43

Referências Bibliográficas 45

CAPÍTULO II – POPULAÇÃO E RAZÃO SEXUAL 49

Introdução 50

Material e Métodos 53

Resultados 57

Discussão 65

Conclusões 75

Referências Bibliográficas 77

CAPÍTULO III – MORFOLOGIA E ANATOMIA FLORAL 80

Introdução 81

Material e Métodos 85

Resultados 88

Discussão 108

Conclusões 116

Referências Bibliográficas 118

CAPÍTULO IV – ESPOROGÊNESE E GAMETOGÊNESE 121

Introdução 122

Material e Métodos 124

Resultados 126

Discussão 140

Conclusões 144

Referências Bibliográficas 146

CONSIDERAÇÕES FILOGENÉTICAS 148

Referências Bibliográficas 156

CONCLUSÕES GERAIS 158

POSFÁCIO 160

RESUMO 162

ABSTRACT 163

PREFÁCIO

Este estudo foi idealizado no sentido de dar continuidade a uma linha de pesquisa em plantas parasitas existente no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade de São Paulo (USP). Essa linha foi iniciada pela Dra. Margarida Venturelli na década de 70 passada e, após seu súbito falecimento, interrompida por aproximadamente trinta anos. A retomada veio com os trabalhos de Ceccantini e Amaral (2005), Groppo e colaboradores (2007) e Amaral (2007), que versam sobre a distribuição geográfica, impacto no hospedeiro e anatomia do sistema endofítico de *Pilostyles ulei* Solms-Laub.

Após extensa revisão da bibliografia, tornou-se evidente a falta de conhecimentos básicos a respeito do ciclo de vida na família Apodanthaceae, incluindo tópicos como polinização, germinação e estabelecimento, além da ausência de estudos versando sobre a distribuição das flores na população e sistema reprodutivo das espécies. Existe uma profusão de trabalhos lançando hipóteses, das mais díspares possíveis, entretanto não existem estudos específicos publicados na literatura. Tamanha falta de conhecimento levou à formulação de um projeto de mestrado amplo, impulsionado muitas vezes por grande curiosidade científica, preocupado em analisar o gênero *Pilostyles* a nível populacional e individual, a fim de alavancar o maior número possível de características nunca dantes descritas.

O Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo tem incentivado seus alunos a apresentarem a Dissertação/Tese em forma de artigos científicos, no intuito de acelerar o respectivo processo de publicação. A apresentação no formato de artigos, apesar de ser tendência nacional, cria determinadas dificuldades, principalmente quanto ao aprofundamento do tema em estudo, visto que o texto de um artigo é mais conciso que o de uma Dissertação/Tese.

Por esses motivos, optamos pela estrutura da presente dissertação sob a forma de capítulos. A apresentação dessa forma assegura ao estudo o caráter de totalidade, ao mesmo tempo em que permite uma discussão pormenorizada de alguns aspectos. Ao todo foram organizados quatro capítulos, que abrangem aspectos dos mais gerais aos mais específicos:

- Capítulo I. Ciclo de vida e fenologia – apresenta um estudo amplo a respeito de características do ciclo de vida da parasita *Pilostyles ulei* até então pouco exploradas na literatura mundial, como sistemas de polinização, dispersão, germinação e estabelecimento. Inclui ainda resultados de um acompanhamento fenológico da parasita e de sua hospedeira realizado durante dois anos. Tendo em vista a falta de estudos e de metodologias pré-estabelecidas no estudo de plantas holoparasitas, em tal capítulo ficam visíveis as dificuldades encontradas pela equipe na realização dos experimentos, principalmente aqueles envolvendo coleta de néctar e germinação.

- Capítulo II. População e razão sexual – inclui estudos realizados a nível populacional em duas espécies de distribuição disjunta, *Pilostyles ulei* (Brasil) e *P. thurberi* (México). Mostra resultados das análises de distribuição das flores na população, e em cada hospedeiro, e estudo da razão sexual das espécies. Ressalta como tais características podem vir a influenciar no sistema reprodutivo das parasitas, e levanta hipóteses acerca da esporidade das populações.

- Capítulo III. Morfologia e anatomia floral – inclui resultados da análise anatômica e morfológica das flores de *P. ulei* e *P. thurberi,* ressaltando semelhanças e diferenças entre tais espécies. Estudos anatômicos detalhados

sobre a família são escassos na literatura mundial, de modo que existem amplas discussões a respeito da natureza de determinadas peças florais, como origem dos verticilos estéreis e dos sacos polínicos, número de carpelos constituintes do gineceu, etc. Este capítulo em especial visa à caracterização detalhada das flores da parasita, proporcionando uma oportunidade única de entender o processo evolutivo de tais flores e estabelecer homologias com outros grupos de angiospermas.

- Capítulo IV. Esporogênese e gametogênese - o estudo da embriologia de *Pilostyles* não estava incluso no projeto de mestrado original, mas surgiu naturalmente de acordo com a experiência da mestranda, que realizou Iniciação Científica sobre o tema, sob orientação do professor Jorge E. A. Mariath, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Em tal capítulo pode-se perceber que as características embriológicas de *P. ulei* se mantiveram constantes, sendo, portanto, de alto interesse para futuros estudos lidando com a filogenia da família.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas parasitas caracterizam-se por possuir uma estrutura, o haustório, que funciona como uma ponte através da qual retiram parte ou toda sua nutrição diretamente dos seus hospedeiros (Kuijt 1969). Tal estrutura é um órgão modificado, possivelmente homólogo à raiz, que penetra nos tecidos do hospedeiro e é responsável pela absorção de água e nutrientes (Nickrent 2002a, Press *et al*. 1990). Segundo Nickrent (2002a) existem dois tipos de haustórios: o primário, que é uma modificação do ápice da radícula, e o secundário, formado a partir de tecidos outros que não a radícula do embrião, como raízes secundárias. Entretanto, nem sempre podemos fazer uma correlação direta entre os haustórios e as raízes; o autor adverte que os haustórios das plantas endoparasitas têm uma estrutura mais complexa.

O nível de interferência das plantas parasitas no hospedeiro varia enormemente, desde aquelas que causam relativamente pouco impacto, até aquelas que afetam dramaticamente a fisiologia e fertilidade dos seus hospedeiros (Nickrent 2002a). Até mesmo reações positivas foram observadas, como aumento na ramificação do hospedeiro e, conseqüentemente, na produção de sementes (Gomes & Fernandes 1994).

As plantas parasitas constituem um grupo muito diverso de organismos; sua diversidade é de aproximadamente 4200 espécies, distribuídas irregularmente em 274 gêneros e 18 famílias (Nickrent 2002a). Elas incluem desde árvores e arbustos, até ervas anuais e perenes (Kuijt 1969), e estão representadas em praticamente todos os tipos de hábitats existentes (Nickrent 2002a).

Entende-se que o parasitismo é uma característica convergente que evoluiu aproximadamente 12 vezes entre as angiospermas (Barkman *et al*. 2007, Westwood *et al.* 2010) (Fig. 1). Entretanto, é interessante notar que tal modificação evoluiu apenas

no clado das magnoliídeas e das eudicotiledôneas, sendo representado no último grupo por 10 linhagens convergentes.

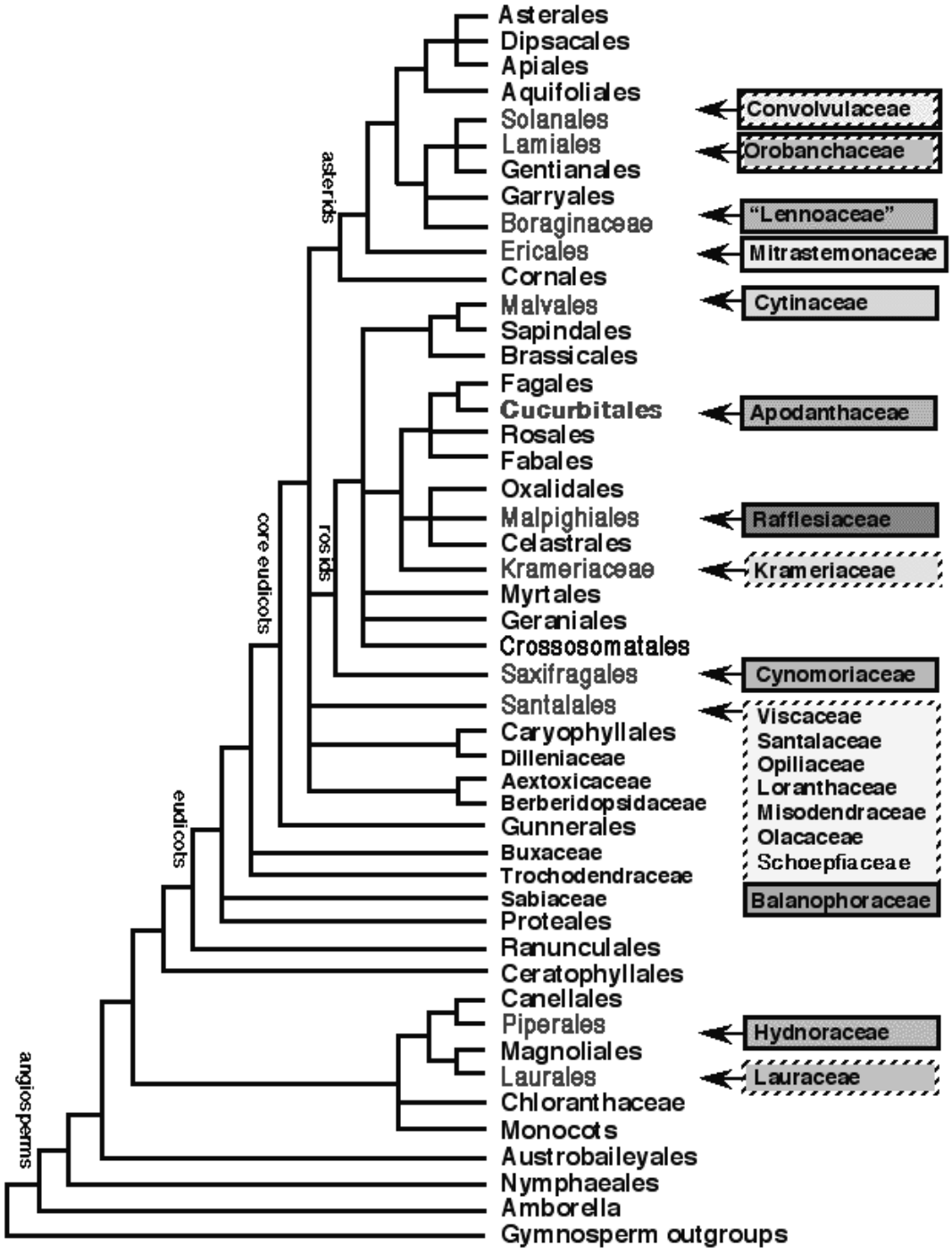


Figura 1. Linhagens de plantas parasitas atuais. Clados dentro de boxes com borda contínua representam holoparasitas e aqueles dentro de boxes pontilhados, hemiparasitas. (retirado de http://www.parasiticplants.siu.edu/index.html)

Além de uma classificação baseada nas relações de parentesco (filogenética), podemos classificar as parasitas também de acordo com seu nível de dependência nutricional, dividindo-as em dois grandes grupos: as hemiparasitas e as holoparasitas. As hemiparasitas são clorofiladas e capazes de realizar fotossíntese pelo menos em alguma parte do seu ciclo de vida, podendo ser divididas ainda em facultativas, quando não necessitam de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, ou obrigatórias, quando tal associação faz-se necessária.

As plantas holoparasitas dependem inteiramente de recursos retirados do xilema e floema hospedeiros (Nickrent 2002a). Seu modo de vida representa a mais extrema manifestação do parasitismo, uma vez que implica em adaptações morfo-fisiológicas extremas, tais como redução do corpo vegetativo, perda de cloroplastos e conseqüente ausência de capacidade fotossintética (Stewart & Press 1990, Nickrent *et al*. 1998). Acredita-se que o holoparasitismo tenha evoluído independentemente em pelo menos sete linhagens: Balanophoraceae, Cynomoriaceae, Hydnoraceae, Cuscutaceae, Lennoaceae, Orobanchaceae e Rafflesiales (Nickrent 2002a); entretanto as afinidades filogenéticas desses taxa continuam dúbias.

O posicionamento da antiga ordem Rafflesiales dentre as angiospermas foi, e continua sendo, um desafio para os sistematas. Anteriormente, Rafflesiales foi posicionada em Rafflesianae próximo a Aristolochiaceae no sistema de Takhtajan (1980); em Rosidae próximo a Santanales, Proteales e Celastrales no sistema de Cronquist (1981); em Magnolianae próximo a Aristolochiaceae no sistema de Dahlgren (1991); e em Rafflesianae próximo a Piperinae no sistema de Thorne (1992). Mais atualmente Rafflesiales foi posicionada em um grupo não resolvido, incluindo muitas famílias de magnoliídeas, na base das angiospermas (APG 1998). Em todos esses sistemas a ordem Rafflesiales incluía as famílias Rafflesiaceae *s.l.* e Hydnoraceae.

Estudos moleculares recentes na tentativa de posicionar a ordem têm igualmente fracassado. Em um estudo de Nickrent (2002b), baseado em análises de

DNA nuclear, a família Hydnoraceae foi posicionada próximo à Piperales, e distante das demais Rafflesiales. Nesse mesmo estudo ainda, a ordem Rafflesiales foi considerada monofilética e posicionada em Malvales, dentro das eudicotiledôneas (Fig. 2).

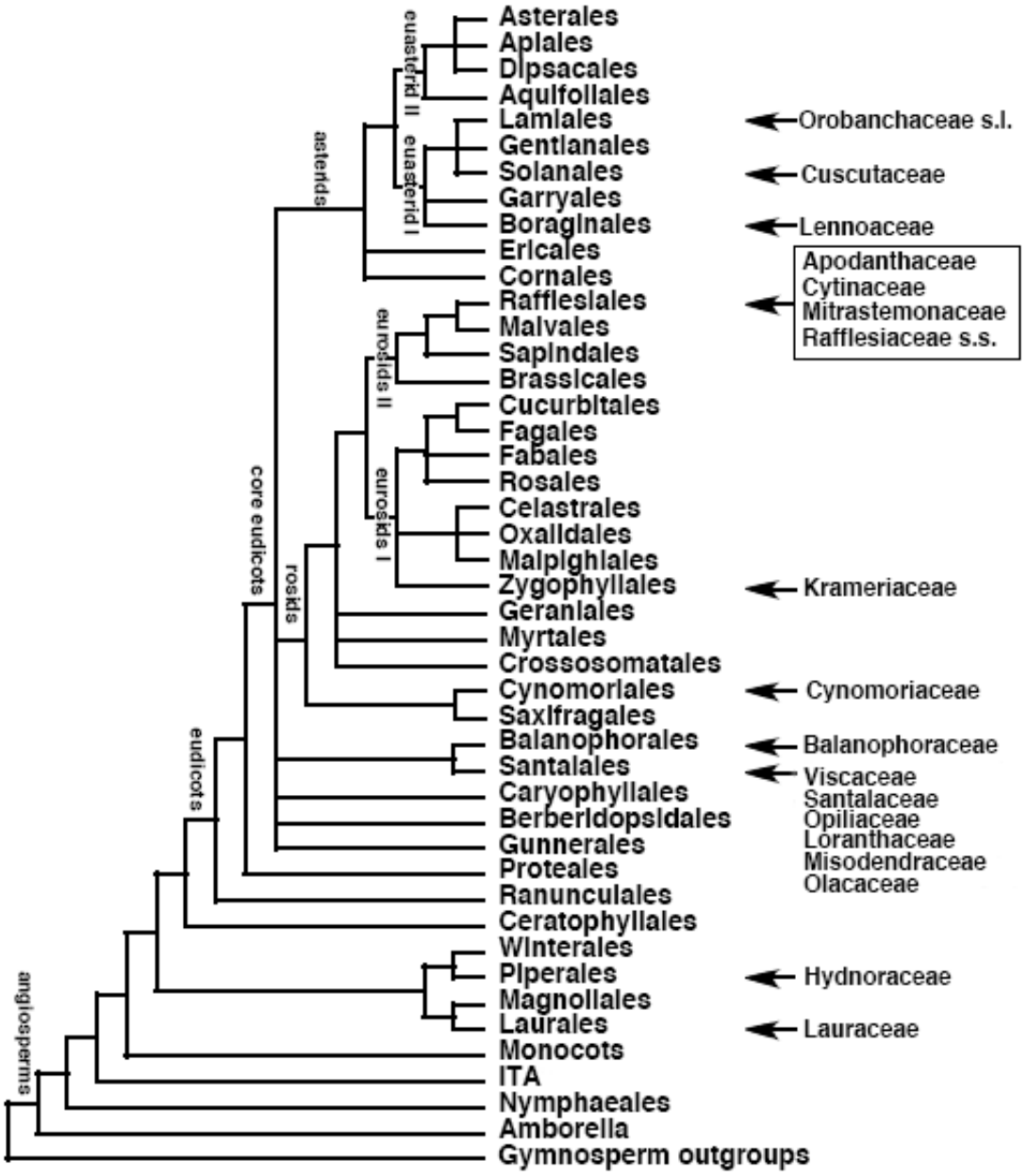


Figura 2. Cladograma das angiospermas; em detalhe, à direita, indicados os taxa de parasitas haustoriais. Ordem Rafflesiales aparece destacada dentro de um box. As iniciais "ITA" referem-se às famílias Illiciaceae, Trimeniaceae, e Austrobaileyaceae. (retirado de Nickrent 2002b)

No sistema de classificação de APG II (2003), entretanto, Rafflesiales (sem Hydnoraceae) foi colocada em um grupo de taxa com posição incerta entre as angiospermas. É interessante notar aqui que 7 desses 18 taxa com posição incerta incluem plantas holoparasitas e não fotossintetizantes. Essa dificuldade de posicionamento provavelmente é resultado de uma morfologia extremamente especializada, que dificulta a detecção de homologias, além da impossibilidade de obter-se DNA do cloroplasto dessas plantas (aclorofiladas) para análise molecular (Nickrent *et al.* 2004). Dificuldades também existem na análise do DNA nuclear, cuja taxa de mutação pode ser até três vezes maior nas plantas holoparasitas, e do DNA mitocondrial, onde relatam-se casos de transferência horizontal de genes entre o hospedeiro e parasita (Nickrent et al. 2004, Barkman *et al.* 2007).

A ordem Rafflesiales, como descrita anteriormente, incluía as famílias Rafflesiaceae *sensu stricto*, Cytinaceae, Mitrastemonaceae e Apodanthaceae (APG II 2003), também referidas como tribos dentro da família Rafflesiaceae *sensu lato* por Harms (1935) e Meijer (1993).

Recentes estudos sobre a morfologia floral de Apodanthaceae (Blarer *et al.* 2004), e óvulos e sementes de Rafflesiaceae *s.l.* (Bouman & Meijer 1994) também não chegaram a uma conclusão comum. Blarer e colaboradores (2004) defendem o posicionamento da ordem Rafflesiales dentro de Malvales enquanto Bouman e Meijer (1994) defendem o posicionamento de Rafflesiaceae *s.l.* próximo a Aristolochiales, como sugerido também pela maioria dos botânicos do século XIX.

Em um estudo de Nickrent e colaboradores (2004), a monofilia de Rafflesiales foi negada e inferiu-se que a ordem seria composta por pelo menos 3 (ou 4) linhagens independentes: Rafflesiaceae *s.s.* foi posicionada dentro da ordem Malpighiales; Mitrastemonaceae, a única família da ordem com ovário súpero, foi colocada em Ericales; e Cytinaceae dentro de Malvales. O posicionamento da família Apodanthaceae variou dependendo da análise molecular realizada: a partir da análise

do DNA nuclear a família foi posicionada em Malvales e, a partir do DNA mitocondrial, dentro de Cucurbitales. Ainda não se sabe qual a verdadeira afinidade filogenética desta família, mas a transferência horizontal de genes ou contaminação das amostras com tecidos hospedeiros foram descartadas pelos autores, visto que os membros desta família não possuem hospedeiros dentro de Malvales ou Cucurbitales.

Recentemente, Barkman e colaboradores (2007) analisaram três genes mitocondriais para construir a primeira análise filogenética a incluir todas as linhagens de angiospermas parasitas. Nesse estudo, Apodanthaceae foi posicionada dentro de Cucurbitales, entretanto os autores admitem o nível de confiança do posicionamento como sendo baixo, devido a múltiplos eventos de transferência horizontal de genes que teriam ocorrido entre a espécie parasita e seu hospedeiro dificultando as análises.

Apesar do baixo nível de confiança das filogenias de Barkman e colaboradores (2007), nos trabalhos de Souza e Lorenzi (2008) e Stevens (2001 em diante), a família aparece incluída na ordem Cucurbitales. Na recente filogenia de APG III (2009), entretanto, ela continua em grupo não resolvido, de posição incerta junto às demais Angiospermas.

A despeito de seu posicionamento filogenético, a família Apodanthaceae inclui plantas aclorofiladas, holoparasitas endoparasitas de caules, cujo corpo vegetativo apresenta extrema redução. A etimologia da palavra ("*Apodes*" = sem pé" e "*anthos*" = flor) reflete a falta de um sistema vegetativo tradicional: não existem órgãos tradicionais como raiz, caule e folhas, mas somente um sistema endofítico, semelhante a um micélio, completamente embebido nos tecidos do hospedeiro (Amaral 2007). As parasitas tornam-se evidentes apenas na época da floração, quando as diminutas flores rompem a periderme do hospedeiro (Groppo *et al*. 2007).

Incluem-se na família Apodanthaceae três gêneros: *Apodanthes* Poit., com quatro espécies na América tropical, *Berlinianche* (Harms) Vattimo-Gil, com duas espécies na África tropical, e *Pilostyles* Guill, com aproximadamente vinte espécies na

América, sudoeste asiático e sudoeste australiano (Blarer *et al.* 2004, Kuijt 1969, Vattimo 1971, Vattimo 1972) (Fig. 3).

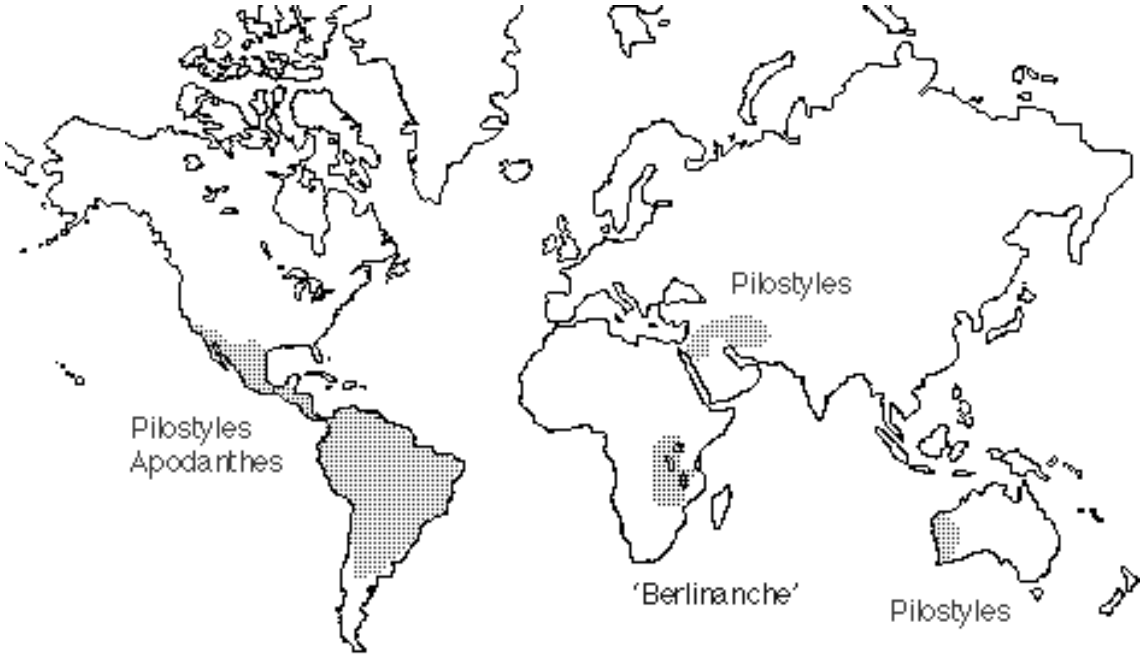


Figura 3. Mapa de distribuição da família Apodanthaceae. (retirado de http://www.parasiticplants.siu.edu/index.html)

A separação entre os gêneros *Berlinianche* e *Pilostyles* não é aceita por todos os especialistas. Harms (1935) inclui as duas espécies africanas de *Berlinianche* em uma seção, chamada *Sectio Berlinianche*, dentro do gênero *Pilostyles*. Bouman e Meijer (1994), em estudo da estrutura dos óvulos e sementes de Rafflesiaceae *s.l.*, sugerem igualmente uma inclusão de *Berlinianche* dentro de *Pilostyles*. Vattimo (1971), entretanto, discute esse posicionamento, e afirma se tratarem de dois gêneros, visto que existem significativas diferenças na morfologia do androceu. Segundo ela, nas flores estaminadas de *Berlinianche*, o androceu de estames monoadelfos não se funde à coluna central, como ocorre em *Pilostyles* e *Apodanthes*.

O gênero *Pilostyles* data de 1834, quando Guillemin descreveu em detalhe a espécie *Pilostyles berterii* Guill., separando-a do gênero *Apodanthes*, o qual até então pertencia (Guillemin 1834). Esta separação foi baseada principalmente na morfologia e

persistência dos verticilos estéreis que envolvem a flor: em *Apodanthes* as peças do verticilo interno são caducas, enquanto que em *Pilostyles* são persistentes. A etimologia do gênero deriva das palavras gregas "*Pilos*" (barrete que se ajusta à cabeça) e "*stylos*" (coluna), sendo referência à flor estaminada, que apresenta androceu em forma de coluna terminada por píleo de margem piloso-glandulosa (Vattimo 1972).

O gênero *Pilostyles* é composto por aproximadamente vinte espécies, que se distribuem pelas regiões temperadas e tropicais do mundo todo, mas cujo centro de diversidade é a América tropical (Rutherford 1970, Vattimo 1971, Groppo *et al*. 2007). Inclui espécies endoparasitas de caule de vários gêneros de leguminosas, como *Adesmia*, *Galactia*, *Patagonium*, *Parosela* (Faboideae), *Calliandra*, *Mimosa* (Mimosoideae), entre outras (Vattimo 1971, Vattimo 1972). Apesar da maioria das espécies do gênero ocorrer na América tropical, e quase metade dessas somente no Brasil, os estudos existentes concentram-se em áreas pouco significativas para o gênero. Existem estudos sobre *P. hamiltonni* da Austrália (Dell *et al.* 1982), *P. haussknechtii* do Oriente Médio (Solms-Laubach 1874) e *P. thurberi* da América do Norte (Solms-Laubach 1875, Rutherford 1970, Kuijt *et al*. 1985). O restante da América possui mais de 10 espécies, mas consta com apenas três estudos morfológicos (Endriss 1902, Groppo *et al*. 2007, Amaral 2007).

A espécie *Pilostyles ulei* Solms-Laubach é endoparasita específica de leguminosas arbustivas do gênero *Mimosa* (Vattimo 1972) e possui como sinonímia *Pilostyles ingae* (Karst.) Hook. (Vattimo 1972). Ocorre na Bahia (Stannard 1995), Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais (Vattimo 1972). Neste último estado possui distribuição ampla, ocorrendo na Serra do Espinhaço, Serra do Cipó, Serra dos Óculos e Serra do Cabral (Vattimo 1978). Na Serra do Cipó, *Pilostyles ulei* parasita indivíduos de *Mimosa maguirei* Barneby e de *M. foliolosa* Benth. var. *multipinna* (Benth.) Barneby (Groppo *et al.* 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M.M. 2007. A estrutura da angiosperma endoparasita *Pilostyles ulei* (Apodanthaceae): interface e impacto no lenho de *Mimosa* ssp. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

APG. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531-553.

APG II. 2003. An update of the Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical journal of Linnean Society* 141: 399-436.

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.

BARKMAN, T.J., MCNEAL, J.R., LIM, S-H., COAT, G., CROOM, H.B., YOUNG, N.D. & dePAMPHILIS, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology 7*: 248.

BLARER, A., NICKRENT, D.L. & ENDRESS, P.K. 2004. Comparative floral structure and systematics in Apodanthaceae (Rafflesiales). *Plant Systematics and Evolution* 245: 119-142.

BOUMAN, F. & MEIJER, W. 1994. Comparative structure of ovules and seeds in Rafflesiaceae. *Plant Systematics and Evolution* 193: 187-212.

CECCANTINI, G.C.T. & AMARAL, M.M. 2005. Análises estruturais e moleculares da angiosperma endoparasita *Pilostyles ulei* (Apodanthaceae) e de leguminosas hospedeiras: corpo vegetativo, impacto no lenho e relações de parentesco. Projeto FAPESP.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981.

DAHLGREN, G. 1991. Step towards a natural system of the dicotyledons: embryological characters. *Aliso* 13: 107-165.

DELL, B., KUO, J. & BURBIDGE, H. 1982. Anatomy of *Pilostyles hamiltonii* C. A. Gardner (Rafflesiaceae) in stems of *Daviesia*. *Australian Journal of Botany* 30: 1-9.

ENDRISS, W. 1902. Monographie von *Pilostyles ingae* (Karst.) (*Pilostyles ulei* Solms-Laubach). *Flora* 91: 209-236.

GOMES, A.L. & FERNANDES, G.W. 1994. Influence of parasitism by *Pilostyles ingae* (Rafflesiaceae) on its host plant, *Mimosa maguirei* (Leguminosae). *Annals of Botany* 74: 205-208.

GROPPO, M., AMARAL, M.M. & CECCANTINI, G.C.T. 2007. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Apodanthaceae (Rafflesiaceae *s.l.*), e notas sobre a anatomia de *Pilostyles*. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25 (1): 81-86.

GUILLEMIN, M. 1834. Memoire sur le *Pilostyles*, nouveau genre de la famille des Rafflesiacees. *Ann. Sci. Natur. Ser. 2* 2: 19-25.

HARMS, H. 1935. Rafflesiaceae. pp. 243-281 *In*: Engler, A. & Prantl, K.A.E. [eds.] Die Naturlichen Pflanzenfamilien. 2ed. Band 16b. Berlim: Leipzig Verlag von Wilhelm Engelmann.

KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KUIJT, J. *The biology of parasitic flowering plants*. California: University of California Press, 1969.

KUIJT, J., BRAY, D. & OLSON, A.R. 1985. Anatomy and ultrastructure of the endophytic system of *Pilostyles thurberi* (Rafflesiaceae). *Canadian Journal of Botany* 63: 1231-1240.

MEIJER, W. 1993. Rafflesiaceae. pp. 557-563 *In*: Kubitzki, K. [ed.]. *The families and genera of vascular plants*. 2. Flowering plants. Dicotyledons. Berlim: Springer.

NICKRENT, D.L. 2002a. Parasitic plants of the world. Chapter 2, pp. 7-27 *In*: J.A. López-Sáez, P. Catalán and L. Sáez [eds.]. Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. Madrid: Mundi-Prensa.

NICKRENT, D.L. 2002b. Phylogenetic origins of parasitic plants. Chapter 3, pp. 29-56 *In*: J.A. López-Sáez, P. Catalán and L. Sáez [eds.]. Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. Madrid: Mundi-Prensa.

NICKRENT, D.L., BLARER, A., QIU, Y-L. & VIDAL-RUSSELL, R. 2004. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* 4:40.

NICKRENT, D.L., DUFF, R.J., COLWELL, A.E., WOLF, A.D., YOUNG, N.D., STEINER, K.E. & PAMPHILIS, C.W. 1998. Molecular phylogenetic and evolutionary studies of parasitic plants. pp. 211-241 *In:* Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Doyle, J.J. Molecular Systematics of Plants. II. DNA Sequencing. Boston: Kluwer Academic Publishers.

PARASITIC PLANT CONECTION. Disponível em <http://www.parasiticplants.siu.edu>, último acesso em maio de 2010.

PRESS, M.C., GRAVES, J.D. & STEWART, G.R. 1990. Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant, Cell and Environment* 13: 91-104.

RUTHERFORD, R.J. 1970. The anatomy and cytology of *Pilostyles thurberi* Gray (Rafflesiaceae). *Aliso* 7 (2): 263-288.

SOLMS-LAUBACH, H. 1974. Ueber den thallus von *Pilostyles haussknechtii*. *Bot. Zeitung* (Berlin) 32: 49-59.

SOLMS-LAUBACH, H. 1975. Das haustorium der Loranthaceen und der thallus der Rafflesiaceen und Balanophoreen. *Abh. Naturf. Ges. Halle* 13: 238-276.

STANNARD, B.L. 1995. Rafflesiaceae. *In* Stannard, B.L. (ed.) Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens. Kew, p.544.

STEWART, G.R. & PRESS, M.C. 1990. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular* 41: 127-151.

TAKHTAJAN, A.L. 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Botanical Review* 46: 225-359.

THORNE, R.T. 1992. Classification and geography of flowering plants. *Botanical Review* 58: 225-348.

VATTIMO, I. 1971. Contribuição ao conhecimento da tribo Apodanthea R. Br. Parte I – Conspecto das espécies (Rafflesiaceae). *Rodriguésia* 26 (38): 37-62.

VATTIMO, I. 1972. Raflesiáceas. *In*: R. Reitz [ed.] Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí.

VATTIMO, I. 1978. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica do gênero *Pilostyles* Guill. (Rafflesiaceae). *Rodriguésia* 3 (45): 7-11.

WESTWOOD, J.H.; YODER, J.I.; TIMKO, M.P. & dePAMPHILIS, C.W. 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* 15: 227-235.

CAPÍTULO I

CICLO DE VIDA E FENOLOGIA

1. INTRODUÇÃO

As plantas parasitas representam grandes problemas econômicos em todo o mundo. Aproximadamente 30 gêneros de angiospermas parasitas são patógenos de plantas cultivadas por humanos, como milho e outros cereais, sendo os principais: *Cuscuta, Arceuthobium, Orobanche* e *Striga*. Apesar de ser difícil precisar, o impacto econômico dessas plantas é altíssimo; estima-se, somente para *Arceuthobium*, uma perda anual de bilhões de dólares em plantações nos Estados Unidos e Canadá (Nickrent 2002). Métodos convencionais, como o uso de herbicidas, não são bem sucedidos no controle de tais plantas. Desse modo, atualmente, há um grande investimento no desenvolvimento de métodos efetivos de controle, como a criação de variedades resistentes, e no estudo do ciclo de vida dessas parasitas. Muitos foram os estudos publicados sobre a fisiologia, ecologia e ciclo de vida desses e demais gêneros de interesse comercial, sendo particularmente abundantes aqueles que envolvem o estudo de moléculas sinalizadoras de germinação e indutoras do desenvolvimento de haustórios (Musselman 1980, Estabrook & Yoder 1998, Joel 2000, Meulebrouck *et al.* 2008, Xie *et al.* 2008).

A despeito de todo esse interesse pelas parasitas economicamente importantes, as demais espécies, em especial as holoparasitas, têm recebido relativamente pouca atenção. Quanto à família Apodanthaceae, existem trabalhos sobre a anatomia do sistema endofítico (Endriss 1902, Rutherford 1970, Dell *et al.* 1982, Kuijt *et al*. 1985, Amaral 2007), e influência no hospedeiro (Gomes & Fernandes 1994, Amaral 2007), mas praticamente nada é sabido sobre a fenologia, ciclo de vida e biologia dessas espécies.

A biologia da família Apodanthaceae, composta pelos gêneros *Apodanthes*, *Berlinianche* e *Pilostyles*, continua um mistério. Quem são os agentes polinizadores? Como ocorre a dispersão das diminutas sementes? Em qual local ocorre a

germinação e estabelecimento? Diversos autores arriscaram respostas para essas intrigantes questões, entretanto nenhuma delas passa de mera hipótese, visto que até o momento não foi localizado nenhum estudo a respeito.

A polinização é o evento menos conhecido. As hipóteses lançadas sobre o agente polinizador de *Pilostyles* variam desde dípteros e abelhas (Vattimo 1971), até borboletas pequenas ou mesmo moscas (Croat 1978). Armstrong (1998) sugere ainda polinização por formigas do gênero *Messor* em *Pilostyles thurberi* A. Gray. Segundo o autor, a floração da parasita e de sua hospedeira, *Psorothamnus emoryi* (A. Gray) Rydb., ocorre ao mesmo tempo, e as formigas, enquanto buscam as flores da hospedeira (cujo cálice possui glândulas com conteúdo oleoso), estariam realizando a polinização de *P. thurberi*.

Quanto à dispersão das sementes de *Pilostyles* também pouco se sabe, entretanto Dell e Burbidge (1981) sugerem a existência um agente dispersor muito eficiente; segundo eles, poucos frutos são encontrados no solo abaixo das plantas pistiladas. As hipóteses sobre como ocorre a dispersão das sementes e qual o agente envolvido são muitas, mas os diversos autores concordam se tratar de zoocoria. Foram citados epizoocoria por formigas, térmitas, pequenos roedores, aves e gado, e endozoocoria por aves, pequenos roedores e até chimpanzés (Kuijt 1969, Vattimo 1971, Bouman & Meijer 1994). Devemos considerar aqui a ampla distribuição das espécies de *Pilostyles* e, conseqüentemente, a grande diversidade de hábitats e agentes dispersores existentes.

O processo de germinação é crucial no ciclo de vida das plantas holoparasitas, pois há necessidade de penetração rápida e efetiva no hospedeiro antes que as reservas da semente se esgotem acabando com as chances de sobrevivência da planta. Com relação à família Apodanthaceae, não existem estudos bem sucedidos na tentativa de germinar as sementes em laboratório, e a germinação nunca foi

observada no ambiente natural em nenhuma das espécies. Não se sabe sequer se o processo de penetração ocorre no caule ou nas raízes dos hospedeiros.

Dependendo do agente envolvido na dispersão, é razoável supor que o local onde ocorrerá a germinação poderá variar. Se for verdadeiro que as formigas, térmitas ou pequenos roedores são os agentes dispersores, provavelmente será verdadeiro também que a germinação ocorre no solo, e que a parasita penetra seu hospedeiro a partir de suas raízes. Ule (1915) acredita que as sementes de *Pilostyles* germinam no solo, formando uma "rede micelial" que, quando em contato com as raízes do hospedeiro, causaria a infecção. Já Kumerow (1962) sugere que as sementes de *Pilostyles berterii* Guill., depois de carregadas por roedores para dentro do solo, só germinariam em contato com exudados das raízes do hospedeiro, assim como ocorre nas holoparasitas de raiz, ocorrendo posterior realocação do sistema endofítico para o caule.

Contrastando com tais hipóteses, Bouman e Meijer (1994) acreditam que a penetração ocorra diretamente no caule da hospedeira. Adicionam ainda ser necessário que o agente dispersor cause algum ferimento no caule, facilitando a penetração da parasita, cujas sementes, relativamente pequenas e com reserva insuficiente, seriam incapazes de crescer através da casca do hospedeiro.

Todos os trabalhos envolvendo a anatomia do sistema endofítico de *Pilostyles* (Endriss 1902, Rutherford 1970, Dell *et al*. 1982, Kuijt *et al*. 1985, Amaral 2007), baseiam-se em espécimes adultos, de modo que o desenvolvimento inicial do corpo da parasita continua desconhecido. Kuijt e colaboradores (1985) admitem a fragilidade do seu estudo, tendo em vista a incapacidade de acompanhar a ontogênese da parasita. Citando suas próprias palavras: "At present, such preliminary work is impossible in *Pilostyles*, as germination has never been observed in the genus; in fact, this is true for Rafflesiaceae as a whole". Rutherford (1970) também reconhece que

seu estudo se restringe à anatomia floral e vegetativa de espécimes adultos, apesar dos seus esforços em tentar germinar as sementes de *P. thurberi*.

Quanto à fenologia de *Pilostyles* também restam muitas dúvidas, existindo apenas dois trabalhos, com resultados contrastantes. Groppo e colaboradores (2007) afirmam que a floração da parasita ocorre durante praticamente todo o ano, de fevereiro a outubro, e a frutificação em março. Segundo Vattimo (1972), entretanto, a floração ocorre de janeiro a fevereiro e de julho a dezembro, e a frutificação em abril. Estes relatos, além de divergentes, falham em não relacionar a fenologia de *Pilostyles* com a fenologia da hospedeira *Mimosa*. Tal estudo comparativo faz-se necessário tendo em vista a íntima associação entre os tecidos da hospedeira e da endoparasita, existindo inclusive a possibilidade de conexões simplásticas (Dell *et al.* 1982, Haupt *et al.* 2001) e de transferência de inúmeras moléculas entre tais organismos.

A ausência de informações sobre fenologia, biologia e ciclo de vida não se restringe somente à *Pilostyles ulei* Solms-Laub. Na verdade, isso se aplica às demais espécies da família Apodanthaceae, visto que não existem estudos específicos publicados até agora. Assim, espera-se que o presente trabalho represente um avanço para a compreensão da biologia dessas intrigantes angiospermas, podendo vir a elucidar características ambíguas e/ou nunca antes estudadas na família.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Espécie e local de estudo

A população de *Pilostyles ulei* marcada para o presente estudo encontra-se em uma área de campo rupestre localizada na propriedade Mãe d'água, no quilômetro 103 da rodovia MG-010, coordenadas S 19º18'27,8", W 43º 36' 11,6". O local de estudo situa-se no Parque Nacional da Serra do Cipó, região central do Estado de Minas Gerais, Brasil (Fig. 4).

O clima é do tipo tropical de altitude, com verões chuvosos e um curto período seco (3-4 meses) durante o inverno (Gomes & Fernandes 1994). A temperatura média anual é de 21,2º C e a média anual de precipitação é de 1622 mm (IBAMA 2007). A altitude do local varia entre 800 e 1500 metros, e influencia na diversidade de tipos vegetacionais encontrados no parque: campos rupestres, matas mesófilas (capões de mata), cerrado e cerradão, matas ciliares e matas secas sobre calcário (IBAMA 2007).

Na Serra do Cipó, *Pilostyles ulei* parasita indivíduos de *Mimosa foliolosa* Benth. var. *multipinna* (Benth.) Barneby (Fig. 5.a) e de *M. maguirei* Barneby (Fig. 5.b), hospedeiros encontrados em praticamente todos os tipos vegetacionais presentes no parque (Groppo *et al.* 2007). *M. foliolosa* var. *multipinna* são subarbustos delgados de 0,6-1,5m de altura, com caules pouco ramificados, eretos e sem espinhos. Ramos, folhas bipinadas e inflorescências densamente cobertos por tricomas. *M. maguirei* inclui indivíduos arbustivos, com altura variando de 1,2 a 2,6m, caules pouco ramificados, sem espinhos ou tricomas, e característica epiderme de coloração esbranquiçada (Barneby 1991).

Figura 4. Local de estudo: Mapa de localização do Parque Nacional da Serra do Cipó, estado de Minas Gerais, Brasil.

2. 2. Estabelecimento da hospedeira no Fitotério do Departamento de Botânica

O estabelecimento da hospedeira *Mimosa foliolosa* no Fitotério do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo surgiu com a finalidade de facilitar posteriores estudos de biologia floral e germinação da parasita *Pilostyles ulei*. Para tal, frutos maduros de *Mimosa foliolosa* (Fig. 5.c) foram coletados nos meses de fevereiro e março de 2008 em indivíduos selecionados aleatoriamente na população. Em laboratório, as sementes (Fig. 5.d) foram acondicionadas em local seco e à temperatura ambiente.

A metodologia adotada para germinar as sementes seguiu aquela proposta por Silveira e Fernandes (2006): as sementes foram escarificadas mecanicamente com o auxílio de lixas e colocadas para germinar diretamente em vasos contendo terra (Fig. 5.e). Um mês após a germinação, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos individuais (Fig. 5.f) e após para canteiro devidamente identificado.

Foram realizadas também tentativas de transplante de indivíduos parasitados. Nos meses de agosto e novembro, indivíduos de *M. foliolosa* e de *M. maguirei* parasitados foram coletados em campo e acondicionados em câmara úmida durante transporte até o laboratório. Os espécimes foram então transplantados para sacos plásticos contendo terra, em estufa apropriada no Fitotério do Departamento de Botânica. Nenhum dos indivíduos transplantados sobreviveu.

2. 3. Coleta e análise de néctar

Diversos métodos foram utilizados na tentativa de coletar o néctar das flores de *P. ulei.* Em maio de 2008, foi realizada uma primeira tentativa de coleta do néctar utilizando-se capilares de vidro comerciais. Os capilares foram previamente numerados e pesados em balança de precisão no laboratório. Cada capilar recebeu marcações, a cada centímetro, foi preenchido com água e pesado novamente. Dessa

maneira pretendia-se calcular o volume de néctar coletado fazendo-se uma correlação com o peso do capilar cheio.

Em junho de 2008 foi realizada uma segunda tentativa, agora utilizando-se capilares ultrafinos. Tais capilares foram desenvolvidos pela própria equipe, através do aquecimento e alongamento dos capilares de vidro comerciais. Os capilares ultrafinos foram então numerados e pesados como o descrito anteriormente.

Em agosto de 2008, utilizou-se papel filtro especial para cromatografia. Primeiramente, o papel foi cortado em pequenas tiras de 0,3cm X 1,5cm, que foram então lavadas em álcool 80% e depois colocadas para secar em estufa a 60ºC por 30 minutos. Posteriormente, as tiras foram numeradas e pesadas em balança de precisão (como descrito anteriormente).

2. 4. Observação e coleta de visitantes

Para caracterização dos visitantes, polinizadores e/ou dispersores em potencial, indivíduos de *Mimosa foliolosa* parasitados foram observados a uma distância de 0,5 m. As observações foram realizadas em campo, nos meses de maio, junho, agosto e novembro de 2008, totalizando 43 horas e 45 minutos. Para cada período de observação foram anotados os seguintes dados:

1) duração das visitas,

2) indivíduos e número de ramos hospedeiros visitados e

3) espécies/grupos visitantes.

Apenas foram considerados na análise aqueles visitantes que tocaram as partes reprodutivas da flor (ou seja, os sacos polínicos e a superfície estigmática), sendo a duração da visita computada somente enquanto o visitante encontrava-se em contato com essas regiões, sendo, portanto, descontados períodos de vôo.

Os insetos foram coletados com o auxílio de uma rede entomológica e sacrificados em câmara mortífera contendo Acetato de Etila. Posteriormente, foram acondicionados em tubos plásticos contendo etanol absoluto e enviados para identificação por especialistas do Centro de Estudos Faunísticos e Ambientais (CDZoo), do Departamento de Zoologia, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Até o momento do depósito da dissertação alguns insetos continuaram sem identificação precisa. Espera-se que tais identificações sejam alcançadas em breve, sendo então anexadas ao exemplar da biblioteca e incluídas nos artigos científicos a serem publicados.

2. 5. Análise histológica das raízes da hospedeira

Para análise da existência ou não de sistema endofítico da parasita nas raízes da hospedeira, foram selecionados aleatoriamente três indivíduos de *M. foliolosa* parasitados, que tiveram sua porção radicular escavada em campo. Pequenos discos foram amostrados na raiz principal e em cada ramificação lateral. As amostras foram fixadas em uma solução de glutaraldeído e formaldeído em tampão fosfato de sódio (McDowell & Trump 1976), desidratadas em série etílica crescente (etanol 10% a 95%) e incluídas em hidroxietilmetacrilato (conforme especificações do fabricante, Kit Leica Historresin®). Os blocos resultantes foram secionados transversalmente em micrótomo de rotação Reichert & Jung (modelo AutoCut 2040), com espessura de corte de 5 a 10 micrômetros. As seções foram montadas em lâminas de vidro para microscopia e coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4 (Feder & O' Brien 1968), para posterior análise sob Microscópio Óptico.

2. 6. Experimentos com germinação

Frutos maduros de *Pilostyles ulei* foram coletados em indivíduos selecionados aleatoriamente na população. Em laboratório, foram secionados longitudinalmente sob Microscópio Estereoscópio para separação das diminutas sementes do pericarpo viscoso. Uma vez separadas as sementes, foram realizados os seguintes ensaios:

2. 6. 1. Germinação em placas de Petri

1200 sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água filtrada. Os frascos foram colocados em uma câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro e temperatura constante de 25ºC por 90 dias.

Posteriormente, uma vez observada ausência de germinação e provável existência de dormência, novas sementes foram separadas em lotes (n=100) e submetidas à cada um dos experimentos a seguir (de acordo com Garcia-Franco & Rico-Gray 1996):

1) Escarificação com ácido sulfúrico. Lotes foram colocados em uma solução 1 N de ácido sulfúrico por 1, 5, 10 e 15 minutos. Posteriormente foram lavados com água destilada e colocados em placas de Petri, com papel filtro umedecido em água filtrada como substrato.

2) Contato com extratos da hospedeira. Os extratos foram obtidos a partir da maceração de porções da raiz, caule e folhas de plantas hospedeiras saudáveis, e foram utilizados para umedecer o papel filtro que serviu de substrato para as sementes.

3) Lote controle. Foi colocado em placas de Petri contendo papel filtro umedecido em água filtrada como substrato.

Finalmente, todos os lotes foram colocados por 40 dias em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro e temperatura constante de 25ºC.

2. 6. 2. Germinação *in vitro*

Os testes de germinação *in vitro* contaram com a colaboração da equipe do Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, do departamento de Botânica da Universidade de São Paulo. Primeiramente as sementes foram descontaminadas em uma solução de hipoclorito de sódio (20% de água sanitária comercial) e detergente comercial por 10, 20 e 30 minutos. Os lotes foram então lavados em água destilada e autoclavada por três vezes antes de serem colocados para germinar em frascos de vidro contendo meio de cultura (abaixo detalhado). Duas condições de luminosidade foram utilizadas: escuro, onde os frascos semeados foram envoltos por papel alumínio, e claro, com frascos de vidro fechados com tampa plástica transparente. Ambos foram mantidos em câmara climática, à temperatura constante de 25 ± 2ºC, com um fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 116 µmol.m-2.s-1.

Composição do meio de cultura: 0,165 g/L de (NH4)2SO4; 0,6 g/L de Ca(NO3)2; 0,9 g/L de KNO3; 0,275 g/L de CaCl2; 0,435 g/L de KH2PO4; 0,442 g/L de K2SO4; 0,250 g/L de MgSO4; 10 ml/L de Micronutrientes MS; 1 g/L de Peptona de soja; 0,001 g/L de Tiamina; 0,1 g/L de Mio inositol; 20 ml/L de Fe- EDTA e 20 g/L de Sacarose (modificado de Murashige & Skoog 1962).

2. 6. 3. Germinação *in vivo*

Além desses experimentos em laboratório, foram realizados também experimentos em casa de vegetação, em plântulas de *M. foliolosa* presentes no Fitotério do Instituto de Biociências da USP. Em maio de 2009 foram realizados os seguintes ensaios:

1) Sementes foram inoculadas em incisões longitudinais de aproximadamente 1cm realizadas nas regiões mais apicais do caule hospedeiro (Fig. 6.a);

2) Sementes foram colocadas diretamente sobre o caule da hospedeira, mais precisamente na axila das folhas dos nós mais apicais (Fig. 6.b).

Um ano após a realização dos experimentos, em maio de 2010, foram coletadas as porções do ramo hospedeiro onde foram colocadas as sementes de *P. ulei*. As amostras foram processadas seguindo-se as técnicas usuais em histologia vegetal (descritas no tópico 2.5), visando-se análise anatômica do material, de modo a acompanhar a possível ocorrência de germinação da parasita.

2. 7. Acompanhamento fenológico

O acompanhamento fenológico da parasita *Pilostyles ulei* e da hospedeira *Mimosa foliolosa* foi realizado de abril de 2006 a novembro de 2008. Os estados computados foram de brotamento, senescência foliar, floração e frutificação, tendo sido acompanhados seis hospedeiros parasitados escolhidos aleatoriamente na população.

3. RESULTADOS

3. 1. Coleta e análise de néctar

Nenhuma das metodologias adotadas obteve sucesso na coleta do néctar de *P. ulei*, provavelmente devido à pequena quantidade produzida pelas flores. Desse modo, a análise quantitativa e qualitativa do néctar não pôde ser realizada.

3. 2. Observação e coleta de visitantes

Foram observadas nove espécies de insetos tocando as partes reprodutivas das flores de *P. ulei* durante as suas visitas (Fig. 7), representando as ordens Hymenoptera, Diptera e Hemiptera (ver Tabela 1). A ordem Hymenoptera aparece melhor representada, com seis espécies, seguida de Diptera, com duas, e Hemiptera, uma.

Quanto ao comportamento de forrageio, as vespas e abelhas mostraram padrões semelhantes. Ambas caminham sobre os ramos da hospedeira, procurando pelas flores abertas e parando para coletar o néctar. Depois de visitar todas as flores daquele ramo, voam para o mais próximo em busca de novas flores abertas.

A formiga observada comporta-se de maneira semelhante, andando pelos ramos da hospedeira em busca de flores abertas (Fig. 8.e). Entretanto, foi observado também comportamento de defesa: caso pouse outro inseto no ramo em que se encontram, as formigas tentam afastá-lo, provavelmente em defesa da sua fonte de alimentação.

O díptero da família Syrphidae, pertencente ao gênero *Toxomerus*, apresentou comportamento de forrageio distinto. O inseto sobrevoa os ramos (Fig. 8.a), de cima à baixo, só pousando nas flores abertas (Fig. 8.b). O inseto apresenta alto nível de especialização, visitando praticamente todas as flores abertas de um dado ramo com rapidez e precisão.

Quanto ao díptero da família Sarcophagidae, o comportamento observado foi diferente dos demais. Apesar de o inseto visitar as flores abertas, na maioria das visitas, foi sobre os frutos suas investidas. Provavelmente o adulto (Fig. 8.c) se alimente do néctar das flores, e a forma larval (Fig. 8.d) se desenvolva dentro dos frutos, se alimentando de todo o seu conteúdo (sementes em desenvolvimento e tecido placentário). De fato foram coletados muitos frutos de *P. ulei* contendo tais larvas, de forma que nos parece provável que seu desenvolvimento ocorra alimentando-se dos mesmos.

Apesar das 43 horas e 45 minutos de observação direta e dos mais de 30 dias completos de trabalho em campo, o processo pelo qual as sementes de *P. ulei* são dispersas continua desconhecido. Não foi observado nenhum animal que pudesse dispersar as sementes, nem tampouco sementes germinando na natureza.

3. 3. Análise histológica das raízes hospedeiras

Não foram observadas células do sistema endofítico de *P. ulei*, com os típicos núcleos proporcionalmente grandes e presença de dois nucléolos, nas raízes da hospedeira *M. foliolosa.*

3. 4. Experimentos com germinação

Nenhum dos métodos adotados obteve sucesso na germinação das sementes de *Pilostyles ulei*.

3. 5. Acompanhamento fenológico

Os dados fenológicos observados referem-se à atividade, ou seja, porcentagem de indivíduos apresentando certa fenofase na população. Os resultados das observações de floração e frutificação podem ser visualizados na tabela 2.

O fator determinante no ciclo de vida da hospedeira *Mimosa foliolosa* parece ser a precipitação (Fig. 9). A hospedeira está em processo constante de renovação, ocorrendo eventos de brotamento e senescência foliar durante praticamente todo o ano (Fig. 10). Como o esperado, uma menor porcentagem de indivíduos apresenta brotamento no inverno, período de seca, ocorrendo diminuição também da senescência foliar durante o verão, período chuvoso.

As fenofases de floração (Fig. 11.a) e frutificação (Fig. 11.b) de *M. foliolosa* ocorrem em períodos relativamente marcados. A espécie apresenta floração de novembro a abril (Fig. 12), entrando em fase vegetativa (com poucos indivíduos florindo) durante o inverno, que é caracterizado por intenso período de seca de maio a agosto. A formação dos frutos inicia logo após, sendo observada atividade na população de março a agosto (Fig. 13).

A espécie *Pilostyles ulei* parece apresentar fenofases com certo atraso, mas diretamente relacionadas à fenologia da hospedeira *M. foliolosa*. A floração ocorre de março a julho (Fig. 12); entretanto, a partir de dezembro já podemos observar alguns indivíduos com botões florais muito jovens, ainda sob a periderme da hospedeira. Tais botões aparecem inicialmente como pequenas saliências nos ramos (Fig. 11.c), levando de dois a três meses para se desenvolver completamente. Quando as flores emergem da periderme, a partir de fevereiro, já estão praticamente formadas, havendo apenas aumento de volume até alcançar a maturidade (Fig. 11.d). Após a polinização e fecundação, as escamas florais permanecem inalteradas, formando-se frutos (Fig. 11.e) que em pouco diferem dos botões antes da antese. Assim, é difícil delimitar precisamente o início do período de frutificação, mas parece haver um pico de junho a novembro (Fig. 13). Um esquema representando a atividade de cada fenofase pode ser visto na Tabela 3.

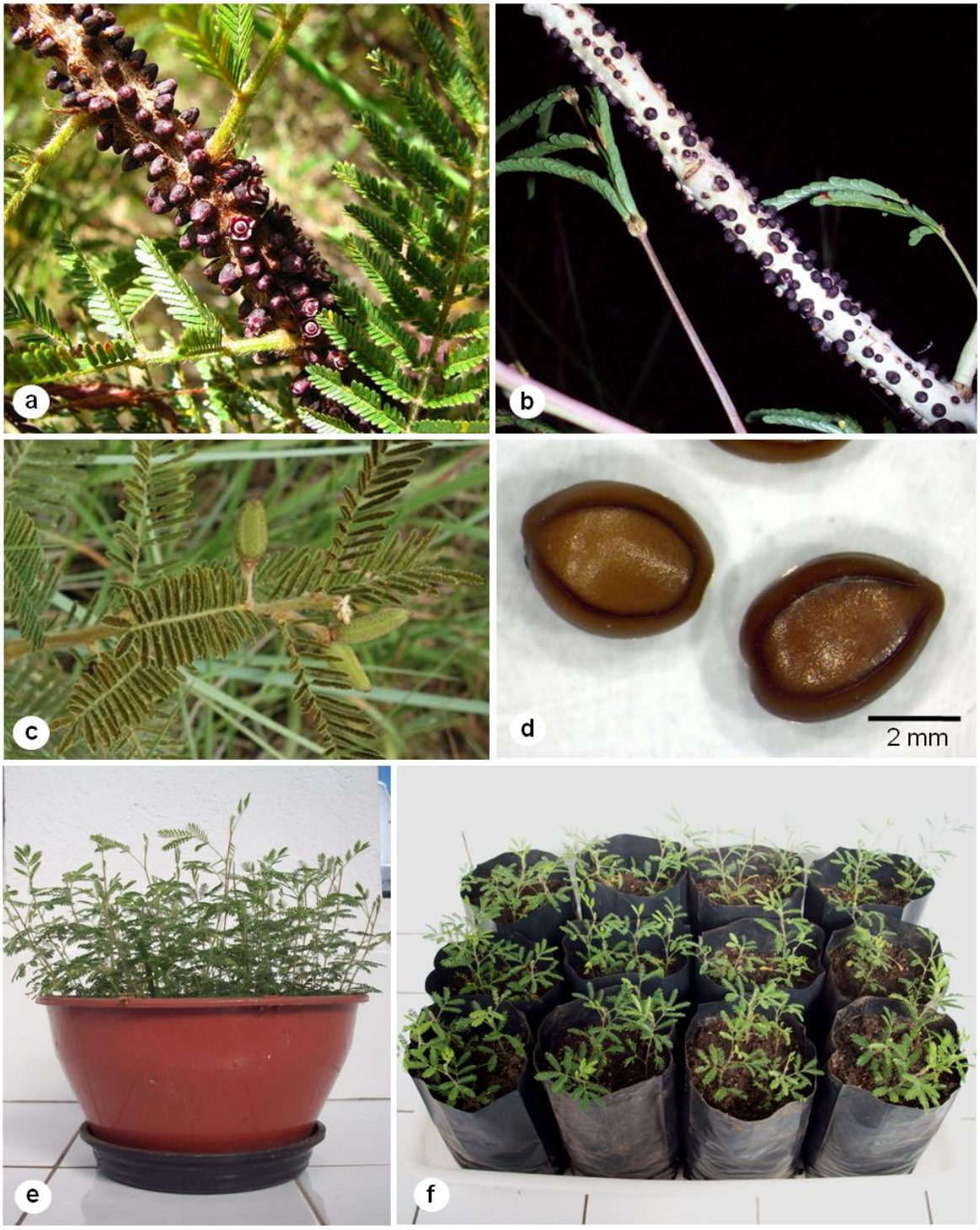


Figura 5. a) *Pilostyles ulei* parasitando *Mimosa foliolosa*; b) *P. ulei* parasitando *Mimosa maguirei*. c-f: estabelecimento da hospedeira *Mimosa foliolosa* no Fitotério do Departamento de Botânica. c) Frutos verdes e d) sementes de *Mimosa foliolosa*; e) Plântulas em vaso contendo terra; d) Transplante das plântulas para sacos plásticos individuais.

Figura 6. Experimento de germinação *in vivo*: a) Sementes de *P. ulei* inoculadas em incisões de aproximadamente 1cm realizadas no caule da hospedeira *M. foliolosa*; b) Sementes (seta) depositadas na axila das folhas dos ramos mais apicais. est – estípula, pec – pecíolo.

Tabela 1. Visitantes florais: total de visitas e tempo total de permanência em contato com os órgãos reprodutivos das flores de *P. ulei*.

Visitante	Total de visitas	Total (min.)
Hymenoptera - Vespidae - *Pachodynerus*	65	179,45
Hymenoptera - Vespidae - *Polistes*	31	104
Hymenoptera - Vespidae 1	14	36,28
Diptera - Sarcophagidae	20	32,67
Hymenoptera - Vespidae 2	10	15,8
Diptera - Syrphidae - *Toxomerus*	2	13,3
Hymenoptera - Apidae - *Trigona*	3	10,08
Hemiptera	6	9,2
Hymenoptera - Formicidae	2	0,65

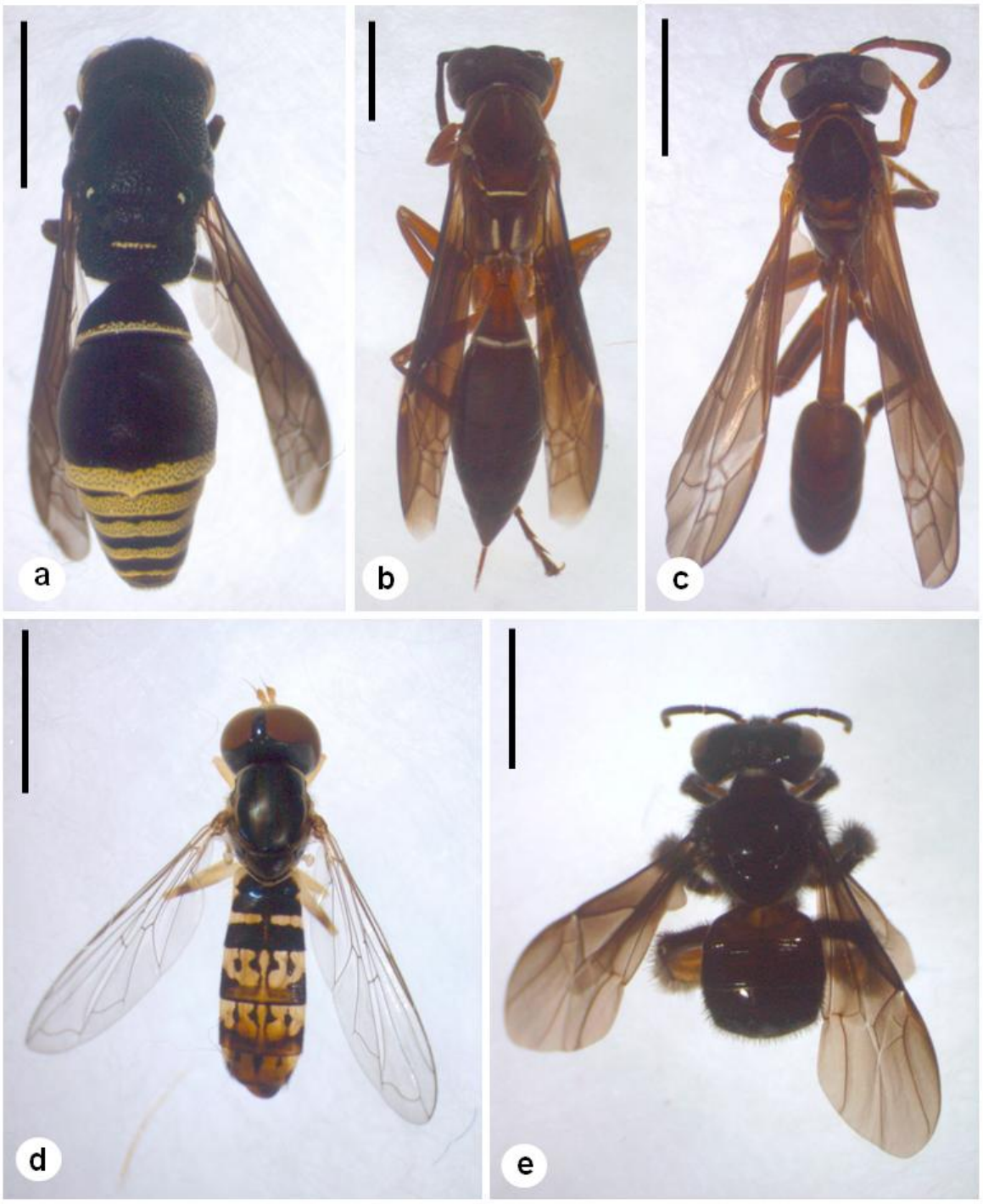


Figura 7. Visitantes florais. a) Vespidae, gênero *Pachodynerus*; b) Vespidae, gênero *Polistes*; c) Vespidae 2; d) Diptera, gênero *Toxomerus*; e) Apidae, gênero *Trigona*. Escalas = 3 mm

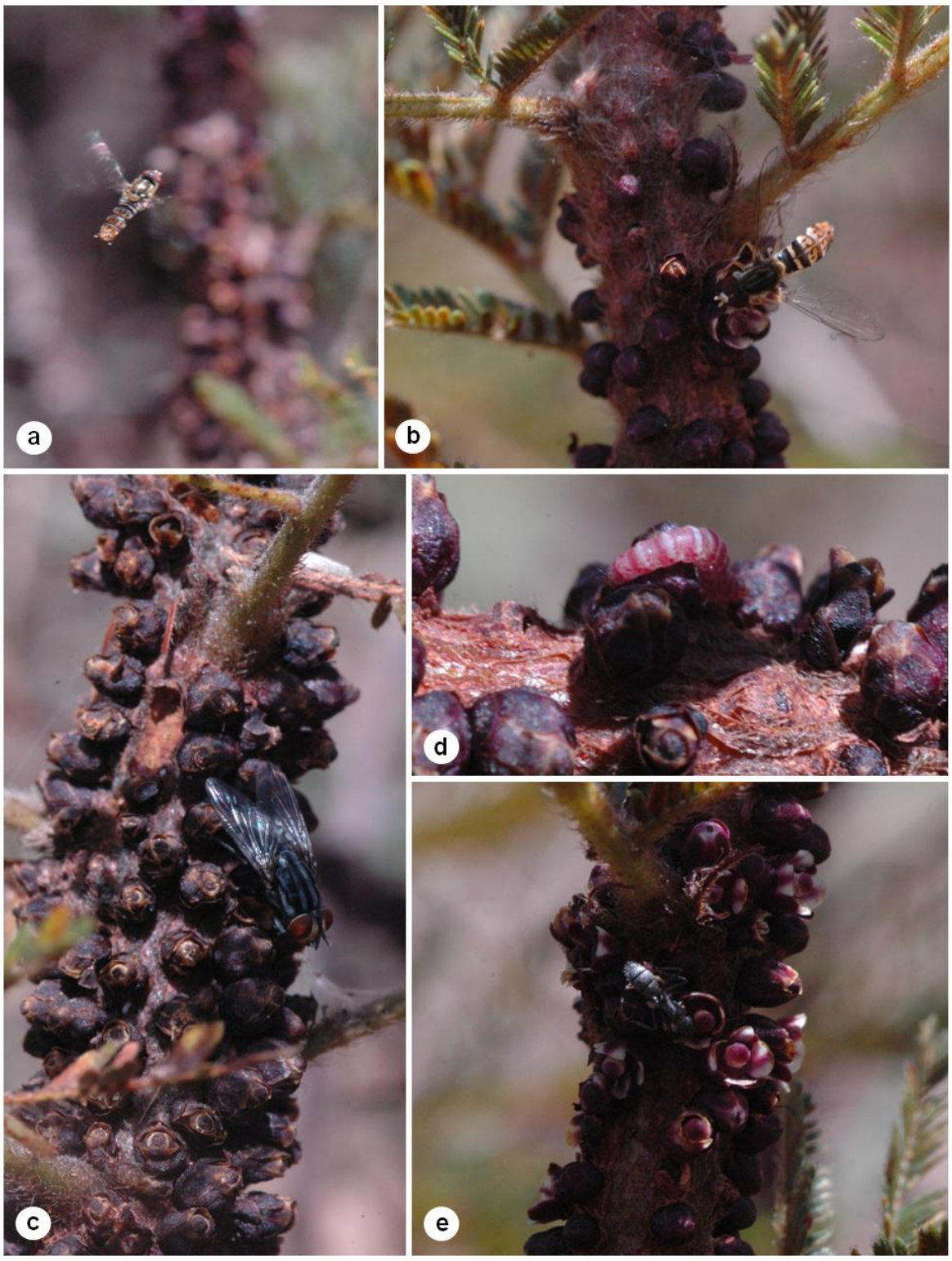


Figura 8. Visitantes florais. a-b: Díptero do gênero *Toxomerus,* família Syrphidae. a) Inseto em comportamento de forrageio, sobrevoando ramo infectado. b) Inseto em busca do néctar nas flores abertas. c-d: Díptero da família Sarcophagidae sobre frutos de *P. ulei*. c) Adulto. d) Estádio larval. e) Inseto da família Formicidae em busca do néctar nas flores abertas.

Tabela 2. Acompanhamento fenológico de seis indivíduos de *M. foliolosa* e *P. ulei,*respectivamente hospedeira e parasita associada, realizado de abril de 2006 a novembro de 2008. Os símbolos referem-se à presença das fenofases de floração (❀) e frutificação (●) nos indivíduos indicados.

N°	Espécie	2006								2007						2008						
		Abr	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Mar	Abr	Mai	Ago	Nov	Fev	Mar	Mai	Jun	Ago	Set	Nov
1	*M. foliolosa*	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	●	●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	●	●	●		❀
	P. ulei	❀	❀	●	●	●	●	●			❀	❀	❀	●	●	●	❀	❀ ●	❀ ●	●	●	
2	*M. foliolosa*	●		❀	❀		❀ ●	❀ ●	❀	❀ ●	❀	❀		●	❀	❀ ●	❀ ●	●	●	●	●	❀
	P. ulei	❀	❀	❀ ●	❀ ●	●	●	●			❀	❀	❀	●	●	●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	●		
3	*M. foliolosa*	❀ ●			❀	❀ ●	●		❀	❀	❀	❀ ●	●		●	❀ ●	❀ ●	●	●	●		❀
	P. ulei	❀	❀ ●	❀ ●	❀ ●	●	●	●		●	❀	❀	❀	●	●	❀	❀	❀	❀	●	●	
4	*M. foliolosa*			●	●	❀			❀	❀	❀ ●	●	●	●		❀	❀	❀		●		
	P. ulei	❀	❀			●	●	●			❀	❀ ●	❀ ●	●	●	●	❀	❀	❀ ●	●	●	
5	*M. foliolosa*	●	●	❀ ●	❀ ●	❀ ●	❀	❀	❀	❀	❀	❀			❀	❀	❀ ●	●	●			
	P. ulei	❀	❀ ●	❀ ●	❀ ●	●	❀ ●	●			❀	❀	❀ ●	●	●	●	❀	❀	❀	●		
6	*M. foliolosa*	●	●	❀ ●	❀ ●	❀	❀		❀	❀	❀ ●	●		●	❀ ●	●	❀ ●	●	●	●		
	P. ulei	❀	❀ ●	❀ ●	❀ ●	●	●	●		●	❀	❀	❀	●	●	●	❀	❀ ●	❀ ●	●	●	

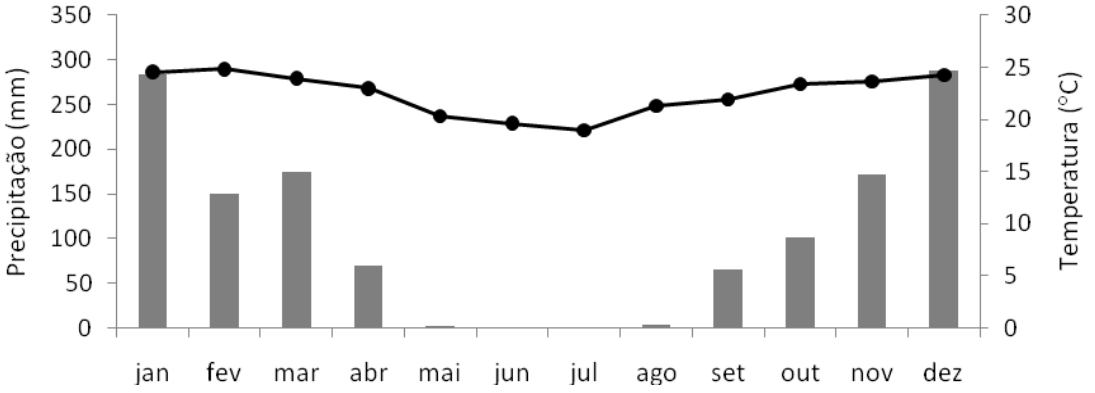


Figura 9. Precipitação total e temperatura média para a estação de observação de Conceição do Mato Dentro, Minas Gerais (dados do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET).

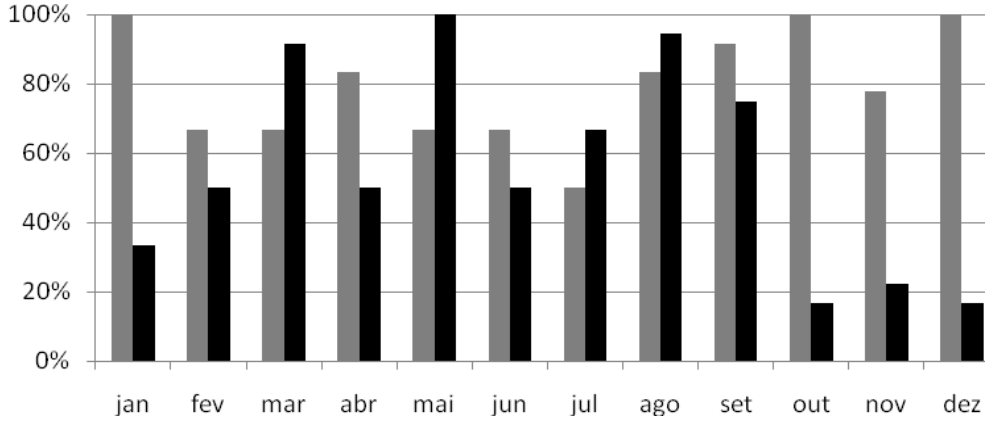


Figura 10. Porcentagem de indivíduos de *Mimosa foliolosa* na população apresentando fenofases de brotamento (■) e senescência foliar (■); dados médios entre os anos de 2006 a 2008.

Figura 11. Fenofases da hospedeira e parasita. a) Indivíduo de *Mimosa foliolosa* em floração; b) Indivíduo de *M. foliolosa* em frutificação (frutos verdes); c) Botões florais de *Pilostyles ulei* ainda sob periderme da hospedeira; d) Flores de *P. ulei* em antese; e) Indivíduo de *P. ulei* em frutificação.

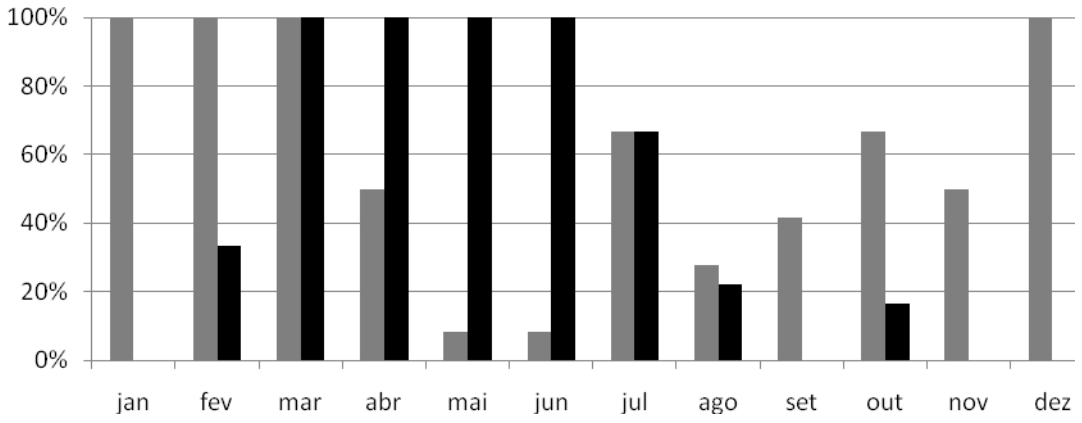


Figura 12. Floração: porcentagem de indivíduos de *Mimosa foliolosa* (■) *e Pilostyles ulei* (■) apresentando a fenofase de floração; dados médios entre os anos de 2006 a 2008.

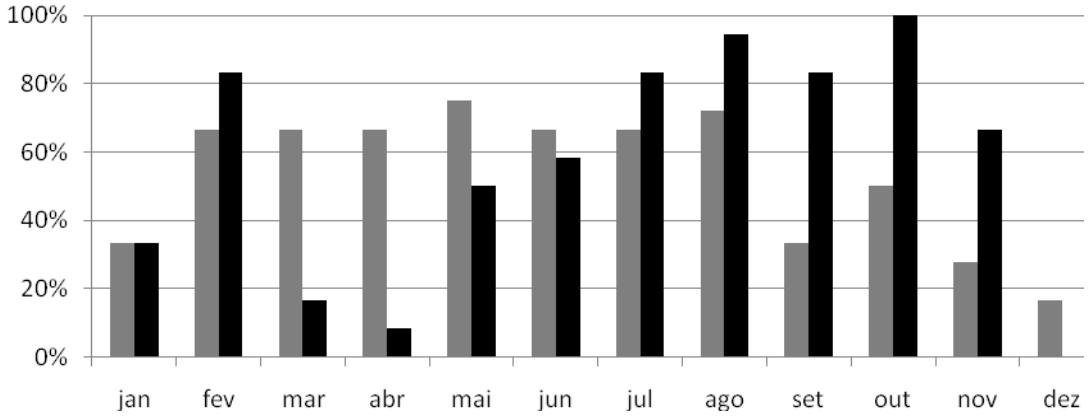


Figura 13. Frutificação: porcentagem de indivíduos de *Mimosa foliolosa* (■) *e Pilostyles ulei* (■) apresentando a fenofase de frutificação; dados médios entre os anos de 2006 a 2008.

Tabela 3. Picos de atividade das fenofases de floração (■) e frutificação (■) na hospedeira *Mimosa foliolosa* e na parasita *Pilostyles ulei*.

Espécie	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Mimosa foliolosa	■	■	■	■		■	■	■			■	■
Pilostyles ulei			■	■	■	■	■	■	■	■	■	

4. DISCUSSÃO

Não é à toa que o ciclo de vida das Apodanthaceae continua desconhecido em sua totalidade. O estudo de angiospermas tão intrigantes, tal como *Pilostyles,* foge aos padrões descritos para a maioria das plantas fotossintetizantes. Variados métodos foram utilizados, e tiveram que sofrer adaptações no decorrer do trabalho, uma vez que não existe metodologia pré-estabelecida para o estudo de plantas holoparasitas endoparasitas em geral.

Pilostyles ulei possui morfologia floral generalista, não apresentando restrições morfológicas aos polinizadores. Assim, tendo em vista os padrões de forrageio, nos parece provável que todos os insetos observados desempenham algum papel na polinização de *P. ulei*. Alguns se mostraram mais freqüentes (*Pachodynerus* e *Polistes*) e outros mais especializados (*Toxomerus*), mas todos aparecem como potenciais polinizadores, uma vez que entram em contato com o estigma e sacos polínicos das flores. Levando-se em consideração o número de visitas e o tempo total de permanência em contato com os órgãos reprodutivos da flor, as vespas aparecem como os visitantes mais freqüentes.

O modo pelo qual as sementes de *P. ulei* são dispersas permanece desconhecido. Não se sabe no que consiste o diásporo, como e por quem ele é disperso. Entretanto, pode-se observar que os frutos de *Pilostyles* não permanecem aderidos à planta hospedeira, sendo destacados em algum momento após sua maturação por algum agente dispersor. Tal observação advém do fato de não existirem frutos caídos no solo abaixo das plantas hospedeiras parasitadas.

Apesar de não ter sido observado nenhum possível dispersor, a morfologia do fruto e da semente de *P. ulei* nos leva a crer que a hipótese mais provável seja a endozoocoria por aves, assim como ocorre na maioria das hemiparasitas de caule. Bouman e Meijer (1994) afirmam que as características do fruto das Apodanthaceae

estão de acordo com a síndrome da ornitocoria, e que, sem dúvida, as aves desempenham algum papel na sua dispersão. De fato, Gomez (1983) afirma que os frutos de *Apodanthes casearіae* Poit. (semelhantes aos de *Pilostyles*) são comidos por pássaros do gênero *Thraupis*. Provavelmente, as bagas suculentas são comidas pelas aves, sendo as sementes então depositadas com os excrementos diretamente no caule dos hospedeiros. Desse modo, o tegumento interno esclerificado dessas sementes as protegeria, mantendo seu poder de germinação ao longo do trato digestivo desses animais.

Uma provável dispersão por aves, associada à ausência constatada de tecidos parasitas nas raízes da hospedeira, nos leva a crer que a germinação ocorra diretamente no caule, assim como proposto por Kuijt (1969). Tendo a semente sido depositada no caule hospedeiro juntamente com os excrementos da ave dispersora, o embrião filiforme emergido dela encontraria um substrato nutritivo favorável. Uma vez atravessado o córtex, a parasita desenvolveria abaixo um sistema endofítico que cerca o cilindro central como uma capa, estabelecendo-se principalmente na região do floema secundário.

A incapacidade de germinar as sementes de uma espécie holoparasita como *P. ulei* é um resultado que não foge aos descritos até o momento na literatura. Kuijt e colaboradores (1985) relatam que nunca foi observada germinação no gênero nem na família; Rutherford (1970) e Blassingame (1968) também reconhecem que seus estudos se restringem à anatomia de espécimes adultos, apesar dos esforços em tentar germinar as sementes de *P. thurberi*.

Tais resultados negativos não se aplicam somente à *Pilostyles*. Não existem relatos de observação da germinação de qualquer holoparasita na natureza. Com exceção das espécies de importância econômica (dos gêneros *Cuscuta e Orobanche* por exemplo), tampouco existem estudos bem sucedidos com germinação de holoparasitas em laboratório. Existem ensaios com B*dallophyton* (Garcia-Franco &

Rico-Gray 1996) e *Cytinus* (Vega *et al.* 2009), onde não foi verificada germinação, e com *Conopholis* (Baird & Riopel 1986), *Dactylanthus* (Ecroyd 1996) e *Hydnora* (Bolin *et al.* 2009), onde foram verificadas taxas de germinação muito baixas.

O que fica claro em todos estes trabalhos é que os processos de germinação e estabelecimento inicial da planta holoparasita são os períodos mais críticos no seu ciclo de vida. Tais plantas perderam sua capacidade fotossintetizante, sendo sumamente necessário estabelecer uma conexão com o hospedeiro logo no início do desenvolvimento, antes que as reservas da semente se esgotem. Para lidar com tais dificuldades, as plantas holoparasitas evoluíram um sistema de comunicação altamente específico, sendo necessária a percepção de alguma molécula química provinda do hospedeiro para ocorrer a germinação e uma segunda sinalização para iniciar o desenvolvimento do haustório (Stewart & Press 1990, Press *et al.* 1990).

Os resultados negativos observados no presente estudo podem ser devidos à diversos fatores, sem os quais as sementes de *Pilostyles* são incapazes de germinar na natureza. Possíveis hipóteses são: 1) requerimento de sinalização química específica provinda da hospedeira e 2) necessidade de associação simbiótica com microorganismos como os fungos, tal como ocorre nas diminutas sementes das orquídeas. A ausência de informações sobre o período de maturação das sementes, nos leva também à hipótese alternativa de que as sementes coletadas poderiam estar imaturas quando da realização dos experimentos de germinação.

Uma vez tendo a parasita se estabelecido, a comunicação entre ela e a planta hospedeira continua sendo fator determinante no ciclo de vida de ambas. A existência de tal comunicação pode ser observada quando comparamos as fenologias de tais plantas. Inicialmente parece haver um atraso de 2 a 3 meses entre o início de determinada fenofase na hospedeira *M. foliolosa* e seu início em *P. ulei*. Entretanto, se considerarmos que cada período não pode ser delimitado de modo estanque, novas possibilidades vêm à tona.

Parece-nos mais provável que as fenologias da holoparasita e de sua hospedeira apresentem sincronia. O atraso observado nas épocas de floração, de aproximadamente três meses, pode ser explicado pelo longo período de amadurecimento e emergência das flores de *Pilostyles*. Nas observações fenológicas só foram computadas as flores já emersas, mas os botões florais iniciam-se muito antes: a partir de dezembro já podemos observar a existência de pequenos botões sob a periderme, época que coincide com o início da floração também na hospedeira. Já o atraso observado entre os períodos de frutificação provavelmente seja devido ao tempo necessário para a maturação dos frutos, que é específico para cada espécie, e/ou à incapacidade de delimitarmos o inicio exato da frutificação em *Pilostyles* (pois os frutos são externamente muito semelhantes às flores).

Tais observações deixam claro que existe relação direta entre as fenologias da hospedeira e da endoparasita. O que não se sabe, entretanto, é o modo como ocorre tal sincronização e a natureza das moléculas envolvidas. Até o momento foram relatadas transferências de genes mitocondriais (Davis & Wurdack 2004, Nickrent *et al.* 2004, Barkman *et al.* 2007), e até mesmo de mRNA, moléculas que podem vir a afetar a expressão gênica na parasita, silenciando determinados genes por exemplo (Roney *et al.* 2007, Tomilov *et al.* 2008, Westwood *et al.* 2009). Stewart e Press (1990) relatam ainda a possibilidade de transferência de moléculas hormonais, uma vez que inexistem relatos de síntese dessas substâncias pelas plantas holoparasitas.

Em conseqüência disso, é razoável supor que, ao menos em parte, o crescimento e respostas reprodutivas da holoparasita são controlados pela planta hospedeira, entretanto maiores estudos são necessários para elucidar as moléculas e processos envolvidos em tão interessante associação.

5. CONCLUSÕES

Com certeza o tema ciclo de vida nas Apodanthaceae esta longe de ser exaurido. O presente estudo representa um primeiro ensaio, importante não só pelos resultados inéditos, mas também pelos resultados negativos, que abrem possibilidade de apontarmos possíveis erros e de adequação dos métodos em estudos futuros. Podemos concluir que:

- Todos os insetos observados podem desempenhar algum papel na polinização de *P. ulei; a*lguns se mostraram mais freqüentes (*Pachodynerus* e *Polistes* - Hymenoptera) e outros mais especializados (*Toxomerus* - Diptera).
- Não foi observado nenhum animal que pudesse dispersar as sementes, nem tampouco sementes germinando na natureza, entretanto, sua morfologia nos leva a crer que a endozoocoria por aves seja a hipótese mais plausível.
- Não foi possível realizar a germinação das sementes de *Pilostyles ulei* em laboratório nem em casa de vegetação.
- A ausência de tecidos do sistema endofítico parasita nas raízes da hospedeira é uma forte indicação de que a germinação e penetração ocorram diretamente no caule.
- Existe uma relação direta entre as fenologias da hospedeira *M. foliolosa* e da parasita *P. ulei*, inclusive com possibilidade de sincronização.

Cada fase do ciclo de vida no gênero, e na família como um todo, foi pouco estudada até o momento. Quanto à polinização, são necessários estudos lidando, para citar alguns exemplos, com: análise de compatibilidade, fluxo polínico, análise de presença e testes de viabilidade do pólen no corpo dos visitantes florais, etc.

A despeito do amplo período de observação em campo, a maneira como as sementes são dispersas continua um mistério. Uma possível solução seria monitorar plantas hospedeiras com frutos de *Pilostyles* colocando-se câmeras sensíveis ao

movimento, a fim de angariar informações sobre o agente dispersor, nunca dantes visualizado.

Apesar de não termos obtido sucesso na germinação das sementes, diversos métodos foram utilizados, sendo os resultados negativos de extrema importância para readequação em estudos futuros. Seria interessante investir na germinação *in vitro*, utilizando-se diferentes meios de cultura adicionados de extratos da hospedeira, como exudados das raízes por exemplo. Ensaios com cultura de tecidos da parasita poderiam representar método alternativo, com amplas possibilidades de estudarmos a formação de sistema endofítico, citogenética e, inclusive, de desenvolvermos marcação específica (hibridização *in situ*) para identificação de células parasitas embebidas nos tecidos hospedeiros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M.M. 2007. A estrutura da angiosperma endoparasita *Pilostyles ulei* (Apodanthaceae): interface e impacto no lenho de *Mimosa* ssp. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARMSTRONG, W.P. 1998. *Pilostyles thurberi*: seldom-seen wildflower that lives inside the stem of another plant. *In*: Wayne's word, a on-line textbook of Natural History (www.waynesword.palomar.edu).

BAIRD, WM V. & RIOPEL, J.L. 1986. Life History Studies of *Conopholis americana* (Orobanchaceae). *American Midland Naturalist* 116: 140-151.

BARKMAN, T.J., MCNEAL, J.R., LIM, S-H., COAT, G., CROOM, H.B., YOUNG, N.D. & dePAMPHILIS, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology* 7: 248.

BARNEBY, R.C. 1991. Sensitivae Censitae: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 65: 1-835.

BEATTIE, A.J., TURNBULL, C., KNOX, R.B. & WILLIAMS, E.G. 1984. Ant inhibition of pollen function: a possible reason why ant pollination is rare. *American Journal of Botany* 71(3): 421-426.

BOLIN, J.F.; MAASS, E.; TENNAKOON, K.U. & MUSSELMAN, L.J. 2009. Host-specific germination of the root holoparasite *Hydnora triceps* (Hydanoraceae). *Botany* 87: 1250-1254.

BOUMAN, F. & MEIJER, W. 1994. Comparative structure of ovules and seeds in Rafflesiaceae. *Plant Systematics and Evolution* 193: 187-212.

CROAT, T.B. *Flora of Barro Colorado Island*. California: Stanford University Press, 1978.

DAVIS, C.C. & WURDACK, K.J. 2004. Host-to-Parasite Gene Transfer in Flowering Plants: Phylogenetic Evidence from Malpighiales. *Science* 305: 676–678.

DELL, B. & BURBIDGE, H. 1981. Notes on the biolgy of *Pilostyles* (Rafflesiaceae) in Western Australia. *W. Austr. Herb. Res. Notes* 5: 71-79.

DELL, B., KUO, J. & BURBIDGE, H. 1982. Anatomy of *Pilostyles hamiltonii* C. A. Gardner (Rafflesiaceae) in stems of *Daviesia*. *Australian Journal of Botany* 30: 1-9.

ECROYD, C.E. 1996. The ecology of *Dactylanthus taylorii* and threats to its survival. *New Zealand Journal of Ecology* 20(1): 81-100.

ENDRISS, W. 1902. Monographie von *Pilostyles ingae* (Karst.) (*Pilostyles ulei* Solms-Laubach). *Flora* 91: 209-236.

ESTABROOK, E.M. & YODER, J.I. 1998. Plant-Plant Communications: Rhizosphere Signaling between Parasitic Angiosperms and Their Hosts. *Plant Physiology* 116: 1–7.

GARCIA-FRANCO, J.G. & RICO-GRAY, V. 1996. Dispersión, viabilidad, germinación y banco de semillas de *Bdallophyton bambusarum* (Rafflesiaceae) en la costa de Veracruz, México. *Revista Biol. Trop*. 44: 87-94.

GOMES, A.L. & FERNANDES, G.W. 1994. Influence of parasitism by *Pilostyles ingae* (Rafflesiaceae) on its host plant, *Mimosa maguirei* (Leguminosae). *Annals of Botany* 74: 205-208.

GOMEZ, L.D. 1983. Rafflesiaceae. *In*: Burger, W. [ed.] Flora Costaricensis. Fieldiana Bot. II, 13:89-93.

GROPPO, M., AMARAL, M.M. & CECCANTINI, G.C.T. 2007. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Apodanthaceae (Rafflesiaceae *s.l.*), e notas sobre a anatomia de *Pilostyles*. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25 (1): 81-86.

HAUPT, S.; OPARKA, K.J.; SAUER, N. & NEUMANN, S. 2001. Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. *Journal of Experimental Botany* 52: 173-177.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/>.

INMET, Instituto nacional de Meteorologia. Disponível em < http://www.inmet.gov.br/>.

JOEL, D.M. 2000. The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. *Crop Protection* 19: 753-758.

KUIJT, J. *The biology of parasitic flowering plants*. California: University of California Press, 1969.

KUIJT, J., BRAY, D. & OLSON, A.R. 1985. Anatomy and ultrastructure of the endophytic system of *Pilostyles thurberi* (Rafflesiaceae). *Canadian Journal of Botany* 63: 1231-1240.

KUMEROW, J. 1962. *Pilostyles berteri* Guill., eine wenig bekannte Rafflesiaceae in mittelchile. *Zeits. Bot*. 50: 321-337.

MEULEBROUCK, K.; AMELOOT, E.; VAN ASSCHE, J.A.; VERHEYEN, K.; HERMY, M. & BASKIN, C.C. 2008. Germination ecology of the holoparasite Cuscuta epithymum. *Seed Science Research* 18: 25–34.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

MUSSELMAN, L.J. 1980. The biology of *Striga*, *Orobanche* and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology* 18:463-489.

NICKRENT, D.L. 2002. Parasitic plants of the world. Chapter 2, pp. 7-27 *In*: J.A. López-Sáez, P. Catalán and L. Sáez [eds.]. *Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands*. Madrid: Mundi-Prensa.

NICKRENT, D.L., BLARER, A., QIU, Y-L. & VIDAL-RUSSELL, R. 2004. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* 4:40.

PRESS, M.C., GRAVES, J.D. & STEWART, G.R. 1990. Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant, Cell and Environment* 13: 91-104.

PROCTOR, M., YEO, P. & LACK, A. *The natural history of pollination*. Hampshire: Harper Collins, 1996.

PUTERBAUGH, M.N. & PRINCE, M.B. 2000. Why are reports of ant pollination rare? A field and lab exercise using the scientific method. pp. 218-233 *In:* Puterbaugh, M.N. *Tested studies for laboratory teaching*. vol.22. Proceedings of the 22nd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education.

RONEY, J.K.; KHATIBI, P.A. & WESTWOOD, J.H. 2007. Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder. *Plant Physiology* 143: 1037–1043.

RUTHERFORD, R.J. 1970. The anatomy and cytology of *Pilostyles thurberi* Gray (Rafflesiaceae). *Aliso* 7 (2): 263-288.

STEWART, G.R. & PRESS, M.C. 1990. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular* 41: 127-151.

SUDD, J.H. & FRANKS, N.R. *The behavioral ecology of ants*. Glasgow: Black & Son, 1987.

TOMILOV, A.A.; TOMILOVA, N.B.; WROBLEWSKI, T.; MICHELMORE, R. & YODER, J.I. 2008. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journa*l 56: 389–397.

ULE, E. 1915. Über brasilianische Rafflesiaceen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 33: 468-478.

VATTIMO, I. 1971. Contribuição ao conhecimento da tribo Apodanthea R. Br. Parte I – Conspecto das espécies (Rafflesiaceae). *Rodriguésia* 26 (38): 37-62.

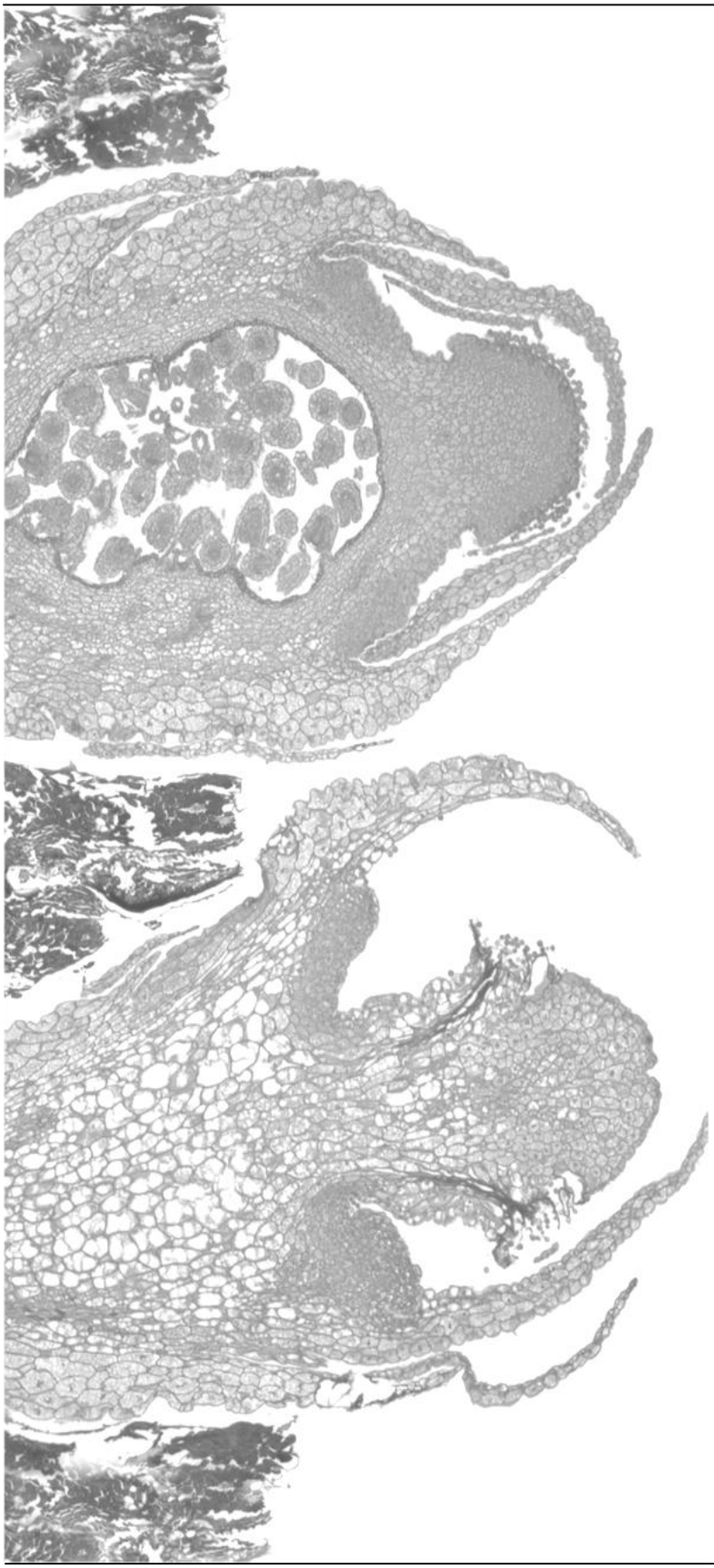
VATTIMO, I. 1972. Raflesiáceas. *In*: R. Reitz [ed.] *Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues*. Itajaí.

VEGA, C.; ARISTA, M.; ORTIZ, P.L.; HERRERA, C.M. & TALAVERA, S. 2009. The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasite. *Annals of Botany* 103:1065-1075.

XIE, X.; YONEYAMA, K.; KUSUMOTO, D.; YAMADA, Y.; TAKEUCHI, Y.; SUGIMOTO, Y. & YONEYAMA, K. 2008. Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by Sorghum bicolor. *Tetrahedron Letters* 49: 2066–2068.

WESTWOOD, J.H.; RONEY, J.K.; KHATIBI, P.A. & STROMBERG, V.K. 2009. RNA translocation between parasitic plants and their hosts. *Pest Management Science* 65: 533-539.

WESTWOOD, J.H.; YODER, J.I.; TIMKO, M.P. & dePAMPHILIS, C.W. 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* 15: 227-235.



CAPÍTULO II

POPULAÇÃO E RAZÃO SEXUAL

1. INTRODUÇÃO

A família Apodanthaceae inclui plantas aclorofiladas, endoparasitas de caules, cujo corpo vegetativo apresenta extrema redução. Não existem órgãos tradicionais como raiz, caule e folhas, mas somente um sistema endofítico, semelhante a um micélio, completamente embebido nos tecidos do hospedeiro (Kuijt 1969). Esse endófito é formado por cordões de células parenquimáticas no floema secundário hospedeiro, que se anastomosam formando uma rede complexa, explorando o caule hospedeiro nos seus três eixos (Amaral 2007). Nos locais onde se desenvolvem as flores, grupos de células que se projetam radialmente, os extensores (em inglês chamados “sinkers”), alcançam o xilema secundário hospedeiro (Amaral 2007, Rutherford 1970).

Sustenta-se que o crescimento do sistema endofítico acompanha o crescimento do meristema apical caulinar, recebendo a denominação de crescimento isofásico (Kuijt 1969). Durante a extensão das regiões apicais do hospedeiro, as células de *Pilostyles* maturam na mesma direção, desenvolvendo um novo sistema endofítico nesta nova posição. Dessa maneira, a região próxima ao ápice caulinar do hospedeiro está permanentemente infectada; o restante do corpo da parasita pode manter continuidade com a parte migrante ou, do contrário, fenecer (Amaral 2007). As parasitas tornam-se evidentes apenas na época da floração, quando as diminutas flores, que são diclinas no gênero, rompem a periderme do hospedeiro (Groppo *et al*. 2007). Apesar de a anatomia do corpo vegetativo de *Pilostyles* ter sido amplamente estudada (Solms-Laubach 1874 e 1875, Endriss 1902, Rutherford 1970), existindo inclusive estudos em microscopia eletrônica de transmissão (Dell *et al*. 1982, Kuijt *et al*. 1985) e microscopia confocal (Amaral 2007), faltam estudos básicos na literatura quanto ao sistema reprodutivo da família Apodanthaceae. Como estão distribuídas as flores na hospedeira? Existe um padrão de distribuição, diferente em cada espécie

parasita? Em nível populacional, como estão distribuídos e qual a proporção de indivíduos estaminados e pistilados?

Foram localizados até o momento poucos trabalhos contendo informações acerca da biologia de *Pilostyles* (Blassingame 1968, Vattimo 1971 e 1972, Dell & Burbidge 1982). Tais estudos versam primariamente sobre a sistemática e distribuição do gênero, havendo apenas relatos pontuais a respeito da organização do corpo reprodutivo da parasita.

Como resultado direto dessa falta de conhecimento, a esporidade das plantas da família Apodanthaceae tem sido amplamente discutida. É impossível, morfológica e anatomicamente, distinguir duas parasitas quando elas ocorrem no mesmo hospedeiro. O que podemos visualizar são as centenas de flores dispostas regularmente ao longo dos ramos, mas não podemos saber se pertencem a um indivíduo, dois ou mais. A única afirmação que pode ser feita é que as flores são diclinas, mas não podemos saber se ocorrem em indivíduos monóicos ou dióicos. Tal dúvida é tópico constante nos estudos envolvendo outras plantas endoparasitas, como por exemplo, aquelas da família Cytinaceae. A impossibilidade de determinar um indivíduo da holoparasita *Bdallophyton bambusarum* (Liebm.) Harms, que possui flores diclinas como em *Pilostyles*, levou os autores Garcia-Franco e colaboradores (1998) a conduzir um estudo de variabilidade genética na população (análise de aloenzimas). Somente a partir de tal análise, os autores puderam responder qual o sistema reprodutivo na espécie, que descobriram ser dióica.

A maioria dos autores defende igualmente uma condição dióica para a família Apodanthaceae (Kuijt 1969, Rutherford 1970, Vattimo 1971, Meijer 1993, Groppo *et al.* 2007), entretanto tais hipóteses levam em consideração as demais famílias da antiga ordem Rafflesiales como referência. Essas famílias, nomeadamente Rafflesiaceae *sensu stricto*, Cytinaceae e Mitrastemonaceae, são em sua maioria dióicas, mas não podem ser consideradas quando da análise da esporidade em *Pilostyles*, pois

atualmente sabe-se que não possuem parentesco direto com a família (Nickrent *et al*. 2004).

O presente estudo visa analisar o modo reprodutivo altamente especializado da família Apodanthaceae, baseando-se principalmente em observações das populações em seu hábitat natural. Caracteriza o primeiro ensaio acerca do sistema reprodutivo da família, a nível populacional, analisando duas espécies de distribuição disjunta, *Pilostyles ulei* Solms-Laub. (Brasil) e *Pilostyles thurberi* A. Gray. (México), principalmente quanto à distribuição das flores nas diferentes espécies hospedeiras e à razão sexual das populações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Parte deste estudo foi realizada em cooperação com a pesquisadora Teresa Terrazas Salgado, da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), na Cidade do México, DF. Esta cooperação foi possível graças a um intercâmbio realizado no período de agosto a novembro de 2009, com bolsa de estudos concedida pelo Banco Santander através do "Programa de Mobilidade De Pós-Graduandos da Rede de Macrouniversidades Públicas da América Latina e Caribe". Durante permanência na referida universidade foram realizadas saídas de campo para os estados de Querétaro, Puebla e San Luis Potosi, para coletar espécimes da parasita *Pilostyles thurberi*. Em laboratório, a espécie foi analisada quanto à sua esporidade (resultados expressos no presente capítulo), morfologia e anatomia floral (vide capítulo III), visando-se um estudo comparativo com a espécie brasileira para maior entendimento da evolução da morfologia floral na família Apodanthaceae.

2. 1. Espécies e locais de coleta

Foram estudadas uma população do gênero *Pilostyles* no Brasil, Estado de Minas Gerais, e três populações no México, incluindo os Estados de Querétaro e Puebla (Fig. 14). As espécies e localidades de coleta estão especificadas a seguir:

- Parque Nacional Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (SC)

  Pilostyles ulei. Área de campo rupestre, propriedade Mãe d'água do IBAMA, no quilômetro 103 da rodovia MG-010, coordenadas S 19º18'27,8", W 43º 36' 11,6". Tal propriedade localiza-se no Parque Nacional da Serra do Cipó, região central do Estado de Minas Gerais, Brasil. O clima é do tipo tropical de altitude, com verões chuvosos e um curto período seco (3-4 meses) durante o inverno (Gomes & Fernandes 1994). A temperatura média anual é de 21,2º C, a média

anual de precipitação é de 1622 mm (IBAMA 2007) e a altitude varia entre 800 e 1500 metros. Na Serra do Cipó, *Pilostyles ulei* parasita indivíduos de *Mimosa foliolosa* Benth. var. *multipinna* (Benth.) Barneby e de *M. maguirei* Barneby.

- Hacienda El Ciervo, Querétaro, México (HC)

Pilostyles thurberi. Propriedade privada Hacienda El Ciervo, município de Tequisquiapan, altitude de 2000m e coordenadas S 20º27'05,9", W 99º52'09,3". População relativamente pequena e esparsa, com baixa densidade de indivíduos. O clima é temperado, com temperatura média anual de 12,2° C e precipitação de 511,8 mm (CEA Querétaro 2009). No local, *P. thurberi* parasita indivíduos de *Dalea bicolor* Willd.

- Los Trigos, Querétaro, México (LT)

Pilostyles thurberi. Base do Cerro Zamorano, localidade Los Trigos, em vegetação do tipo Matorral Sub-montano, altitude de 2660m e coordenadas S 20º54'63,8", W 100º12'01". Em tal localidade, Município de Colón, o clima é do tipo temperado semi-seco, com temperatura média anual de 17,9° C e precipitação de 574 mm (CEA Querétaro 2009). Nos meses de maio e junho se registram as temperaturas mais altas e a maior taxa de precipitação. No local, *P. thurberi* parasita indivíduos de *Dalea bicolor* Willd.

- Santa Isabel, Puebla, México (SI)

Pilostyles thurberi. Localidade de Santa Isabel, Município Palmar de Bravo, altitude de 2200m e coordenadas S 18º46'26,2", W 97º28'27,0". O clima é do tipo temperado semi-seco, com temperatura média anual de 16,9° C e precipitação de 493,6 mm (Red Nacional de Estaciones Estatales Agroclimatológicas 2009). No Estado de Puebla, *P. thurberi* parasita indivíduos de *Dalea melantha* var. *melantha* S. Schauer.

Figura 14. Mapa de localização das populações estudadas nos estados de Querétaro e Puebla (México), e Minas Gerais (Brasil). As capitais dos referidos estados aparecem sinalizadas para facilitar localização espacial: Santiago de Querétaro (S.Q.), Puebla (P.) e Belo Horizonte (B.H.).

2. 2. Estudo da distribuição das flores e razão sexual da população

Visando-se entender como estão distribuídas as flores nos ramos hospedeiros, assim como a razão sexual das espécies *Pilostyles ulei e P. thurberi*, realizou-se um amplo levantamento dos hospedeiros parasitados existentes nas áreas de estudo. Na localidade Serra do Cipó (SC), foram marcados e numerados 100 indivíduos. Em junho de 2008, em cada um dos indivíduos, foram coletadas 50 flores de *Pilostyles ulei* ao acaso nos ramos, totalizando 5000 flores. De maneira similar, em setembro de 2009 foram coletadas aproximadamente 50 flores de *Pilostyles thurberi* em 10 hospedeiros na localidade de Hacienda El Ciervo (HC); aproximadamente 50 flores em 50 hospedeiros em Los Trigos (LT); e 50 flores em 50 hospedeiros na localidade de Santa Isabel (SI). As amostras foram tomadas de acordo com o número de hospedeiros parasitados disponíveis em cada população.

As flores foram acondicionadas em tubos plásticos contendo fixador FAA 50% e, em laboratório, analisadas sob Microscópio Estereoscópio de modo a determinar se tratavam-se de flores estaminadas ou pistiladas. A partir de tais dados, foi possível determinar a razão sexual das populações, calculada como sendo a razão de flores pistiladas/estaminadas.

2. 3. Distribuição das flores nos ramos

Foi realizada uma segunda amostragem em doze indivíduos de *M. foliolosa* parasitados para verificar se existe algum padrão de distribuição das flores da parasita *P. ulei* ao longo dos ramos. Em um ramo por planta hospedeira, foram coletadas aproximadamente 50 flores na base, 50 no meio e 50 no ápice dos ramos. As flores foram acondicionadas em tubos plásticos contendo fixador FAA 50% e, em laboratório, analisadas sob Microscópio Estereoscópio.

3. RESULTADOS

As espécies *P. ulei* e *P. thurberi*, apesar de apresentarem distribuição disjunta, ocorrem em ambientes semelhantes nos diferentes países. As localidades são correspondentes quanto ao tipo de vegetação, cada qual com suas famílias predominantes, mas que se caracterizam pela presença de plantas adaptadas à aridez, apresentando características xeromórficas. Ambas as espécies são endoparasitas específicas de leguminosas.

Quanto à distribuição das parasitas em cada hospedeiro, visualiza-se em *P. ulei* e *P. thurberi* uma distribuição ascendente (Fig. 15.a). Tal padrão pode ser observado pela presença de botões florais jovens, ainda sob a periderme, próximos ao ápice caulinar (Fig. 15.b), seguidos de uma região com botões mais desenvolvidos (Fig. 15.c), flores abertas (Fig. 15.d) e, mais abaixo, cicatrizes no córtex deixadas pela queda dos frutos/flores secas (Fig. 15.e). O sistema endofítico, assim como as flores de *Pilostyles* (Fig. 15.f e 15.g), se restringe à região caulinar. Não foram observadas células da parasita, com os característicos núcleos grandes e presença de dois nucléolos, nas raízes da hospedeira *M. foliolosa* (vide capítulo I).

3. 1. Distribuição das flores entre hospedeiros

A partir da análise dos 100 indivíduos de *M. foliolosa* parasitados, observou-se que 83% dos indivíduos possuem flores de *P. ulei* estaminadas e pistiladas ocorrendo no mesmo ramo, não raramente ocorrendo lado a lado (Fig. 16), e 17% possuem apenas flores pistiladas. Não foi encontrado nenhum indivíduo com apenas flores estaminadas. Naqueles hospedeiros que possuem ambos os tipos florais, o número de flores estaminadas é bem menor quando comparado ao número de flores pistiladas: das 50 flores coletadas por indivíduo, existe uma média de 5,91 flores estaminadas.

Em *P. thurberi* pode-se distinguir três tipos de comportamento: 1) na localidade de Hacienda El Ciervo (HC), os hospedeiros apresentam apenas um tipo de flor, estaminadas (60% dos hospedeiros) ou pistiladas (40%); 2) em Santa Isabel (SI) todos os hospedeiros apresentam ambos os tipos florais e 3) em Los Trigos (LT) as duas situações aparecem: hospedeiros com ambos os tipos florais (11,9%), e hospedeiros com somente flores estaminadas (44,05%) ou pistiladas (44,05%) (Fig. 17).

Em SI e LT, naqueles hospedeiros que possuem ambos os tipos florais, podemos observar diferenças na densidade das flores. Em SI, assim como em SC, há maior quantidade de flores pistiladas, existindo uma média de 14,84 flores estaminadas por hospedeiro (de 50 coletadas). Em LT, entretanto, as flores estaminadas predominam, havendo uma média de 10,28 flores pistiladas por hospedeiro.

3. 2. Distribuição das flores em cada hospedeiro

Não foi observada nenhuma distinção entre as áreas de ocorrência das flores de *P. ulei* ao longo dos ramos da hospedeira *M. foliolosa*: em praticamente todas as plantas hospedeiras, na base, meio e ápice dos ramos ocorrem flores pistiladas e estaminadas (Fig. 18). As ultimas aparecem em menor número (vide tópico 3.3) e distribuídas aleatoriamente entre as flores pistiladas. Não observou-se nenhuma tendência, como o aumento de algum dos tipos de flor em direção ao ápice ou base dos ramos.

3. 3. Razão Sexual

Em *P. ulei*, levando-se em consideração todos os indivíduos coletados, a razão sexual da população é de 7,9: 1,0, ou seja, existem 7,9 flores pistiladas para cada flor estaminada (Tabela 4). Em *P. thurberi*, a razão sexual das populações das localidades

de Hacienda el Ciervo (0,6: 1,0) e Los Trigos (0,8: 1,0), ambos em Querétaro, mostram números levemente tendentes em direção às flores estaminadas. Diferentemente, em Santa Isabel, Puebla, há predominância de flores pistiladas, sendo a razão sexual de 2,3: 1,0.

3. 4. Existência de flores monoclinas

Por serem as flores pistiladas e estaminadas muito pequenas (2,0-3,0 mm de diâmetro) e externamente semelhantes, a determinação só pôde ser efetuada através da seção longitudinal das mesmas e análise sob Microscópio Estereoscópio. Mesmo assim, de todas as flores analisadas, algumas continuaram sem determinação nesse estágio. Posteriormente, através da preparação dessas flores para análise histológica, descobriu-se a existência de flores monoclinas, fato inédito tanto para o gênero quanto para a família.

As flores monoclinas representam 1,29% de todas as flores de *Pilostyles ulei* coletadas e são relativamente freqüentes nos indivíduos, aparecendo em 48,78% dos hospedeiros (Tabela 5). Entretanto, são pouco abundantes: na maioria dos indivíduos foi coletada apenas 1 flor monoclina, sendo o número máximo encontrado de 3 por hospedeiro. Números semelhantes são observados em *P. thurberi* (Tabela 5), entretanto é interessante notar que, nas localidades onde os hospedeiros possuem em sua maioria flores de apenas um tipo (HC e LT), as flores monoclinas só aparecem em hospedeiros que possuem apenas flores estaminadas, em outras palavras, naqueles com puras flores pistiladas nunca aparecem flores monoclinas.

Outra característica que parece estar relacionada com o padrão de distribuição das flores é a porcentagem de hospedeiros que possuem flores monoclinas: aproximadamente 50% naquelas populações onde os hospedeiros possuem ambos os

tipos florais (SC e SI), e aproximadamente 20% naquelas onde as flores estaminadas e pistiladas encontram-se em hospedeiros separados (HC e LT) (Tabela 5).

Morfologicamente, as flores monoclinas possuem tanto rudimentos seminais quanto sacos polínicos, entretanto o desenvolvimento dessas estruturas é muito variável. Quanto ao androceu, podem existir apenas poucos sacos polínicos, sem completar os anéis típicos das flores estaminadas, ou os dois anéis podem estar completos. O desenvolvimento do gineceu varia desde a existência de apenas um lóculo, sem rudimentos seminais, até a existência de um gineceu bem desenvolvido, com muitos rudimentos. Para maiores detalhes sobre sua morfologia e anatomia, vide capítulo III.

Apesar de possuírem ambos os esporângios, as flores monoclinas exibem diferenças na capacidade de desenvolvimento de tais estruturas. Em todas as flores observadas, a meiose ocorre apenas no microsporângio, sendo os grãos de pólen formados ao final da gametogênese; ao contrario, os rudimentos seminais não passam da fase de células mãe de megásporos.

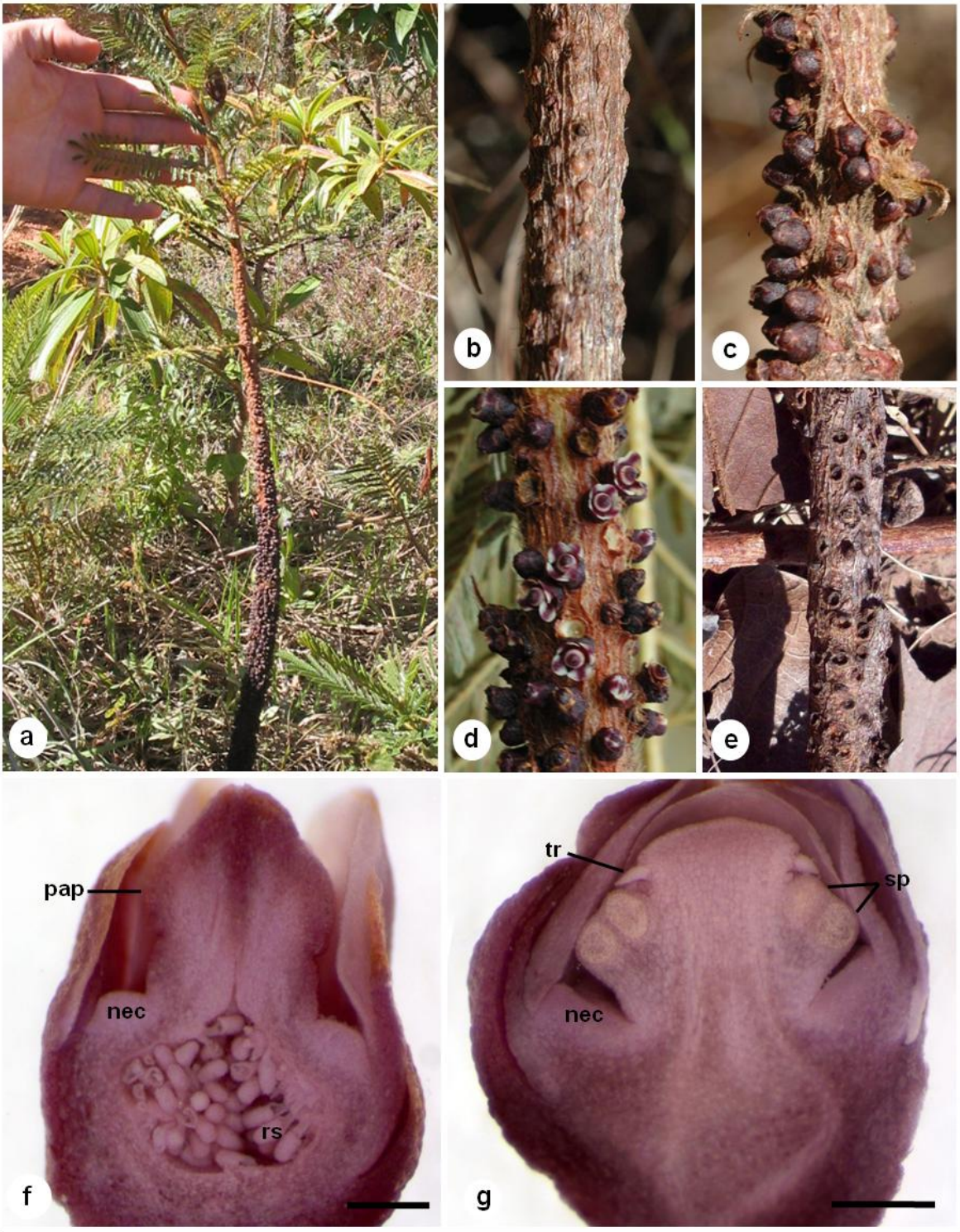


Figura 15. *Pilostyles ulei*. a) Distribuição das flores em ramo de *Mimosa foliolosa* parasitada, notar padrão de desenvolvimento ascendente; b) Botões sob periderme hospedeira no ápice dos ramos; c) Botões florais já emersos; d) Região com flores em antese; e) Cicatrizes deixadas pela queda de frutos e/ou flores secas; f) Seção longitudinal de flor pistilada. g) Seção longitudinal de flor estaminada. nec – disco nectarífero, pap – papilas estigmáticas, tr – tricomas vesiculares, rs – rudimentos seminais, sp – sacos polínicos. Escalas = 0,5mm

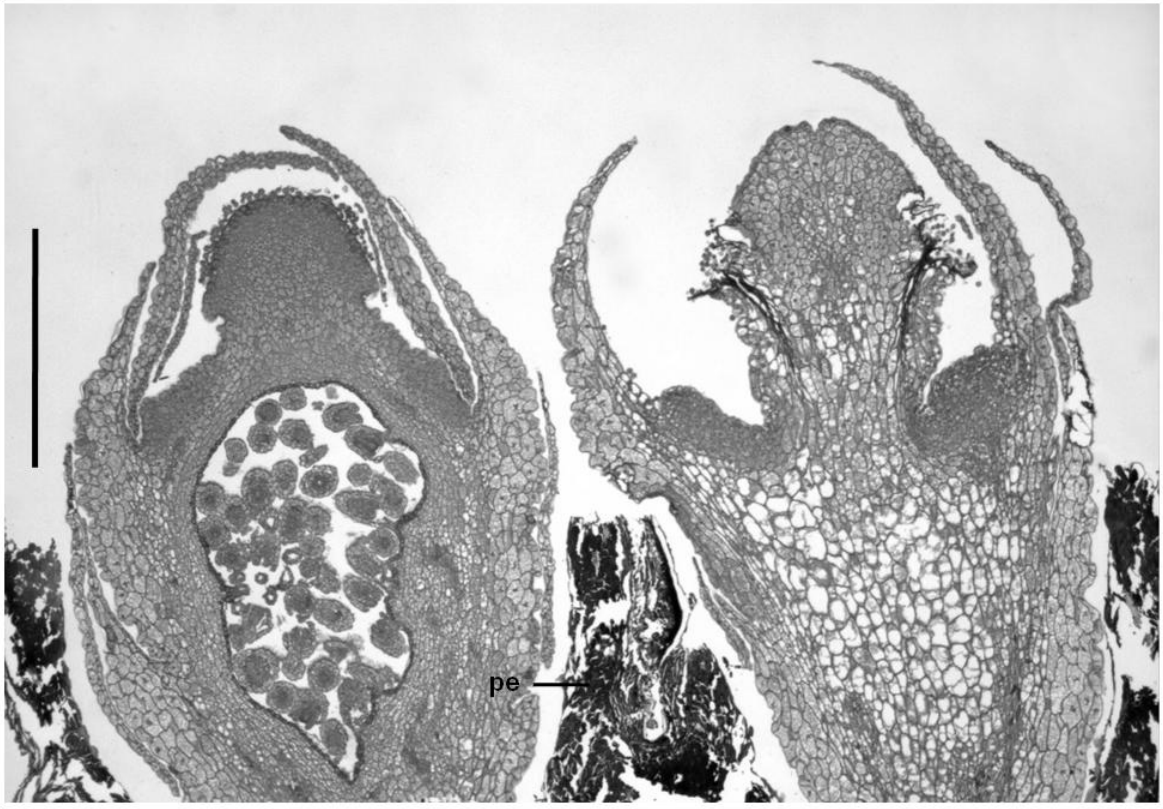


Figura 16. *Pilostyles ulei:* Seção transversal do caule da hospedeira *Mimosa foliolosa* evidenciando flor pistilada (esquerda) e estaminada (direita) lado a lado. pe - periderme da hospedeira. Escala = 1 mm.

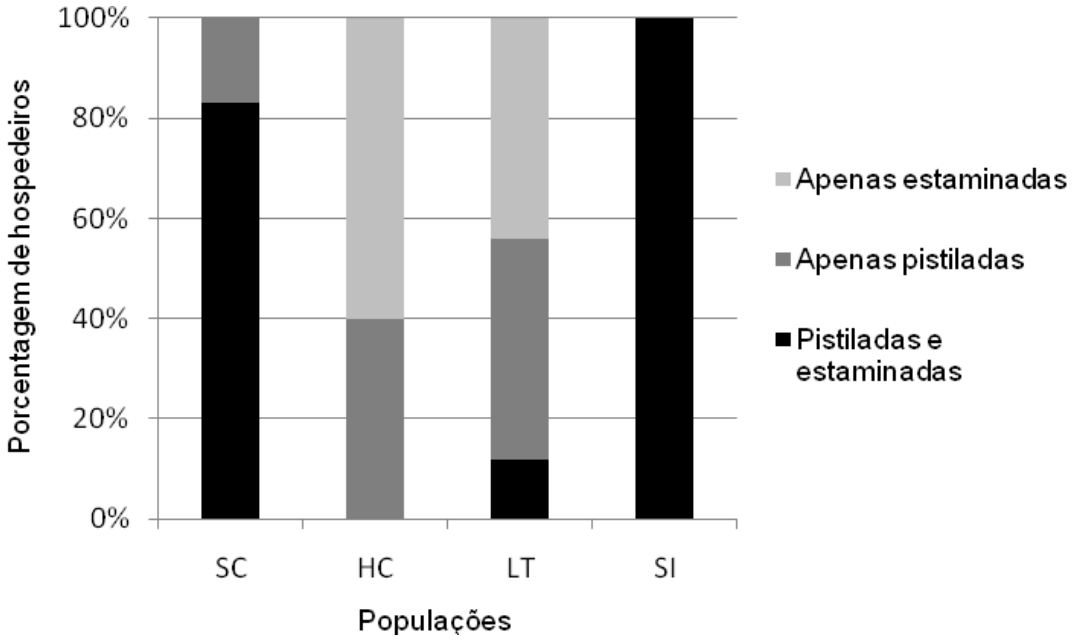


Figura 17. Análise da distribuição das flores de *Pilostyles ulei* (SC) e *Pilostyles thurberi* (HC, LT e SI) entre os hospedeiros. Visualiza-se a porcentagem de hospedeiros infectados apenas por flores pistiladas, estaminadas ou ambos os tipos em cada população.

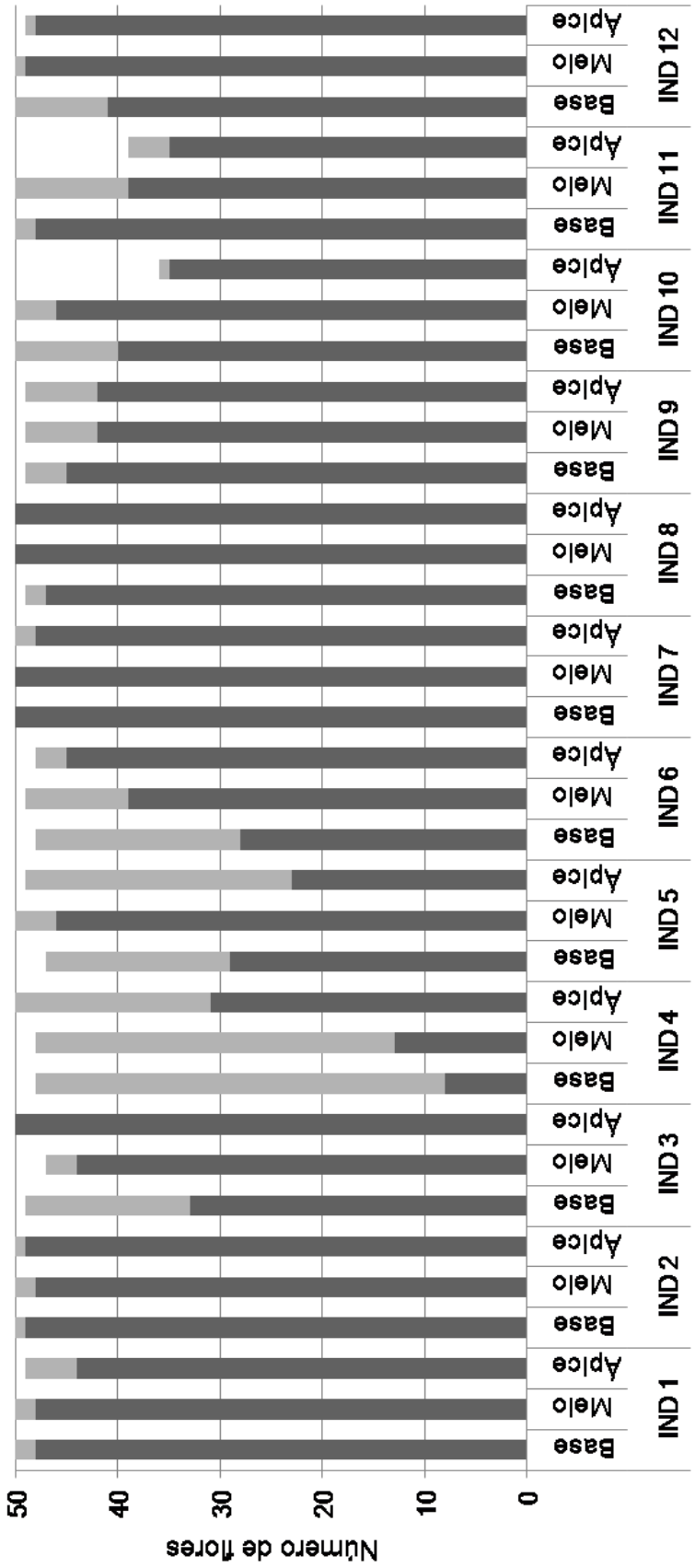


Figura 18. Análise da distribuição das flores de *Pilostyles ulei* em doze indivíduos de *Mimosa foliolosa* var. *multipinna*, população SC, levando-se em consideração a localização das flores no ramo hospedeiro. ■ = flores pistiladas, ■ = flores estaminadas.

Tabela 4. Espécies parasitas, localidades de ocorrência, espécies hospedeiras e razão sexual de cada população.

Espécie	Localidade	Hospedeira	Distribuição das flores	Razão Sexual
Pilostyles ulei	SC	*Mimosa foliolosa* var. *multipinna*	Maioria dos hospedeiros com ambas as flores	7,9: 1,0
Pilostyles thurberi	SI	*Dalea melantha* var. *melantha*	Hospedeiros com ambas as flores	2,3: 1,0
Pilostyles thurberi	HC	*Dalea bicolor*	Hospedeiros com apenas um tipo de flor	0,6: 1,0
Pilostyles thurberi	LT	*Dalea bicolor*	Maioria dos hospedeiros com apenas um tipo de flor	0,8: 1,0

Tabela 5. Flores monoclinas: porcentagem do total de flores coletado em cada população, porcentagem de hospedeiros que possuem flores monoclinas, e números máximo e mínimo de flores monoclinas em cada indivíduo.

População	Porcentagem de flores monoclinas	Porcentagem de hospedeiros	Números Mínimo - Máximo
SC	1,29%	48,78%	1 - 3
SI	1,76%	50%	1 - 4
HC	0,65%	20%	1 - 2
LT	1,75%	18,64%	1 - 14

4. DISCUSSÃO

O andamento do presente trabalho deixou claro que o estudo de uma angiosperma de características tão particulares como *Pilostyles* realmente foge aos padrões. Não só as espécies variam quanto ao comportamento e razão sexual, mas também as diferentes populações.

4.1. Distribuição das flores e esporidade

Com relação à distribuição das flores, foram observados diferentes comportamentos em cada população, independentemente da espécie parasita em questão. Entretanto, parece haver certa constância de acordo com a espécie hospedeira: em *Mimosa foliolosa* e *Dalea melantha* as flores aparecem aleatoriamente nos ramos, enquanto que em *Dalea bicolor*, os indivíduos possuem em sua maioria apenas um tipo floral.

Tais observações são uma indicação de que *Pilostyles* pode variar sua expressão sexual em cada população, não sendo essa uma característica fixa de cada espécie. Assim, podemos inferir que a determinação do sexo nas flores da parasita não esta sujeita a um controle genético tão severo, mas sim seja uma característica plástica, podendo responder a fatores ambientais e/ou intrínsecos (como idade, tamanho, herbivoria, condição nutricional).

Devemos considerar ainda, sendo *Pilostyles* uma planta endoparasita, sua íntima associação morfofisiológica com a planta hospedeira. Segundo Stewart e Press (1990), em plantas holoparasitas como as Apodanthaceae, o crescimento e respostas reprodutivas são controlados por hormônios da planta hospedeira, uma vez que inexistem relatos de síntese dessas substâncias pelas parasitas. Desse modo, acredita-se que o controle da expressão sexual em *Pilostyles* esteja ligado também à condição nutricional de cada hospedeiro (Bickford *et al.* 2005), sendo os fatores

ambientais traduzidos por este através dos hormônios. A constância de padrões de distribuição, diferentes em cada espécie hospedeira, nos indica que cada espécie percebe o ambiente e o traduz de forma distinta. Outro indício vem do estudo de Dell e Burbidge (1981), que relata a ocorrência simpátrica de duas espécies hospedeiras, e uma distribuição de flores parasitas diferente em cada uma.

Se partirmos do pressuposto de que, em sua maioria, cada hospedeiro possui apenas um parasita, como o proposto por Vattimo (1971) e Dell e Burbidge (1981), poderíamos sugerir que:

- *Pilostyles ulei* é monóica, pois os hospedeiros possuem em sua maioria ambos os tipos florais em arranjo aleatório nos ramos (a ausência de flores estaminadas em alguns hospedeiros pode ser um artifício de coleta, visto que o número de flores é muito desigual nessa população).
- *Pilostyles thurberi* é monóica na hospedeira *Dalea melantha*, pois todos os hospedeiros possuem ambos os tipos florais em arranjo aleatório nos ramos.
- *Pilostyles thurberi* é dióica na hospedeira *Dalea bicolor*, pois a maioria dos hospedeiros possui apenas um tipo de flor.

Apesar de tais hipóteses serem plausíveis, não podemos admiti-las como únicas. A dificuldade em estudar a esporidade de *Pilostyles* resulta justamente da impossibilidade de delimitarmos um indivíduo parasita. Desse modo, iremos considerar também as hipóteses de que todas as espécies sejam monóicas ou dióicas na presente discussão.

A maioria dos autores defende uma condição dióica para a família Apodanthaceae (Kuijt 1969, Rutherford 1970, Vattimo 1971, Meijer 1993, Groppo *et al*. 2007). Se considerarmos que as espécies são dióicas, temos que considerar também que todos os hospedeiros da populações SC e SI, que possuem ambos os tipos florais no mesmo ramo, estão infectados por pelo menos 2 parasitas, um estaminado e outro pistilado. Tal suposição nos parece razoável, entretanto, como explicar a presença de

hospedeiros com apenas um tipo floral nas populações HC e LT? Nessas populações os hospedeiros possuem apenas um parasita cada? Parece-nos pouco provável que existam diferenças constantes quanto ao número de parasitas em cada hospedeiro nas diferentes populações. Acreditamos ser mais razoável a hipótese de que a distribuição das flores esteja diretamente relacionada à fisiologia de cada espécie hospedeira.

No oeste australiano, *P. hamiltonii* C. A. Gardner. parasita quatro gêneros de leguminosas: *Jacksonia, Oxylobium, Gastrolobium* e *Daviesia* (Dell & Burbidge 1981). Nos três primeiros gêneros de hospedeiras, os autores relatam que os indivíduos parasitados possuem flores pistiladas e estaminadas ocorrendo no mesmo ramo, e consideram então a parasita monóica. Em *Daviesia*, entretanto, não há um padrão definido: a maioria das espécies possui apenas um tipo de flor, mas em *D. angulata* Benth., por exemplo, existem populações de indivíduos com apenas um tipo floral e outras onde também ocorrem indivíduos com ambos os tipos de flores. Nesse caso os autores lançam a hipótese de que tais indivíduos estejam infestados por mais de uma parasita (dióica).

Nossos estudos mostram resultados semelhantes, entretanto dados adicionais levam à nova reflexão. Tomemos como exemplo *P. thurberi* parasitando *Dalea bicolor* (populações HC e LT): a maioria dos hospedeiros possui apenas um tipo de flor, estaminada ou pistilada, mas na localidade de LT existem ainda hospedeiros onde ambos os tipos florais aparecem. Esses indivíduos, sete ao total, apresentam um maioria de flores estaminadas; o número de flores pistiladas por hospedeiro raramente ultrapassa oito (de 50 coletadas). Seriam estas oito flores pertencentes a outra parasita, pistilada, que produz um número muito inferior de flores se comparada à estaminada, ou seriam pertencentes a uma parasita monóica? Igualmente, em *P. ulei*, podemos observar números discrepantes. Como indicado nos resultados, naqueles hospedeiros que possuem ambos os tipos florais, existe uma média de 5,91 flores

estaminadas. Novamente podemos questionar se essas 5,9 flores estaminadas representam um indivíduo, estaminado, ou se existe apenas um indivíduo monóico nestes hospedeiros.

Vattimo (1972), em estudo realizado com *P. stawiarskii* Vattimo-Gil no sul do Brasil, afirma que a presença de flores pistiladas e estaminadas no mesmo indivíduo é rara e, quando ocorre, tais flores ficam em "áreas contíguas, porém distintas", podendo-se delimitá-las. Em *P. ulei*, entretanto, não foi possível observar tal delimitação: em hospedeiros que possuem ambos os tipos florais, as flores estaminadas e pistiladas estão dispostas aleatoriamente ao longo dos ramos.

Tais observações, nomeadamente 1) presença de hospedeiros com apenas um tipo de flor e outros com ambos os tipos florais em uma mesma população, 2) flores de tipos diferentes dispostas aleatoriamente nos ramos, e 3) em densidades muito divergentes, abrem a possibilidade de formularmos a hipótese alternativa de que os indivíduos são monóicos em todas as populações. Nesse caso, deveríamos supor também que as espécies monóicas sejam plásticas, tendo a capacidade de ajustar o tipo de flores produzidas em cada população. Assim, naqueles hospedeiros que possuem apenas um tipo floral, devemos supor que o indivíduo parasita modificou sua alocação sexual de modo a produzir mais/somente flores estaminadas ou pistiladas, em um sistema reprodutivo que se assemelha à dioecia. Os indivíduos seriam monóicos, possuindo a capacidade de produzir ambos os tipos florais, mas produziriam apenas um tipo em resposta à estímulos específicos vindos de cada espécie hospedeira. Tal sistema reprodutivo, onde existem dois sexos inconstantes em uma população com flores diclinas, é chamado de paradioecia por Lloyd (1980), e representa estágio intermediário no caminho evolutivo entre monoecia e dioecia.

Tal situação pode ser verificada, por exemplo, na monóica *Atriplex halimus* L., espécie capaz de produzir até cinco tipos florais diferentes, combinações de flores estaminadas, pistiladas e monoclinas com arranjos distintos de verticilos estéreis

(Talamali *et al.* 2003). Segundo os autores a espécie classifica-se como plástica, estando a determinação do sexo ligada a fatores endógenos e ambientais, como duração do dia e intensidade luminosa. No estudo, os autores relatam a alta plasticidade dos indivíduos, existindo espécimes (monóicos) capazes de produzir somente flores pistiladas ou estaminadas, dependendo das condições ambientais a que foram expostos.

Em *Pilostyles*, além da possibilidade do padrão de distribuição das flores responder a estímulos específicos vindos de cada hospedeira, é possível também que as variações no sistema reprodutivo estejam ligadas à ploidia das populações. Em *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), por exemplo, as populações diplóides são dióicas enquanto as poliplóides são predominantemente monóicas, exibindo duas estratégias: 1) alguns indivíduos produzem sempre flores pistiladas e estaminadas, e 2) outros são plásticos, variando fases de produção de apenas flores estaminadas, com fases onde ambos os tipos florais são produzidos (Pannell 1997).

4.2. Razão sexual e estratégias reprodutivas

A razão sexual em *Pilostyles* aparece tendente às flores pistiladas em duas populações: SC (7,9:1,0) e SI (2,3:1,0). Tal tendência foge aos padrões descritos para a maioria das espécies com flores diclinas, onde a razão comumente é de 1:1 (Rottenberg 1998) na ausência de fatores que influenciem a razão sexual, como por exemplo, taxa de mortalidade diferencial (Delph & Wolf 2005). Desvios são esperados apenas quando os esporângios não estão igualmente adaptados à determinada condição ambiental, podendo então a razão sexual ser alterada para favorecer o esporângio mais bem sucedido (alocação sexual facultativa, Charnov & Bull 1977), aumentando a contribuição genética do indivíduo para as futuras gerações (Freeman *et al.* 1984).

Estudos anteriores do gênero *Pilostyles* mostram igualmente razões sexuais distorcidas. Vattimo (1971), analisando-se 100 hospedeiros de *P. stawiarskii*, encontrou 59 deles apenas com flores estaminadas e 41 com apenas flores pistiladas, registrando, portanto, razão sexual levemente tendente em direção às plantas estaminadas. Contrastando com tais resultados, Dell e Burbidge (1981) observaram que as flores pistiladas de *P. hamiltonii* aparecem em número duas a três vezes maior que as estaminadas naqueles hospedeiros que possuem ambos os tipos florais. Tais tendências, 1) razão ligeiramente tendente às estaminadas em populações cujos hospedeiros possuem apenas um tipo floral e 2) tendente às pistiladas naquelas com hospedeiros possuindo ambos os tipos de flores, estão de acordo com os resultados observados no presente estudo, analisando-se populações de *P. ulei* no Brasil e *P. thurberi* no México.

As hipóteses levantadas pelos autores para explicar tais tendências são: taxa de mortalidade diferencial (Vattimo 1971), e dificuldade de coleta das flores estaminadas, que possuiriam menor duração, destacando-se dos ramos logo após a polinização (Dell & Burbidge 1981). Essas características, apesar de terem sido observadas em outras espécies do gênero, poderiam servir de modelo para explicar a razão sexual desproporcional encontrada nas populações SC e SI. Entretanto, Freeman e colaboradores (1976) afirmam que a mortalidade diferencial é uma forma muito custosa de ajustar a razão sexual, e sugerem que o ajuste de acordo com as condições ambientais seja mais eficiente. De fato, não encontramos indícios de que hospedeiros infectados por flores estaminadas estejam debilitados e/ou vivenciem maior nível de estresse. Assim, como hipótese alternativa, podemos inferir que *Pilostyles* seja uma planta plástica (Lloyd 1979), sendo capaz de adaptar sua razão sexual às condições específicas de cada local, como quantidade de recursos disponíveis, densidade populacional e qualidade do polinizador.

Uma das teorias que explica como as plantas são capazes de perceber o ambiente ao redor e assim ajustar sua razão sexual foi proposta por Correns (1928), em estudo realizado com as dióicas *Silene alba* (Mill.) Krause e *Rumex acetosa* L. O autor demonstrou que a razão sexual de tais plantas pode ser alterada controlando-se a quantidade de pólen depositada no estigma das flores pistiladas ("pollination success"). Uma baixa densidade de grãos de pólen resultaria em uma prole com razão sexual próxima à igualdade ou levemente tendente às estaminadas, enquanto uma alta densidade resultaria em uma razão fortemente tendente às pistiladas. Tal fenômeno, denominado "Certation", seria o resultado do crescimento diferencial dos tubos polínicos carregando gametas com determinantes pistilados e estaminados. Os estudos subseqüentes de Conn e Blum (1981) e Stehlik e Barrett (2006) com plantas dióicas confirmam tal teoria. Lopez e Dominguez (2003), estudando a monóica *Begonia gracilis* Vilmorin-Andrieux, lançam a hipótese de que uma grande densidade de grãos de pólen no estigma poderia ser um indicativo de uma razão populacional tendente às estaminadas, então qualquer tendência do indivíduo em investir na função pistilada seria favorecida, resultando em um ajuste na razão sexual da próxima geração.

Considerando-se os resultados obtidos no presente estudo, nos parece razoável supor que tais fenômenos façam parte da estratégia reprodutiva das populações de *P. ulei* e *P. thurberi*. No caso daquelas populações com razão sexual tendente às flores pistiladas (SC e SI), é interessante notar que a maioria dos hospedeiros possui flores estaminadas e pistiladas ocorrendo no mesmo ramo, e as populações são relativamente densas (quando comparadas às demais). Tais fatores físicos, em adição à existência de um polinizador eficiente, poderiam estar influenciando positivamente o sucesso reprodutivo das espécies. Tomemos como exemplo *P. ulei*: estudos anteriores da equipe (vide capítulo I) revelaram a existência de nove espécies de insetos, principalmente himenópteros e dípteros, como possíveis

polinizadores. Tais insetos possuem padrão de forrageio semelhante: andam ao longo dos ramos da hospedeira, procurando pelas flores em antese e parando para coletar néctar. Tal comportamento aumenta em muito as chances de transporte efetivo dos grãos de pólen quando flores estaminadas e pistiladas encontram-se sobre o mesmo ramo, podendo inclusive resultar em uma grande quantidade de grãos depositados nos estigmas. Essa grande densidade, por sua vez, poderia ser o fator pelo qual, segundo a teoria de Correns (1928), tais populações apresentem a razão sexual inclinada em direção às flores pistiladas atual.

Independente do número desproporcional de flores estaminadas e pistiladas encontrado, é razoável supor que as populações em questão não experimentam restrição polínica. Assumindo que, em *P. ulei*, uma flor estaminada produza pólen suficiente para fecundar 7,9 flores pistiladas e que os recursos não sejam limitantes, provavelmente a razão sexual seja resultado de uma busca por maximizar a quantidade de sementes produzidas. Tal suposição estaria de acordo com a teoria de "Maximum seed set" de Kaplan (1972), que prediz que a razão sexual é selecionada de modo a maximizar a quantidade de sementes produzidas, sendo esta alcançada com um maior número de flores estaminadas em populações com alta densidade, e com aproximada igualdade em menores densidades.

Essa aproximada igualdade pode ser visualizada naquelas populações ligeiramente tendentes às estaminadas (HC e LT). Ambas possuem hospedeiros com apenas um tipo de flor, estaminadas ou pistiladas, o que impõe uma primeira barreira física à polinização. Parece-nos provável que tais populações sofram de restrição polínica, não pela falta de pólen disponível, mas devido ao padrão de forrageio do polinizador. Uma baixa densidade de grãos de pólen nos estigmas, igualmente considerando-se a teoria de Correns (1928), resultaria nas razões ligeiramente tendentes às estaminadas observadas. Na população HC, que apresenta a razão sexual mais inclinada, além dos hospedeiros possuírem apenas um tipo de flor, eles

encontram-se muito dispersos na população, fatores que dificultam mais ainda o sucesso da polinização. É razoável, nesse caso, a seleção por uma população com maior número de flores estaminadas, aumentando a quantidade de pólen disponível e, portanto, sua probabilidade de alcançar o estigma das flores pistiladas.

4.3. Constância de flores monoclinas

As flores monoclinas aparecem em todas as populações estudadas, no Brasil e no México, sempre em pequena porcentagem, variando de 0,65% a 1,76% do total de flores coletadas. Apesar dos pequenos números, parece haver certa constância, de modo que sua existência não pode ser considerada como um evento isolado.

Existem relatos da ocorrência de flores monoclinas tanto em espécies dióicas quanto monóicas diclinas. O estudo de Ehlers e Bataillon (2007) revisa a ocorrência de indivíduos monóicos (monoclinos ou diclinos) em espécies dióicas, numa condição onde três gêneros coexistem na mesma população (subdioecia). Segundo os autores, na maioria das famílias, esses indivíduos possuem genótipo masculino, plástico, sendo os indivíduos capazes de produzir flores monoclinas denominados “inconstant males”. De maneira similar, na dióica *Rumex acetosa*, foram encontrados indivíduos capazes de produzir flores estaminadas e monoclinas (Ainsworth *et al.* 2005).

Levando-se em consideração o padrão de floração de *Pilostyles*, com a produção de centenas de flores em cada ramo, o pequeno número de flores monoclinas observadas em cada hospedeiro (máximo 2 em HC, 3 em SC, 4 em SI e 14 em LT) é uma forte indicação de que tais flores não são produzidas por um indivíduo específico, mas sim por indivíduos geneticamente estaminados ou pistilados (em uma população dióica), ou por indivíduos monóicos. Nas populações HC e LT, as flores monoclinas aparecem somente naqueles hospedeiros que possuem apenas

flores estaminadas, podendo este ser um indício de que tais flores são geneticamente estaminadas nessas populações.

Além disso, a meiose ocorre somente no microsporângio, enquanto o desenvolvimento do megasporângio cessa na fase de células mãe de megásporos. Dessa maneira, podemos considerar as flores monoclinas nestas espécies como funcionalmente estaminadas, uma vez que contribuem geneticamente para a próxima geração apenas através dos grãos de pólen.

5. CONCLUSÕES

Os relatos supracitados deixam claro que a determinação do sexo nas plantas é um processo que envolve muitas variáveis, sejam elas genéticas ou ambientais, e que tais fatores devem ser considerados em conjunto quando da análise do sistema reprodutivo de qualquer espécie. Segundo o entendimento deste grupo de pesquisa, os fenótipos observados devem ser analisados cuidadosamente, pois os sistemas de classificação por nós criados são limitados, em contraste com uma gama enorme de possibilidades existentes na natureza. Podemos concluir que:

- *Pilostyles* apresenta ciclo de vida diretamente relacionado à fisiologia da planta hospedeira, fato que se reflete no seu sistema reprodutivo.
- A distribuição das flores nos ramos hospedeiros é isofásica ascendente, estando os botões florais próximos ao ápice caulinar, seguidos de uma região com flores abertas e, mais abaixo, cicatrizes no córtex deixadas pela queda dos frutos/flores secas.
- Quando as flores estaminadas e pistiladas ocorrem no mesmo ramo hospedeiro, elas encontram-se dispersas de modo aleatório; não se observou nenhuma tendência, como o aumento de algum dos tipos de flor em direção ao ápice ou base dos ramos.
- As espécies de *Pilostyles* estudadas exibem alta plasticidade, sendo capazes de modificar sua expressão sexual em cada população.
- A determinação do sexo nas flores depende de fatores ambientais e/ou intrínsecos, independentes da espécie parasita em questão, mas que parecem responder a estímulos específicos de cada espécie hospedeira.
- A razão sexual é ligeiramente tendente às flores estaminadas em populações cujos hospedeiros possuem apenas um tipo floral, e tendente às pistiladas naquelas com hospedeiros possuindo ambos os tipos de flores.
- As flores monoclinas são funcionalmente estaminadas e aparecem em proporção constante em todas as populações estudadas. Pelo menos nas

localidades de “Hacienda El Ciervo” e “Los Trigos” (Querétaro – México), elas parecem ser formadas a partir de indivíduos geneticamente estaminados.

Com certeza tais dados merecem destaque pelo ineditismo para a literatura atual da família Apodanthaceae. Entretanto, apesar do grande número de características estudadas, acreditamos que o sistema reprodutivo de *Pilostyles* só poderá ser completamente compreendido a partir do momento que formos capazes de delimitarmos um indivíduo. Seria interessante investir em estudos que elucidem tal tópico crucial, como, por exemplo, análises de variabilidade genética. Pode-se citar o estudo realizado por Garcia-Franco e colaboradores (1998), com a também endoparasita *Bdallophyton bambusarum,* por possuir grande potencial de aplicação em *Pilostyles*.

Outros estudos necessários quanto ao sistema reprodutivo de *Pilostyles* são: 1) análise da razão sexual no começo, meio e fim da estação de floração, e entre anos diferentes, para verificar se números se mantém constantes; 2) análise da ploidia nas diferentes populações, a fim de verificar se tais fatores genéticos tomam parte na determinação do sistema reprodutivo das espécies estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, C.; RAHMAN, A.; PARKER, J. & EDWARDS, G. 2005. Intersex inflorescences of *Rumex acetosa* demonstrate that sex is unique to each flower. *New Phytologist* 165: 711-720.

AMARAL, M.M. 2007. A estrutura da angiosperma endoparasita *Pilostyles ulei* (Apodanthaceae): interface e impacto no lenho de *Mimosa* ssp. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BICKFORD, C.P.; KOLB, T.E. & GEILS, B.W. 2005. Host physiological condition regulates parasitic plant performance: *Arceuthobium vaginatum* subsp. *cryptopodum* on *Pinus ponderosa*. *Oecologia* 146: 179–189.

BLARER, A., NICKRENT, D.L. & ENDRESS, P.K. 2004. Comparative floral structure and systematics in Apodanthaceae (Rafflesiales). *Plant Systematics and Evolution* 245: 119-142.

BLASSINGAME, J.L. 1968. Revision of the genus *Pilostyles* in the southwestern United States. Dissertação de mestrado, Graduate Faculty of Texas Technological College, Texas.

CHARNOV, E. & BULL, J.J. 1977. When is sex environmental determined? *Nature 266*: 828-830.

CEA QUERETARO, Comission Estatal De Aguas. 2009. Disponível em <http://www.ceaqueretaro.gob.mx/index>.

CONN, J.S. & BLUM, U. 1981. Sex ratio of *Rumex hastatulus*: the effect of environmental factors and certation. *Evolution 35(6)*: 1108-1116.

CORRENS, C. 1928. Bestimmung, Vererbung and Verteilung des Geschlechtes bei den hoheren Pflanzen. *Handb. Vererbungsw*. 2: 1-138.

ENDRISS, W. 1902. Monographie von *Pilostyles ingae* (Karst.) (*Pilostyles ulei* Solms-Laubach). *Flora* 91: 209-236.

DELL, B. & BURBIDGE, H. 1981. Notes on the biolgy of *Pilostyles* (Rafflesiaceae) in Western Australia. *W. Austr. Herb. Res. Notes* 5: 71-79.

DELL, B., KUO, J. & BURBIDGE, H. 1982. Anatomy of *Pilostyles hamiltonii* C. A. Gardner (Rafflesiaceae) in stems of *Daviesia*. *Australian Journal of Botany* 30: 1-9.

DELPH, L.F. & WOLF, D.E. 2005. Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist 166*: 119-128.

EHLERS, B.K. & BATAILLON, T. 2007. 'Inconstant males' and the maintenance of labile sex expression in subdioecious plants. *New Phytologist* 174: 194-211.

FEDER, N., & O'BRIEN, T.P. 1968. Plant Microtechnique: Some Principles and New Methods. *American Journal of Botany 55* (1): 123-142.

FREEMAN, D.C., McARTHUR, E.D. & HARPER, K.T. 1984. The adaptive significance of sexual lability in plants using *Atriplex canescens* as a principal example. *Annals of the Missouri Botanical Garden 71*: 265-277.

FREEMAN, D.C., KLIKOFF, L.G. & HARPER, K.T. 1976. Differential resource utilization by the sexes of dioecious plants. *Science 193*: 597-599.

GARCIA-FRANCO J.G.; SOUZA, V.; EGUIARTE, L.E. & RICO-GRAY, V. 1998. Genetic variation, genetic structure and effective population size in the tropical holoparasitic endophyte *Bdallophyton bambusarum* (Rafflesiaceae). Plant Systematics and Evolution 210:271-288.

GOMES, A.L. & FERNANDES, G.W. 1994. Influence of parasitism by *Pilostyles ingae* (Rafflesiaceae) on its host plant, *Mimosa maguirei* (Leguminosae). *Annals of Botany* 74: 205-208.

GROPPO, M., AMARAL, M.M. & CECCANTINI, G.C.T. 2007. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Apodanthaceae (Rafflesiaceae *s.l.*), e notas sobre a anatomia de *Pilostyles*. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25 (1): 81-86.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2007. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/>.

KAPLAN, S.M. 1972. Seed production and sex ratio in anemophilous plants. *Heredity 28*: 281-285.

KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KUIJT, J. *The biology of parasitic flowering plants*. California: University of California Press, 1969.

KUIJT, J., BRAY, D. & OLSON, A.R. 1985. Anatomy and ultrastructure of the endophytic system of *Pilostyles thurberi* (Rafflesiaceae). *Canadian Journal of Botany* 63: 1231-1240.

LLOYD, D.G. 1979. Parental strategies of angiosperms. *New Zealand Journal of Botany 17*: 595-606.

LLOYD, D.G. 1980. The distributions of gender in four angiosperm species illustrating two evolutionary pathways to dioecy. *Evolution* 34: 123-134.

LÓPEZ, S. & DOMÍNGUEZ, C.A. 2003. Sex choice in plants: facultative adjustment of the sex ratio on the perennial herb *Begonia gracilis*. *Journal of evolutionary biology 16*: 1177-1185.

MEIJER, W. 1993. Rafflesiaceae. pp. 557-563 *In*: Kubitzki, K. [ed.]. *The families and genera of vascular plants*. 2. Flowering plants. Dicotyledons. Berlim: Springer.

NICKRENT, D.L. 2002. *Parasitic plants of the world*. Chapter 2, pp. 7-27 *In*: J.A. López-Sáez, P. Catalán and L. Sáez [eds.]. Parasitic plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. Madrid: Mundi-Prensa.

PANNELL, J. 1997. Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Merculiaris annua*. *Heredity* 78: 50-56.

PRESS, M.C., GRAVES, J.D. & STEWART, G.R. 1990. Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant, Cell and Environment* 13: 91-104.

RED NACIONAL DE ESTACIONES ESTATALES AGROCLIMATOLÓGICAS. 2009. Disponível em <http://clima.inifap.gob.mx/redclima/default.aspx>.

ROTTENBERG, A. 1998. Sex ratio and gender stability in the dioecious plants of Israel. *Botanical Journal of the Linnean Society 128*: 137-148.

RUTHERFORD, R.J. 1970. The anatomy and cytology of *Pilostyles thurberi* Gray (Rafflesiaceae). *Aliso* 7 (2): 263-288.

SOLMS-LAUBACH, H. 1974. Ueber den thallus von *Pilostyles haussknechtii*. *Bot. Zeitung* (Berlin) 32: 49-59.

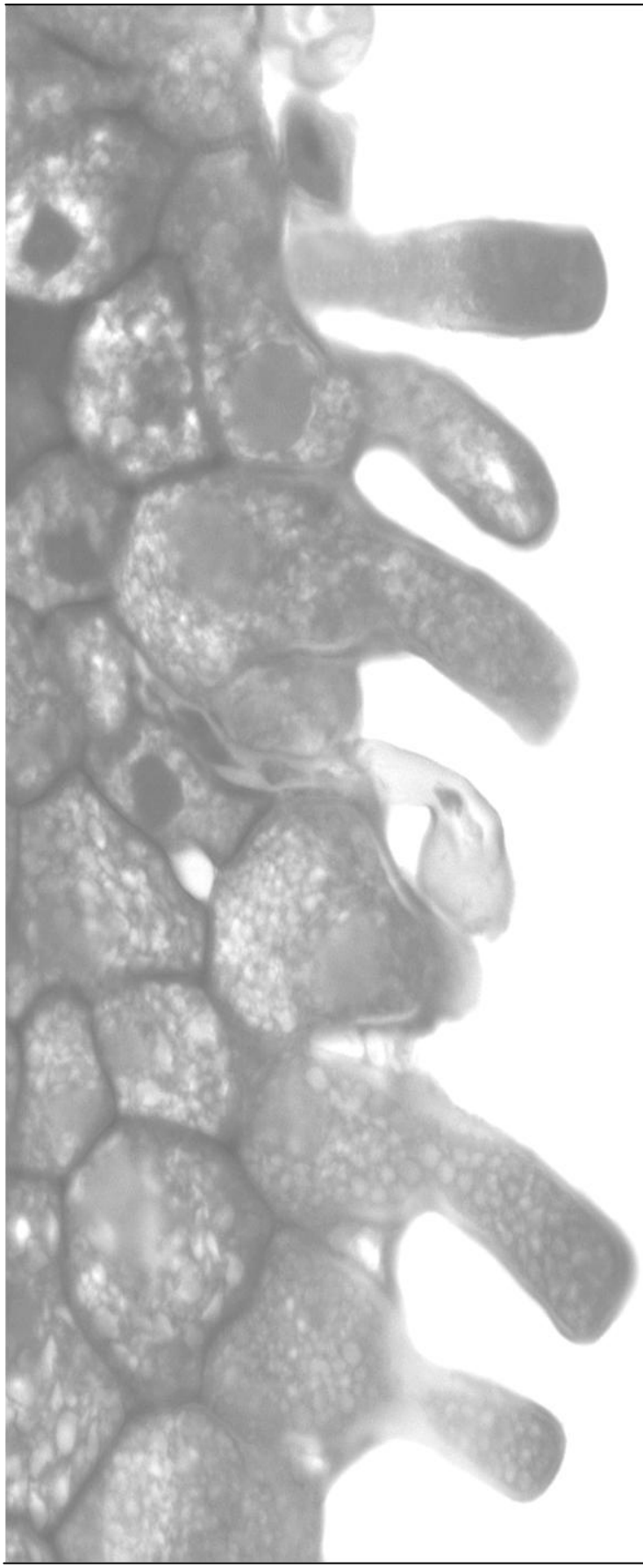
SOLMS-LAUBACH, H. 1975. Das haustorium der Loranthaceen und der thallus der Rafflesiaceen und Balanophoreen. *Abh. Naturf. Ges. Halle* 13: 238-276.

STEHLIK, I. & BARRETT, S.C.H. 2006. Pollination intensity influences sex ratios in dioecious *Rumex nivalis*: a wind-pollinated plant. *Evolution* 60: 1207–1214.

TALAMALI, A.; BAJJI, M.; Le THOMAS, A.; KINET, J-M. & DUTUIT, P. 2003. Flower architecture and sex determination: how does *Atriplex halimus* play with floral morphogenesis and sex genes? *New Phytologist* 157: 105-113.

VATTIMO, I. 1971. Contribuição ao conhecimento da tribo Apodanthea R. Br. Parte I – Conspecto das espécies (Rafflesiaceae). *Rodriguésia* 26 (38): 37-62.

VATTIMO, I. 1972. Raflesiáceas. *In*: R. Reitz [ed.] *Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues*. Itajaí.



CAPÍTULO III

MORFOLOGIA E ANATOMIA FLORAL

1. INTRODUÇÃO

A família Apodanthaceae, além de possuir corpo vegetativo reduzido, apresenta flores com morfologia altamente especializada. Estudos anteriores relatam a existência de flores pistiladas e estaminadas, na maioria das vezes ocorrendo em indivíduos hospedeiros separados, fato pelo qual se acredita ser a família dióica (Kuijt 1969, Rutherford 1970, Vattimo 1971, Meijer 1993, Groppo *et al.* 2007). No capítulo II do presente estudo, além de termos observado a presença de diferentes padrões de distribuição das flores em cada população, observou-se a existência de flores monoclinas. Tais flores aparecem em porcentagem muito pequena nas populações (de 0,65% a 1,76%), sendo sua descoberta resultado do grande número de flores examinadas quando da análise da razão sexual em *Pilostyles*. Inédita para a família Apodanthaceae, tal descoberta abre a possibilidade para novos estudos, não só a nível populacional, mas também morfo-anatômicos e ontogenéticos, que visem elucidar a morfologia floral altamente especializada da família.

Especula-se que ao longo da evolução ocorreram eventos de fusão e redução, de modo que a morfologia floral atual da família seja bastante particular, de difícil interpretação. As flores são pequenas (2,0-3,0 mm de diâmetro), globosas a ovóides, semelhantes a botões dispostos regularmente ao longo dos ramos da hospedeira (Groppo *et al.* 2007).

Nas flores estaminadas, o androceu consiste em um sinândrio tubular, formado por dois a quatro anéis/séries de sacos polínicos adnatos ou não (*Berlinianche*) à uma coluna central, que acredita-se representar o gineceu estéril. Não há formação de estames tetrasporangiados, característicos da maioria das angiospermas (Endress 1994), nem tampouco os esporângios encontram-se organizados em pares ou em grupos de quatro. Fatores adicionais, como número variável de anéis e de esporângios (Vattimo 1971, 1972), dificultam uma interpretação, de modo que até o momento se desconhece o número de anteras a partir do qual essa estrutura evoluiu.

As flores pistiladas, externamente semelhantes às estaminadas, possuem ovário ínfero ou semi-ínfero, disco epígino carnoso e estilete cônico a cilíndrico. A maioria dos autores acredita que o gineceu é tetracarpelar (Kuijt 1969, Blarer *et al*. 2004, Groppo *et al.* 2007), mas o número de placentas parietais, que é variável mesmo dentro de cada indivíduo, abre brecha para outras interpretações. Os rudimentos seminais são anátropos e bitegumentados (Bouman & Meijer 1994). Na região subapical do estilete (também referido como coluna central), existe um anel de papilas fortemente secretoras (Blarer *et al*. 2004); no ápice deste, porém, faltam essas papilas, e não se sabe ao certo delimitar a superfície estigmática receptiva (Kuijt 1969, Vattimo 1971).

Um nectário carnoso, anular, preenche o espaço entre o perigônio e a coluna, nas flores de ambos os tipos. As estruturas reprodutivas são envolvidas por três verticilos de órgãos estéreis, que são morfologicamente indistintos, fato que levou à formulação de diferentes hipóteses. Blarer e colaboradores (2004), em um estudo de morfologia floral em Apodanthaceae, lançam duas hipóteses sobre a natureza desses verticilos: 1) os verticilos são constituídos por brácteas, cálice e corola isômeros ou 2) os dois verticilos mais externos são constituídos por brácteas e o interno por sépalas (como naquelas Malvales que não possuem pétalas). Vattimo (1971) acredita que eles sejam formados por tépalas ou, quando há diferenciação morfológica entre as peças de verticilos diferentes, sépalas e pétalas. Já Meijer (1993) as denomina de brácteas tepalóides. Diversos autores lançam outras hipóteses, mas parece que ainda não existe um consenso a respeito da natureza dessas peças florais, o que dificulta em muito a detecção de homologias com outros grupos de angiospermas.

Desde os primeiros sistemas de classificação, os caracteres morfológicos vêm sendo utilizados para inferir parentesco entre os organismos. Ultimamente, entretanto, um número enorme de novas e sofisticadas técnicas estão disponíveis para determinar a relação entre os taxa, como por exemplo: análise de proteínas, técnicas

de cromatografia, de hibridização do DNA e análise molecular. Dessa maneira, está sendo realizada uma reinterpretação do conhecimento disponível, levando a mudanças, às vezes inesperadas, nos sistemas de classificação existentes (Bhattacharyya & Johri 1998).

Um dos maiores desafios dos sistematas atuais é a interpretação dos eventos de convergência e reversão que ocorreram durante a evolução dos organismos, e que acabam levando a classificações de parentesco equivocadas. Outras dificuldades muito recorrentes são as modificações estruturais extremas que sofreram determinadas plantas, como as holoparasitas endoparasitas.

No sistema de classificação de APG II (2003), sete dos 18 taxa de posição incerta representam plantas holoparasitas. As maiores dificuldades encontradas no estudo molecular dessas plantas são (Nickrent *et al*. 2004, Barkman *et al.* 2007):

1) impossibilidade de obter-se DNA do cloroplasto (plantas aclorofiladas);

2) DNA nuclear com taxa de mutação que pode ser até 3 vezes maior que nas plantas fotossintetizantes;

3) DNA mitocondrial, onde relatam-se casos de transferência horizontal de genes entre o hospedeiro e parasita.

Observa-se que os três compartimentos que abrigam DNA nas células das holoparasitas possuem características particulares, representando um desafio aos estudos moleculares. Tais dificuldades refletem-se no insucesso destes estudos, que recentemente tentaram posicionar a família. Em um estudo de Nickrent e colaboradores (2004), o posicionamento da família Apodanthaceae variou dependendo da análise molecular utilizada: a partir da análise do DNA nuclear a família foi posicionada próximo a Malvales e, a partir do DNA mitocondrial, próximo a Cucurbitales. No estudo de Barkman e colaboradores (2007), baseado na análise de três genes mitocondriais, Apodanthaceae foi posicionada dentro de Cucurbitales,

entretanto os autores admitem o nível de confiança do posicionamento como sendo baixo, devido à múltiplos eventos de transferência horizontal de genes que teriam ocorrido entre a espécie parasita e seu hospedeiro dificultando as análises.

Nos trabalhos de Souza e Lorenzi (2008) e Stevens (2001 em diante), a família aparece incluída na ordem Cucurbitales, entretanto, na recente filogenia de APG III (2009), ela continua em grupo não resolvido, de posição incerta junto às demais Angiospermas.

Tendo em vista as dificuldades impostas por este grupo de holoparasitas aos sistematas atuais, que resultaram na formulação de cladogramas com baixo nível de confiança e divergentes, fica claro que é necessário um retorno às origens, quando o parentesco entre os organismos era inferido utilizando-se ferramentas como a morfologia e anatomia. Tais estudos, além de serem escassos para a família Apodanthaceae, são também antigos, podendo-se citar o trabalho de Endriss (1902) como o mais detalhado até o momento.

É de entendimento deste grupo de pesquisa que, assim como as técnicas moleculares evoluíram, aquelas aplicadas ao estudo da morfologia e anatomia também, com novos e mais potentes microscópios e técnicas aperfeiçoadas de inclusão e coloração na histologia. Visto isso, faz-se necessário um amplo e detalhado estudo na família, não só quanto à morfologia e anatomia floral de *Pilostyles*, mas também quanto à sua ontogênese. Tal estudo é particularmente importante no caso dessas plantas, cujo corpo vegetativo é extremamente reduzido, proporcionando uma oportunidade única de entender o processo evolutivo das flores e estabelecer homologias com outros grupos de angiospermas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Espécies e locais de coleta

Foram estudadas uma população do gênero *Pilostyles* no Brasil, Estado de Minas Gerais, e duas populações no México, Estado de Querétaro (Fig. 14). As espécies e localidades de coleta estão especificadas a seguir:

- *Pilostyles ulei* Solms-Laubach

  Propriedade Mãe d'água do IBAMA, no quilômetro 103 da rodovia MG-010, coordenadas S 19º18'27,8", W 43º 36' 11,6". Propriedade localizada em área de campo rupestre no Parque Nacional da Serra do Cipó, região central do Estado de Minas Gerais, Brasil. No local, *Pilostyles ulei* parasita indivíduos de *Mimosa foliolosa* Benth. var. *multipinna* (Benth.) Barneby e de *M. maguirei* Barneby.

- *Pilostyles thurberi* A. Gray

  Espécie coletada em duas localidades no Estado de Querétaro, México: 1) Propriedade privada Hacienda El Ciervo, município de Tequisquiapan, altitude de 2000m e coordenadas S 20º27'05,9", W 99º52'09,3"; 2) Base do Cerro Zamorano, localidade Los Trigos, Município de Colón, em vegetação do tipo Matorral Sub-montano, altitude de 2660m e coordenadas S 20º54'63,8", W 100º12'01". Em ambas as localidades *P. thurberi* parasita indivíduos de *Dalea bicolor* Willd.

2. 2. Análise histológica

Quanto à anatomia floral, foram selecionados ramos hospedeiros com botões parasitas em diferentes estádios de desenvolvimento, desde pequenas elevações na periderme hospedeira até flores completamente desenvolvidas.

O material coletado em campo foi reduzido a pequenos fragmentos (contendo casca hospedeira e botões florais parasitas) e fixado em uma solução de glutaraldeído e formaldeído em tampão fosfato de sódio 0.1M , pH 7,2 (McDowell & Trump 1976) e/ou fixador FAA 50% (Johansen 1940), permanecendo sob pressões negativas por no mínimo 48h.

Em laboratório, parte do material foi desidratada em série etílica crescente (etanol 10% a 95%), incluída em resina hidroxietilmetacrilato (conforme especificações do fabricante, Kit Leica Historresin®), secionada transversal e longitudinalmente com navalha de vidro de 6-8mm em micrótomo de rotação Reichert & Jung (modelo AutoCut 2040) com espessura de corte de 5-8µm. As seções foram montadas em lâminas de vidro para microscopia e coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4 (Feder & O' Brien 1968) e/ou Azul de Astra e Fucsina Básica (Kraus *et al.* 1998).

Outra parte foi incluída utilizando-se as técnicas usuais em parafina, secionada transversal e longitudinalmente com navalha de aço em micrótomo de rotação Leica (modelo RM2125RT) com espessura de corte de 8-10µm. As seções foram montadas em lâminas de vidro para microscopia e coradas com Safranina e Verde Rápido (conforme adaptações sugeridas por Kraus & Arduin 1997).

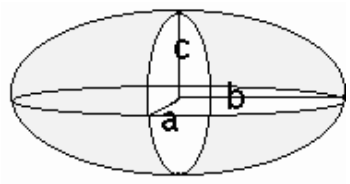
2. 3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise dos botões florais em Microscopia Eletrônica de Varredura, foram selecionados ramos hospedeiros com botões parasitas em diferentes estádios de desenvolvimento. Tais amostras foram reduzidas a pequenos fragmentos e dissecadas de modo a expor os pequenos botões que ainda encontravam-se sob a periderme da hospedeira. Durante a dissecção, alguns botões tiveram as peças dos verticilos mais externos retiradas de modo a evidenciar o desenvolvimento dos demais verticilos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente

(etanol 10% a 100%) e dessecadas em ponto crítico. Sob microscópio estereoscópio, as amostras foram posicionadas em suportes de alumínio com o auxílio de fita adesiva dupla-face, sendo posteriormente metalizadas com ouro para análise sob Microscópio Eletrônico de Varredura.

2. 4. Análise de regressão linear

Para analisar se existe alguma relação, direta ou inversamente proporcional, entre o desenvolvimento dos esporângios, trinta flores monoclinas foram analisadas e separadas em morfotipos. As flores foram secionadas longitudinalmente e medidas sob microscópio estereoscópio quanto ao comprimento e largura do lóculo e número de sacos polínicos. O volume do lóculo foi calculado aplicando-se a seguinte fórmula, específica para elipsóides, onde se admitiu serem os valores de *a* e *c* iguais (elipsóide regular):



Volume = 4/3 * π * a/2 * b/2 * c/2

Posteriormente foram realizadas análises de regressão linear para verificar se existe correlação entre as dimensões do lóculo (comprimento, largura, razão comprimento/largura e volume) e o número de sacos polínicos.

3. RESULTADOS

As flores pistiladas e estaminadas de *P. ulei* e *P. thurberi* possuem morfologia e anatomia semelhantes. Os resultados abaixo referem-se em sua maioria às flores de *P. ulei,* espécie analisada em maior detalhe no presente estudo. A fim de evitar repetições, somente as características ainda não descritas ou conflitantes observadas nas flores de *P. thurberi* serão mencionadas.

3. 1. Verticilos estéreis

As flores pistiladas, estaminadas e monoclinas de *Pilostyles* (Fig. 19.a-c) são envolvidas por três verticilos de órgãos estéreis morfologicamente indistintos (Fig. 19.d). Como não existem informações sobre sua natureza e no intuito de evitar quaisquer interpretações, as peças serão referidas como escamas durante a apresentação dos resultados.

As escamas de todos os verticilos são livres, persistentes no fruto e aderem-se à flor em variadas posições, constituindo verticilos mais ou menos discretos. Os verticilos exteriores possuem escamas com coloração castanho-purpúrea uniforme, ligeiramente mais clara na face adaxial. Diferentemente, aquelas do verticilo interno possuem coloração creme e listra/banda central púrpura (Fig. 19.e). Em todas as escamas as margens são inteiras, ocorrendo ocasionalmente ápices trilobados nos verticilos externo e médio (Fig. 19.f).

O verticilo externo é constituído por dois tipos de escamas, diferentes quanto à sua morfologia e região de inserção. Existem duas escamas mais externas alternando com duas internas. As escamas externas são arredondadas (orbiculares a elípticas), de comprimento médio de 2,32mm e largura 1,69mm e região de inserção ampla (Fig. 20.a, 20.e). As mais internas possuem formato obovado, com base atenuada (Fig. 20.b, 20.f), comprimento médio de 2,46mm e largura 1,62mm, região de inserção

estreita e levemente acima no eixo da flor. Tais escamas se desenvolvem em momentos distintos, sendo as escamas mais externas responsáveis por proteger o botão floral em seu caminho através da casca hospedeira (Fig. 19.g, 19.h).

Verticilo médio tetrâmero com escamas de formato alongado, aproximadamente oblongo (com bordos paralelos por certa distância) e base obtusa (Fig. 20.c). Possuem comprimento médio de 2,31mm e largura 1,44mm. A região de inserção possui formato triangular (Fig. 20.g), aderindo-se à parede do ovário em posição mediana, próximo à região de inserção do verticilo interno. Às vezes as escamas não se tocam nos bordos (pré-floração valvar), sendo mais comum a pré-floração imbricada.

Verticilo interno alternando com o verticilo médio, tetrâmero, com escamas de formato obovado/espatulado e base atenuada (Fig. 20.d). Possuem comprimento médio de 2,3mm e largura 1,62mm. A região de inserção é curta, truncada (Fig. 20.h), aderindo-se à flor logo abaixo do nectário anular. Pré-floração imbricada.

A análise anatômica das escamas de *Pilostyles* mostra que existe pouca variação entre os verticilos externo e interno. Em *P. ulei* todas as escamas são constituídas de células com características parenquimáticas, não sendo possível fazer uma distinção clara entre epiderme e mesofilo. As escamas possuem de 5-7 camadas de células na sua região mais basal, afilando em direção às margens e ápice, onde observamos 1-2 camadas (Fig. 21.a). Não foram observados feixes vasculares. Diferentemente, em *P. thurberi,* as células epidérmicas da face abaxial possuem formato papiloso (Fig. 21.b), e cada escama é vascularizada por um feixe ventral, que não se estende além da região mediana de cada peça. Os feixes localizam-se próximo à superfície adaxial e possuem organização simples, com poucos elementos vasculares (Fig. 21.c). Nas duas espécies o mesofilo parece ser homogêneo, tendo sido observado leve aumento no tamanho das células parenquimáticas em direção à face abaxial.

As escamas são glabras. Em ambas as espécies, estômatos estão presentes somente na superfície abaxial (Fig. 21.d, 21.e), sendo mais comuns nos verticilos mais externos. Não puderam ser observadas células subsidiárias que se diferenciem das demais células epidérmicas. Nas flores pistiladas de *P. ulei*, estômatos estão presentes também no estilete.

Foram observadas variações no número de peças presentes em cada verticilo. De 50 flores analisadas, sete apresentaram variações em apenas um dos verticilos, em dois, ou nos três (Tabela 6). Em todos os casos a delimitação dos verticilos fica prejudicada: parece haver um gradiente de diferenciação morfológica entre as peças, que também podem estar dispostas em um arranjo mais ou menos espiralado. Em algumas flores foram observados verticilos trímeros, pentâmeros e heptâmeros (além dos demais tetrâmeros usuais) e em outras os três verticilos sofreram alteração, sendo observada uma flor com 3 verticilos trímeros e outra com 3 pentâmeros. Em *P. thurberi* puderam ser observadas escamas do verticilo interno que parecem na verdade a fusão de duas peças (Fig. 21.f), possuindo aproximadamente o dobro da largura das demais escamas do mesmo verticilo e presença de dois feixes vasculares (Fig. 21.g).

3. 2. Flores pistiladas

As flores pistiladas (Fig. 22.a) possuem disco epígino carnoso, ovário semi-ínfero, tetracarpelar e unilocular. O estilete é curto, variando de cônico a cilíndrico, sendo atravessado em todo seu comprimento por uma fenda estreita (Fig. 22.b), que leva até o único lóculo. Tal fenda é resultado da não-fusão dos primórdios dos carpelos durante a ontogênese do gineceu, e é delimitada internamente por tecido transmissor. Na região subapical do estilete existe um anel de papilas fortemente secretoras (Fig. 22.c). Essas papilas são células com aproximadamente 80 µm de comprimento e com ápice mais ou menos truncado (Fig. 22.d). O citoplasma é denso e o núcleo proporcionalmente grande e localizado próximo à base da célula.

No ápice do estigma, porém, faltam essas papilas (Fig. 22.b), fato que levou alguns autores a indagar qual seria a superfície estigmática receptiva. A análise histológica de flores pistiladas após antese permitiu a visualização, pela primeira vez documentada na família, de grãos de pólen em germinação. Foi observado que os grãos de pólen ficam aderidos na região onde se encontram as papilas, provavelmente devido à alguma substância secretada por estas. O tubo polínico penetra por entre as papilas, de modo apoplástico (Fig. 22.d). Uma vez que não pôde ser visualizada germinação no ápice do estigma (região não papilosa), acredita-se que a superfície receptiva esteja restrita à área das papilas.

Durante a ontogênese das flores pudemos observar que inicialmente o ápice do primórdio do gineceu apresenta apenas uma fenda estreita (Fig. 23.a). Em flores mais desenvolvidas, pode-se observar que no ápice do estigma formam-se lobos mais ou menos independentes. Tais lobos aparecem em número variável, de três (Fig. 23.b), quatro (Fig. 23.c) a cinco (Fig. 23.d), sendo a condição tetrâmera aparentemente mais comum.

Variabilidade semelhante pode ser observada também nas regiões de placentação. As placentas não percorrem toda a extensão do lóculo, estando irregularmente distribuídas no interior da parede do ovário. A variabilidade nas regiões de placentação é observada entre flores de uma mesma planta e inclusive em diferentes alturas no ovário de uma única flor. Desse modo, em cortes transversais em variadas alturas pode-se observar as presença de três (Fig. 23.e), quatro (Fig. 23.f) a cinco placentas (Fig. 23.g).

3. 3. Flores estaminadas

Nas flores estaminadas de *Pilostyles* (Fig. 24.a) não existe uma diferenciação morfológica dos estames em filetes e anteras. O androceu consiste em um sinândrio

tubular, que envolve uma coluna central (também referida como gineceu estéril), sendo totalmente fusionado a esta. No ápice desta estrutura existem duas séries/anéis de sacos polínicos, sendo o anel inferior com diâmetro ligeiramente maior que o superior (Fig. 24.b). Não há superposição nem alternância perfeita entre os sacos de anéis diferentes. Além disso, eles aparecem em número variável em cada anel: o anel superior (Fig. 24.c) possui em média 13 sacos polínicos, e o inferior (Fig. 24.d), 16.

Até o momento, nos parece difícil realizar qualquer inferência quanto à origem dos sacos polínicos em *Pilostyles ulei*, uma vez que muitas variações foram encontradas nas flores estaminadas analisadas. Verificou-se a existência de anéis incompletos (Fig. 25.a), de três anéis em algumas áreas (Fig. 25.b) e de sacos polínicos aparentemente abortados (Fig. 25.c) em outras.

Analisando-se flores estaminadas antes da deiscência podemos observar alguns sacos polínicos confluentes, tanto no mesmo anel (Fig. 25.d), quanto entre anéis diferentes. A linha de deiscência é transversal ao eixo da flor, e individual para cada saco polínico (Fig. 25.e). Após a abertura de todos os sacos polínicos, uma porção da parede externa se destaca da flor, dando a impressão de que a linha de deiscência é comum entre os sacos de anéis adjacentes (Fig. 25.f). O septo que separa os anéis superior e inferior pode ainda dissolver-se. No final do processo, o que podemos observar, na flor ressecada, são apenas as paredes superiores dos sacos do anel superior e inferiores do anel inferior ressecadas e ligeiramente curvadas para fora.

Imediatamente acima dos sacos polínicos existe uma, ou mais raramente duas, franjas de tricomas vesiculares unicelulares (Fig. 26.a, 26.b). Tais tricomas apresentam citoplasma denso e núcleo proporcionalmente grande e localizado próximo à base da célula (Fig. 26.c). Morfologicamente, possuem formato cilíndrico e extremidade afilada, e seu comprimento pode alcançar até 250 µm. Esses tricomas

alcançam, ou até ultrapassam, a parede externa dos sacos polínicos, ficando sua extremidade próxima à linha de deiscência dos mesmos.

Em algum momento após a deiscência dos sacos polínicos, a extremidade dos tricomas colapsa, liberando então todo o conteúdo celular (Fig. 26.d). No momento da liberação o núcleo não pode mais ser reconhecido, tendo ocorrido degeneração e lise celular, de modo que a célula permaneça vazia (Fig. 26.e) ao final do processo de secreção holócrina.

As flores estaminadas de *P. thurberi* (Fig. 27.a) são morfológica e anatomicamente semelhantes àquelas de *P. ulei*, com duas principais diferenças: os sacos polínicos estão organizados em três anéis, ao invés de dois, e os tricomas vesiculares formam de duas a três franjas, ao invés de uma. Na população de Los Trigos pudemos encontrar, entretanto, interessantes variações. Em algumas flores a coluna estaminal não se fusiona à coluna interna, que acredita-se representar o gineceu estéril, ficando totalmente livre desta (Fig. 27.c) ou parcialmente fusionada no seu ápice (Fig. 27.d). Neste caso, podemos observar que os tricomas vesiculares se desenvolvem a partir da coluna central. Outra característica observada mais raramente é a presença de tricomas vesiculares acima e abaixo dos sacos polínicos (Fig. 27.b).

3. 4. Flores monoclinas

As recém descobertas flores monoclinas possuem tanto rudimentos seminais quanto sacos polínicos (Fig. 28.c), entretanto o desenvolvimento dessas estruturas é muito variável.

Quanto ao androceu, podem existir apenas poucos sacos polínicos, sem completar os anéis típicos das flores estaminadas (Fig. 28.a, 28.e) ou, mais raramente, os dois anéis podem estar completos (Fig. 28.b). Foram observados um número mínimo de 3 e máximo de 24 sacos polínicos, sempre distribuídos em dois anéis

(incompletos), sendo o anel superior ligeiramente menor em circunferência e, conseqüentemente, em número de sacos polínicos. As extremidades dos anéis incompletos são terminadas sempre por um saco polínico que assume uma posição mediana, ao invés de pertencer ao anel superior ou inferior. Os grãos de pólen são formados normalmente e os sacos abrem por fenda transversal, assim como ocorre nas flores estaminadas.

O desenvolvimento do gineceu varia desde a existência de apenas um lóculo, sem rudimentos seminais (Fig. 28.b), até a existência de um gineceu bem desenvolvido, com muitos rudimentos (Fig. 28.a, 28.f). Uma fenda no estilete, que leva até o lóculo, está sempre presente. Independentemente do tamanho do lóculo, não foi observada ocorrência de meiose; o desenvolvimento dos rudimentos cessa na fase de células mãe de megásporos, quando ainda os tegumentos estão em fase inicial de formação.

Outras características secundárias, como os tricomas vesiculares (típicos das flores estaminadas) e as papilas estigmáticas (típicas das flores pistiladas), também apresentam variação. É interessante notar que, na região do píleo, sempre se desenvolvem tricomas vesiculares onde existem sacos polínicos abaixo (Fig. 28.d, 28.e); naquelas regiões onde os anéis estão incompletos, formam-se papilas estigmáticas. Assim, em algumas flores, existe uma gradação, ou seja, as papilas existentes de um lado “tornam-se” tricomas à medida que aumentam de tamanho (Fig. 28.d).

Para analisar se existe alguma relação entre o desenvolvimento dos dois tipos de esporângios, 34 flores monoclinas foram analisadas (tabela 7). A partir da análise de regressão linear, verifica-se que não existe correlação entre o comprimento (Fig. 29), a largura (Fig. 30), a relação comprimento/largura (Fig. 31) e o volume do lóculo (Fig. 32) com o número de sacos polínicos em cada flor monoclina, pois em nenhum caso a probabilidade de F foi menor que 0,05.

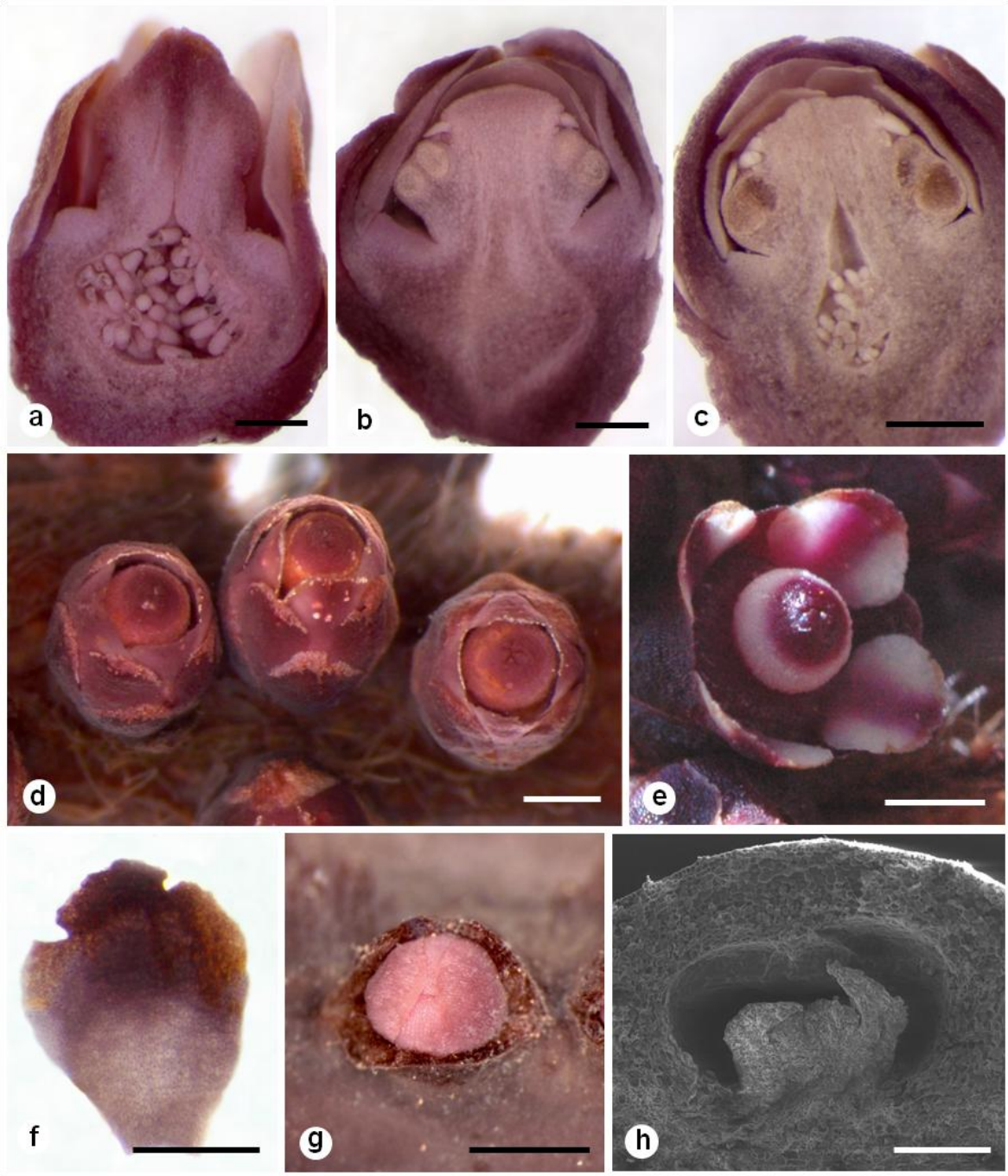


Figura 19. *Pilostyles ulei*: a) Flor pistilada secionada longitudinalmente; b) Flor estaminada secionada longitudinalmente; c) Flor monoclina secionada longitudinalmente; d) Flores pistiladas sobre ramo da hospedeira *M. foliolosa* evidenciando os verticilos estéreis; e) Flor aberta, detalhe para a coloração das escamas do verticilo interno com listra central púrpura; f) Escama do verticilo externo com ápice trilobado. g) Flor emergindo da periderme da hospedeira *M. maguirei*, note duas escamas externas protetoras; h) Botão floral ainda sob periderme, destaque para duas escamas do verticilo externo que se desenvolvem antes das demais peças. Escalas: a-g = 0,5mm, h = 200µm.

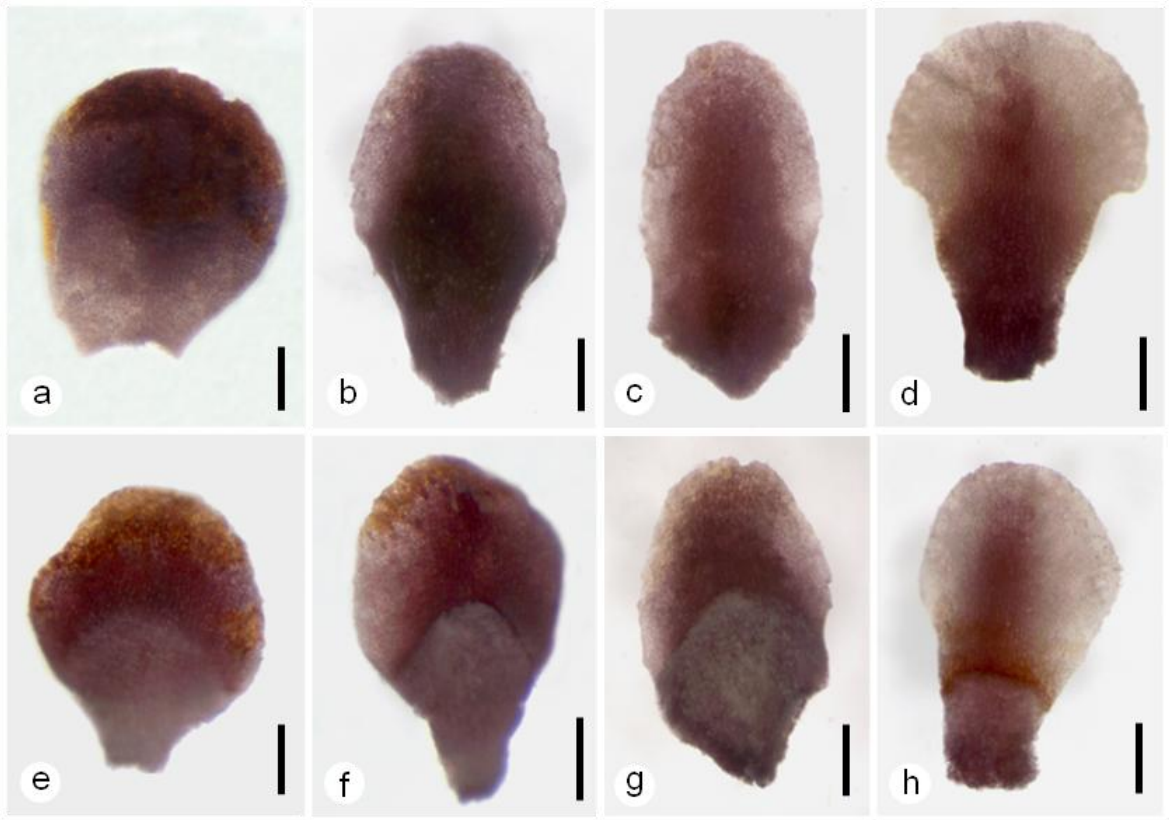


Figura 20. Escamas de *Pilostyles ulei*. a-d face abaxial; e-h face adaxial. a,e. Escamas mais externas do verticilo externo. b,f. Escamas mais internas do verticilo externo. c,g. Escamas do verticilo médio. d,h. Escamas do verticilo interno. Escalas = 0,5 mm.

Tabela 6. Flores de *P. ulei* apresentando variações quanto ao número de escamas em cada verticilo.

Flor	**Verticilos (n° de escamas)**		
	externo	médio	interno
1	4	4	5
2	4	4	5
3	3	3	4
4	3	3	3
5	5	5	5
6	4	5	5
7	4	4	7

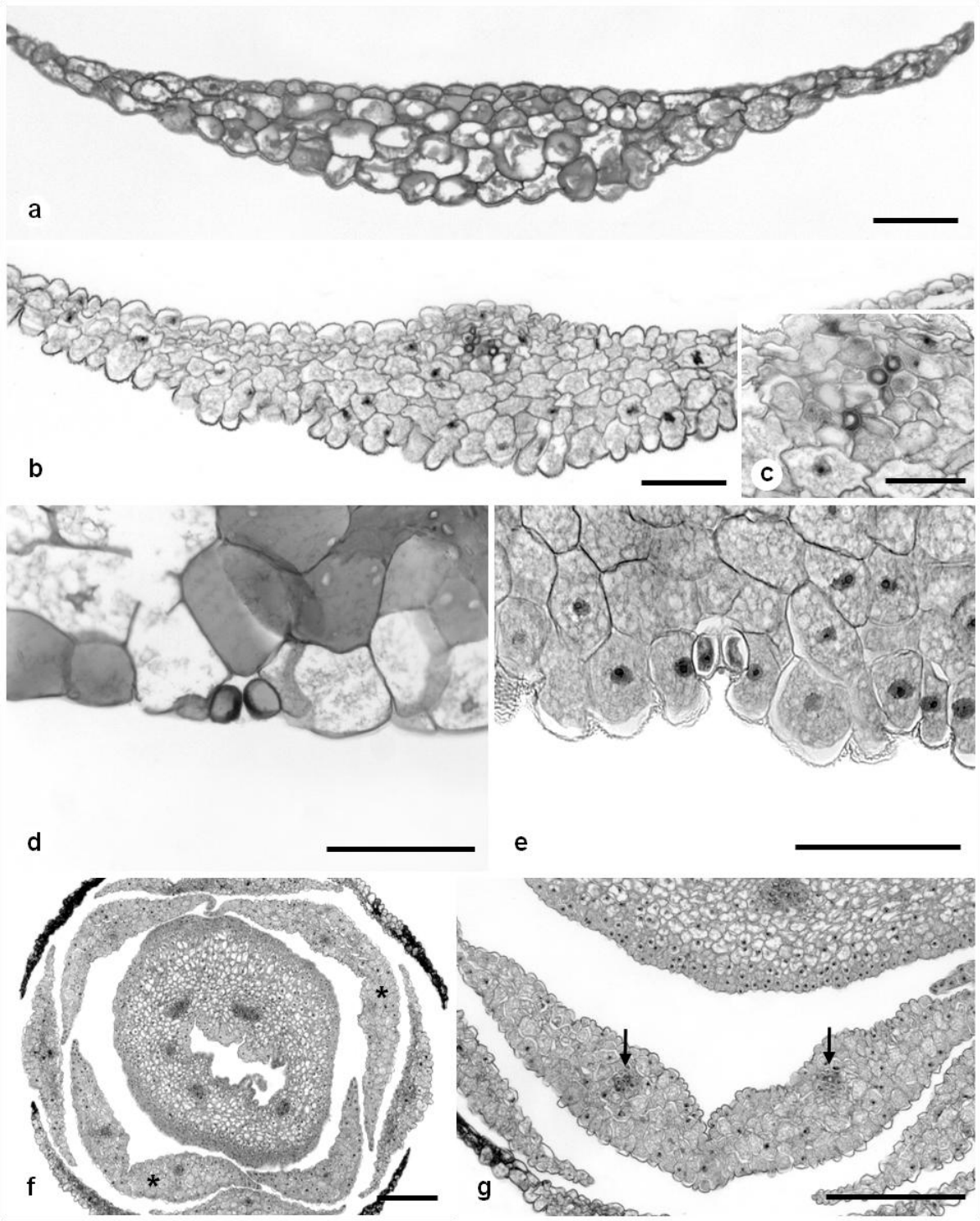


Figura 21. Anatomia das escamas: a) Seção transversal de escama do verticilo médio de *P. ulei*; b) Seção transversal de escama do verticilo médio de *P. thurberi*; c) Detalhe do feixe vascular; d) Estômato em escama de *P. ulei*; e) Estômato em escama de *P. thurberi*, note epiderme papilosa; f) Flor pistilada de *P. thurberi* com três verticilos tetrâmeros, mas cujo verticilo interno parece possuir escamas (*****) formadas pela fusão de duas peças; g) Detalhe de escama do verticilo interno, note dois feixes vasculares (setas). Figuras a-e com superfície abaxial voltada para baixo. Escalas a-e = 100µm, f-g = 300 µm.

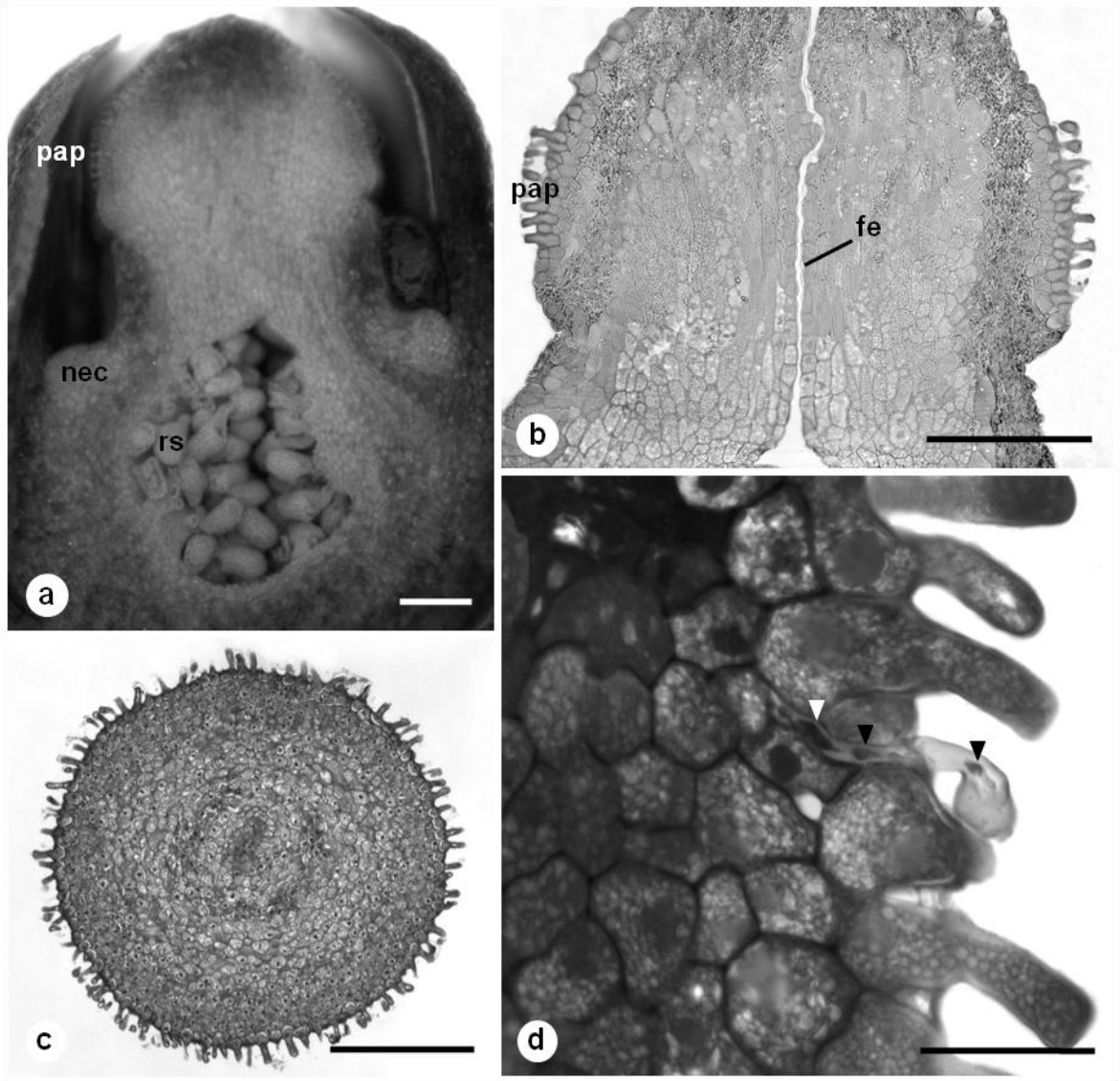


Figura 22. Flores pistiladas de *Pilostyles ulei*: a) Seção longitudinal; b) Seção longitudinal evidenciando fenda do estilete; c) Seção transversal da região subapical, onde se encontram as papilas. d) Detalhe do grão de pólen germinando, note os núcleos gaméticos (pontas de seta pretas) e núcleo da célula vegetativa (ponta de seta branca) no tubo polínico. fe – fenda do estilete, nec – nectário , pap – papilas estigmáticas, rs – rudimentos seminais. Escalas a-c = 300 µm, d = 50 µm.

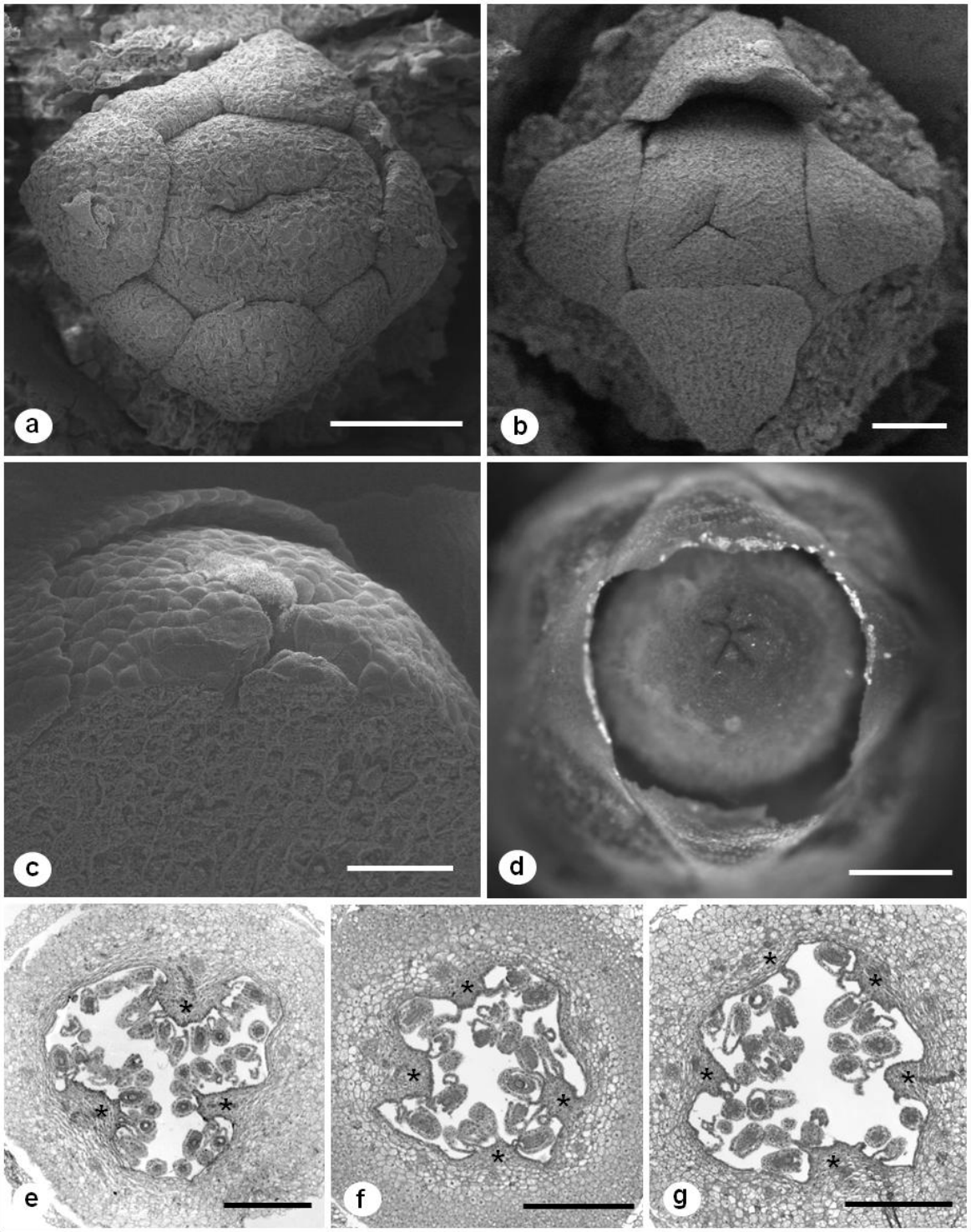


Figura 23. Flores pistiladas de *Pilostyles ulei*: a) Botão floral jovem, evidenciando ápice do primórdio do gineceu com fenda; b) Botão floral mais desenvolvido, evidenciando presença de três lobos estigmáticos (apenas verticilo interno de escamas foi mantido); c) Flor madura evidenciando presença de quatro lobos; d) Flor madura evidenciando presença de cinco lobos; e-g: cortes transversais do ovário, evidenciando e) três placentas, f) quatro placentas, g) cinco placentas. * - placentas. Escalas a-b = 100µm, c = 200µm, d-g = 500µm.

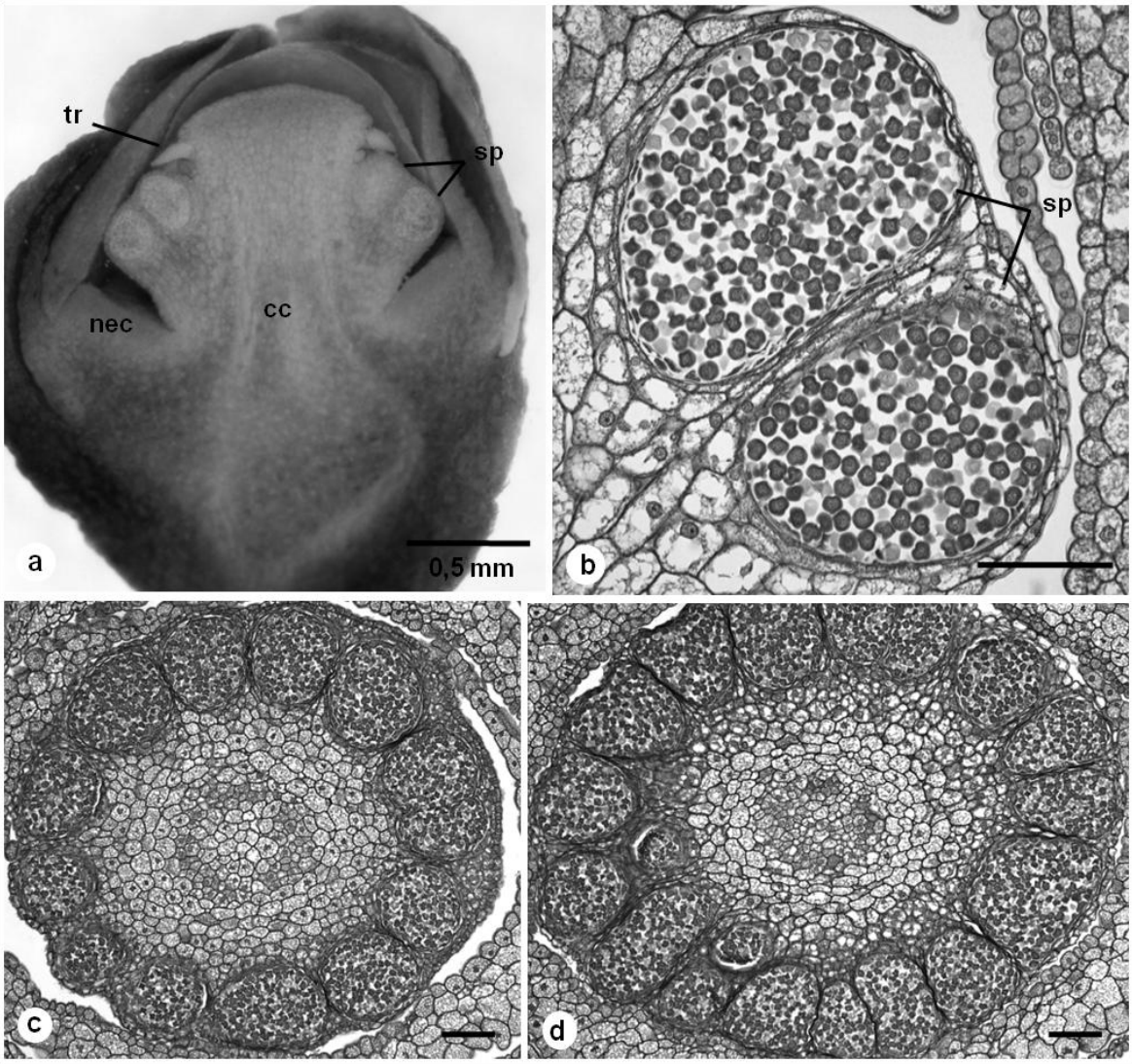


Figura 24. Flores estaminadas de *Pilostyles ulei*. a) Seção longitudinal de flor estaminada; b) Detalhe das duas séries de sacos polínicos secionados longitudinalmente; c-d. Cortes seriados: c) Seção transversal do anel superior de sacos polínicos; d) Seção transversal do anel inferior. cc – coluna central, nec – nectário, sp – saco polínico, tr – tricoma vesicular. Escalas = 100 µm

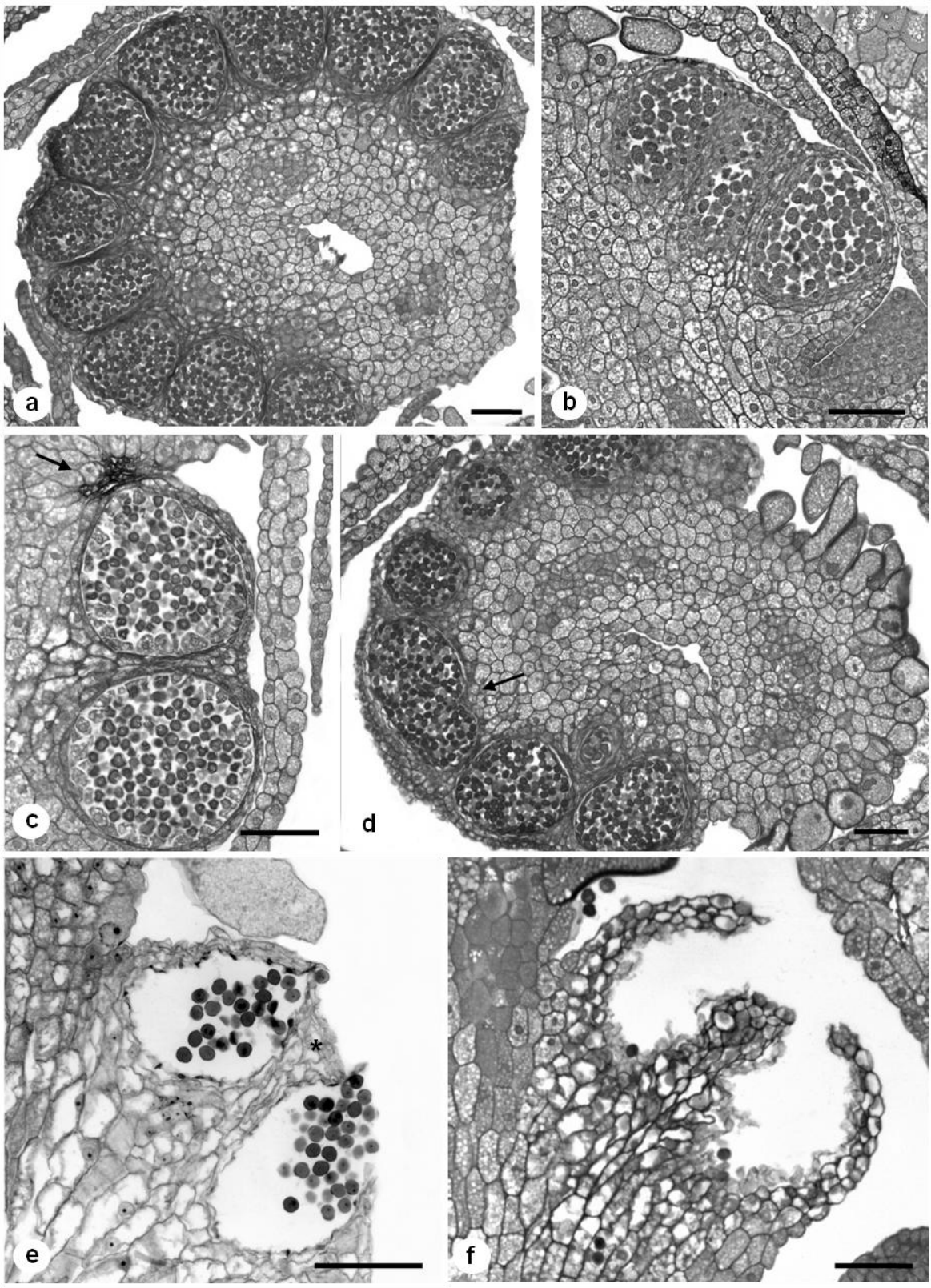


Figura 25. Variações e deiscência no androceu de *Pilostyles ulei*: a) Seção transversal de anel incompleto de sacos polínicos. b) Presença de três anéis de sacos polínicos. c) Seção longitudinal, evidenciando aborto de um saco polínico (seta). d) Seção transversal evidenciando sacos polínicos do mesmo anel confluentes (seta); e) Deiscência dos sacos polínicos, note septo (*) que se destacará; f) Sacos já vazios no final do processo de deiscência. Escalas = 100 µm

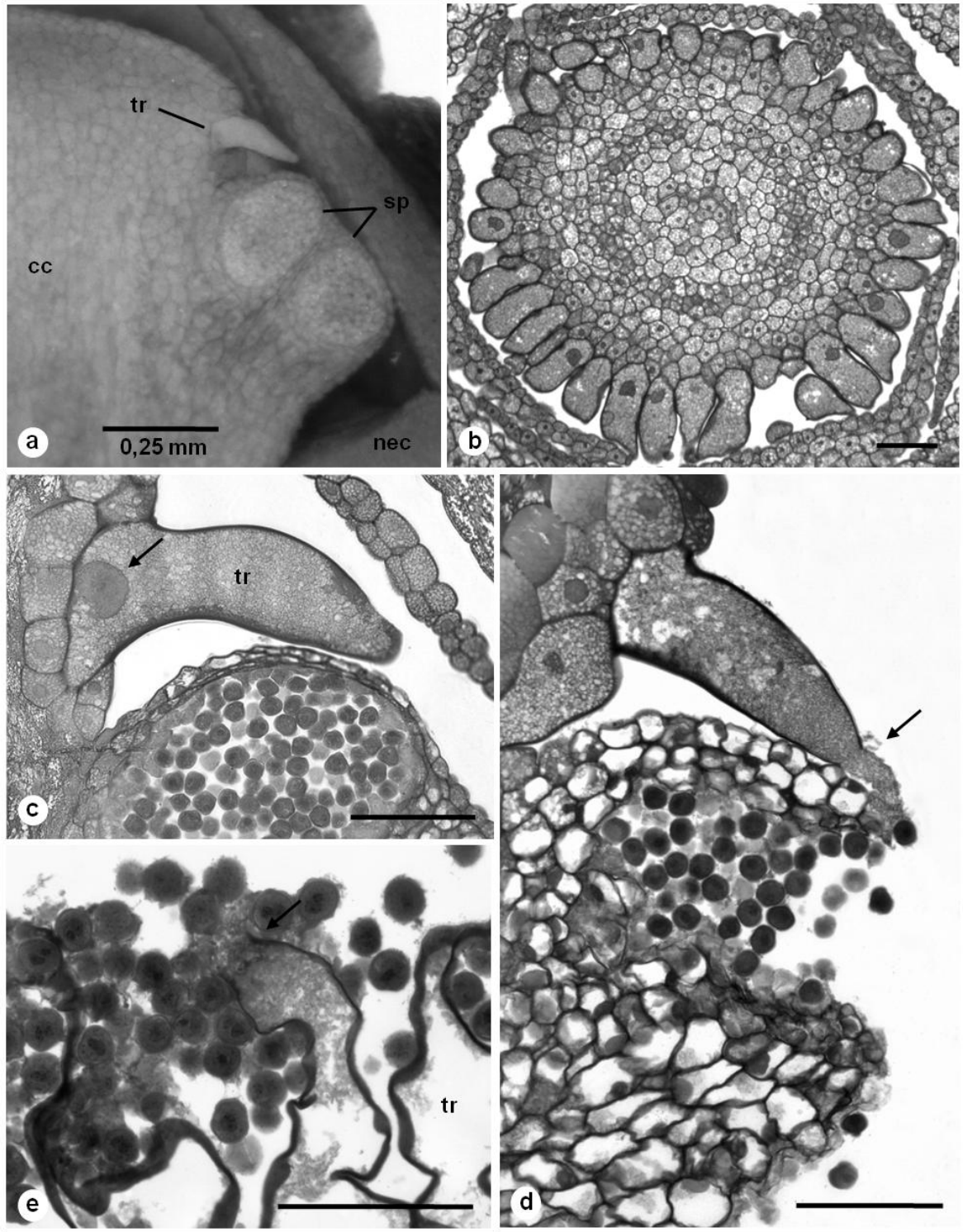


Figura 26. Flores estaminadas de *Pilostyles ulei*: a) Seção longitudinal; b) Seção transversal na região dos tricomas vesiculares; c) Detalhe de tricoma vesicular, com núcleo relativamente grande (seta); d) Seção longitudinal de tricoma em processo de liberação; note ápice rompido (seta); e) Seção transversal da zona com tricomas em processo de liberação (seta); note tricoma à direita já totalmente vazio. cc – coluna central, nec – nectário, sp – saco polínico, tr – tricoma vesicular. Escalas = 100 µm

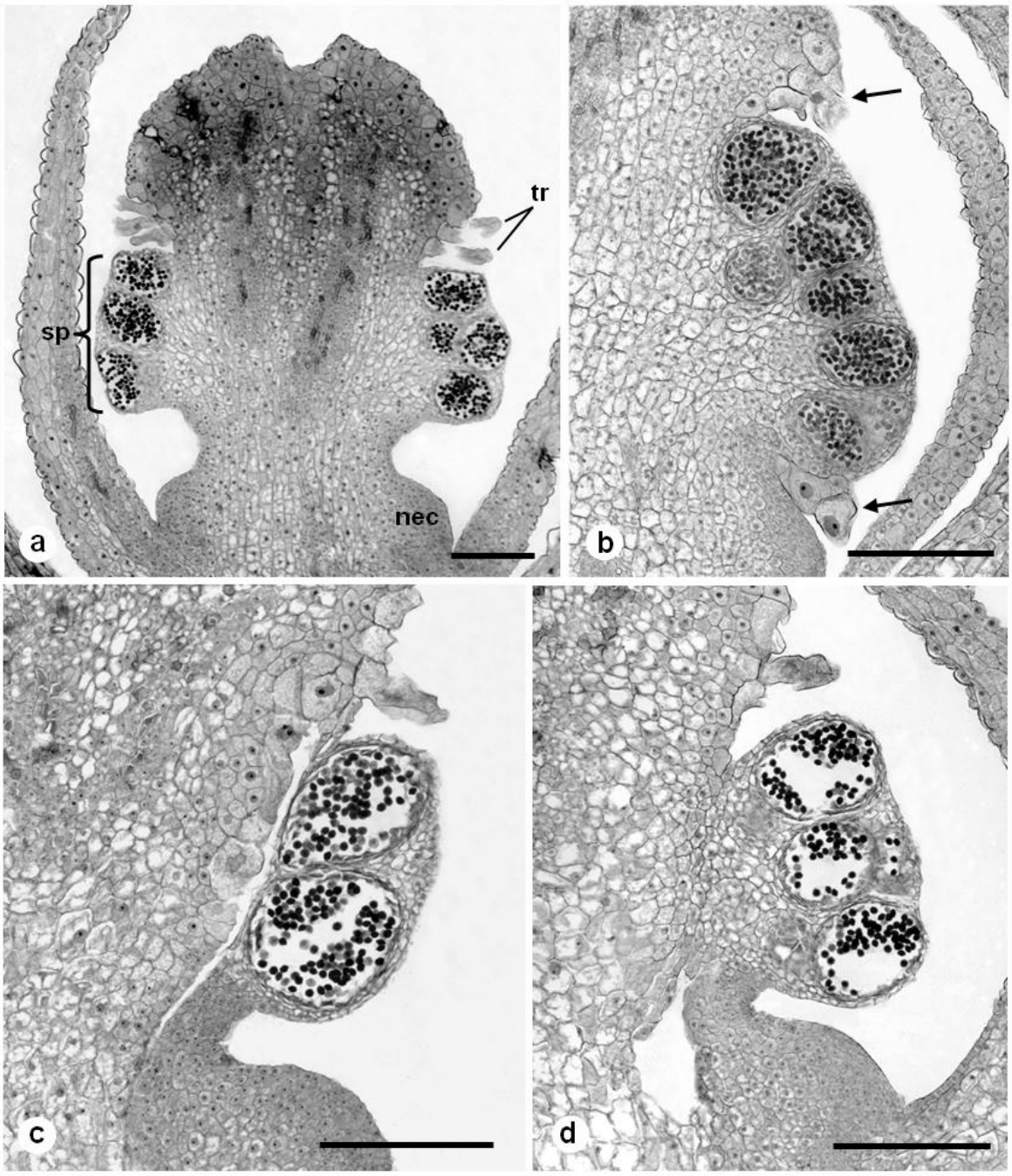


Figura 27. Flores estaminadas de *Pilostyles thurberi*: a) Seção longitudinal, evidenciando três anéis de sacos polínicos e de 2 a 3 franjas de tricomas vesiculares; b) Detalhe de flor com tricomas vesiculares (setas) acima e abaixo dos sacos polínicos; c) Seção longitudinal de flor com coluna estaminal não-fusionada à coluna central; d) Seção longitudinal de flor com coluna estaminal parcialmente fusionada. nec – nectário, sp – saco polínico, tr – tricoma vesicular. Escalas = 25 µm

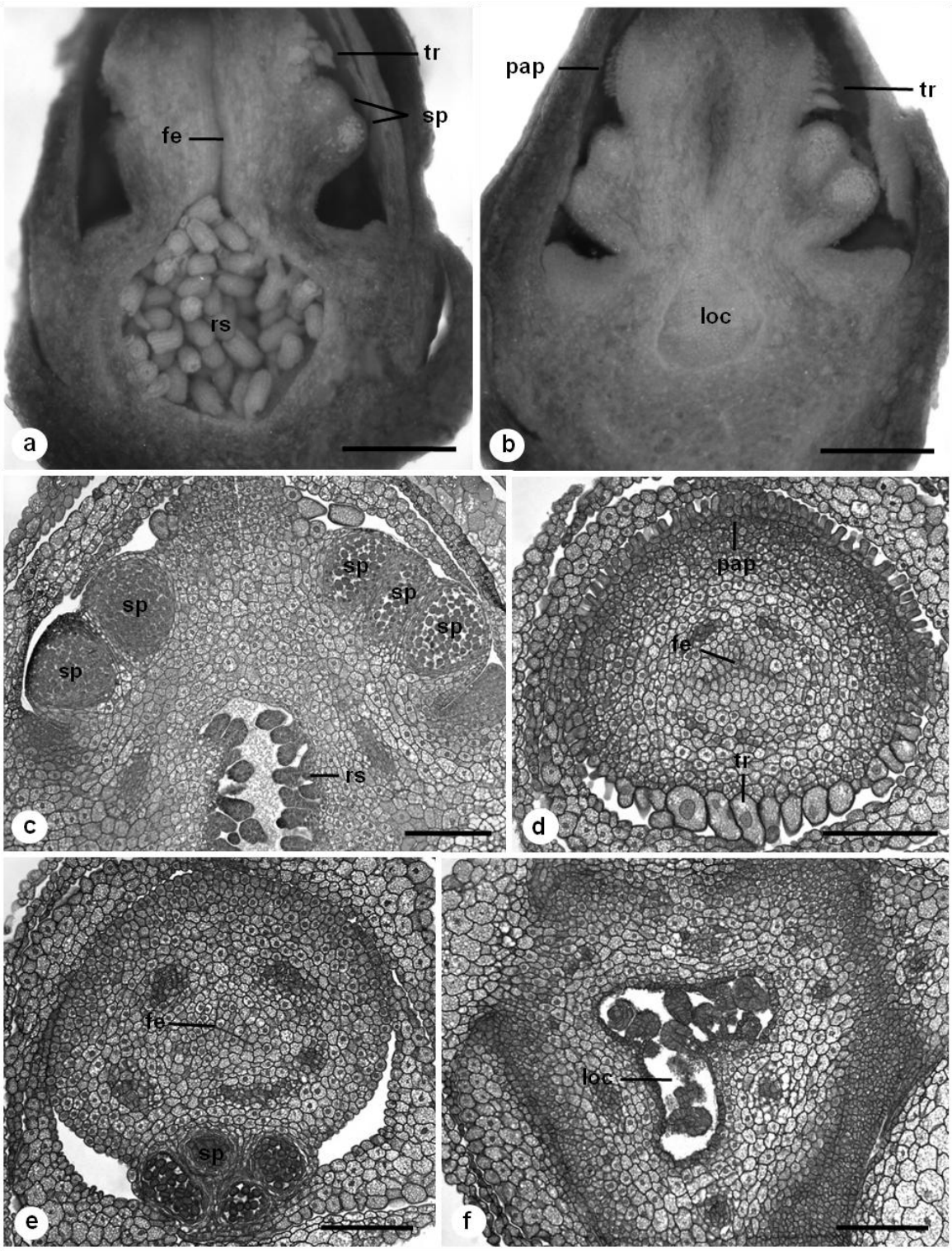


Figura 28. Flores monoclinas de *Pilostyles ulei*: a) Seção longitudinal de flor monoclina com anéis de sacos polínicos incompletos, mas com gineceu bem desenvolvido. b) Seção longitudinal de flor monoclina com anéis completos, e apenas lóculo presente. c) Detalhe dos sacos polínicos e rudimentos seminais. d, e, f. Seqüência de fotomicrografias: d) Seção transversal na região das papilas e tricomas; e) região dos sacos polínicos; f) região do lóculo. fe – fenda do estilete, loc – lóculo, pap – papilas estigmáticas, tr – tricomas vesiculares, rs – rudimentos seminais, sp – sacos polínicos. Escalas = 200 µm

Tabela 7. Medições realizadas em 34 flores monoclinas para posterior análise de regressão linear.

Flor	Tamanho do lóculo (mm)		N° de sacos polínicos
	comprimento	largura	
1	1	0,275	12
2	0,304	0,145	15
3	0,84	0,347	17
4	0,478	0,246	17
5	0,579	0,347	13
7	0,623	0,434	3
8	0,42	0,246	21
10	0,768	0,869	15
12	0,608	0,405	14
13	1,057	0,724	8
14	0,579	0,492	22
15	0,768	0,695	17
17	0,362	0,217	11
18	0,898	0,942	17
19	0,652	0,362	18
20	0,829	0,361	13
21	0,872	1,063	12
22	1,17	1,106	6
23	0,829	0,361	24
24	0,362	0,449	8
25	0,553	0,489	10
26	1,042	0,361	17
27	0,531	0,361	10
28	0,744	0,319	17
29	0,829	1	9
30	0,829	0,723	12
31	0,884	0,492	5
32	1,063	0,851	16
33	1,021	0,531	8
34	0,808	0,65	18

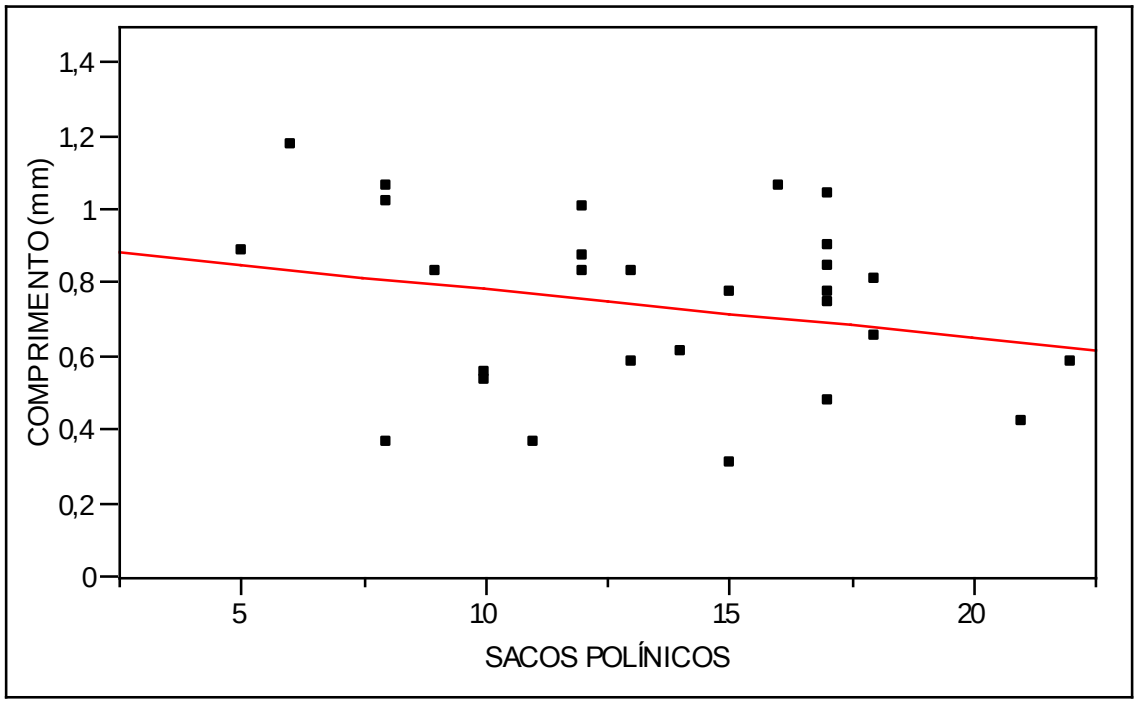


Figura 29. Análise de regressão linear entre o comprimento do lóculo (mm) e o número de sacos polínicos nas flores monoclinas. R^2 = 0,06; F = 0,209.

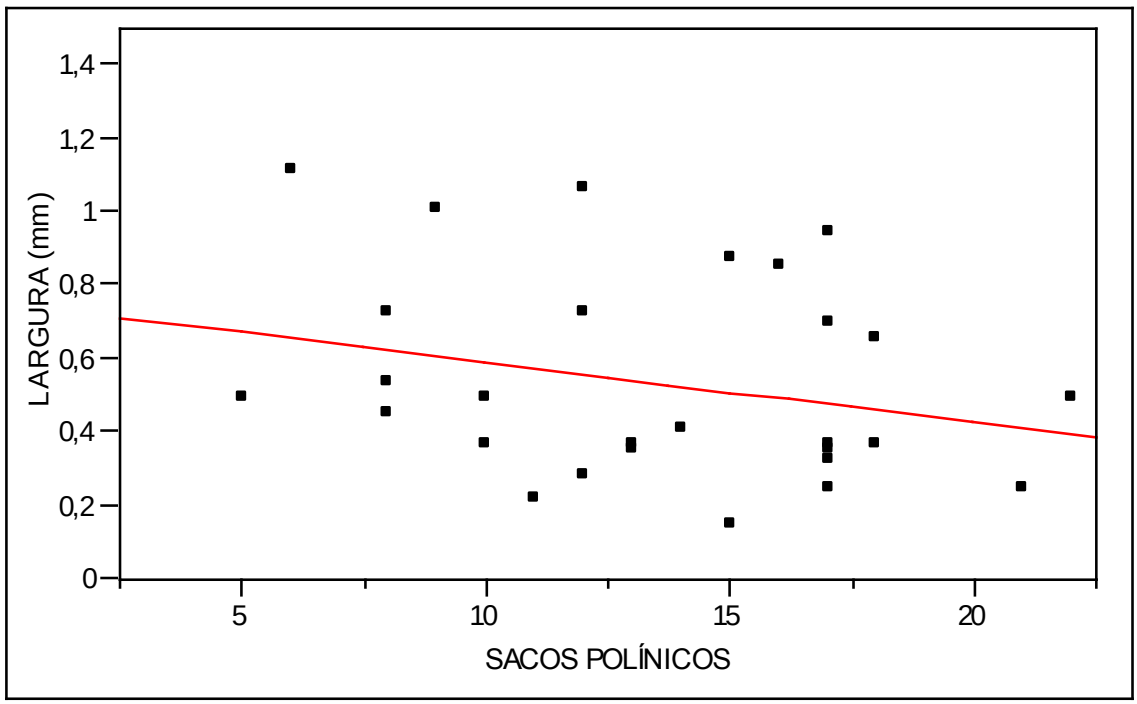


Figura 30. Análise de regressão linear entre a largura do lóculo (mm) e o número de sacos polínicos nas flores monoclinas. R^2 = 0,06; F = 0,176.

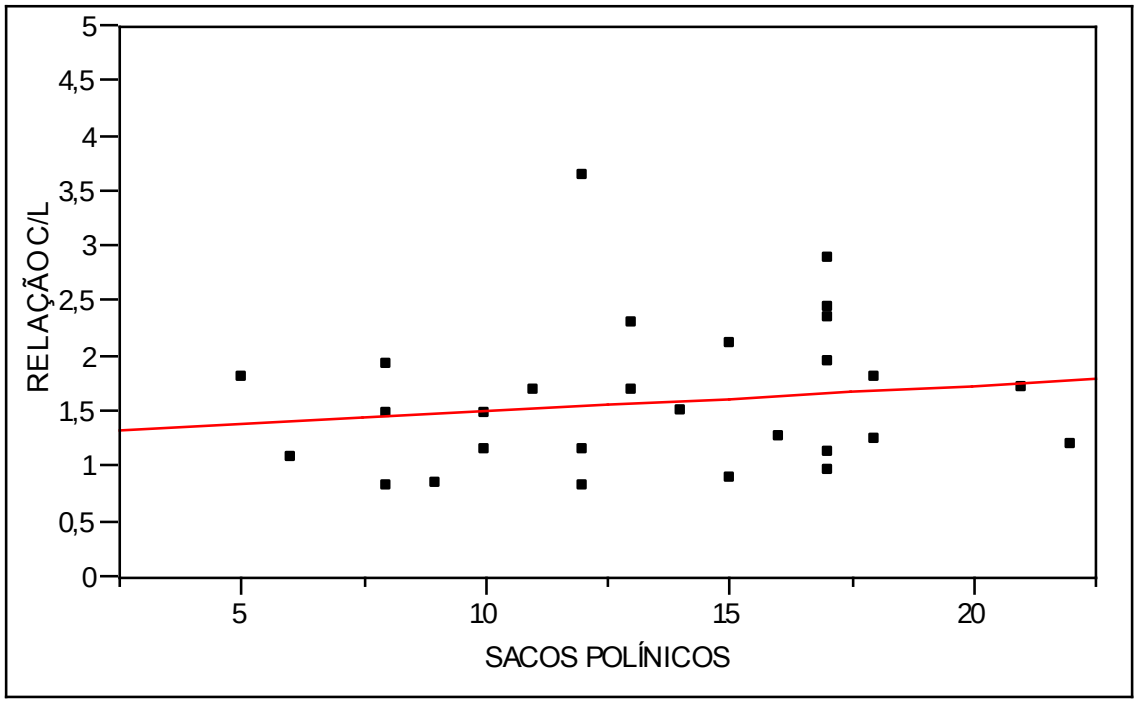


Figura 31. Análise de regressão linear entre a relação comprimento/largura do lóculo e o número de sacos polínicos nas flores monoclinas. R^2 = 0,02; F = 0,452.

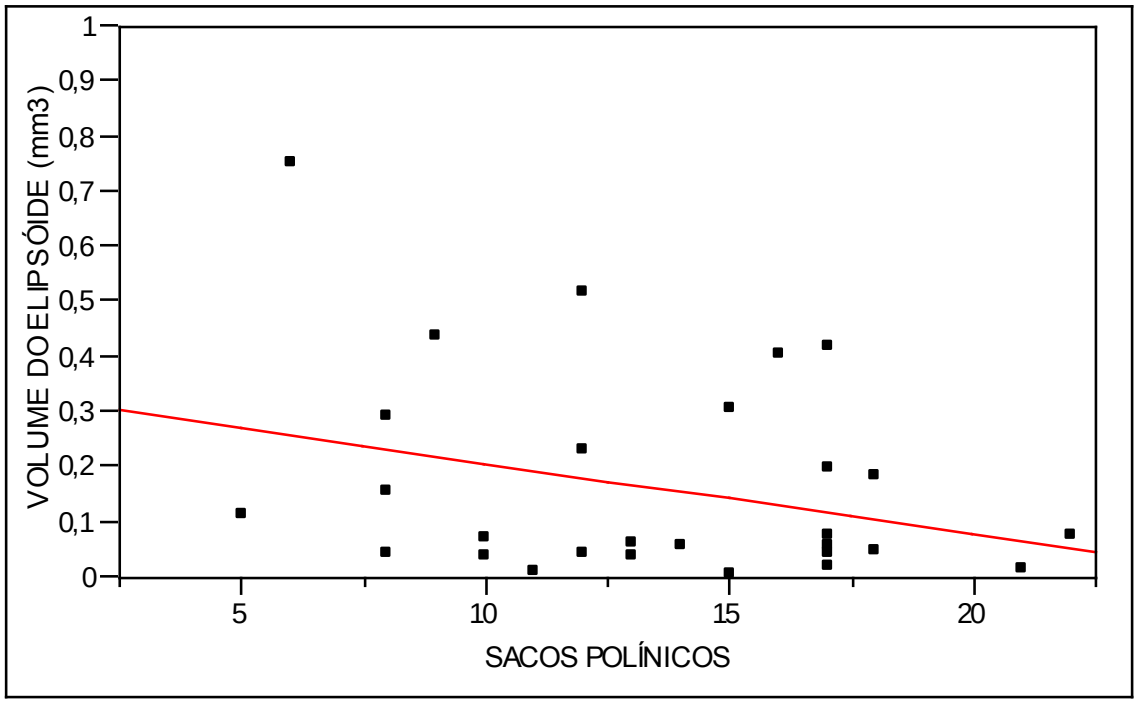


Figura 32. Análise de regressão linear entre o volume do lóculo (mm^3) e o número de sacos polínicos nas flores monoclinas. R^2 = 0,09; F = 0,119.

4. DISCUSSÃO

As flores da família Apodanthaceae apresentam morfologia extremamente especializada, sendo resultado de eventos de redução e fusão dos diferentes verticilos. Além dessas especializações, parece não haver um número constante de peças em cada verticilo, sendo encontradas variações no número de escamas, número de placentas nas flores pistiladas, de sacos polínicos nas estaminadas e variação no grau de desenvolvimento dos esporângios nas flores monoclinas.

4.1. Verticilos estéreis

À primeira vista os verticilos parecem ser constituídos por peças morfologicamente indistintas. Sua morfologia e anatomia semelhantes dificultam uma interpretação, o que levou diversos autores a lançarem hipóteses divergentes. As peças foram referidas como sendo brácteas (Woodson *et al.* 1973), tépalas (Groppo *et al.* 2007), ou mesmo brácteas tepalóides (Meijer 1993). Vattimo (1971) acredita que tais verticilos são formados por tépalas ou, quando há diferenciação morfológica entre as peças de verticilos diferentes, sépalas e pétalas.

Em inspeção mais detalhada, entretanto, algumas diferenças podem ser observadas com relação ao formato e inserção das peças. Em *P. ulei* o verticilo externo parece ser, na verdade, constituído por dois verticilos dímeros alternos. O mais externo formado por escamas arredondadas (orbiculares a elípticas) com região de inserção ampla e o mais interno formado por escamas de formato obovado e bases atenuadas. As peças não se inserem exatamente no mesmo ponto, estando aquelas do suposto verticilo 2 inseridas um pouco mais acima no eixo floral. Além disso, acompanhando-se a ontogênese, fica evidente que as escamas externas desenvolvem-se mais cedo, protegendo o botão floral jovem, característica já descrita para *Apodanthes* (Vattimo 1973).

A hipótese da existência de dois verticilos externos dímeros em *Pilostyles*, formulada anteriormente (Blarer *et al.* 2004), ganha força quando comparamos tais verticilos com aqueles das demais espécies da família. Parece haver uma tendência no sentido de redução no número de peças do verticilo mais externo: na tetrâmera *Apodanthes tribracteata* Rusby e na hexâmera *Berlinianche aethiopica* (Welw.) Vatt. ele é trímero (Vattimo 1973, Blarer *et al.* 2004), enquanto que na tetrâmera *Apodanthes caseariae* Poit. é dímero, com escamas muito menores, e se insere bem abaixo no eixo da flor (Blarer *et al*. 2004). Tais observações são indício de que tais verticilos externos não façam parte da flor, sendo formados provavelmente por brácteas tepalóides.

Apesar de termos observado variações, na maioria das flores os demais verticilos são tetrâmeros, entretanto se desconhece a natureza de suas peças. O verticilo interno é decíduo e possui coloração mais clara em *Apodanthes* e possui escamas com área de inserção menor e tricomas unisseriados na face adaxial em *Berlinianche* (Blarer *et al.* 2004), características comumente encontradas na corola das angiospermas. O verticilo médio possui escamas unidas na base em *Apodanthes* (Blarer *et al.* 2004), conação mais comumente observada no verticilo das sépalas. Blarer e colaboradores (2004), levando-se em consideração tais características, formularam a hipótese da existência de cálice e corola isômeros na família Apodanthaceae, suposição essa que faz sentido também quando analisamos os verticilos estéreis de *Pilostyles*.

Se formos considerar quatro verticilos, ao invés de três, a questão da alternância básica entre os verticilos é solucionada, pois os quatro verticilos são alternos entre si. A presença de cálice e corola isômeros é compatível com o posicionamento da família no grupo das eudicotiledôneas (Nickrent 2002), em contraposição ao posicionamento no clado das magnoliídeas proposto por diversos botânicos do século XIX.

4.2. Flores pistiladas

Armstrong (1998) relata que a distinção entre flores estaminadas e pistiladas em campo é difícil, uma vez que, nas pistiladas, a região das papilas fica recoberta por grãos de pólen, lembrando muito uma flor estaminada em antese. No ápice do píleo, porém, faltam essas papilas, fato que levou alguns autores a indagar qual seria a superfície estigmática receptiva (Kuijt 1969, Vattimo 1971). Nossas observações de grãos de pólen em germinação, inéditas para a família, comprovam que a região estigmática é restrita à área das papilas.

A placentação é parietal, entretanto o número de placentas é variável até mesmo em diferentes alturas no ovário de uma única flor. Tal variabilidade já havia sido descrita em outras espécies, e dificulta a interpretação do gineceu, cujo número de carpelos continua sendo questão debatida. Alguns autores consideram a existência de quatro placentas bem delimitadas (Vattimo 1972, Blarer *et al.* 2004), e outros a presença de rudimentos inseridos em toda a superfície interna do ovário (Kuijt 1969, Meijer 1993). Ainda segundo Endriss (1902) as placentas não percorrem uniformemente todo o ovário mas, através da análise dos feixes vasculares, pode-se perceber a existência de cinco placentas. Naquelas flores onde se observa número inferior, o autor sugere a supressão de uma ou mais placentas durante a ontogênese floral.

4.3. Flores estaminadas

Assim como em *P. ulei*, variações foram observadas em todas as outras espécies do gênero estudadas até o momento. Vattimo (1971, 1972) relata que o número de anteras é variável numa mesma espécie, podendo haver aborto de uma ou mais séries ou às vezes de apenas parte de uma série. Segundo a autora, existem de 19 a 23 sacos polínicos em cada um dos dois anéis, sendo observados também anéis

com 17 sacos. Blarer e colaboradores (2004) relatam a existência de aproximadamente 18 sacos polínicos por anel em *P. thurberi*.

Até o momento se desconhece a origem desses sacos polínicos, mas diversos autores lançam hipóteses. Rutherford (1970) e Vattimo (1971, 1972) acreditam que cada saco polínico é homólogo a uma antera. Já Endriss (1902) interpreta que, sendo uma antera normal tetrasporangiada, cada anel (de aproximadamente 20 sacos polínicos) seria derivado de cinco anteras originais. Blarer e colaboradores (2004) questionam tal afirmação: uma vez que as flores de *Pilostyles* são tetrâmeras (e não pentâmeras) e deveriam possuir 16 sacos polínicos (ao invés de 20) por anel. Em *P. ulei* os sacos polínicos aparecem em número variável, não se alternam ou sobrepõem, estando às vezes organizados em anéis incompletos ou em três anéis em algumas regiões. Todas essas variações impedem uma caracterização precisa do androceu na espécie, dificultando a realização de análises comparativas e, conseqüentemente, de inferências quanto à sua natureza.

A deiscência dos sacos polínicos em *Pilostyles* é outro tópico controverso. Segundo Blarer e colaboradores (2004) a linha de deiscência entre os dois anéis resulta em uma abertura conjunta a dois sacos polínicos adjacentes, irregularmente superpostos. Kuijt (1969), Vattimo (1972) e Takhtajan (1997), entretanto, relatam que cada saco polínico abre independentemente através de uma fenda transversal, e Meijer (1993) através de fenda longitudinal. Nossos resultados mostram que inicialmente cada saco abre por fenda transversal independente, posteriormente a parede anticlinal externa se destaca e o septo que separa os anéis superior e inferior se dissolve. Tais características já haviam sido observadas isoladamente (Endriss 1902, Blarer *et al.* 2004), entretanto o processo completo ainda não havia sido descrito.

Com relação aos tricomas vesiculares, alguns autores relatam que a extremidade desses tricomas apresenta-se rompida em flores após a antese (Endriss

1902, Blarer *et al.* 2004, Groppo *et al.* 2007), entretanto a função que eles desempenham na polinização de *Pilostyles* era até então desconhecida. Através do presente estudo foi verificado que, na flor estaminada de *P. ulei*, os tricomas vesiculares secretam uma substância, de composição ainda desconhecida, mas que parece ser o próprio protoplasto celular. Este é o primeiro relato comprovando a existência de tricomas secretores na família, descoberta fundamental para se entender o ciclo de vida e modo reprodutivo altamente especializado das espécies.

Existem poucos relatos de tricomas semelhantes em outras angiospermas. Tricomas secretores no androceu foram descritos para Cucurbitaceae (Vogel 1981, Dieringer & Cabrera 1994), Geniostomaceae (Endress *et al.* 1998), Lamiaceae (Moyano *et al.* 2003) e Malvaceae (Balthazar *et al.* 2004). Quando um tricoma é tocado pelo inseto, ocorre sua ruptura e liberação de uma substância adesiva, que literalmente gruda os grãos de pólen no corpo do polinizador (Vogel 1981). Esta liberação explosiva foi descrita também por outros autores (Dieringer & Cabrera 1994, Endress *et al.* 1998) e nos parece provável que o mesmo ocorra em *P. ulei*. Entretanto, não podemos descartar a hipótese levantada por Teppner e Stabentheiner (2007) de que o rompimento do tricoma seria devido aos movimentos da parede da antera em deiscência.

Independente do modo como ocorre a liberação dessa substância em *P. ulei*, parece provável que ela possua a função de manter os grãos de pólen unidos e de grudá-los ao corpo do polinizador. Se tal suposição é verdadeira, este adesivo possui papel fundamental no sucesso reprodutivo das flores estaminadas, aumentando as chances de transporte do grão de pólen, bem como sua aderência na superfície estigmática das flores pistiladas. Este aumento na eficiência de transporte do pólen pode ser especialmente importante naquelas populações onde a razão sexual é altamente desproporcional, com número muito inferior de flores estaminadas (vide capítulo II).

A observação de flores estaminadas com a coluna do androceu livre é característica também inédita para o gênero *Pilostyles*, sendo anteriormente relatada somente para *Berlinianche*. Em *P. thurberi* pudemos observar flores com a coluna totalmente livre e outras onde as colunas encontram-se parcialmente fusionadas. Tal descoberta vem a contribuir na corroboração da teoria vigente de que a coluna central das flores estaminadas corresponde na verdade à soldadura de duas: a coluna estilar central, maciça, representando provavelmente vestígio do gineceu; e a externa, oca, que traz no bordo superior as anteras, e que parece corresponder aos filetes estaminais soldados (Vattimo 1972). Apesar de não ter sido possível acompanhar a ontogênese inicial de *Pilostyles*, é razoável supor que no início do desenvolvimento tais colunas sejam independentes, ocorrendo posteriormente fusão pós-genital: as superfícies epidérmicas das colunas em desenvolvimento fazem contato e se aderem, resultando em um tecido homogêneo na estrutura final.

O que não fica claro, entretanto, é a região a partir da qual os tricomas vesiculares se desenvolvem. Segundo Kuijt (1969) a dioecia evoluiu recentemente no grupo, e a partir de flores monoclinas, visto que podem ser visualizados vestígios do outro esporângio em cada flor. Até o momento a hipótese mais aceita é de que os tricomas vesiculares são derivados das papilas estigmáticas da flor monoclina ancestral (Kuijt 1969, Vattimo 1971), sendo formados a partir da coluna central (gineceu estéril) e, portanto, homólogos às papilas das flores pistiladas. Entretanto a existência de flores com tricomas acima e abaixo da região dos sacos polínicos evidencia a necessidade de maiores estudos para comprovar suposta homologia.

4.4. Flores monoclinas

Independentemente da esporidade da planta, cada meristema floral é bipotente, possuindo toda a informação genética para produzir ambos os tipos de esporângios. Naquelas plantas que possuem flores diclinas, o verticilo inapropriado

pode não se desenvolver ou então abortar durante a ontogênese floral. Essas modificações, pelas quais passam os meristemas das flores diclinas, são controladas através de uma complexa interação de diversos genes que, por sua vez, regulam a expressão dos conhecidos genes homeóticos da família ABC (Ainsworth *et al*. 2005). Tais genes são os responsáveis pela identidade floral, interagindo de maneira a caracterizar os diferentes verticilos da flor (Coen & Meyerowitz 1991). No caso das flores estaminadas, por exemplo, espera-se que os genes da classe C (responsáveis pela identidade dos verticilos de estames e carpelos) parem de ser expressos no centro do meristema, local onde se desenvolveria o gineceu (Ainsworth *et al*. 2005), levando ao aborto do órgão e caracterizando a flor como estaminada.

Se a dioecia evoluiu recentemente na família Apodanthaceae (Kuijt 1969), a presença de flores monoclinas nos mostra que tais processos de regulação gênica não estão completamente estabelecidos em *Pilostyles*, de modo que seja “permitido” aos meristemas produzir ambos os esporângios, sem ocorrer aborto de nenhum verticilo. As cirscuntâncias que levam à formação das flores monoclinas são desconhecidas, e não se sabe se sua presença representa uma característica selecionada ou se são vestígios de um passado evolutivo. A distribuição aleatória das flores monoclinas entre as demais flores nos leva à informação adicional de que os processos de determinação do sexo ocorrem em cada meristema floral, sendo independentes da sua localização no caule hospedeiro.

A existência de flores monoclinas com um misto de papilas (típicas de flores pistiladas) e tricomas vesiculares (típicos de estaminadas) em *Pilostyles* evidencia também que ambas as estruturas são homólogas, desenvolvendo-se na mesma localidade a partir do meristema floral.

.Como relatado no capítulo II, apesar de possuírem ambos os esporângios, as flores monoclinas exibem diferenças na capacidade de desenvolvimento de tais estruturas, ocorrendo meiose apenas no microsporângio. A ausência de meiose no

megasporângio é verificada independente do morfotipo da flor, com gineceu pouco ou bem desenvolvido, sendo um indício de que o destino final destas flores, funcionalmente estaminadas, seja uma característica determinada por forte fator genético. Talvez seja o caso, analisando-se geneticamente, de uma falha nos mecanismos regulatórios, com atraso na parada da expressão dos genes da classe C no centro do meristema, levando à formação de carpelos mais ou menos desenvolvidos nessas flores geneticamente estaminadas.

Outra característica que independe do morfotipo floral é o desenvolvimento do androceu: em todas as flores analisadas o número de sacos polínicos formados não varia significativamente de acordo com as dimensões do lóculo. Isso demonstra que aparentemente não existe relação direta/inversamente proporcional entre o desenvolvimento dos esporângios em *P. ulei.* Muitos estudos mostram a existência de tal correlação negativa (Delph & Lloyd 1991, Barrett *et al*. 1999, Olson & Antonovics 2000), onde a alocação de recursos para o desenvolvimento de um esporângio diminui a alocação para ao outro, e referem-se a esta correlação como a principal força que direciona a especialização dos gêneros e evolução da dioecia. Entretanto, tal competição por recursos parece não existir nas flores monoclinas de *P. ulei*, provavelmente porque tais flores (funcionalmente estaminadas) não desenvolvam sementes e frutos, processos tidos como mais custosos para a planta.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho contribui para o aprofundamento no conhecimento da morfologia e anatomia floral em *Pilostyles* através de observações inéditas, como: grãos de pólen em germinação, tricomas vesiculares associados à polinização, flores com colunas separadas e com tricomas acima e abaixo da região dos sacos polínicos. Tais observações contribuíram não só para corroborar/refutar teorias já citadas na literatura, mas também como base para construção de novas hipóteses, como se segue:

- As flores pistiladas, estaminadas e monoclinas são envolvidas por quatro verticilos estéreis: dois dímeros externos de brácteas tepalóides, médio de sépalas e o interno de pétalas.
- O número variável de placentas dificulta a interpretação do número de carpelos constituintes do gineceu, fato pelo qual admitimos como verdadeiro ser este tetrâmero até o momento.
- A região estigmática é restrita à área das papilas.
- O número de sacos polínicos é extremamente variável, o que impede uma caracterização precisa do androceu e, conseqüentemente, a realização de inferências quanto à sua natureza.
- Inicialmente cada microsporângio abre por fenda transversal independente, posteriormente a parede anticlinal externa se destaca e o septo que separa os anéis superior e inferior se dissolve.
- Os tricomas vesiculares secretam uma substância pegajosa, que parece ser o próprio protoplasto celular, sendo provavelmente responsável por unir os grãos de pólen e grudá-los ao corpo do polinizador.
- A coluna das flores estaminadas é formada através de fusão pós-genital de duas colunas: a estilar central, maciça, representando vestígio do gineceu; e a externa, oca, que traz no bordo superior os sacos polínicos.

- Não existe correlação (direta ou inversamente proporcional) entre o desenvolvimento do androceu e do gineceu nas flores monoclinas.

Analisando-se a flor como um todo, podemos perceber que existem muitas variações, tanto no número de peças em cada verticilo, quanto no grau de desenvolvimento dos esporângios nas flores monoclinas. As variações no número de peças, que ocorrem em porcentagem alta nas flores amostradas, demonstram que não podemos estabelecer com facilidade um número básico para as flores, anteriormente referido como sendo quatro pela maioria dos autores. O número de peças varia de 3 a 5 em todos os verticilos. Partindo desta constatação, estudos futuros que lidem principalmente com a ontogênese inicial e vascularização floral são necessários para solucionar qual o número básico da flor. Se tal número é 5, como acredita Endriss (1902), seria interessante constatar se ocorre aborto ou supressão de peças naquelas flores trímeras e tetrâmeras durante a ontogênese inicial.

A descoberta da existência de flores monoclinas abre um leque de possibilidades de pesquisas inéditas na família. Surge todo um campo de pesquisa novo, não só com estudos a nível populacional, mas também a nível anatômico e inclusive molecular. São especialmente interessantes estudos lidando com a expressão gênica nos diferentes verticilos, incluindo análises de hibridização *in situ* de genes da família ABC. Estudos deste tipo são fundamentais para solucionar questões ainda em aberto, visando-se um entendimento completo da morfologia floral na família.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, C.; RAHMAN, A.; PARKER, J. & EDWARDS, G. 2005. Intersex inflorescences of *Rumex acetosa* demonstrate that sex determination is unique to each flower. New Phytologist 165: 711-720.

APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical journal of Linnean Society* 141: 399-436.

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.

ARMSTRONG, W.P. 1998. *Pilostyles thurberi*: seldom-seen wildflower that lives inside the stem of another plant. *In*: Wayne's word, a on-line textbook of Natural History. Disponível em <www.waynesword.palomar.edu>.

BALTHAZAR, M.; ALVERSON, W.S.; SCHONENBERGER, J. & BAUM, D.A. 2004. Comparative floral development and androecium structure in Malvoideae (Malvaceae *s.l.*). *International Journal of Plant Sciences* 165: 445–473.

BARKMAN, T.J., MCNEAL, J.R., LIM, S-H., COAT, G., CROOM, H.B., YOUNG, N.D. & dePAMPHILIS, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology 7*: 248.

BARRETT, S.C.H.; CASE, A.L. & PETERS, G.B. 1999. Gender Modification and Resource Allocation in Subdioecious *Wurmbea dioica* (Colchicaceae). *Journal of Ecology* 87: 123-137.

BHATTACHARYYA, B. & JOHRI, B.M. *Flowering plants: taxonomy and phylogeny*. Narosa Publishing House: New Delhi, 1998.

BLARER, A., NICKRENT, D.L. & ENDRESS, P.K. 2004. Comparative floral structure and systematics in Apodanthaceae (Rafflesiales). *Plant Systematics and Evolution* 245: 119-142.

BOUMAN, F. & MEIJER, W. 1994. Comparative structure of ovules and seeds in Rafflesiaceae. *Plant Systematics and Evolution* 193: 187-212.

COEN, E.S. & MEYEROWITZ, E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353: 31-37.

DELPH, L.F. & LLOYD, D.G. 1991. Environmental and Genetic Control of Gender in the Dimorphic Shrub *Hebe subalpina*. *Evolution* 45: 1957-1964.

DIERINGER, G. & CABRERA, L.R. 1994. Sexual selection of anther trichomes and sexual dimorphism in *Ibervillea lindheimeri* (Cucurbitaceae: Melothrieae). *American Journal of Botany* 81: 111-118.

ENDRESS, P.K. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press: 1994.

ENDRESS, M.E., IGERSHEIM A. & GARNOCK-JONES, P. 1998. Sexual dimorphism and secondary pollen presentation in *Geniostoma ligustrifolium* (Geniostomaceae). *American Journal of Botany* 85 (6, Suppl.): 126.

ENDRISS, W. 1902. Monographie von *Pilostyles ingae* (Karst.) (*Pilostyles ulei* Solms-Laubach). *Flora* 91: 209-236.

FEDER, N., & O'BRIEN, T.P. 1968. Plant Microtechnique: Some Principles and New Methods. *American Journal of Botany 55* (1): 123-142.

GROPPO, M., AMARAL, M.M. & CECCANTINI, G.C.T. 2007. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Apodanthaceae (Rafflesiaceae *s.l.*), e notas sobre a anatomia de *Pilostyles*. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25 (1): 81-86.

JOHANSEN, D. A. *Plant Microtecnique*. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1940.

KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KRAUS, J.E.; de SOUZA, H.C.; REZENDE, M.H.; CASTRO, N.M.; VECCHI, C. & LUQUE, R. 1998. Astra Blue and Basic Fuchsin Double Staining of Plant Materials. *Biotechnic and Histochemistry* 73: 235-243.

KUIJT, J. *The biology of parasitic flowering plants*. California: University of California Press, 1969.

McDOWELL, E. M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory* 100: 405-414.

MEIJER, W. 1993. Rafflesiaceae. pp. 557-563 *In*: Kubitzki, K. [ed.]. *The families and genera of vascular plants*. 2. Flowering plants. Dicotyledons. Berlim: Springer.

MOYANO, F., COCUCCI, A. & SÉRSIC, A. 2003. Acessory pollen adhesive from glandular trichomes on the anthers of *Leonorus sibiricus* L. (Lamiaceae). *Plant Biology* 5: 411-418.

NICKRENT, D.L. 2002. Orígenes filogenéticos de las plantas parásitas. *In*: J. A. López-Sáez, P. Catalán and L. Sáez [eds.]. Plantas Parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares. Mundi-Prensa Libros, S. A., Madrid. Capítulo 3, pp. 29-56.

NICKRENT, D.L., BLARER, A., QIU, Y-L. & VIDAL-RUSSELL, R. 2004. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* 4:40.

OLSON, M.S. & ANTONOVICS, J. 2000. Correlation between male and female reproduction in the subdioecious herb *Astilbe biternata* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany* 87: 837–844.

RUTHERFORD, R.J. 1970. The anatomy and cytology of *Pilostyles thurberi* Gray (Rafflesiaceae). *Aliso* 7: 263-288.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil*, baseado em APG II. 2.ed. Nova Odessa : Instituto Plantarum, 2008.

STEVENS, P. F. (2001 em diante). *Angiosperm Phylogeny Website* (http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/). Versão 9, junho de 2008 [continuamente atualizada].

TAKHTAJAN, A.L. *Diversity and classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1997.

TEPPNER, H. & STABENTHEINER, E. 2007. Anther opening, polyad presentation, pollenkitt and pollen adhesive in four *Calliandra* species (Mimosaceae – Ingeae). *Phyton* 47: 291-320.

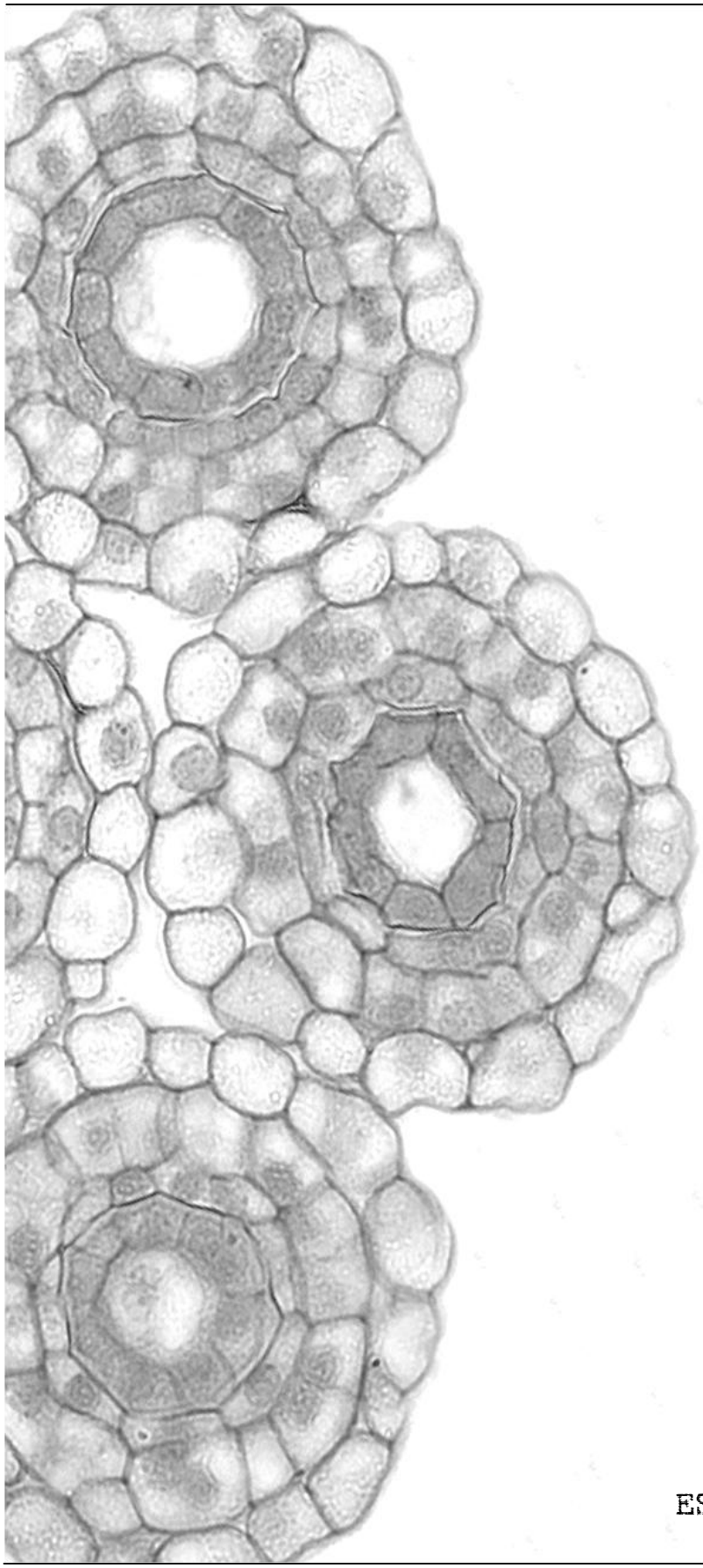
VATTIMO, I. 1971. Contribuição ao conhecimento da tribo Apodanthea R. Br. Parte I – Conspecto das espécies (Rafflesiaceae). *Rodriguésia* 26: 37-62.

VATTIMO, I. 1972. Raflesiáceas. *In*: R. Reitz [ed.] *Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues*. Itajaí.

VATTIMO, I. 1973. Notas sobre o gênero *Apodanthes* Poit. com descrição de duas novas espécies (Rafflesiaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 33: 135-141.

VOGEL, S. 1981. The Glue-Producing Anther Hairs of *Cyclanthera pedata* (Cucurbitaceae). *Plant, systematics and evolution* 137: 291-316.

WOODSON, R.E.; SCHERY, R.W. & GENTRY, A.H. 1973. Flora of Panama. Part IV. Family 50A. Rafflesiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 60: 17-21.



CAPÍTULO IV

ESPOROGÊNESE E GAMETOGÊNESE

1. INTRODUÇÃO

O estudo do desenvolvimento floral, ou ontogênese, abrange desde a iniciação do primórdio floral até a antese. O estudo do desenvolvimento dos esporângios e os eventos da esporogênese e gametogênese, apesar de fazerem parte do desenvolvimento floral, costumam estar incluídos na área da embriologia (Maheshwari 1950), fato pelo qual estão dispostos aqui em outro capítulo.

Como visto no capítulo anterior, o posicionamento filogenético da família Apodanthaceae continua desconhecido, sendo reflexo da morfologia extremamente especializada da família e de dificuldades em realizar estudos moleculares, tais como: 1) impossibilidade de obter-se DNA do cloroplasto (plantas aclorofiladas); 2) taxa de mutação do DNA nuclear até 3 vezes maior que nas plantas fotossintetizantes; 3) transferência horizontal de genes mitocondriais entre o hospedeiro e parasita. Tais dificuldades refletem-se nos recentes estudos moleculares de Nickrent e colaboradores (2004), onde a família Apodanthaceae é posicionada dentro de Malvales ou Cucurbitales, e Barkman e colaboradores (2007), onde aparece dentro de Cucurbitales.

Assim, existe uma necessidade de alavancar o maior número possível de caracteres morfológicos da família, até o momento pouco explorada, de modo a estabelecer homologias com outros clados e inclusive possibilitar uma revisão das propostas taxonômicas vigentes.

As obras clássicas de Johansen (1950), Maheshwari (1950), Davis (1966) e Johri (1984) confirmam a importância do uso dos caracteres embriológicos na sistemática das angiospermas. Uma lista das características embriológicas de especial interesse à taxonomia pode ser encontrada no livro de Bhojwani e Bhatnagar (1981), assim como relatos de casos de parentesco resolvidos através de sua análise. Fica

claro que os caracteres embriológicos, aliados ao conjunto de informações de outras áreas de estudo, subsidiam uma melhor avaliação das relações entre os táxons.

Entretanto, apesar da comprovada importância de tais estudos, ensaios sobre a embriologia no gênero *Pilostyles* são escassos, existindo apenas os de Endriss (1902) e Rutherford (1970), que mostram resultados conflitantes em alguns pontos. Assim, tendo em vista o escasso conhecimento embriológico da família Apodanthaceae o presente trabalho tem por objetivos: 1) identificar e descrever os estádios do desenvolvimento dos esporângios nas flores estaminadas e pistiladas de *Pilostyles ulei,* e 2) caracterizar os processos de esporogênese e gametogênese da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Parte do presente estudo foi realizada em colaboração com o Prof. Jorge E. A. Mariath, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em março de 2009. Durante permanência na referida universidade, foi analisada em maior profundidade a embriologia de *Pilostyles ulei*, incluindo o estudo da esporogênese e gametogênese das flores pistiladas e estaminadas, juntamente com a análise estrutural e bioquímica da parede do grão de pólen.

2. 1. Espécie e local de estudo

As coletas de *Pilostyles ulei* foram realizadas em área de campo rupestre, na propriedade Mãe d'água do IBAMA, no quilômetro 103 da rodovia MG-010, coordenadas S 19º18'27,8", W 43º 36' 11,6" (Fig. 4). Tal propriedade localiza-se no Parque Nacional da Serra do Cipó, região central do Estado de Minas Gerais, Brasil. O clima é do tipo tropical de altitude, com verões chuvosos e um curto período seco (3-4 meses) durante o inverno (Gomes & Fernandes 1994). A temperatura média anual é de 21,2º C e a média anual de precipitação é de 1622 mm (IBAMA 2007). Na Serra do Cipó, *Pilostyles ulei* parasita indivíduos de *Mimosa foliolosa* Benth. var. *multipinna* (Benth.) Barneby e de *M. maguirei* Barneby.

2. 2. Microscopia óptica

Quanto à anatomia floral, foram selecionados ramos hospedeiros com botões parasitas em diferentes estádios de desenvolvimento, desde pequenas elevações na periderme hospedeira até flores completamente desenvolvidas.

O material coletado em campo foi reduzido a pequenos fragmentos (contendo casca hospedeira e botões florais parasitas) e fixado em uma solução de glutaraldeído e formaldeído em tampão fosfato de sódio 0.1M , pH 7,2 (McDowell & Trump 1976)

e/ou fixador FAA 50% (Johansen 1940), permanecendo sob pressões negativas por no mínimo 48h. Em laboratório, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (etanol 10% a 95%), incluídas em resina hidroxietilmetacrilato (conforme especificações do fabricante, Kit Leica Historresin®), secionadas transversal e longitudinalmente com navalha de vidro de 6-8mm em micrótomo de rotação Reichert & Jung (modelo AutoCut 2040) com espessura de corte de 5-10µm. As seções foram montadas em lâminas de vidro para microscopia e coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, pH 4,4 (Feder & O' Brien 1968) e/ou Azul de Astra e Fucsina Básica (Kraus *et al.* 1998).

Os testes histoquímicos para a determinação dos constituintes celulares foram realizados através de corantes e/ou reagentes específicos de uso corrente em anatomia vegetal. Para identificação de proteínas totais foi utilizado Coomassie Blue R-250 em solução acética 7% (Southworth 1973); Alcian Blue 8GX em solução acética 3% para ácidos polissacarídicos (Lillie 1965); Ácido Periôdico/Shiff para polissacarídeos insolúveis (O' Brien & McCully 1981); Calcofluor White, 0,01% em solução aquosa (Pacini *et al.* 1999) para celulose; Auramina para esporpolenina e Azul de Anilina para identificação de calose (Martin 1959).

2.3. Morfologia polínica

Grãos-de-pólen de flores em antese foram submetidos à técnica de acetólise (Erdtman 1960) e montados em gelatina glicerinada, para análise em Microscopia Óptica. Para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura, as amostras acetolisadas foram desidratadas em série etílica crescente (até álcool absoluto) e processadas em dessecador de ponto crítico. Sob microscópio estereoscópio e com auxílio de fita adesiva dupla-face, o material foi posicionado em suportes de alumínio ("stubs"), e posteriormente recoberto com ouro em aparelho metalizador tipo "sputtering".

3. RESULTADOS

3. 1. Ontogênese dos rudimentos seminais

Os primórdios dos rudimentos seminais iniciam-se após o botão floral ter rompido a periderme do hospedeiro. O lóculo, que é elipsóide a esférico na flor madura, aparece como uma fenda nesse estádio, devido à recente fusão dos carpelos. A placentação é parietal.

Os primórdios iniciam-se pela atividade de regiões meristemáticas na placenta, numa organização do tipo bizonada, com uma camada dérmica e uma subdérmica (Fig. 33.a). Nesta última, uma célula inicial arquesporial diferencia-se das demais por apresentar maior volume e núcleo evidente. Através de divisões periclinais, a inicial forma uma linha axial de células (Fig. 33.b). Quando esta linha apresenta de 5-8 células de altura, o primórdio começa a curvar-se lateralmente (Fig.33.c).

Ligeiramente após o início da curvatura, ocorre o aparecimento das iniciais do tegumento interno. Tais iniciais surgem a partir de divisões oblíquas da camada dérmica (Fig. 33.d). Simultaneamente, ou levemente após, a célula terminal da linha axial aumenta grandemente em volume, em um processo que levará ao surgimento da célula mãe de megásporos (Fig. 33.f). Quando o rudimento atinge uma curvatura de aproximadamente 90º, inicia-se a formação do tegumento externo, também através de divisões oblíquas da camada dérmica (Fig. 33.e). O nucelo é formado através de divisões periclinais apenas, possuindo, portanto, uma camada de células na maturidade.

O tegumento interno é anelar, possui duas camadas de células e se desenvolve antes do tegumento externo (Fig. 34.a). Suas células são quadrangulares em corte transversal, aumentando de tamanho em direção ao ápice. Possui em média 15 células em circunferência na camada mais externa e 11 na interna (Fig. 34.b). O tegumento externo possui uma camada de células e atinge o mesmo tamanho do

tegumento interno no rudimento seminal maduro (Fig. 34.c, 34.e). Suas células são alongadas em direção paralela ao eixo do rudimento. Possui em média 17 células em circunferência. Freqüentemente verifica-se, em ambos os tegumentos, a ocorrência de divisões na região apical, de modo que o tegumento interno possa apresentar três camadas e o externo duas nessa região (Fig. 34.c).

O funículo apresenta amplos espaços intercelulares, correspondendo à um cilindro de células praticamente oco (Fig. 34.a). O nucelo apresenta apenas uma camada de células, com aproximadamente 8 células em circunferência (Fig. 34.b, 34.e). Os rudimentos seminais maduros de *Pilostyles ulei* são anátropos (Fig. 34.d), tenuinucelados e bitegumentados. Apresentam aproximadamente 250 µm de comprimento e 130 µm de diâmetro. A micrópila é formada pelo tegumento interno apenas (Fig. 34.e).

3. 2. Megasporogênese e megagametogênese

A única célula arquesporial dá origem diretamente à célula mãe de megásporos, que se diferencia das demais por ser maior e possuir núcleo volumoso (Fig. 35.a). Não foram visualizados arquespórios adicionais. Na esporogênese, a citocinese acompanha as divisões da meiose, sendo entretanto assimétrica: a primeira divisão dá origem a uma díade, sendo a célula micropilar menor que a calazal (Fig. 35.b). A segunda divisão da meiose é do tipo assíncrona (Fig. 35.c): a díade de posição micropilar pode ou não se dividir, formando uma tríade linear (Fig. 35.d) ou uma tétrade em “T” (Fig. 35.e), respectivamente. Apenas o megásporo de posição calazal é viável; os demais degeneram, sendo seus restos observados mesmo quando o gametófito está maduro (Fig. 35.f).

O megásporo funcional gradativamente aumenta de volume, diferenciando-se diretamente em célula-mãe de megagametófito (Fig. 36.a). A gametogênese inicia-se com a divisão mitótica da célula mãe de megagametófito, que é paralela ao eixo do

rudimento seminal (Fig. 36.b). Formam-se então dois vacúolos no gametófito binucleado: um maior, que separa os dois núcleos, e outro menor, de posição calazal (Fig. 36.c). Ambos os núcleos formados dividem-se perpendicularmente, resultando em um gametófito tetranucleado com um grande vacúolo central (Fig. 36.d). A terceira e última divisão mitótica origina um megagametófito octonucleado, que posteriormente sofre citocinese.

O desenvolvimento é do tipo *Polygonum*. A fusão dos núcleos polares, calazal e micropilar, ocorre antes da fecundação, ficando o núcleo diplóide resultante próximo ao aparelho oosférico (Fig. 36.g). O gametófito feminino maduro contém sete células (Fig. 36.e-g): três antípodas, um núcleo da célula média, duas sinérgides e uma oosfera.

3. 3. Estratos parietais

A ontogênese inicial dos microsporângios de *P. ulei* não pôde ser acompanhada devido ao fato de que tais esporângios encontram-se completamente formados quando da emersão das flores estaminadas da periderme hospedeira. Neste estádio, a parede dos esporângios apresenta os seguintes estratos parietais, de fora para dentro: epiderme, endotécio, camada média e tapete (Fig. 37.a).

A epiderme é formada por uma camada celular, com células uninucleadas e vacuoladas, apresentando fina cutícula no esporângio maduro (Fig. 37.e). O endotécio é formado por uma camada de células, que não apresentam os típicos espessamentos de parede verificados na maioria das angiospermas. A camada média é formada por células de seção retangular, uninucleadas, vacuoladas. Eventualmente podem ser observadas duas camadas de células, que são descontínuas ao longo do esporângio. No início da gametogênese as células dessa camada começam a sofrer uma compressão, que se intensifica, de modo que ao final restem poucas células ou

apenas resquícios da camada média (Fig. 37.d). O tapete é do tipo secretor, possuindo apenas uma camada de células relativamente grandes, com citoplasma denso e núcleo volumoso (Fig. 37.c). Suas células começam a degenerar (Fig. 37.d) durante a diferenciação dos micrósporos, que após liberados da parede de calose sofrem aumento de volume. No microsporângio maduro, encontram-se apenas resquícios das células do tapete, pois seu conteúdo celular foi totalmente integrado ao fluído locular. Assim, podemos visualizar que apenas a epiderme continua íntegra pouco antes da deiscência do esporângio e liberação dos grãos de pólen (Fig. 37.e).

Em seção longitudinal da flor podemos visualizar que os esporângios adjacentes (dos anéis superior e inferior) estão separados por poucas camadas de células (Fig. 37.f). Excetuando-se as células do tapete, que servem como referência na delimitação de cada esporângio, existem de 3 a 5 camadas de células, vacuolizadas e uninucleadas. Tais células possuem formato alongado em seção longitudinal da flor, e parecem ser contínuas com aquelas que formam o endotécio e a camada média.

3. 4. Microsporogênese e microgametogênese

As células mãe de micrósporos são formadas a partir da diferenciação do tecido esporogênico. Comparadas com as demais células do microsporângio, são grandes e possuem núcleo volumoso e localizado na região central da célula (Fig. 38.a). O término da meiose I (Fig. 38.b-38.c) resulta em uma díade envolta por calose (Fig. 38.d); na segunda fase da meiose forma-se uma tétrade (Fig. 38.e), que posteriormente recebe depósito de calose entre os micrósporos, o que isola as células filhas (Fig. 38.g). A citocinese é do tipo simultânea e as tétrades são em sua maioria tetraédricas (Fig. 38.f), eventualmente ocorrendo o tipo decussado.

Concomitantemente ao processo de dissolução da calose e isolamento dos micrósporos, ocorre a degeneração das células do tapete. Foi observado um sincronismo nas células dos meiócitos de um mesmo esporângio durante a meiose, porém esse sincronismo não se repete nas células de esporângios adjacentes na mesma flor.

A gametogênese inicia-se com a divisão mitótica do núcleo do micrósporo (Fig. 39.a), que é assimétrica, gerando duas células de tamanho desigual. A célula maior, denominada vegetativa, é esférica e central, ocupando quase todo o interior do grão de pólen; a célula menor, generativa, primeiramente assume posição periférica, ficando contígua à parede do grão de pólen (Fig. 39.b, 39.c). Posteriormente, a célula generativa é pressionada pelo citoplasma da célula vegetativa, o que causa seu afastamento da intina e a modificação do seu formato, que torna-se arredondado. Após ser totalmente englobada, pode-se observar que a célula generativa assume seu típico formato lenticular (Fig. 39.d). Em *P. ulei*, o grão de pólen é liberado na forma bicelular (Fig. 39.e).

3. 5. Gametófito masculino

Os grãos de pólen são pequenos, suboblatos, com diâmetro polar médio de 15,1 µm e equatorial médio de 17,85 µm, formato piriforme em vista equatorial (Fig. 39.f), e esférico a triangular convexo em vista polar (Fig. 39.g). São tricolpados, com colpos alargando-se gradualmente do pólo proximal ao distal, escotadura proximal aguda e distal truncada (Fig. 39.h, 39.i). Classificam-se como heteropolares, com o pólo proximal apresentando protuberância formada pela junção das placas de sexina (Fig. 39.g), sendo estas livres no pólo distal. Ornamentação do tipo psilada no apocolpo e mesocolpo.

Antes da dissolução da calose os micrósporos já apresentam deposição de esporopolenina na sua esporoderme, como o evidenciado pela coloração com

auramina (Fig. 40.a). A deposição inicia-se na superfície externa da esporoderme. Após a dissolução da calose parece que os grãos permanecem algum tempo unidos, e o desenvolvimento da esporoderme prossegue, alcançando estádio avançado de desenvolvimento (Fig. 40.b).

No gametófito maduro, a esporoderme apresenta-se estratificada em intina e exina, que por sua vez subdivide-se em nexina e sexina. A sexina é a porção mais externa, cuja principal composição é a esporopolenina (Fig. 40.c) e, em *P. ulei*, parece estar interrompida nos colpos. Quanto à estrutura, a nexina parece possuir dois estratos: a nexina 1, mais externa e espessa, sendo formada também por esporopolenina e que permanece ao longo dos colpos; e a nexina 2, mais interna e delgada. A sexina e a nexina 1 coram-se com Azul de Toluidina O, assumindo a cor azul claro (Fig. 40.d), e pela Fucsina Básica (Fig. 40.e). Em seções coradas com Azul de Toluidina O podemos ainda observar a existência de uma zona menos densa nesta camada. A parte externa da sexina reage positivamente ao Comassie Blue, evidenciando a presença de proteínas (Fig. 40.f).

Na seqüência, encontra-se a intina, camada mais interna que permanece em contato com a plasmalema do gametófito. Em *P. ulei* parece subdividir-se em: intina 1, mais externa, corando-se de azul escuro com Azul de toluidina O; e intina 2, mais interna, que assume coloração azul claro com tal corante (Fig. 40.d). A intina 1 cora-se com Alcian Blue, atestando sua natureza péctica (Fig. 40.g), reage positivamente ao teste de identificação de proteínas com Comassie Blue (Fig. 40.f) e reage com Calcofluor White, evidenciando a presença de celulose (Fig. 40.h).

PAS reage com praticamente todos os estratos e citoplasma das células vegetativa e generativa, evidenciando a presença de polissacarídeos insolúveis no gametófito masculino (Fig. 40.i).

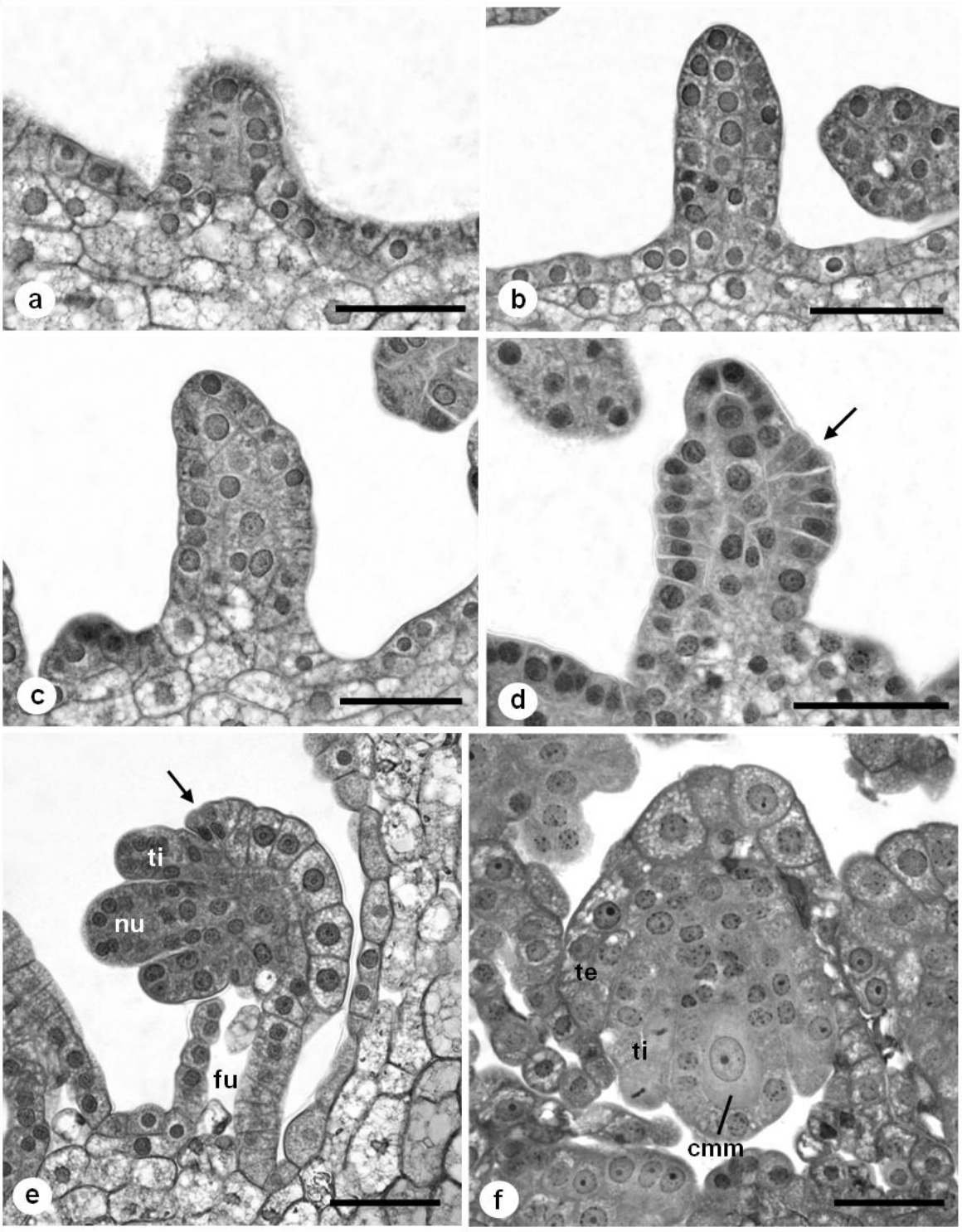


Figura 33. Ontogênese do rudimento seminal: a) Início do primórdio do rudimento seminal, evidenciando-se configuração bizonada; b) Linha axial de células resultado de divisões periclinais da inicial; c) Início da curvatura do primórdio; d) Início de desenvolvimento do tegumento interno, note divisões oblíquas da camada dérmica (seta); e) Início de desenvolvimento do tegumento externo, note divisões oblíquas da camada dérmica (seta); f) Detalhe da célula mãe de megásporos envolvida por uma camada de nucelo. cmm – célula mãe de megásporos, fu – funículo, nu – nucelo, te – tegumento externo, ti – tegumento interno. Escalas = 50 µm

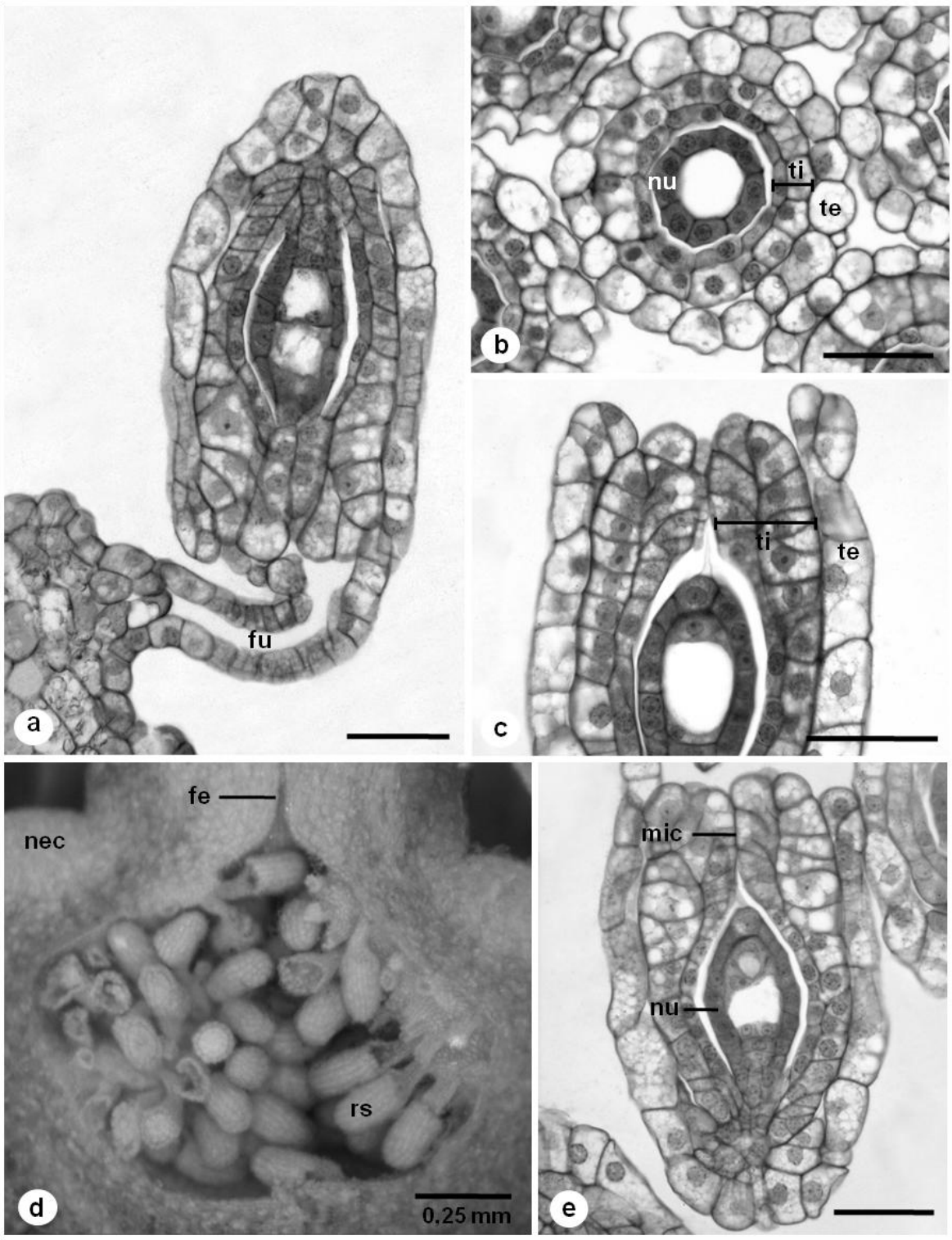


Figura 34. Rudimento seminal: a) Seção longitudinal de rudimento seminal maduro, note funículo com amplos espaços intercelulares; b) Seção transversal de rudimento seminal maduro; c) Detalhe do ápice dos tegumentos; d) Seção transversal do ovário, note rudimentos anátropos à direita; e) Seção longitudinal de rudimento seminal maduro, evidenciando formação da micrópila pelo tegumento interno. fe – fenda do estilete, fu – funículo, mic – micrópila, nec – nectário, nu – nucelo, rs – rudimento seminal, te – tegumento externo, ti – tegumento interno. Escalas = 50 µm

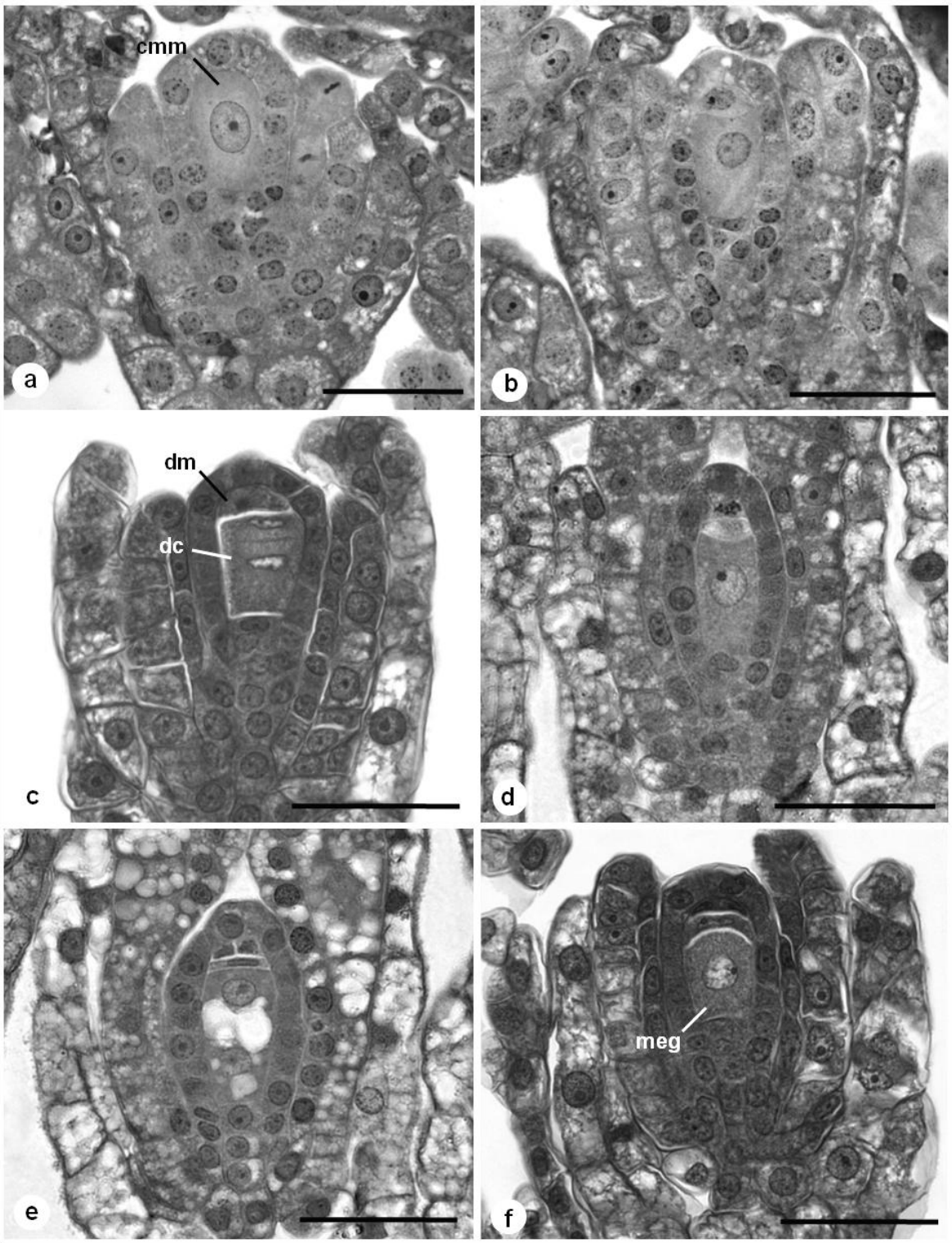


Figura 35. Megasporogênese: a) Célula mãe de megásporos; b) Díade, sendo célula micropilar menor; c) Segunda divisão da meiose do tipo assíncrona: díade calazal em telófase e díade micropilar em anáfase; d) Tríade resultante da meiose assíncrona, díade micropilar em metáfase; e) Tétrade em “T”; f) Final da esporogênese: esporo calazal viável e demais em processo de degeneração. cmm – célula mãe de megásporos, dc – díade calazal, dm – díade micropilar, meg – mesgásporo viável. Escalas = 50 µm

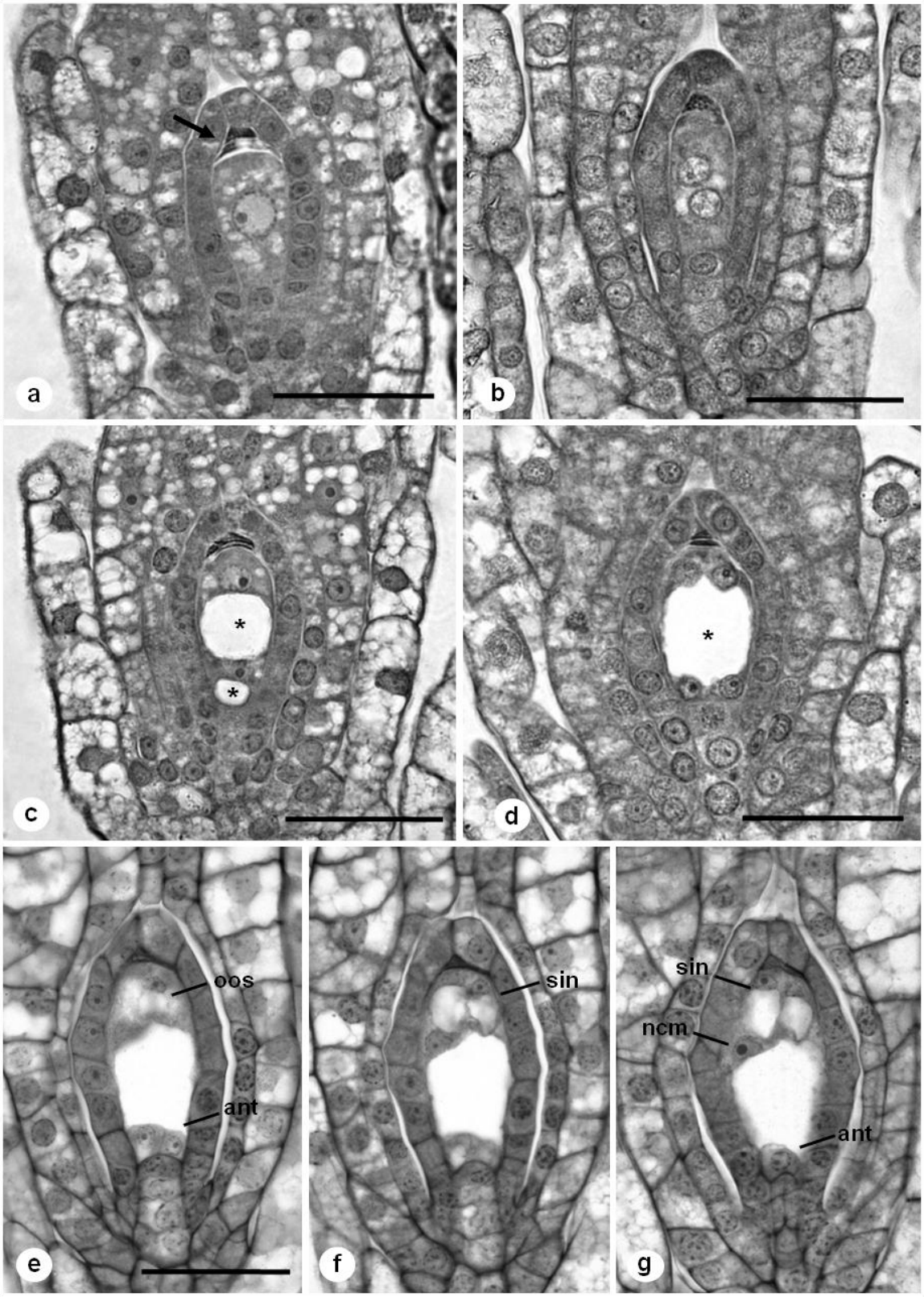


Figura 36. Megagametogênese: a) Célula mãe de megagametófito e megásporos não funcionais em degeneração (seta); b) Megagametófito binucleado; c) Megagametófito binucleado após formação dos vacúolos (*); d) Megagametófito tetranucleado, presença de um grande vacúolo central (*); e-g) Cortes seriados do gametófito feminino maduro, heptanucleado. ant – antípoda, ncm – núcleo da célula média, oos – oosfera, sin – sinérgide. Escalas = 50 µm

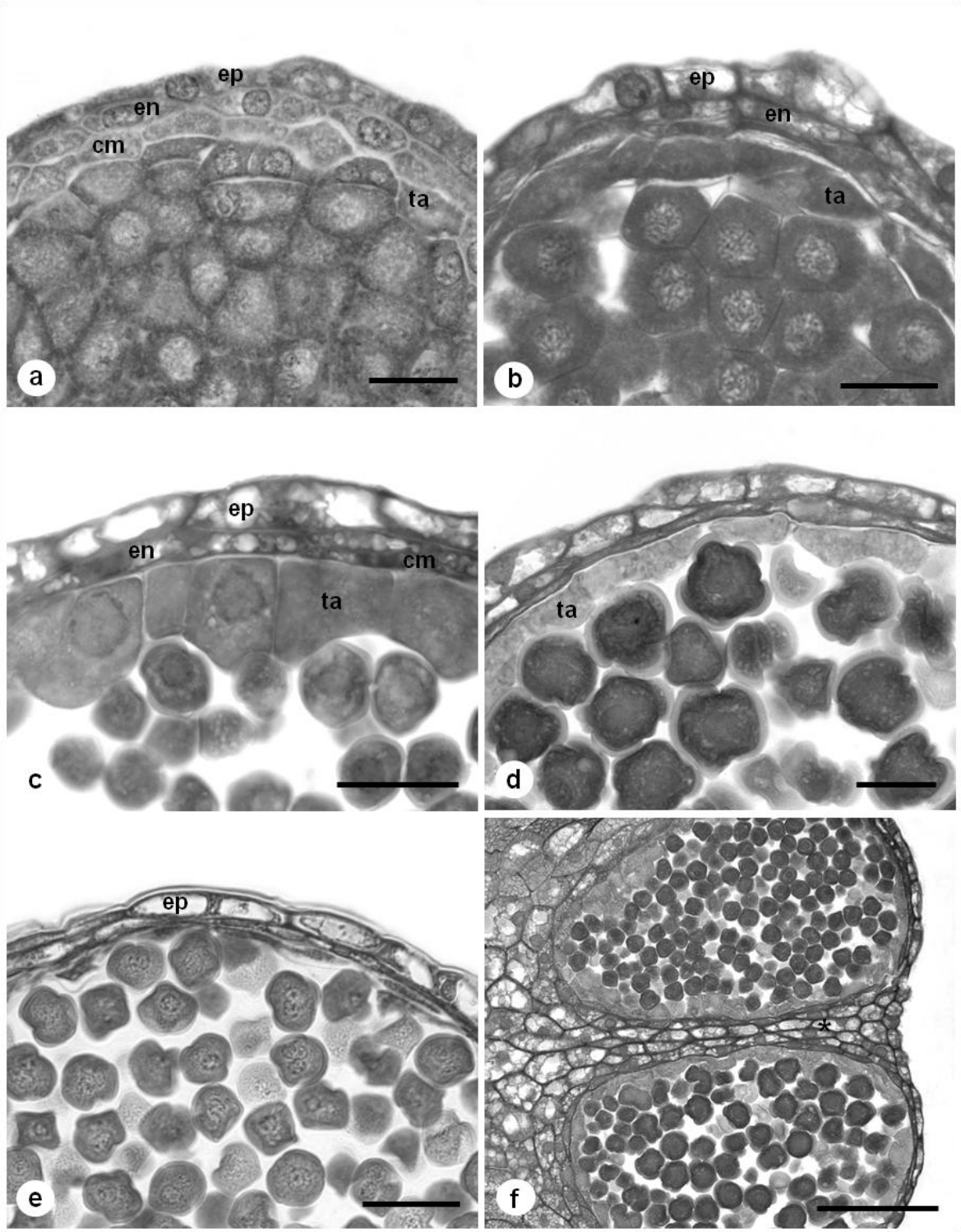


Figura 37. Estratos parietais: a) Microsporângio no estádio de tecido esporígeno; b) Estádio de células mãe de micrósporos; c) Tétrades, note tapete secretor íntegro; d) Micrósporos livres e tapete em degeneração; e) Esporângio pouco antes da deiscência, note apenas epiderme íntegra e presença de cutícula; f) Detalhe das camadas celulares que separam os esporângios dos anéis superior e inferior. cm – camada média, em – endotécio, ep – epiderme, ta – tapete. Escalas a-e = 25 µm, f = 50 µm.

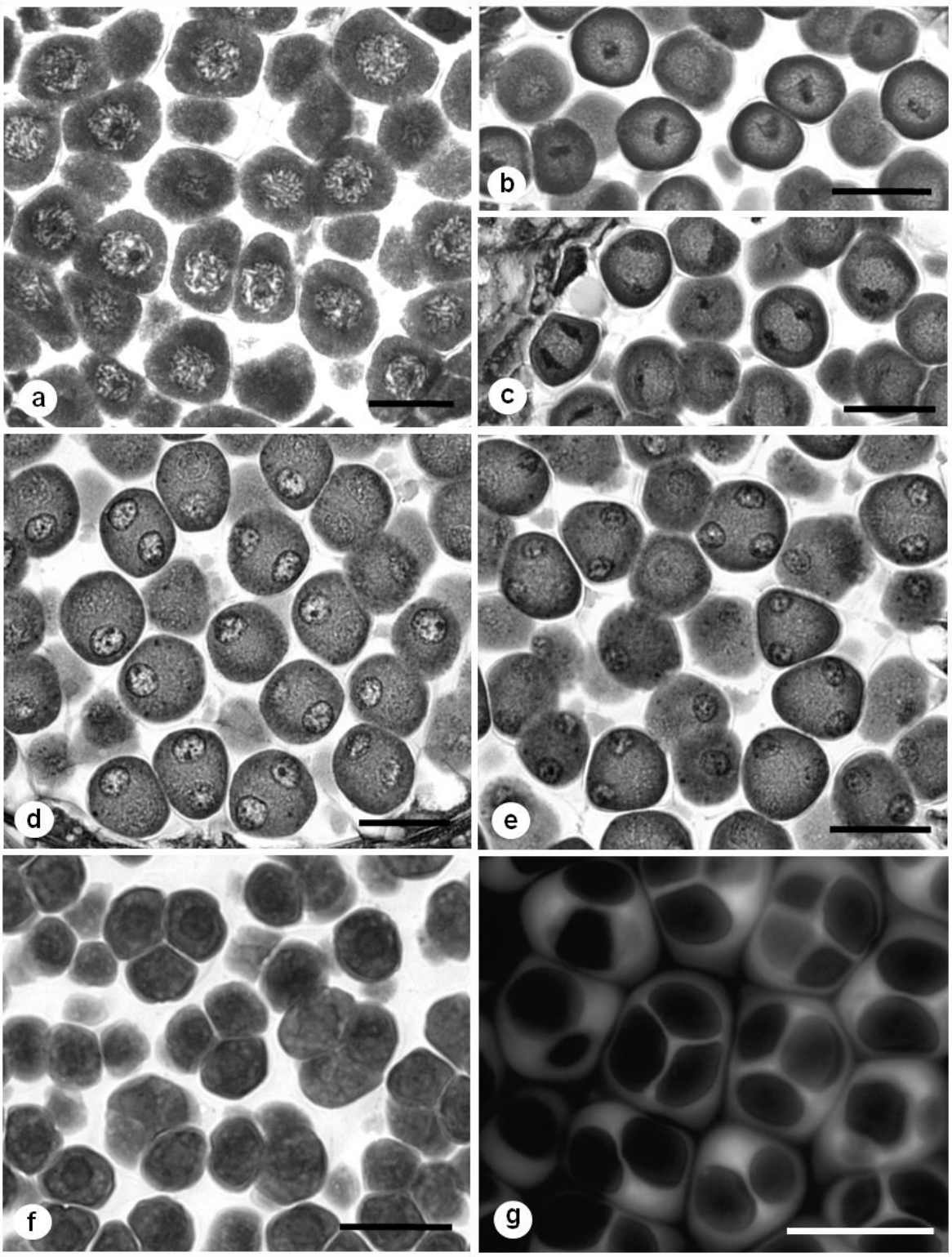


Figura 38. Microsporogênese: a) Células mãe de micrósporos em prófase I; b) Metáfase I; c) Anáfase I; d) Díades; e) Tétrades antes da citocinese; f) Micrósporos após citocinese, ainda agrupados em tétrades; g) Teste de azul de anilina evidenciando deposição de calose nas tétrades. Escalas = 25 µm.

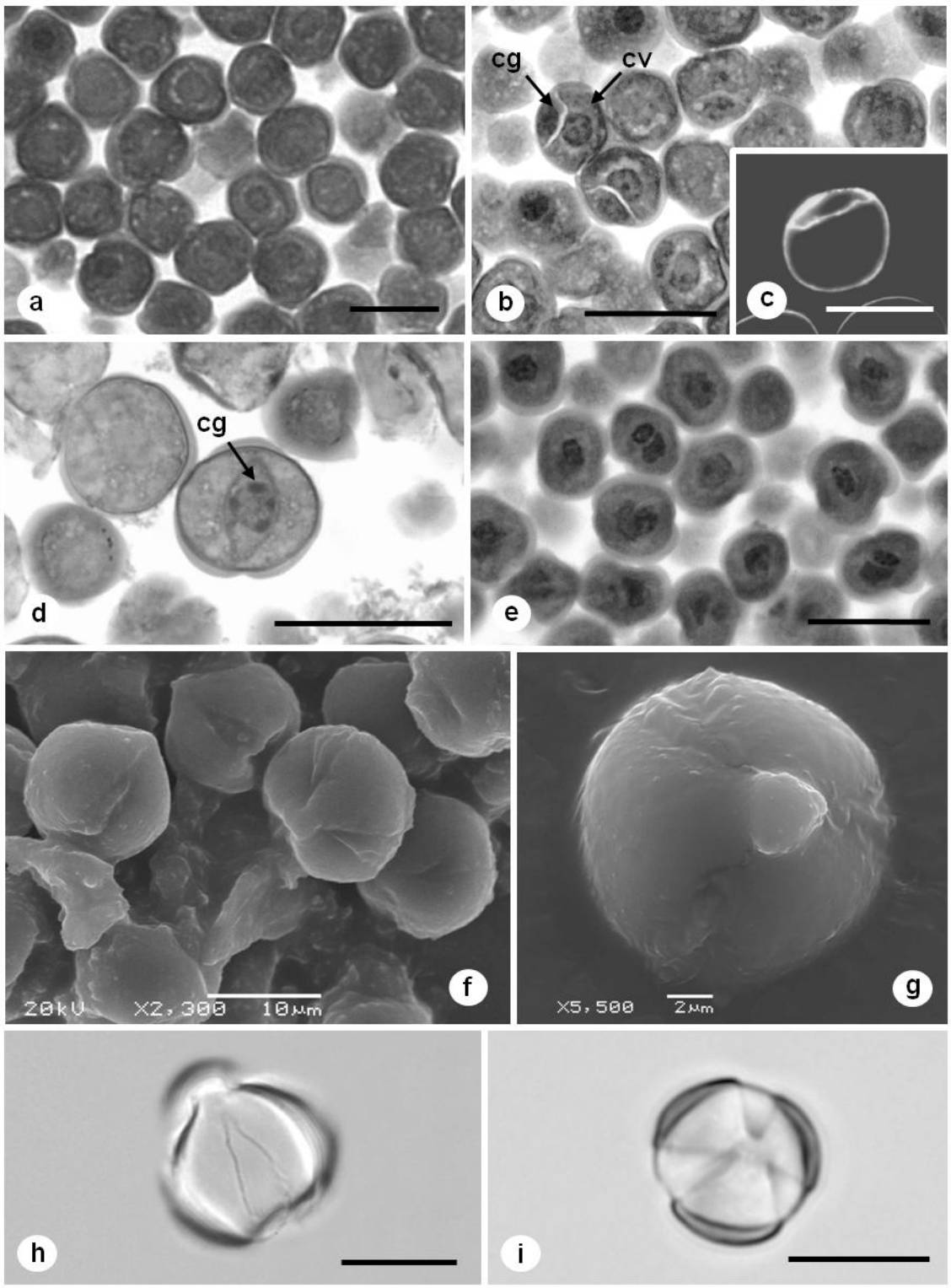


Figura 39. Microgametogênese e gametófito: a) Micrósporos livres; b) Gametófito após divisão mitótica assimétrica; c) Teste com Calcofluor white, evidenciando parede celulósica; d) Detalhe da célula generativa lenticular; e) Gametófitos bicelulares; f) Grãos de pólen cobertos com secreção dos tricomas vesiculares (vide capítulo III); g) Grão em vista polar, note protuberância no pólo proximal; h) Grão acetolisado em vista equatorial, note colpo alargando-se gradualmente do pólo proximal ao distal; i) Grão acetolisado em vista polar, evidenciando a presença de três colpos. cg – célula generativa, cv – célula vegetativa. Escalas a,b,d,e = 25 µm, c,h,i = 25 µm.

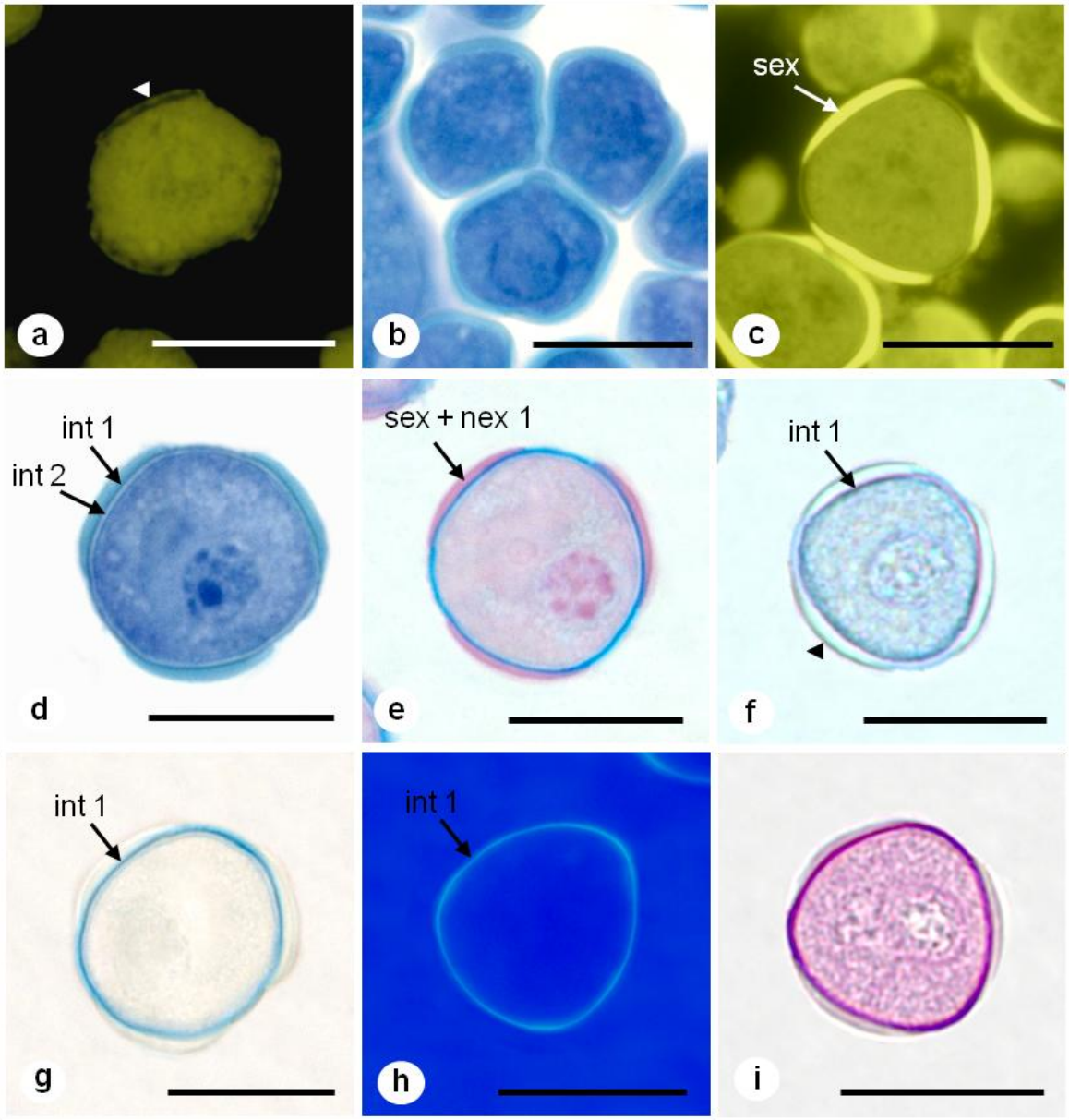


Figura 40. a) Coloração com auramina evidenciando deposição de esporopolenina (ponta de seta) na esporoderme do micrósporo; b) Coloração com Azul de Toluidina O evidenciando tétrade com esporoderme em estádio avançado de desenvolvimento; c) Coloração com auramina evidenciando deposição de esporopolenina no gametófito bicelular; d) Coloração com Azul de Toluidina evidenciando estratos da intina; e) Coloração com Azul de Astra e Fucsina básica; f) Coloração com Comassie Blue evidenciando presença de proteínas na intina 1 e porção externa da sexina (ponta de seta); g) Coloração com Alcian Blue; h) Reação com Calcofluor White para celulose; i) Teste de PAS evidenciando presença de polissacarídeos insolúveis. int – intina, nex – nexina, sex – sexina. Escalas = 15µm.

4. DISCUSSÃO

A formação dos tegumentos no rudimento seminal é uma característica de importância taxonômica bem como a origem dérmica ou subdérmica. De acordo com Davis (1966), a condição bitegumentada é a mais comum entre as dicotiledôneas, sendo encontrada em 155 famílias. Em *P. ulei* os rudimentos seminais são bitegumentados, sendo ambos os tegumentos originados a partir de divisões oblíquas da camada dérmica dos primórdios.

Uma característica que já havia sido descrita para o gênero (Blarer *et al*. 2004), e que se confirma em *P. ulei*, é a presença de um funículo com amplos espaços intercelulares. Tal estrutura é considerada pelos autores como altamente incomum dentre as angiospermas. Segundo Rutherford (1970) as células do funículo se tornam altamente vacuoladas e começam a degenerar no momento em que o tegumento externo inicia, de forma que ao final o funículo corresponda à um cilindro de células praticamente oco.

Outra característica de potencial taxonômico é a participação dos tegumentos na formação da micrópila. Um estudo realizado por Davis (1966) com 189 famílias constatou que em 88 famílias de dicotiledôneas a micrópila é formada pelo tegumento interno, em 74 por ambos os tegumentos e em 4 pelo tegumento externo. Em *P. ulei* a micrópila é formada pelo tegumento interno apenas. Tal observação concorda com o relatado por Endriss (1902) e Rutherford (1970), mas discorda com o observado por Blarer e colaboradores (2004) e Bouman e Meijer (1994), que afirmam ser a micrópila formada pelos dois tegumentos.

Além destas características, destacam-se no presente estudo outros caracteres considerados de grande importância taxonômica, como organização do primórdio do rudimento seminal do tipo bizonada e rudimento seminal do tipo anátropo. Quanto à megasporogênese, característica inédita para a família é a ocorrência de meiose I do

tipo assimétrica, formando uma díade micropilar menor que a calazal. Bouman e Meijer (1994) e Rutherford (1970) relatam a ocorrência de tétrades lineares, fato que não pode ser observado em *P. ulei*, cujas tétrades são sempre em “T”, podendo ocasionalmente a díade micropilar degenerar-se sem ocorrência de divisão mitótica. Apenas o megásporo de posição calazal é viável.

O desenvolvimento do gametófito feminino de *P. ulei* é do tipo *Polygonum*, sendo este o mais freqüente nas dicotiledôneas (Davis 1966). Esse tipo é caracterizado por apresentar duas sinérgides e uma oosfera, formando o aparelho oosférico na porção micropilar, uma célula média com dois núcleos polares e três antípodas localizadas na porção calazal. Destaca-se como característica de importância taxonômica a fusão dos núcleos polares antes da fecundação.

Os microsporângios são compostos pelo tecido esporogênico e por um número variável de estratos parietais que o protegem. Davis (1966) descreveu quatro tipos de desenvolvimento desses estratos nas angiospermas, sendo eles: *Básico, Dicotiledôneo, Monocotiledôneo* e *Reduzido.* Apesar de não termos acompanhado a ontogênese inicial, é razoável supor que ocorre desenvolvimento de um estrato parietal primário e que este se divide para formar o estrato parietal primário externo e o interno. O que não se consegue saber é qual estrato se divide depois, se o estrato parietal primário externo, determinando o tipo Monocotiledôneo, ou o estrato interno, determinando o tipo Dicotiledôneo. No esporângio maduro de *P. ulei* podemos verificar que a epiderme é a camada mais externa, existem dois estratos intermediários e internamente o tapete. Dos estratos intermediários, o mais externo é "topograficamente" (posição dependência) o endotécio e o mais interno (posição dependência) a camada média (Mariath, comunicação pessoal).

Na maioria das angiospermas o endotécio é uniestratificado, apresentando espessamentos de parede de formato anelar, em forma de U, helicoidal ou reticulado (Maheshwari 1950, Mariath *et al.* 2003). Estes espessamentos podem estar reduzidos

em plantas aquáticas, como em *Utricularia* e *Wolffia* ou ausentes em anteras com deiscência poricida (Maheshwari 1950). No endotécio de P*. ulei* não existem espessamentos, levando à hipótese de que houve durante a evolução uma transferência de função. Parece-nos razoável supor que a liberação dos gametófitos não ocorra por deiscência mecânica do endotécio, e sim por expansão e ressecamento do esporângio como um todo. Tal hipótese leva em consideração o processo de diferenciação das flores estaminadas em *P. ulei*, que se encontram completamente formadas quando da emersão através da casca hospedeira, ocorrendo posteriormente grande aumento de volume até alcançar a maturidade. Exatamente este aumento de volume sofrido pela flor, somando-se à desidratação dos tecidos, parece-nos ser o responsável pela gradual e progressiva abertura dos microsporângios maduros, que ocorre inicialmente através de fenda transversal individual (vide capítulo III).

A geração esporofítica culmina com a formação dos esporos haplóides, através da divisão meiótica reducional, sendo a esporogênese, portanto, correspondente à primeira fase reprodutiva que ocorre nas anteras (Cocucci & Mariath 1975). Mais comumente, a meiose ocorre no tecido esporogênico de maneira sincrônica em todos os esporângios da antera. Em *P. ulei*, entretanto, não foi verificada tal sincronia, estando os esporângios de uma mesma flor em diversos estádios e desenvolvimento, desde células-mãe até tétrades.

Os grãos de pólen são pequenos, suboblatos e tricolpados. A presença de uma protuberância formada pela junção das placas de sexina no pólo proximal é característica nunca dantes descrita para o gênero. Na família Apodanthaceae, a morfologia polínica dos gêneros apresenta diversidade incomum, sendo os grãos de *Apodanthes* tricolpados, como em *Pilostyles,* e os de *Berlinianche* inaperturados (Blarer *et al.* 2004). A presença de pólen tricolpado sugere o posicionamento da família dentro do clado das eudicotiledôneas, entretanto são necessários maiores

estudos para elucidar se o pólen inaperturado de *Berlinianche* é característica derivada ou plesiomórfica na família.

A ornamentação é do tipo psilada em todas as espécies da família. Em *Pilostyles* os principais agentes polinizadores são as vespas (vide capítulo I), e nos parece que a ornamentação dos grãos não é a responsável pela sua aderência ao corpo dos insetos. Aqui podemos ver outro provável caso de transferência de função, sendo o papel de auxiliar na aderência dos grãos ao corpo dos insetos transferido das ornamentações para a substância adesiva liberada pelos tricomas vesiculares existentes no androceu da espécie (vide capítulo III). Tal substância, que representa o próprio protoplasto dos tricomas, parece exercer múltiplas funções, como por exemplo: manter grãos de pólen unidos, protegê-los contra a radiação solar e desidratação durante o transporte e facilitar aderência ao corpo do inseto e ao estigma das flores pistiladas.

Assim como a forma do grão de pólen, a estratificação da esporoderme, sua composição e ornamentação são caracteres amplamente utilizados na sistemática das angiospermas (Erdtman 1952). O único estudo existente para o gênero *Pilostyles* lida apenas com a descrição da estrutura da esporoderme (Takhtajan *et al.* 1985), sendo o presente estudo o primeiro a caracterizar bioquimicamente os diferentes estratos. Além de ser considerada uma importante parede protetora, atualmente sabe-se que a esporoderme não é uma camada inerte, e sim uma superfície complexa onde ocorrem processos enzimáticos, trocas iônicas e mecanismos de reconhecimento (Heslop-Harrison 1976). Desse modo, fica claro que o conhecimento da composição dos diferentes estratos é peça chave para um entendimento do sistema reprodutivo das espécies como um todo. Em *P. ulei* os grãos de pólen apresentam depósito de proteínas na superfície externa da sexina e na intina, sendo provavelmente tais proteínas responsáveis pelo reconhecimento durante a interação pólen/estigma, controlando assim os cruzamentos entre espécies (Heslop-Harrison *et al*. 1973).

5. CONCLUSÕES

O presente estudo contribuiu para um conhecimento mais claro e amplo do processo de esporogênese e gametogênese no gênero *Pilostyles*. Não só foram elucidadas as principais etapas do desenvolvimento dos esporângios, como foram evidenciadas diversas características nunca dantes descritas, sendo essas de grande valor taxonômico para a família Apodanthaceae. Podemos concluir que:

- Os primórdios dos rudimentos seminais iniciam-se pela atividade de regiões meristemáticas na placenta, numa organização do tipo bizonada.
- Os rudimentos são anátropos, tenuinucelados e bitegumentados; o tegumento interno é formado primeiro, mas ambos alcançam o mesmo tamanho no rudimento maduro.
- A micrópila é formada apenas pelo tegumento interno.
- A megasporogênese é do tipo monospórica e o desenvolvimento do gametófito feminino é do tipo *Polygonum.*
- A parede dos microsporângios apresenta os seguintes estratos parietais (de fora para dentro): epiderme, endotécio, camada média e tapete.
- O endotécio carace de espessamentos de parede, sendo a deiscência dos esporângios realizada por expansão e ressecamento do órgão.
- Na microsporogênese, a citocinese é do tipo simultânea e as tétrades são em sua maioria tetraédricas, não havendo sincronismo entre esporângios adjacentes na mesma flor.
- A formação da esporoderme inicia-se cedo, atingindo nível de desenvolvimento avançado antes mesmo da separação dos micrósporos.
- No gametófito maduro, a esporoderme apresenta-se estratificada da seguinte maneira (de dentro para fora): intina 2, intina 1, nexina 2, nexina 1 e sexina.
- Os grãos de pólen são pequenos, suboblatos e tricolpados; a ornamentação é do tipo psilada.

É de entendimento deste grupo de pesquisa que tais dados merecem destaque pelo ineditismo para a literatura atual da família Apodanthaceae e, principalmente, na sua capacidade de ancorar estudos comparativos futuros com outros taxa. Juntamente com a morfologia e anatomia floral, os caracteres embriológicos devem servir de base na avaliação das propostas taxonômicas vigentes, de modo que a filogenia da família não seja baseada apenas em caracteres moleculares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKMAN, T.J., MCNEAL, J.R., LIM, S-H., COAT, G., CROOM, H.B., YOUNG, N.D. & dePAMPHILIS, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology 7*: 248.

BHOJWANI, S.S. & BHATNAGAR, S.P. *The embryology of angiosperms*. 3.ed. New Delhi: Vikas Publishing House, 1981.

BLARER, A., NICKRENT, D.L. & ENDRESS, P.K. 2004. Comparative floral structure and systematics in Apodanthaceae (Rafflesiales). *Plant Systematics and Evolution* 245: 119-142.

BOUMAN, F. & MEIJER, W. 1994. Comparative structure of ovules and seeds in Rafflesiaceae. *Plant Systematics and Evolution* 193: 187-212.

COCUCCI, A.E. & MARIATH, J.E.A. 1975. Sexualidade das plantas. *Ciência hoje* 18: 51-61.

DAVIS, G. L. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. New York: John Wiley, 1966.

ENDRISS, W. 1902. Monographie von *Pilostyles ingae* (Karst.) (*Pilostyles ulei* Solms-Laubach). *Flora* 91: 209-236.

ERDTMAN, G. *Pollen morphology and plant taxonomy:* angiosperms, an introduction to palynology. Waltham, Mass.: Chronica Botanica. 1952.

ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method: a revised description. (S.L.). *Svenk Bot. Tidskr.* 54: 561-564.

FEDER, N. & O´BRIEN, T.P. 1968. Plant microtechique, some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; KNOX, R. B. & HOWLETT, B. 1973. Pollenwall proteins: “gametophytic” and “sporophytic”fractions in the pollen walls of the Malvaceae*. Annals of Botany* 37:403-412.

HESLOP-HARRISON, J. 1976. The adaptative significance of the exine. *In*: *The evolutionary significance of exine* (eds.) I. K. Ferguson e Miller. Linnean Society Symposium 1, Academic Press, London, p. 27-37.

JENSEN, W.A. *Plant Histochemistry- principles and practice.* San Francisco and London: W. H. Freeman and company, 1962. viii+408p.

JOHANSEN, D.A. *Plant Microtecnique*. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1940.

JOHANSEN, D. A. *Plant embryology: embryogeny of the Spermatophyta*. USA: Waltham Mass, 1950.

JOHRI, B. M. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 830p.

LILLIE, R.D. *Histopathologic technic and Practical Histochemistry.* New York: McGraw-Hill Book Company, 1965. 175p.

MAHESHWARI, P. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1950.

MARIATH, J.E.A.; SANTOS, R.P. & BITTENCOURT Jr., N.S. 2003. Flor. *In*: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. [Eds.]. *Anatomia Vegetal.* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 329-373 p.

MARTIN, F.W. 1959. Staining and observering pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*: 125-128.

McDOWELL, E.M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100: 405-414.

NICKRENT, D.L., BLARER, A., QIU, Y-L. & VIDAL-RUSSELL, R. 2004. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* 4:40.

O'BRIEN T.O. & McCULLY, M.E. *The study of plant structure - principles and selected methods*. Melbourne Australia: Termarcaphi Pty. Ltda., 1981. 345p.

PACINI, E.; FRANCHI, G.G. & RIPACCIOLI, M. 1999. Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution* 217: 81-99.

RUTHERFORD, R.J. 1970. The anatomy and cytology of *Pilostyles thurberi* Gray (Rafflesiaceae). *Aliso* 7: 263-288.

SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reativity of pollen walls. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21: 73-80.

TAKHTAJAN, A.L.; MEYER, N.R. & KOSENKO, V.N. 1985. Pollen morphology and classification in Rafflesiaceae s.l. *Botanichnyi Zhurnal* 70: 153-162.

CONSIDERAÇÕES FILOGENÉTICAS

As considerações abaixo discutidas não têm a pretensão de solucionar o posicionamento da família Apodanthaceae dentre as demais angiospermas. Antes, visam uma análise preliminar, com a expectativa de motivar estudos comparativos futuros, lidando principalmente com ontogênese e vascularização floral, que venham a elucidar características florais ainda dúbias na família.

O fato é que o posicionamento da família Apodanthaceae continua incerto. Como mencionado anteriormente, em um estudo de Nickrent e colaboradores (2004), a partir da análise do DNA mitocondrial mostrou-se que a família possui afinidades com Cucurbitales (Fig. 41) e, a partir do DNA nuclear, com Malvales (Fig. 42).

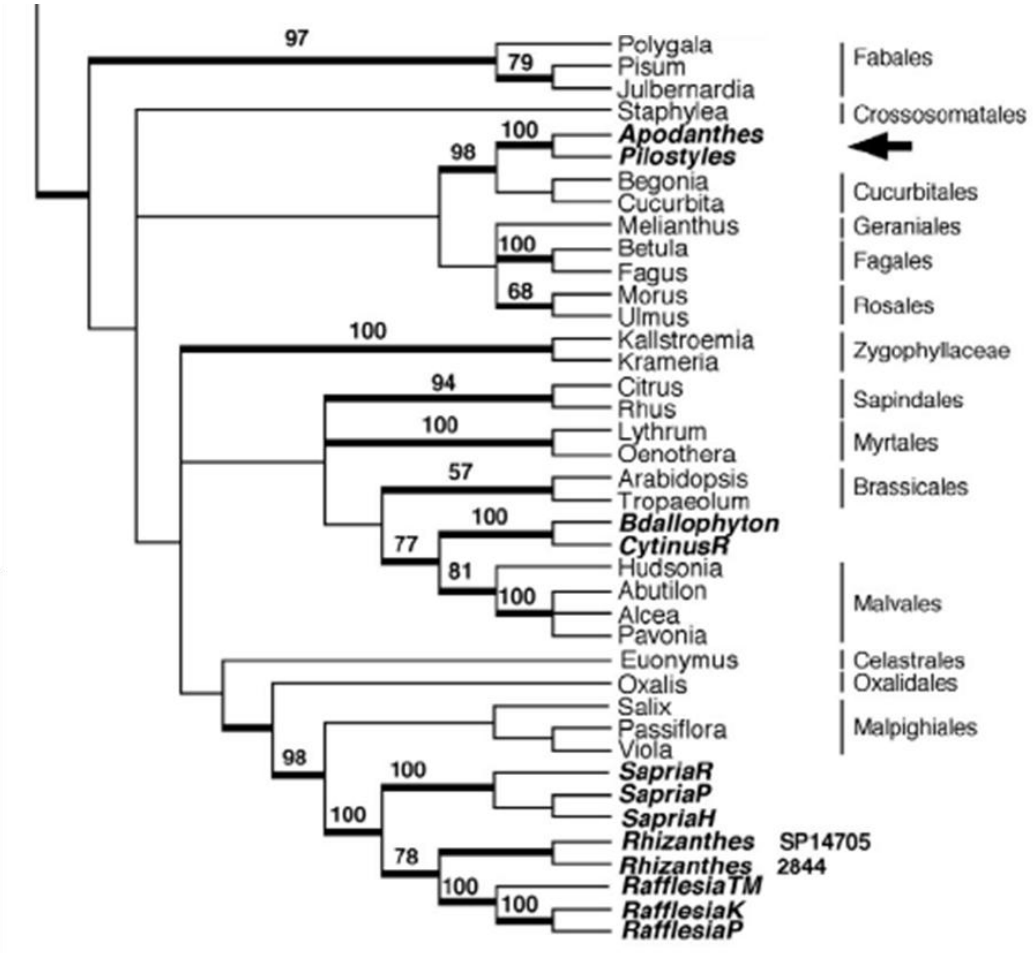


Figura 41. Cladograma resultante da análise do DNA mitocondrial (*mat R*). Taxa da família Rafflesiaceae *s.l.* aparecem em negrito e seta indica possível caso de transferência horizontal de genes (retirado de Nickrent *et al.* 2004).

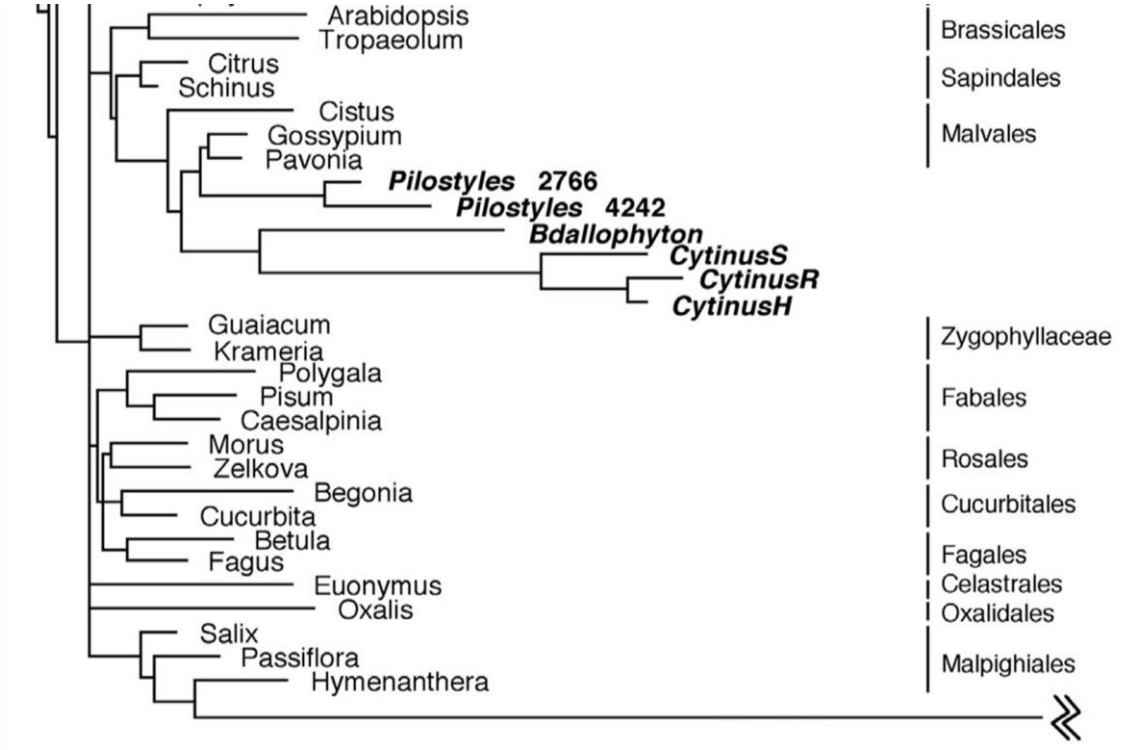


Figura 42. Cladograma resultante da análise do DNA nuclear (SSU rDNA). Taxa da família Rafflesiaceae *s.l.* aparecem em negrito (retirado de Nickrent *et al.* 2004).

Interessante notar que o clado Malvaceae + Apodanthaceae aparece como grupo irmão de Cytinaceae (Fig. 42), família anteriormente pertencente à Rafflesiaceae *s.l*. juntamente com Apodanthaceae (Harms 1935). Características compartilhadas pelas famílias, além do hábito holoparasita endoparasita, incluem: flores diclinas, verticilos estéreis tepalóides, disco nectarífero, androceu em sinândrio, ovário ínfero e unilocular com quatro placentas parietais (Nickrent *et al.* 2004), rudimentos seminais tenuinucelados, megagametogênese do tipo *Polygonum*, fruto baga com sementes muito pequenas e pouco desenvolvidas (Harms 1935) e pólen tricolpado (em *Bdallophyton*, Takhtajan *et al*. 1985). Na obra clássica de Erdtman (1952), o autor adiciona que a sexina dos grãos de pólen de *Pilostyles* é como aquela dos grãos de *Cytinus*. Outros relatos pontuais inferindo semelhança entre as famílias são os de Solms-Laubach (1874), que enfatiza semelhanças no sistema endofítico, e de Endriss (1902), que faz um paralelo entre a morfologia do ovário entre *Cytinus* e *Pilostyles*. Maiores estudos são necessários para verificar se tais características são

convergências, talvez derivadas do hábito endoparasita, ou se representam sinapomorfias entre os clados.

No recente estudo de Barkman e colaboradores (2007), construído a partir da análise de três genes mitocondriais, a família Apodanthaceae foi posicionada dentro da ordem Cucurbitales (Fig. 43). Todavia os autores admitem o nível de confiança do posicionamento como sendo baixo, devido a múltiplos eventos de transferência horizontal de genes mitocondriais (principalmente *atp 1*) que teriam ocorrido, entre a espécie parasita e sua hospedeira, dificultando as análises.

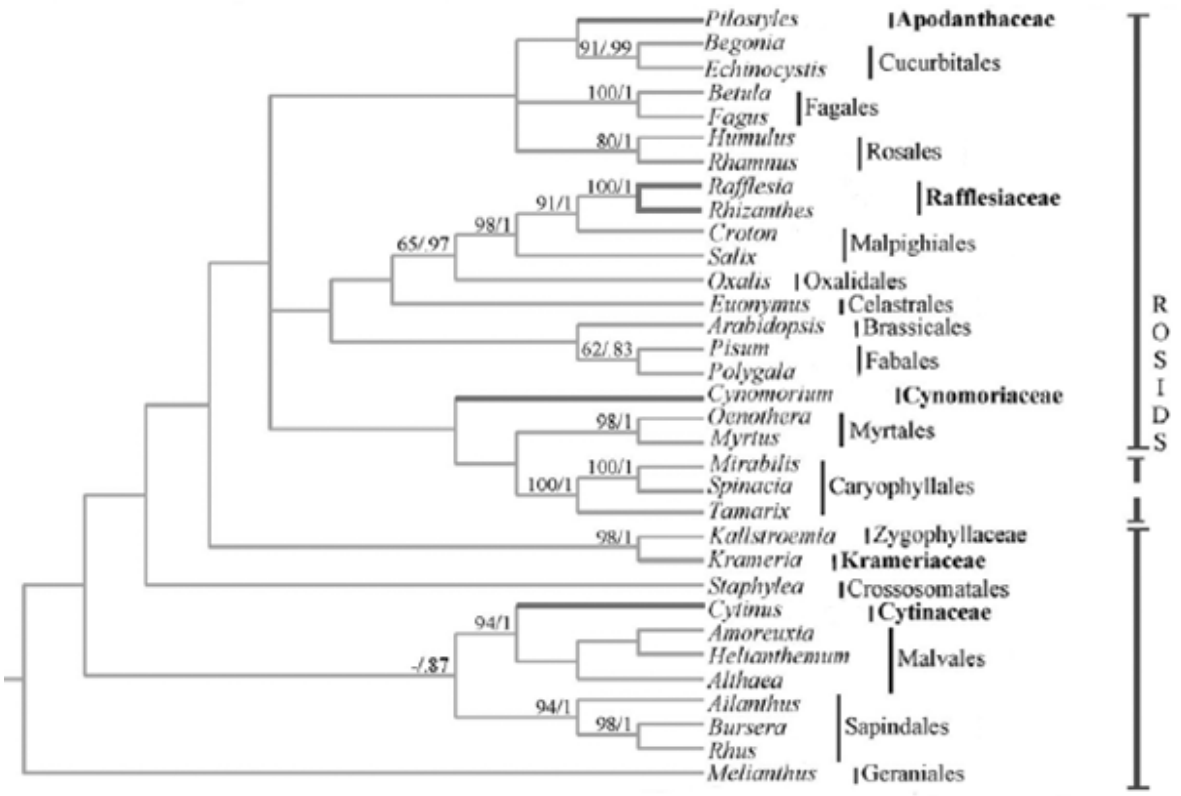


Figura 43. Cladograma resultante da análise combinada de três genes mitocondriais (*atp 1* + *cox I* + *mat R*) (retirado de Barkman *et al*. 2007).

Em ambos os estudos fica excluída a possibilidade de contaminação das amostras, pois Apodanthaceae não possui hospedeiros dentro de Malvales ou Cucurbitales. O que devemos refletir agora é qual análise molecular tem maior probabilidade de refletir a evolução, se aquela realizada a partir do DNA nuclear ou do

mitocondrial. O DNA nuclear das holoparasitas é conhecido por possuir alta taxa de mutação, até três vezes superior que nas plantas fotossintetizantes. O DNA mitocondrial, em contraponto, apresenta altos níveis de transferência horizontal de genes entre hospedeiro e parasita (Barkman *et al.* 2007). Apesar de hoje não possuírem hospedeiros dentro de Cucurbitales, não podemos excluir a possibilidade de tal associação ter ocorrido no passado, com transferência de genes mitocondriais que se incorporaram ao genoma da parasita. Nickrent e colaboradores (2004) sugerem que a árvore construída a partir do DNA nuclear é mais confiável, pois os genes são repetidos de centenas a milhares de vezes no genoma nuclear, sendo menos provável que sofram influência da transferência horizontal. Assim sendo, os autores acreditam no parentesco da família Apodanthaceae com integrantes da ordem Malvales.

São muitos os fatores que dificultam a análise molecular das plantas parasitas, incluindo dificuldades de análise nos três compartimentos contendo DNA nas células. Visto isso, espera-se que o estudo da ontogênese e morfologia floral, à medida que alavanca o maior número possível de caracteres, em análise comparativa com outras angiospermas, possa gerar subsídios para uma revisão das propostas taxonômicas vigentes e, inclusive, culminar em um futuro posicionamento da família. Um interessante ponto de partida para tal análise seria um estudo comparativo da família Apodanthaceae com Malvaceae e Cucurbitaceae, anteriormente referidas como possíveis parentes de tais parasitas (Nickrent *et al.* 2004, Barkman *et al.* 2007).

Como análise preliminar, e com a expectativa de motivar estudos futuros, seguem abaixo tabelas comparativas de caracteres morfo-anatômicos da flor (Tabela 8) e embriológicos (Tabela 9) entre as famílias Apodanthaceae, Malvaceae *s.l.* e Cucurbitaceae (Rao 1954, Davis 1966, Rutherford 1970, Vattimo 1971, Cronquist 1981, Johri *et al.* 1992, Bhattacharyya & Johri 1998, Balthazar *et al.* 2004, Blarer *et al.* 2004, Matthews & Endress 2004, Zhang *et al.* 2006, Judd *et al*. 2008).

Tabela 8. Análise comparativa de caracteres morfo-anatômicos da flor em Apodanthaceae, Malvaceae e Cucurbitaceae. Em vermelho aparecem as características decorrentes do presente estudo, seja pela comprovação de teorias já mencionadas na literatura ou por sugestão de novas hipóteses. NA – não se aplica, ? – desconhecido.

CARACTERES	APODANTHACEAE	MALVACEAE *s.l.*	CUCURBITACEAE
Flores	diclinas (raro monoclinas)	monoclinas	diclinas
Presença de rudimentos	sim, gineceu estéril na flor estaminada	NA	sim, com pistilódio e estaminódio
Nectário	disco nectarífero na base do ovário	tricomas na superfície adaxial das sépalas	nectários extra-florais (raro disco nectarífero ou tricomas)
Soldadura dos verticilos estéreis	peças livres	peças livres ou soldadas	peças soldadas
Bractéolas	3-5 peças livres (2 em *Apodanthes*)	epicálice, 3-12 lobos livres	não
Cálice	tri a pentâmero, dialisépalo (hexâmero em *Berlinianche*)	pentâmero, gamosépalo	pentâmero, gamosépalo
Corola	tri a pentâmera, dialipétala (hexâmera em *Berlinianche*)	pentâmera (ou muitas peças), dialipétala	pentâmera, gamopétala
Androceu (nº estames)	?	isostêmone ou polistêmone	isostêmone, 3-5
Soldadura dos estames	totalmente fusionados, formando sinândrio	filetes soldados formando coluna estaminal ou sinândrio	livres, com filetes soldados ou sinândrio (Cyclantherineae)
Morfologia da antera	?	monoteca, bisporangiada	monoteca (ou biteca, em *Cyclanthera*)
Deiscência da antera	fenda transversal individual	fenda transversal, extrorsa	fenda longitudinal extrorsa (contínua em *Cyclanthera*)
Tricomas secretores no androceu	unicelulares, acima dos sacos polínicos	uni ou pluricelulares, entre as anteras	bicelulares, acima dos sacos em *Cyclanthera*
Posição do gineceu	ínfero ou semi-ínfero	súpero	ínfero ou semi-ínfero
Gineceu (nº de carpelos)	4 (?)	2 a muitos (em geral 5)	em geral 3
Lóculo	1	2 a muitos (em geral 5)	1 (raro 3)
Placentação	parietal	axial	parietal
Estilete	1, curto	1, ramificado no ápice	1 (raro 3), comumente bifurcado
Estigma	3 a 5 lobos, papiloso	o nº ou o dobro do nº de ovários, capitado ou discóide, papiloso	3 lobos, papiloso
Fruto	baga, com placenta hipertrofiada	cápsula loculicida (raro baga ou sâmara)	baga (pepônio), com placenta hipertrofiada

Tabela 9. Análise comparativa de caracteres embriológicos em Apodanthaceae, Malvaceae e Cucurbitaceae. Em vermelho aparecem as características decorrentes do presente estudo, seja pela comprovação de teorias já mencionadas ou por sugestão de novas hipóteses.

CARACTERES	APODANTHACEAE	MALVACEAE *s.l.*	CUCURBITACEAE
Curvatura do rudimento	anátropo	anátropo (campilótropo)	anátropo
N° de tegumentos	dois	dois	dois
Formação da micrópila	pelo tegumento interno	pelos dois tegumentos, em zigzag	pelo tegumento interno (ou pelos dois)
Nucelo	tenuinucelado	crassinucelado	crassinucelado
Suprimento vascular	não	chegando ao topo dos tegumentos	chegando ao topo dos tegumentos
Megasporogênese	monospórico	monospórico	monospórico
Meiose I	assimétrica, díade micropilar menor	assimétrica, díade micropilar menor	díade micropilar menor em *Benincasa*
Meiose II síncrona, assíncrona ou restrita	assíncrona ou restrita à díade calazal	assíncrona	restrita à díade calazal em *Benincasa*
Tétrade de mesgásporos	em T	linear ou em T	linear ou em T
Megásporo funcional	calazal	calazal	calazal
Megametogênese	*Polygonum*	*Polygonum*	*Polygonum* ou *Allium*
Fusão dos núcleos polares	antes da fecundação	antes da fecundação	durante a fecundação
Fecundação	?	porógama	porógama
Endosperma	tipo Nuclear	tipo Nuclear	tipo Nuclear
Tipo de reserva	lipídeo, no endosperma	amido, no endosperma	lipídeo, nos cotilédones
Embriogênese	Caryophyllad ou Solanad	Asterad	Onagrad, Asterad ou Solanad
Forma do embrião maduro	reto, com 8 células	reto (curvado em Malvoideae)	reto
Tegumentos da semente	tégmen bisseriado, fortemente espessado, testa com tanino	tégmen plurisseriado com tanino, testa com tricomas	tégmen colapsa, semente madura apenas com testa
Estratos parietais da antera	epiderme, endotécio, camada média e tapete	epiderme, endotécio, camada média e tapete	epiderme, endotécio, 1-3 camadas médias e tapete
Endotécio	1 camada, sem espessamentos	1-3 camadas, fibroso	1 camada, fibroso
Tapete	secretor	amebóide	secretor
Citocinese e tétrade	simultânea, tétrade tetraédrica	simultânea, tétrade tetraédrica, isobilateral e decussada	simultânea, tétrade tetraédrica, isobilateral e decussada
Pólen liberado	bicelular	bicelular	bicelular (raro tricelular)
Grão de pólen	tricolpado (inaperturado em *Berlinianche*), com ornamentação psilada	pantoporado (ou multicolporado), ornamentação equinada	3 a multicolporado 3 a multicolpado, ornamentação reticulada e fossulada

Algumas características são compartilhadas entre as três famílias, e são relativamente comuns dentre as eudicotiledôneas, principalmente as embriológicas: rudimentos anátropos e bitegumentados, megasporogênese monospórica com esporo calazal viável, gametogênese do tipo *Polygonum,* endosperma nuclear, citocinese simultânea, tétrades tetraédricas e pólen liberado na forma bicelular.

Analisando-se os caracteres morfo-anatômicos, entretanto, podemos perceber diversidade entre as famílias. Dentre as características compartilhadas entre Apodanthaceae e Malvaceae, podemos ressaltar aquelas referentes ao androceu, como: presença de flores com coluna estaminal ao redor do estilete; estratos do microsporângio formados por epiderme, endotécio, camada média e tapete; deiscência através de fenda transversal. Outra característica em comum é a presença de tricomas na coluna estaminal e entre as anteras em Malvaceae, sendo estes unicelulares (*Hibiscus*) ou pluricelulares (*Lavatera*, *Quararibea, Matisia*) na família (Balthazar *et al.* 2004). Segundo Blarer e colaboradores (2004), em *Berlinianche*, as peças do verticilo interno possuem tricomas na superfície adaxial que seriam comparáveis aos nectários que ocorrem nas sépalas em muitas Malvaceae, podendo este ser um indício de parentesco entre as famílias.

Quando comparamos Apodanthaceae e Cucurbitaceae, entretanto, parece haver um maior número de características em comum, tais como: flores diclinas, presença de rudimentos do sexo oposto, androceu em sinândrio (subtribo Cyclantherinae), ovário ínfero, unilocular, placentação parietal e fruto baga com placenta hipertrofiada. Dentre as características embriológicas compartilhadas por essas famílias, e não por Malvaceae, podemos citar: micrópila formada pelo tegumento interno, meiose I assimétrica e meiose II restrita à díade calazal (*Benincasa*), embriogênese do tipo Solanad, tapete do tipo secretor e grãos de pólen tricolpados. De especial interesse são as flores de *Cyclanthera pedata* (L.) Schrader: o androceu forma sinândrio circular, com sacos polínicos abrindo por fenda contínua (Pozner 2004), sendo “coroado” por um anel de tricomas glandulares bicelulares

(Vogel 1981), de forma semelhante ao que ocorre em *Pilostyles*. Tais tricomas possuem a mesma função: quando tocados pelo inseto, sua extremidade colapsa e ocorre liberação de uma substância pegajosa, responsável por grudar os grãos no corpo do polinizador.

Apesar de aparentemente existir maior número de caracteres compartilhados entre Apodanthaceae e Cucurbitaceae, antes é imprescindível que sejamos capazes de reconhecer quais características são derivadas e quais são plesiomórficas dentre as angiospermas, de modo a vislumbrarmos possíveis sinapomorfias entre os grupos. Os caracteres evidenciados no presente estudo são de grande importância e provavelmente devem ter implicações de destaque em futuros estudos filogenéticos sobre Apodanthaceae e suas relações com famílias afins, contemplando um posicionamento mais preciso da família dentre as angiospermas.

De maneira similar, maiores estudos são necessários lidando com ontogênese e vascularização floral, para elucidar características ainda dúbias na família Apodanthaceae, como: identidade dos verticilos estéreis, número de estames a partir do qual sinândrio evoluiu, morfologia das anteras e número de carpelos constituintes do gineceu. Somente a partir de tais análises poderemos entender por completo a morfologia floral da família e, conseqüentemente, estabelecer homologias com outros clados de angiospermas, para no futuro chegarmos a um posicionamento que se baseie não só em análises moleculares, mas que leve em consideração diversas áreas do conhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALTHAZAR, M.; ALVERSON, W.S.; SCHONENBERGER, J. & BAUM, D.A. 2004. Comparative floral development and androecium structure in Malvoideae (Malvaceae *s.l.*). *International Journal of Plant Sciences* 165: 445–473.

BARKMAN, T.J., MCNEAL, J.R., LIM, S-H., COAT, G., CROOM, H.B., YOUNG, N.D. & dePAMPHILIS, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology 7*: 248.

BHATTACHARYYA, B. & JOHRI, B.M. *Flowering plants: taxonomy and phylogeny*. Narosa Publishing House: New Delhi, 1998.

BLARER, A., NICKRENT, D.L. & ENDRESS, P.K. 2004. Comparative floral structure and systematics in Apodanthaceae (Rafflesiales). *Plant Systematics and Evolution* 245: 119-142.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press: New York, 1981.

DAVIS, G. L. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. John Wiley: New York, 1966.

ENDRISS, W. 1902. Monographie von *Pilostyles ingae* (Karst.) (*Pilostyles ulei* Solms-Laubach). *Flora* 91: 209-236.

ERDTMAN, G. *Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms, an introduction to palynology*. Waltham, Mass.: Chronica Botanica, 1952.

HARMS, H. 1935. Rafflesiaceae. pp. 243-281 *In*: Engler, A. & Prantl, K.A.E. [eds.] Die Naturlichen Pflanzenfamilien. 2ed. Band 16b. Berlim: Leipzig Verlag von Wilhelm Engelmann.

JOHRI, B.M.; AMBEGAOKAR, K.B. & SRIVASTAVA, P.S. *Comparative embryology of angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin, 1992.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. 3ed. Sinauer Associates: Sunderland, 2008.

MATTHEWS, M.L. & ENDRESS, P.K. 2004. Comparative floral structure and systematics in Cucurbitales (Corynocarpaceae, Coriariaceae, Tetramelaceae, Datiscaceae, Begoniaceae, Cucurbitaceae, Anisophylleaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 129–185.

NICKRENT, D.L., BLARER, A., QIU, Y-L. & VIDAL-RUSSELL, R. 2004. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* 4:40.

POZNER, R. 2004. A New Species of *Echinopepon* from Argentina and Taxonomic Notes on the Subtribe Cyclantherinae (Cucurbitaceae). *Systematic Botany* 29(3): 599–608.

RAO, C.V. 1954. Embryological studies in Malvaceae. I. Development of gametophytes. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* 20: 127-150.

RUTHERFORD, R.J. 1970. The anatomy and cytology of *Pilostyles thurberi* Gray (Rafflesiaceae). *Aliso* 7: 263-288.

SOLMS-LAUBACH, H. 1874. Ueber den Thallus von *Pilostyles haussknechtii*. *Botanischen Zeitung* 32: 49-59.

TAKHTAJAN, A.L.; MEYER, N.R. & KOSENKO, V.N. 1985. Pollen morphology and classification in Rafflesiaceae s.l. *Botanichnyi Zhurnal* 70: 153-162.

VATTIMO, I. 1971. Contribuição ao conhecimento da tribo Apodanthea R. Br. Parte I – Conspecto das espécies (Rafflesiaceae). *Rodriguésia* 26: 37-62.

VOGEL, S. 1981. The glue-producing anther hairs of *Cyclanthera pedata* (Cucurbitaceae). *Plant, systematics and evolution* 137: 291-316.

ZHANG, L-B.; SIMMONS, M.P.; KOCYAN, A. & RENNER, S.S. 2006. Phylogeny of the Cucurbitales based on DNA sequences of nine loci from three genomes: implications for morphological and sexual system evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 305–322.

CONCLUSÕES GERAIS

Pilostyles é uma planta holoparasita com morfologia e hábitos altamente incomuns no reino vegetal. Estudá-la é literalmente um desafio, e requer que sejamos capazes de uma nova visão, de adequarmos nossos conceitos à sua realidade, que é tanto diversa quanto intrigante.

Em primeiro lugar, o que devemos ter em mente é que *Pilostyles* é uma planta não-fotossintetizante e endoparasita, cujo corpo vegetativo está completamente embebido nos tecidos do hospedeiro. Esta íntima associação com o hospedeiro é peça chave para entendermos seu ciclo de vida, suas adaptações morfológicas e anatômicas e como funciona seu sistema reprodutivo.

A partir da análise de *Pilostyles* em nível populacional pudemos compreender como estão distribuídas as flores em cada hospedeiro e qual a razão sexual das populações brasileira e mexicanas, fatores estes influenciados mais pela espécie hospedeira do que pela espécie parasita em questão. O modo pelo qual cada hospedeira percebe e traduz o ambiente ao seu redor possui impacto direto no sistema reprodutivo de *Pilostyles*, influenciando a morfogênese floral em cada população.

A influência do hospedeiro em *Pilostyles* não se restringe somente à morfogênese floral, mas pode ser observada em praticamente todas as etapas do ciclo de vida da parasita. Quanto à germinação, para citar um exemplo, faz-se necessária sinalização química específica provinda da hospedeira para induzir o desenvolvimento do haustório e posterior penetração. Quanto à análise fenológica, percebe-se que tal influência é determinante também para marcar a periodicidade dos eventos, uma vez que as fenologias da hospedeira e da parasita estão diretamente relacionadas. O sincronismo nas épocas de floração é um forte indício de que existe um grande intercâmbio de moléculas, inclusive hormonais, entre tais plantas.

A morfologia e anatomia das flores de *Pilostyles* sempre foram itens muito discutidos na literatura, mas pouco estudados. O presente trabalho colabora para o aprofundamento no conhecimento de tais tópicos através de observações inéditas, que contribuíram não só para corroborarmos/refutarmos teorias já citadas na literatura, mas também como base para construção de novas hipóteses. Especula-se que ao longo da evolução ocorreram eventos de fusão e redução, de modo que a morfologia floral atual da família seja bastante particular, de difícil interpretação. Essa dificuldade resulta não só do alto nível de especialização, mas também da plasticidade das flores, que apresentam número variável de peças em todos os verticilos.

Especial atenção deve ser dada à descoberta da existência de flores monoclinas na família. Tais flores possuem tanto rudimentos seminais quanto sacos polínicos e ocorrem em todas as populações estudadas, em pequena, mas constante porcentagem. Logo, sua existência não pode ser considerada um evento isolado, mas sim deve ser melhor estudada, de modo a compreendermos quais fatores são determinantes durante a morfogênese floral.

Podemos concluir que o presente estudo é de grande valia para a literatura atual da família Apodanthaceae, até então pouco explorada mundialmente e com muitas lacunas. Em primeiro lugar porque nos possibilita uma maior compreensão do ciclo de vida de *Pilostyles*, abordando temas dos mais diversos, desde germinação, polinização e análises populacionais, garantindo-nos uma visão geral da planta e do seu sistema reprodutivo. Em segundo, porque nos permite evidenciar um grande número de caracteres morfológicos e anatômicos inéditos para a literatura, que poderão ser utilizados para estabelecer homologias com outros clados e, inclusive, possibilitar uma revisão das propostas taxonômicas vigentes.

POSFÁCIO

Imagine uma planta.

Raiz, caule, folhas, flores e frutos.

Agora esqueça (quase) tudo isso. *Pilostyles* é diferente.

E é justamente por causa disso que estudá-la não é tarefa fácil. Somando-se ao hábito endoparasita altamente incomum no reino vegetal, e à todas as complicações metodológicas advindas dele, imagine estudar um organismo virtual, cuja unidade básica não podemos delimitar. É isso mesmo, não podemos delimitar o que é um indivíduo. Dificuldades decorrentes dessa realidade são, por exemplo, nossa incapacidade de afirmar como funciona o sistema reprodutivo e, inclusive, de solucionar qual a esporidade da família. E mais, imagine acompanhar o ciclo de vida e fenologia (com observações mensais) de uma população distante pelo menos 700 km da sua universidade, onde nem mesmo encontrar os indivíduos em campo, visto sua quase invisibilidade nos ramos hospedeiros, é tarefa simples. Não bastasse isso, após extensa inspeção, constata-se que as diferentes populações exibem alta plasticidade morfológica, com flores diferentes dentro de um mesmo hospedeiro, não nos possibilitando estabelecer um número básico para os verticilos florais.

Estudá-las não é fácil, mas com certeza é fascinante. Em primeiro lugar porque as plantas parasitas são intrinsecamente encantadoras; a curiosidade por elas vem crescendo desde o descobrimento em 1821, nas florestas tropicais de Sumatra, da maior flor do mundo, a endoparasita *Rafflesia arnoldii* R. Br. Em segundo porque existe toda uma aura de mistério rondando as plantas parasitas, em especial as holoparasitas; seu modo de vida e morfologia são tão especializados que levaram diversos estudiosos a colocar em dúvida sua natureza vegetal, comparando-as com fungos ou outros organismos. Apesar de toda essa curiosidade, foram publicados poucos estudos específicos até o momento. Por qual razão? Não posso afirmar, mas

compreenderia perfeitamente (depois de três longos anos de estudo) se fosse citado o medo do fracasso. E sim, ele é inevitável quando se estuda plantas tão diferentes, onde nem sempre a adequação dos métodos ocorre de maneira satisfatória.

A realidade é que somos ignorantes quando o assunto são as plantas holoparasitas. Pouco compreendemos da sua morfologia, anatomia, ciclo de vida e relacionamento com hospedeiro, e nem ao menos sabemos com quais outras angiospermas são aparentadas. Mas, a meu ver, é isso que as torna ainda mais interessantes, e fato pelo qual novas pesquisas devem ser realizadas. Há muito o que ser explorado. Com certeza vale a pena investir em *Pilostyles*!

RESUMO

As plantas holoparasitas dependem inteiramente de recursos retirados do xilema e floema hospedeiros e são representadas atualmente por pelo menos sete linhagens, cujo posicionamento filogenético continua sendo revisto. A família Apodanthaceae inclui plantas aclorofiladas, holoparasitas de caules, cujo corpo vegetativo apresenta extrema redução. Por serem endoparasitas, tornam-se evidentes apenas na época da floração, quando as diminutas flores rompem a periderme do hospedeiro. Incluem-se nessa família três gêneros, sendo *Pilostyles* o de mais ampla distribuição. Apesar de existirem estudos minuciosos sobre o sistema endofítico no gênero, sua fenologia, ciclo de vida e ontogênese floral continuam desconhecidos. O presente estudo objetiva elucidar essas questões, de modo a proporcionar uma compreensão do sistema reprodutivo e do processo evolutivo das flores dessas intrigantes angiospermas, servindo de base para estudos futuros que visem a estabelecer homologias com outros clados. Primeiramente foi realizado um levantamento dos hospedeiros parasitados, analisando-se padrão de distribuição das flores e a razão sexual das populações de *Pilostyles* existentes nas áreas de estudo no Brasil e México. Indivíduos foram selecionados aleatoriamente para a realização dos testes de polinização, observação e coleta de visitantes, coleta de néctar e de sementes parasitas, e acompanhamento fenológico. Em laboratório realizaram-se os experimentos de germinação e as técnicas de preparo e análise histológicas das sementes e flores de *Pilostyles*. Com relação ao ciclo de vida, observou-se que: 1) as vespas aparecem como os visitantes mais freqüentes; 2) a dispersão provavelmente seja resultado de endozoocoria por aves; 3) a germinação provavelmente ocorre diretamente no caule hospedeiro; 4) as fenologias da hospedeira e da parasita estão diretamente relacionadas, havendo inclusive possibilidade de sincronismo. Com relação à razão sexual das populações, concluímos que: 1) a determinação do sexo das flores responde a estímulos específicos de cada espécie hospedeira; 2) a distribuição espacial das flores esta diretamente relacionada à razão sexual das populações; 3) existem flores monoclinas em número constante em todas as populações, sendo tais flores funcionalmente estaminadas. A partir do estudo da anatomia floral e embriologia, pudemos observar que: 1) as flores são envolvidas por quatro verticilos estéreis (de fora para dentro: 2 + 2 + 4 + 4); 2) a região estigmática é restrita à área das papilas; 3) a deiscência dos microsporângios é resultado da expansão e ressecamento do órgão; 4) os tricomas vesiculares secretam uma substância pegajosa, provavelmente responsável por unir os grãos de pólen e grudá-los ao corpo do polinizador; 5) a coluna das flores estaminadas é formada através de fusão pós-genital de uma coluna estilar central e de uma coluna externa, que traz no bordo superior os sacos polínicos. Concluindo, acreditamos que tais dados merecem destaque pelo ineditismo para a literatura atual da família Apodanthaceae e, principalmente, na sua capacidade de ancorar futuros estudos comparativos com outros táxons, servindo de base na avaliação das propostas taxonômicas vigentes.

ABSTRACT

Holoparasitic plants depend entirely on resources from the host xylem and phloem and are currently represented by at least seven lineages, whose phylogenetic position is still being reviewed. The Apodanthaceae family includes stem holoparasitic plants, achlorophyllous, whose vegetative body is extremely reduced. Because they are endoparasites, they become evident only at the time of flowering, when the tiny flowers emerge from the host's bark. There are three genera in this family, being *Pilostyles* the one with broader distribution. There are detailed studies on the endophytic system of this genus, but its phenology, life cycle and floral ontogeny remain unknown. This study aims to elucidate these issues, in order to provide an understanding of the reproductive system and the evolutionary process of the flowers of these intriguing angiosperms. We hope these could be a basis for future studies that aim to establish homologies with other groups of angiosperms. First it was made a survey of parasitized hosts in Brazil and Mexico areas, and then the distribution pattern of flowers and sex ratio of the *Pilostyles* populations were analyzed. Individuals were randomly selected for the experiments of pollination, observation and collection of floral visitors, collecting nectar and phenological monitoring. Meanwhile, in the laboratory, were performed germination experiments and the histological analysis of *Pilostyles* seeds and flowers. Regarding the life cycle, we observed that 1) the wasps are the most frequent visitors; 2) the dispersion is probably a result of endozoochory by birds; 3) germination probably occurs directly in host's stem; 4) the host and parasite phenologies are directly related; there is a possibility of timing. Regarding the sex ratio of the populations, we conclude that: 1) sex determination of *Pilostyles* flowers seems to respond to specific stimuli of each host species; 2) the spatial distribution of staminate and pistillate flowers is directly related to the sex ratio of the populations; 3) there are monoclinous flowers in constant number in all populations, and these flowers are functionally staminate. From the study of floral anatomy and embryology, we observed that: 1) the flowers are surrounded by four whorls of scales, thereby arranged from outside to inside: 2 + 2 + 4 + 4; 2) the stigmatic surface is restricted to the area with papillae, 3) the dehiscence of the pollen sacs is a result of synandrium expansion and dryness, occurring initially by individual transverse slit; 4) the vesicular trichomes secrete a sticky substance, probably responsible for uniting the pollen grains and stick it to the pollinator's body; 5) the column of staminate flower is formed by post-genital fusion of a central column, the sterile gynoecium, and an external column, which brings the pollen sacs in the upper board. In conclusion, we believe that such data should be highlighted by the novelty for the Apodanthaceae family literature, and especially in its ability to underpin comparative studies with other taxa, being a basis to evaluate current taxonomic proposals.