



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA – PPG-DB

**Morfoanatomia do desenvolvimento do fruto de
Isertia hypoleuca Benth. (Rubiaceae - Cinchonoideae)**

Andressa Cristine Giacomin

Manaus, Amazonas
Janeiro de 2015

Andressa Cristine Giacomin

**Morfoanatomia do desenvolvimento do fruto de
Isertia hypoleuca Benth. (Rubiaceae - Cinchonoideae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biodiversidade Amazônica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Gracimar Pacheco de Araújo

Manaus, Amazonas
Janeiro de 2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G429m Giacomini, Andressa Cristine
Morfoanatomia do desenvolvimento do fruto de *Iseritia hypoleuca*
Benth. (Rubiaceae - Cinchonoideae) / Andressa Cristine Giacomini.
2015
XXXII f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Gracimar Pacheco de Araújo
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Anatomia . 2. Morfologia. 3. *Iseritia hypoleuca*. 4. Rubiaceae. I.
Araújo, Maria Gracimar Pacheco de II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

Dedicatória

À minha mãe querida, que esteja em paz no sublime plano,
com amor, dedico.

Desejo registrar meus sinceros agradecimentos:

À Profa. Dra. Maria Gracimar Pacheco de Araújo pela orientação, paciência, compreensão, amizade e alegria em ensinar.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Webber por me apresentar *Isertia hypoleuca* e me iniciar nos caminhos da pesquisa científica, pela experiência e conhecimento transmitidos e por ceder o campo para coletas e observações deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Botânica Agroflorestral da FCA/UFAM pelo apoio e auxílio no desenvolvimento do laminário permanente.

À equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal do ICB/UFAM por ceder espaço físico equipamentos para realização da morfometria.

Ao Prof. Thierry Gasnier pelo auxílio no registro fotográfico.

Ao PPBio por fornecer recursos para aquisição de material de laboratório.

À Capes, pela bolsa concedida para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às queridas amigas Sarah Sampaio Py-Daniel e Fernanda Cardoso Freitas pelo apoio, carinho, e alegria de sempre.

À minha família amada, meu pai Waldomiro Donizetti Giacomini e minhas lindas irmãs, Thalita Caroline Giacomini e Jéssica Gabrielle Giacomini pelo eterno apoio, amor, carinho, conselhos e vibrações positivas nos momentos difíceis.

Aos meus filhos, Cauã Giacomini Pereira e Ravi Giacomini Pereira, protagonistas desse percurso de felicidade e amor. Por me ensinarem que a vida é feita de graça e alegria.

Ao meu companheiro de todas as horas Paulo Mendonça Pereira pelo apoio, carinho e amor e por me ensinar que a paciência é um tesouro a ser cultivado diariamente em nossos corações.

Grata à vida, ao amor, ao encanto, desencanto e reencanto!

Grata à lua, ao sol e a chuva. À terra e a fertilidade! Às estrelas, ao universo e à sutil essência que a tudo permeia e simplesmente é!

Resumo

Isertia é um gênero peculiar de Rubiaceae por estar associado às florestas tropicais secundárias ou em processo de regeneração, representado por quinze espécies distribuídas principalmente nas florestas tropicais da América Central e do Sul. O fruto de *Isertia hypoleuca* Benth. apresenta peculiaridades morfológicas que somadas ao emprego impreciso da terminologia e tipologia de frutos dificultam sua classificação. Dessa forma, foram estudados aspectos morfológicos e anatômicos do pericarpo e semente de *I. hypoleuca* para estabelecer os principais estádios ontogenéticos do desenvolvimento do fruto e possibilitar a interpretação correta de sua tipologia. Foram registrados quatro estádios, cujas principais características que marcam cada estádio estão associadas ao processo de esclerificação do endocarpo e exotesta e ao desenvolvimento dos demais tecidos da semente. *Isertia hypoleuca* possui ovário ínfero, sincárpico com quatro a seis lóculos multiovulados, a placentação é axial com óvulos hemianátropos inseridos em toda a extensão do septo. O estádio I é representado pelo fruto recém-formado com um a 20 dias, o exocarpo tem coloração grená o mesocarpo é consistente, o endocarpo é indiferenciado. A parede do pericarpo é unisseriada com células papilosas e glândulas poliédricas. O mesocarpo é parenquimático com muitas drusas e idioblastos. O endocarpo contém cerca de cinco camadas celulares em intenso processo de divisão anticlinal. A semente é unitegmentada e ocorre intensa atividade meristemática na mesotesta. Neste estádio, o teor de umidade é o mais elevado, 86.92%. No estádio II, o fruto tem de 77 a 97 dias, a coloração do exocarpo é verde amarelado, o endocarpo e exotesta iniciam o processo de esclerificação. O estádio III, fruto com 90 a 210 dias, é marcado pela acentuada esclerificação do endocarpo e testa da semente, pela formação da endotesta. O endosperma e embrião estão bem desenvolvidos. Neste estádio o fruto apresenta o maior tamanho. No estádio IV o fruto está maduro, com 230 a 250 dias, o odor é muito semelhante ao do açaí e a coloração é violeta intenso. O fruto sofre redução de seu tamanho, 9.56 x 8.80 mm, e também apresenta o menor teor de umidade 31.9%. O exocarpo é formado por células epidérmicas e células subjacentes do mesocarpo. A região do mesocarpo que corresponde à polpa é uma massa carnosa de células total ou parcialmente desintegradas, idioblastos e fibras. O endocarpo é ósseo, e forma de quatro a seis pirênios polispermos livres entre si. As sementes são marrom avermelhado, angulares, com 1 mm, apresentam testa enrijecida de aspecto foveolado, o endosperma é carnoso. O embrião é cilíndrico branco e opaco e ocupa a região central da semente. Com base na morfogênese, o fruto de *I. hypoleuca* foi classificado como drupa.

Abstract

Isertia is a peculiar genus of Rubiaceae due to its association with secondary tropical forests and recovering forests. It is represented by fifteen species distributed mainly in the rainforests of Central and South America. The morphological peculiarities and the inaccurate use of terminology and typology of *Isertia hypoleuca* Benth. fruits tends to hinder their classification. Thereby, morphological and anatomical aspects of pericarp and seeds of *I. hypoleuca* were studied in order to establish the main ontogenetics stages of fruit development, leading to the correct interpretation of its typology. Four stages were registered which main characteristics of each of them are associated with endocarp and exotesta sclerification and seed tissues development. *Isertia hypoleuca* shows inferior ovary, syncarpic with four to six multi-locular ovary, axial placentation with hemianatrop ovum inserted all along the septum extension. The stage 1 is represented with a newly formed fruit within 1 to 20 days, the exocarp shows maroon coloring, the mesocarp is consistent and the endocarp is undifferentiated. The uniseried mesocarp cell wall shows papilous cells and polyhedral glands. The mesocarp is parenquimatic with many drusen and idioblasts. The endocarp contains about five cell layers in intense process of anticlinal division. The seed is unitegumented and there is intense meristematic activity in the mesotesta. At this stage, the moisture content is the highest, 86.92%. In stage II, the fruit has 77-97 days, exocarp coloring is yellowish green, cored and the exotesta starts the sclerification process. Stage III, fruit with 90 to 210 days, is marked by a sharp sclerification of the endocarp and seed coat, due to the development of endotesta. The endosperm and embryo are well developed. At this stage the fruit has the largest size. In stage IV the fruit is ripe, with 230-250 days, the odor is very similar to the acaí and the color is the deep violet. A reduction of the fruit size occurs showing 9.56 x 8.80 mm, and also the lowest moisture content 31.9% is observed. The exocarp is formed by pericarp wall and underlying mesocarp cells. The mesocarp region corresponding to the fleshy pulp mass comprise a completely or partially disintegrated cells, idioblasts and fibers. The endocarp is osseous and forms four to six pyrenes polispermes disconnected between each other. The seeds are reddish brown angular, with 1 mm, showing a thick testa with foveolad aspect, the endosperm is fleshy. The embryo is white, cylindrical and opaque and occupies the central area of the seed. Based on morphogenesis, the fruit of *I. hypoleuca* was classified as drupe.

Lista de figuras

Figura 1. Ovário de <i>I. hypoleuca</i>	8
Figura 2. Desenvolvimento morfológico do fruto de <i>I. hypoleuca</i> em escala temporal	10
Figura 3. Estádio I do desenvolvimento de <i>I. hypoleuca</i>	11
Figura 4. Fruto com 30 a 40 dias de <i>I. hypoleuca</i>	13
Figura 5. Estádio II do desenvolvimento do fruto de <i>I. hypoleuca</i>	14
Figura 6. Estádio III do desenvolvimento do fruto de <i>I. hypoleuca</i>	16
Figura 7. Estádio IV do desenvolvimento do fruto de <i>I. hypoleuca</i>	18
Figura 8. Detalhes da infrutescência de <i>I. hypoleuca</i>	19

Lista de tabelas

Tabela 1. Morfometria do fruto de <i>I. hypoleuca</i>	8
--	---

Sumário

1.Introdução	1
1.2 Fundamentação teórica	2
1.2.1 Informações sobre a espécie estudada	4
2. Material e Métodos	6
3. Resultados	7
3.1 Características gerais do ovário e do fruto de <i>I. hypoleuca</i>	7
3.2 Morfogênese do fruto e semente de <i>I. hypoleuca</i>, em escala temporal	9
3.2.1 Estádio I - Fruto recém-formado – coloração grená	9
3.2.2 Estádio II - Fruto jovem – coloração verde amarelado	12
3.2.3 Estádio III - Fruto bem desenvolvido – coloração verde	15
3.2.4 Estádio IV - Fruto maduro – coloração violeta intenso	15
3.2.5 Caracterização do fruto de <i>I. hypoleuca</i>	17
3.2.6 Estádio Pós-Maturação	19
4. Discussão	20
4.1 Classificação do fruto de <i>Isertia hypoleuca</i>	24
5. Conclusão	27
6. Referências	28

1. Introdução

As florestas tropicais abrigam mais da metade de toda a biodiversidade conhecida (Laurance 1999; Dirzo e Corvo 2003), estima-se, por exemplo, que as florestas da Amazônia encerrem 40.000 espécies de plantas vasculares, das quais 30.000 são endêmicas da região (Mittermeier et al., 2003).

No Brasil, a Amazônia abrange nada menos que 60% do território (Margulis, 2003) abarcando cerca de 40% do remanescente de florestas tropicais úmidas do mundo (Laurence et al., 2001). Diante dessa magnitude é evidente o importante papel que esse maciço florestal representa para manutenção da biodiversidade, e entender como os seres vivos se organizam e como classificá-los é um desafio de iguais proporções.

Devido à ocupação intensa da Amazônia brasileira desde 1970, a taxa de perda da floresta é dramática, gerando duas grandes preocupações: os impactos climáticos e a perda da biodiversidade. Essas mudanças na paisagem das florestas tropicais vêm ocorrendo principalmente devido à transformação dos ecossistemas naturais para áreas cultivadas e de pastoreio (Fearnside, 2005).

Por outro lado, as áreas desmatadas podem ser renovadas através da sucessão florestal e o estabelecimento de florestas secundárias (Wright, 2005). Há estimativas que, devido às perturbações causadas por ação humana ou não, florestas tropicais antigas desapareçam e sejam substituídas por florestas secundárias e exploradas (Chazdon, 2003; Perz e Skole, 2003; Wright, 2005), o que remete ao que Brown e Lugo (1994) destacaram sobre a importância do gerenciamento de áreas perturbadas em processo de regeneração florestal.

Estudos que contemplem o conhecimento da biodiversidade são extremamente necessários, pois geram mais subsídios para a criação de planos de manejo e conservação dos recursos naturais. Neste contexto se inclui a história natural dos organismos, em especial a caracterização do ciclo de vida, ou mesmo parte desse processo. Este conhecimento é imprescindível para se reconhecer os mecanismos que regem o processo da recomposição e restabelecimento da floresta.

O real entendimento do ciclo de vida das espécies de plantas só é possível através do conhecimento do processo de desenvolvimento dos órgãos e estruturas intrínsecas a este processo, ou seja, da morfogênese dos órgãos reprodutivos. Além disso, estudos morfoanatômicos com base na ontogenia dos órgãos cada vez mais tem

se mostrado imprescindíveis na taxonomia e filogenia, bem como, na resolução de problemas de tipificação e terminologia de órgãos e estruturas morfológicas.

Dentre as famílias botânicas, Rubiaceae é peça fundamental do sub-bosque (Boom & Campos, 1991; Oliveira & Amaral, 2005) e planícies de florestas tropicais, onde muitas vezes é a família de plantas lenhosas mais abundante (Davis, et al., 2009).

Davis *et al.* (2009), reportando-se à Davis *et al.* (2006) e Sohmer e Davis (2007), afirmam que nas regiões tropicais, as espécies de Rubiaceae são sensíveis à perturbação e raramente encontradas em florestas secundárias, não obstante Boom (1984) descreve que as espécies de *Isertia* Schreb. são características de ambientes com esta formação vegetal.

Isertia hypoleuca Benth. (Rubiaceae – Cinchonoideae), se destaca por ser uma espécie pioneira da região amazônica que, juntamente com as embaúbas (*Cecropia* spp.), é uma das primeiras plantas arbóreas a colonizar florestas em processo de regeneração, sendo por isso recomendada para a composição de reflorestamentos, e por apresentar inflorescências vistosas, possui grande potencial paisagístico (Lorenzi, 1998).

Esta espécie apresenta uma complexa estrutura carpológica e um curioso, e até o momento incompreensível, sistema de dispersão, o que instiga a investigação dos seus processos de reprodução e colonização. Neste sentido, o presente estudo objetiva caracterizar a morfoanatomia e morfometria ao longo do desenvolvimento do pericarpo e semente de *I. hypoleuca*, estabelecendo assim os principais estádios ontogenéticos durante o período de formação e maturação do fruto; bem como contribuir com a correta classificação da estrutura carpológica da espécie, somando conhecimento às questões inerentes à tipologia dos frutos de Rubiaceae e das angiospermas em geral.

1.2 Fundamentação teórica

Rubiaceae é a quarta maior família dentre as Angiospermas com 13.183 espécies e 611 gêneros, distribuindo-se principalmente na região tropical. No Brasil, ocorrem cerca de 1.000 espécies, enquanto que na região Norte ela está representada por 702 espécies, onde 24% são endêmicas da região (Davis et al., 2009).

A família está incluída no clado Gentianales, juntamente com Apocynaceae, Gelsemiaceae, Gentianaceae e Longaniaceae (APG III, 2009). A classificação infra-familiar é problemática nas Rubiaceae, especialmente na divisão das subfamílias e

tribos. A classificação mais usual é a de Robbrecht (1988), que baseado em caracteres morfológicos, dividiu a família em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae). Em duas das revisões mais recentes sobre a filogenia e taxonomia de Rubiaceae baseado em dados moleculares, Robbrecht e Manen (2006) propuseram uma classificação através da construção de uma “super-árvore”, dividindo a família em duas subfamílias (Cinchonoideae e Rubioideae) e quatro supertribos, enquanto Bremer (2009) considerou três subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae) e 43 tribos, dentre elas Isertieae, tribo que também recebeu uma nova circunscrição nos últimos anos.

Robbrecht (1988) classificou 26 gêneros em Isertieae; Anderson (1996), também utilizando caracteres morfológicos, considerou apenas sete gêneros; Bremer e Thulin (1998) adicionaram dados moleculares às análises e restringiram o grupo apenas aos gêneros neotropicais: *Isertia* (incl. *Yutajea* Steyerm.) com 15 espécies e *Kerianthera* com duas espécies. Essa nova circunscrição proposta por Bremer e Thulin (1998) é utilizada na "super árvore" de Robbrecht e Manen (2006), entretanto Isertieae é rebaixada à subtribo Isertiinae, dentro da tribo Cinchoneae. A estreita proximidade entre Isertieae e Cinchoneae foi também reconhecida por Bremer e Thulin (1998), mas na filogenia proposta por Bremer (2009) o grupo continua a ser considerada como tribo.

De uma maneira geral, *Isertia* é composto por espécies arbustivas e arbóreas, as inflorescências são terminais e vistosas, as flores são tubulosas com coloração intensa amarela, laranja, rosa ou vermelho com antese diurna ou branca e creme, aromáticas e com antese noturna (Boom, 1984, Wolff et al., 2003). Boom (1984) realizou uma revisão do gênero e propôs uma subdivisão em duas sessões baseada principalmente na consistência do endocarpo: *Cassupa* (seis espécies) com endocarpo carnoso (bagas) e *Isertia* (oito espécies) com endocarpo enrijecido (drupas).

Robbrecht (1988), em seu trabalho sobre as Rubiaceae tropicais, afirmou que o número de estudos morfoanatômicos que auxiliam a taxonomia de Rubiaceae está longe de ser o ideal, especialmente os que tratam dos frutos e sementes.

Para Puff (2001), estudos anatômicos em Rubiaceae que mostrem o desenvolvimento do ovário em fruto e do rudimento seminal em semente são extremamente importantes, podendo contribuir significativamente para o esclarecimento da posição taxonômica dos *taxa*.

A necessidade de investigações sobre a ontogenia do pericarpo e sementes de espécies de Rubiaceae e sua contribuição tanto para o estudo da biologia como das relações filogenéticas da família também foi ressaltado por Corner (1976).

Uma análise minuciosa da embriologia de Rubiaceae foi realizada por Fagerlind (1937). O autor descreveu e analisou a formação do tegumento do óvulo, do nucelo, endosperma e embrião.

Corner (1976), em sua extensa publicação sobre a anatomia das sementes de Dicotiledôneas, descreveu os aspectos gerais dos óvulos e das sementes de Rubiaceae. O autor salientou a necessidade de estudos detalhados sobre as variações da espessura do tegumento, da estrutura da exotesta, do suprimento vascular e da placenta em gêneros e espécies desta família.

Robbrecht (1988) realizou um extenso apanhado sobre características morfoanatômicas de Rubiaceae e com isso propôs um sistema de classificação para a família.

Bremer e Eriksson (1992) ao investigarem as relações filogenéticas, biogeográficas e ecológicas dos tipos de frutos em Rubiaceae, ressaltam que as variações morfológicas infra-familiares indicam uma diversidade de adaptações, especialmente em termos da dispersão de sementes, diversidade de hábito e distribuição.

Além de caracterizar subfamílias e tribos, descrições morfoanatômicas do desenvolvimento de órgãos reprodutivos têm sido úteis para compreender as relações taxonômicas e filogenéticas inter e intraespecíficas como no caso de *Hilia* (Puff e Buchner, 1998), *Theligonum cynocrambe* (Rutishauser *et al.*, 1998), *Virectaria* (Dessein *et al.*, 2001), *Pagameopsis* (Piesschaert, 2002), *Retiniphyllum* (Cortés-B e Delprete, 2003), *Mitrasacmopsis quadrivalvis* (Groeninckx *et al.*, 2007), *Chomelia obtusa* e *Ixora coccinea* (De Toni e Mariath, 2008), *Galium* e *Reubunium* (De Toni & Mariath, 2011), ou mesmo para contribuir na identificação e ampliação sobre a biologia de espécies como com *Tarenna gracilipes* (Vinckier e Smets, 2005) e *Guettarda platypoda* (Lima *et al.*, 2010).

1.2.1 Informações sobre a espécie estudada

Juntamente com *I. leavis*, *I. hypoleuca* apresenta a distribuição mais ampla do gênero. Ocorre em florestas tropicais não inundadas ao longo das Guianas, Venezuela e em regiões amazônicas do Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia em elevações de 100 a 1800

metros (Boom, 1984). Sua dispersão é descontínua e irregular (Lorenzi, 1998), como observado no inventário realizado na Reserva Florestal Adolpho Duke em Manaus (Ribeiro *et al*, 1999), onde ocorreu de maneira ocasional em áreas degradadas. Ainda na região de Manaus pode ser facilmente reconhecida associada a remanescentes florestais ou mesmo isolada de qualquer vegetação natural em trechos das estradas que ligam a capital aos municípios de Presidente Figueiredo (BR – 174) e Itacoatiara (AM – 010).

A espécie é uma árvore, atingindo 15 metros de altura. É também facilmente identificada por apresentar quatro estípulas interpeciolares triangulares, lâminas foliares grandes, 18-65 x 9-18 cm, com faces do limbo discolores e pecíolos longos. As inflorescências são terminais e multifloras com flores gamossépalas e gamopétalas formando um tubo de consistência rígida de coloração vermelho-alaranjado, com 5-6 lacíneos. Na região apical da flor, há um anel de tricomas amarelos que protegem as anteras e o estigma. Possui ovário ínfero com 5-6 lóculos, pluriiovular; o androceu é composto por seis estames epipétalos e dialistêmones (Boom, 1984; Lorenzi, 1998; Taylor, 2007).

O fruto de *I. hypoleuca* é proveniente do ovário concrecido com o hipanto, cálice e nectário, e apresenta o endocarpo composto por pirênios independentes polispermos (Boom, 1984).

De uma maneira geral, o fruto é considerado indeiscente com mesocarpo carnosos: Schumann (1891) e Rodriguez (1976), classifica-o como baga, Boom (1984) como pirênio, Bremer e Thulin (1998) como drupa, Barroso (1999) como nukulânio polispermo e Steyermark *et al.* (2004) e Taylor (2007) como drupáceo. Lorenzi (1998), entretanto, é o único classificá-lo como “cápsula globosa tardiamente deiscente”.

Em Rubiaceae, a “incerteza” quanto à classificação do tipo de fruto e os termos a serem empregados é verificada nos seguintes trabalhos: Rutishauser *et al* (1998), que classificaram o fruto de *Theligonum cynocrambe* com noz, sendo antes considerado como drupáceo; Piesschaert (2002) que interpretou a estrutura do fruto de *Pagameopsis* como uma fase intermédia entre drupa e cápsula, De Toni e Mariath (2011) que também encontraram dificuldades em definir o pericarpo de espécies de *Galium* e *Reubunium* como carnosos ou secos, considerando-os como intermediários, e Pietrobom (2008) que classificou os frutos de *Psychotria hoffmannseggiana* e *Psychotria trichophora* como drupáceos, afirmando que não havia uma “solução concreta” para a classificação dos frutos.

Em observações sobre a biologia reprodutiva, polinização e fenologia de *I. hypoleuca*, verificou-se que a mesma possui características associadas com a ornitofilia, sendo suas flores quase exclusivamente visitadas por beija-flores. Apresenta padrão de floração contínuo com picos de floração entre março e junho e frutos maduros ocorrendo principalmente entre novembro e fevereiro (Giacomin e Webber, 2011).

2. Material e Métodos

As observações e coletas ocorreram na Reserva Particular de Patrimônio Natural Sítio Bons Amigos (SBA), km 15, BR-174, ramal DNER, Manaus, Amazonas, Brasil.

Inicialmente 15 indivíduos de *I. hypoleuca* foram marcados e todas as inflorescências em fase de botão encontradas foram marcadas. As observações em campo e coletas foram realizadas durante 12 meses em intervalos de 15 a 30 dias desde a flor em pré-antese até o fruto maduro. Foram coletadas três infrutescências, de diferentes indivíduos, sendo a idade do fruto definida a partir da data da abertura da flor. Após a coleta as infrutescências foram identificadas, armazenadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório.

Para estabelecer os estádios ontogenéticos do desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca*, foram registradas características organolépticas (cor, textura, consistência e odor) do fruto (exocarpo, mesocarpo e endocarpo) e semente (tegumento, endosperma e embrião) e morfométricas de cada lote coletado.

Para a observação das características organolépticas foi utilizado, quando necessário, lupa estereoscópica (Leica Zoom-2000) e os registros foram feitos com câmera fotográfica digital.

Para a caracterização morfométrica, 100 frutos de cada lote foram selecionados e aferidos as medidas de comprimento, diâmetro e peso. Após as aferições dos frutos maduros, estes foram despulpados manualmente para quantificação dos pirênios/fruto e dez pirênios destes mesmos frutos foram selecionados e quebrados com o auxílio de um alicate para estimar a quantidade de sementes em cada pirênio.

O teor de umidade foi verificado nestes mesmos 100 frutos utilizados para morfometria que foram secos em estufa a 50 °C, e a cada 72h foram tomadas as medidas de peso até o alcance do peso constante.

Para a análise anatômica, os frutos foram fixados em FAA₇₀ (Johansen, 1940) e conservados em álcool 70% (Patiño, 1986), seguido de desidratação em série crescente etílica (Lang, 1973), inclusão em metacrilato (Historesin LEICA®), secção em micrótomo rotativo nos planos transversal e longitudinal (5-12µm) e coloração com Azul de Toluidina (O'Brien et al., 1965) em tampão citrato pH 4,6.

As observações e fotomicrografias foram realizadas em microscópio Zeiss acoplado a câmera Canon PC1252 e todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Botânica Agroflorestal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas e as imagens tratadas com o software Photoshop CS3®.

3. Resultados

3.1 Características gerais do ovário e do fruto de *I. hypoleuca*

O ovário de *I. hypoleuca* é ínfero, sincárpico (Fig. 1-A), composto por quatro a seis carpelos e quatro a seis lóculos, sendo o hexacarpelar e hexalocular o mais frequente (Fig. 1-B). Os lóculos são multiovulados, a placentação é axial com os óvulos inseridos em toda a extensão do septo (Fig. 1-A e B). O óvulo é hemianátropo, como pode ser observado na posição da semente em estágio inicial do desenvolvimento do fruto (Fig. 3-G).

O pericarpo do fruto é formado tanto por tecidos carpelares (ovário) quanto do receptáculo floral (hipanto), além do cálice e nectário que são epíginos. Todos estes elementos estão fundidos entre si, e mesmo apresentando características morfológicas e anatômicas peculiares, formam uma única estrutura (Fig. 3-A).

Durante todo o processo de desenvolvimento, o fruto apresenta alto grau de oxidação quando sofre qualquer tipo de injúria que exponha seus tecidos internos, o que dificultou a classificação e registro de padrões de coloração.

O período de amadurecimento do fruto é de 230 a 250 dias e durante este período foram observados quatro estádios ontogenéticos: Estádio I) Fruto recém-formado – coloração grená (entre um e 20 dias); Estádio II) Fruto jovem – coloração verde amarelado (entre 77 e 97 dias); Estádio III) Fruto bem desenvolvido – coloração verde (entre 190 e 210 dias); e Estádio IV) Fruto maduro – coloração violeta intenso (entre 230 e 250 dias).

Na Tabela 1 pode ser visualizada a forma de crescimento do fruto, onde o mesmo mostra um aumento de volume do estágio I para o II, que se estabiliza até o estágio III e diminui no estágio IV. O peso tem um comportamento similar, porém decresce a partir do estágio III. O teor de água diminui à medida que o fruto amadurece.

Tabela 1. Morfometria do fruto de *Isertia hypoleuca* Benth.

Estádio	↑ (mm)	Ø (mm)	Peso (g)	Teor de umidade
I. Fruto recém formado 1 a 20 dias	9,17 ± 1,66	5,97 ± 1,40	0,20 ± 0,12	86,92%
II. Fruto jovem 77 a 97 dias	12,22 ± 1,19	9,98 ± 0,95	0,66 ± 0,19	61,45%
III. Fruto bem desenvolvido 190 a 210 dias	11,5 ± 1,44	10,60 ± 1,27	0,77 ± 0,25	56,60%
IV. Fruto maduro 230 a 250 dias	9,56 ± 1,09	8,80 ± 1,03	0,41 ± 0,24	31,90%

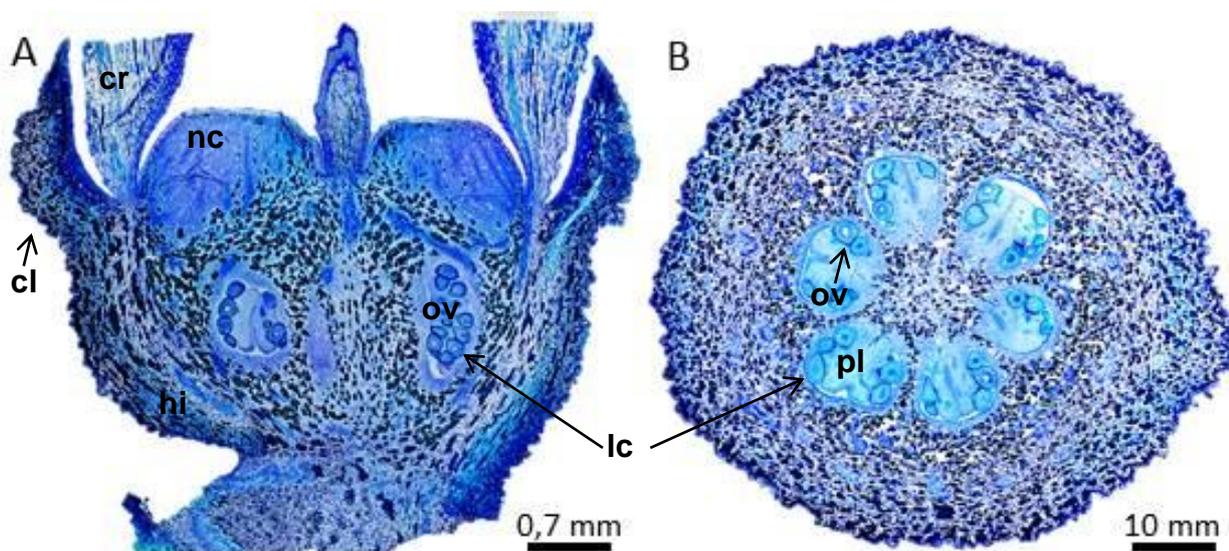


Figura 1. Ovário de *I. hypoleuca*. A) vista longitudinal; B) vista transversal. cl = cálice, cr = corola, hi = hipanto, lc = lóculo, nc = nectário, pl = placenta, ov = óvulo.

3.2 Morfogênese do desenvolvimento do fruto e semente de *I. hypoleuca*

3.2.1 Estádio I - Fruto recém-formado – coloração grená

Nesta fase inicial, o fruto tem de um a 20 dias, possui forma de taça, o cálice gamossépalo é uma crista alta e firme, que circunda e encobre a região lateral do nectário. O exocarpo é levemente rugoso e piloso de coloração grená. O nectário é amarelo com superfície lisa e lustrosa e apresenta uma cicatriz na região central, local de inserção do estilete. O mesocarpo é constituído por uma massa consistente levemente aquosa amarelo claro, o endocarpo é pouco diferenciado do mesocarpo estando intimamente aderido a este. As sementes são globosas, brancas e translúcidas, no entanto, o tegumento e o endosperma são indistintos (Fig. 2-A). O teor de umidade nesta fase é o mais elevado, em torno de 86,92%, o fruto pesa em média 0,20g e o tamanho é de 9,17 mm \pm 1,66 de comprimento e 5,97 mm \pm 1,40 de largura (Tab. 1).

A epiderme externa do pericarpo é unisseriada e sinuosa, composta por células papilosas com glândulas poliédricas e pluricelulares (Fig. 3-D). As camadas subepidérmicas são constituídas de idioblastos contendo substâncias ergásticas (Fig. 3-B e D). Estes mesmos idioblastos estão difusos por todo o restante do mesocarpo, que é parenquimático com células de tamanho e forma variadas (cubóides, arredondadas ou achatadas longitudinalmente) e outros idioblastos contendo drusas; as células apresentam divisões principalmente anticlinais (Fig. 3-A, B e D).

O tecido que corresponde ao endocarpo já é evidente, é estratificado com cerca de cinco camadas de células cubóides que apresentam intensa divisão anticlinal, algumas regiões apresentam duas a três camadas internas de células alongadas longitudinalmente e nas regiões distais apresentam alto grau de diferenciação, com células alongadas em todas as camadas, orientadas em diferentes direções (Fig. 3-A, C, F e G). Essa mesma estrutura do endocarpo já é verificada no ovário em pré-entese, dificultando a interpretação da origem das camadas, se da parede interna do ovário ou células subjacentes do mesocarpo.

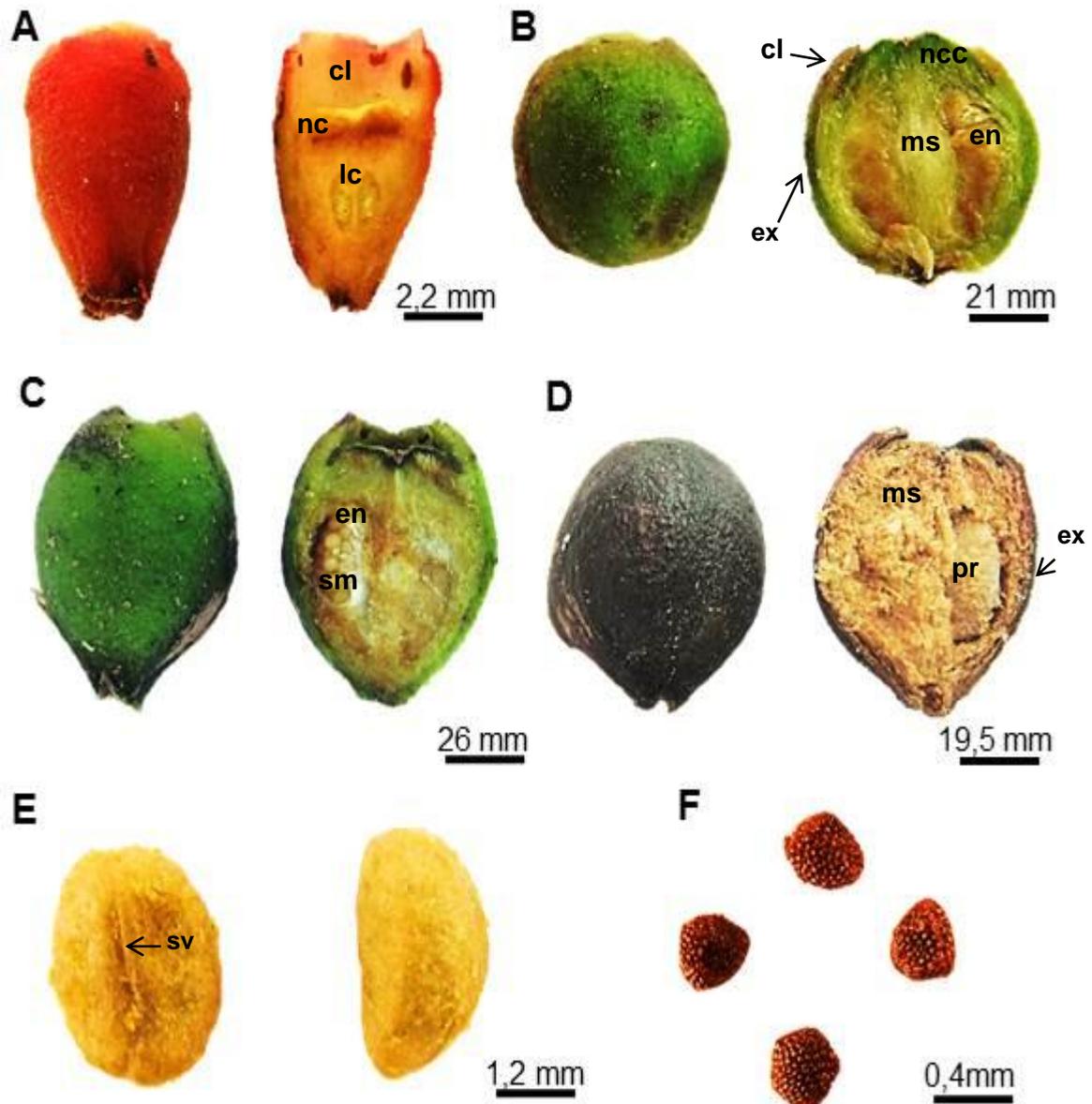


Figura 2. Desenvolvimento morfológico do fruto de *I. hypoleuca*, em escala temporal. A) estágio I, fruto com um a 20 dias; B) estágio II, fruto com 77 a 97 dias. Detalhe do endocarpo oxidado; C) estágio III, fruto com 190 a 210 dias; D) estágio IV, fruto com 230 a 250 dias; E) pirênio em face ventral (esquerdo) e lateral (direito); F) sementes. cl = cálice, en = endocarpo, ex = exocarpo, lc = lóculo, ms = mesocarpo, nc = nectário, pr = pirênio, sm = semente, sv = sulco ventral.

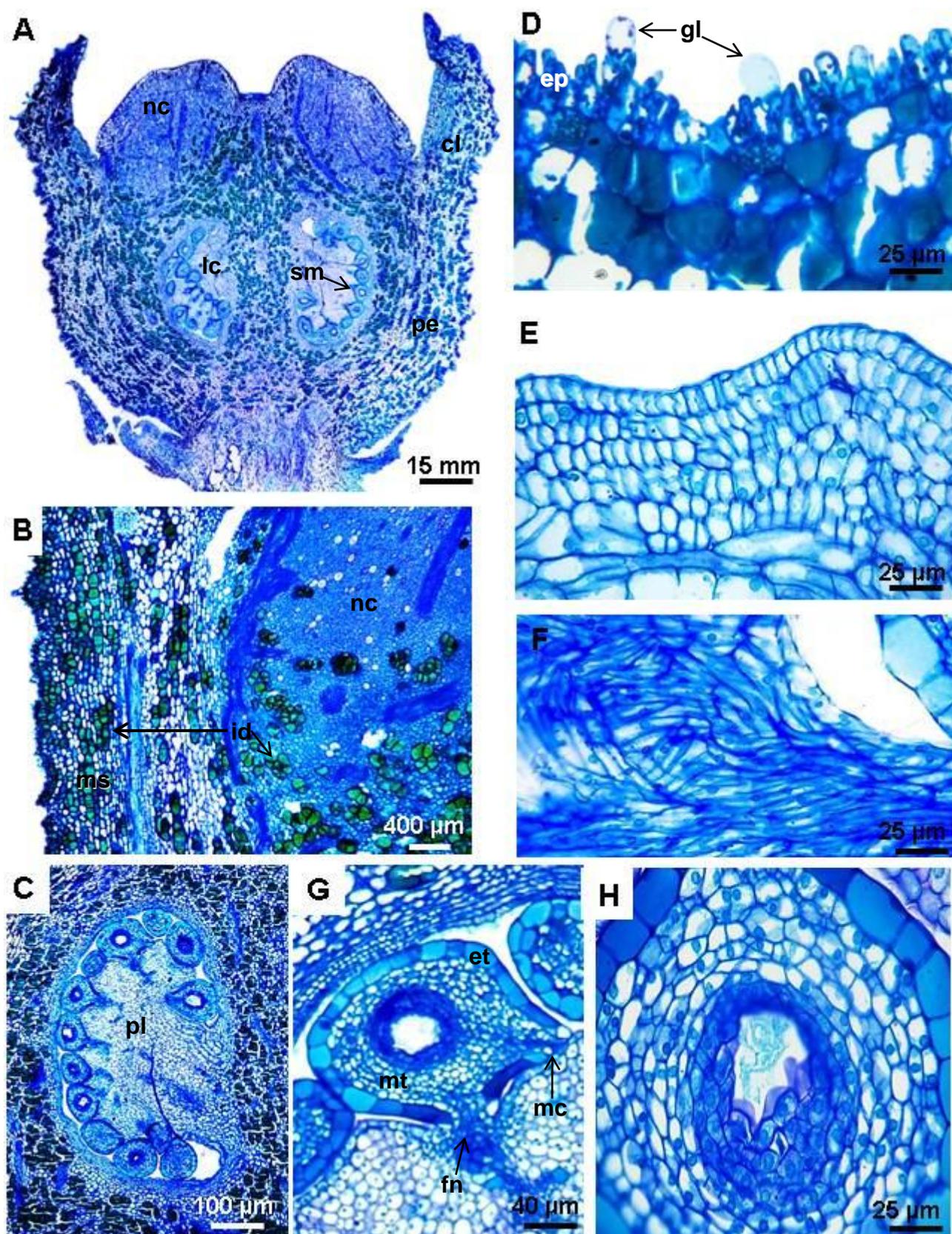


Figura 3. Estádio I do fruto em desenvolvimento de *I. hypoleuca* (secções longitudinais). A) fruto; B) Pericarpo destacando mesocarpo e nectário; C) lóculo; D) epiderme do pericarpo; E) e F) endocarpo; G) e H) rudimento seminal. cl = cálice, ep = epiderme, et = exotesta, fn = funículo, gl = glândula, id = idioblasto, lc = lóculo, mc = micrópila, ms = mesocarpo, mt = mesotesta, nc = nectário, pe = pericarpo, pl = placenta, sm = semente.

A semente ainda conserva as mesmas características do óvulo, continua na posição hemianátropo, é unitegumentada, a exotesta possui uma única camada de células grandes, globosas ou levemente alongadas longitudinalmente, a mesotesta é parenquimática e apresenta atividade meristemática acentuada, ocorrem divisões periclinais e anticlinais, principalmente na região próxima ao saco embrionário (Fig. 3- C e H).

O fruto jovem com 30 a 40 dias apresenta algumas modificações anatômicas importantes que merecem ser assinaladas, mas não somam subsídios que caracterizem outro estágio ontogenético, já que o fruto não apresenta modificações organolépticas e morfométricas. É neste período que ocorre o início da diferenciação da exotesta e a formação do embrião, características somente perceptíveis na análise anatômica (Fig. 4).

3.2.2 Estádio II - Fruto jovem – coloração verde amarelado

À medida que o fruto amadurece, a coloração grená do exocarpo restringe-se à região apical formando um anel em torno do nectário, e entre 77 e 97 dias o fruto apresenta características que marcam um novo ciclo no desenvolvimento, dado pelo padrão de coloração do exocarpo e a distinção e enrijecimento do endocarpo. Outro marco deste período é o aumento substancial do peso do fruto, de 0,20 g para 0,66 g, o maior incremento durante o processo de maturação, ao passo que o teor de umidade diminui cerca de 25%, o tamanho é de 12,22 mm \pm 1,19 de comprimento 9,98 mm \pm 0,95 de largura (Tab. 1).

O fruto possui forma globosa a subglobosa ou elipsóide, o exocarpo é levemente rugoso e a coloração verde amarelado. O cálice é persistente e passa a compor o exocarpo do fruto. O nectário continua com as mesmas características exceto pela coloração que passa a ser verde claro. O mesocarpo também continua com as mesmas características, porém é verde claro. Neste estágio, o endocarpo e semente sofrem a maior modificação. O endocarpo torna-se evidente, é pouco rígido e de coloração branca e translúcida (Fig. 2-B), as sementes são levemente angulares, brancas e translúcidas e o tegumento agora é distinto e apresenta aspecto ornamentado.

Anatomicamente é verificado intenso processo de esclerificação tanto no meso e endocarpo quanto na exotesta (Fig. 5-A e B). Na região mediana do mesocarpo surgem grandes células esclerenquimáticas. Os feixes vasculares estão mais desenvolvidos e são

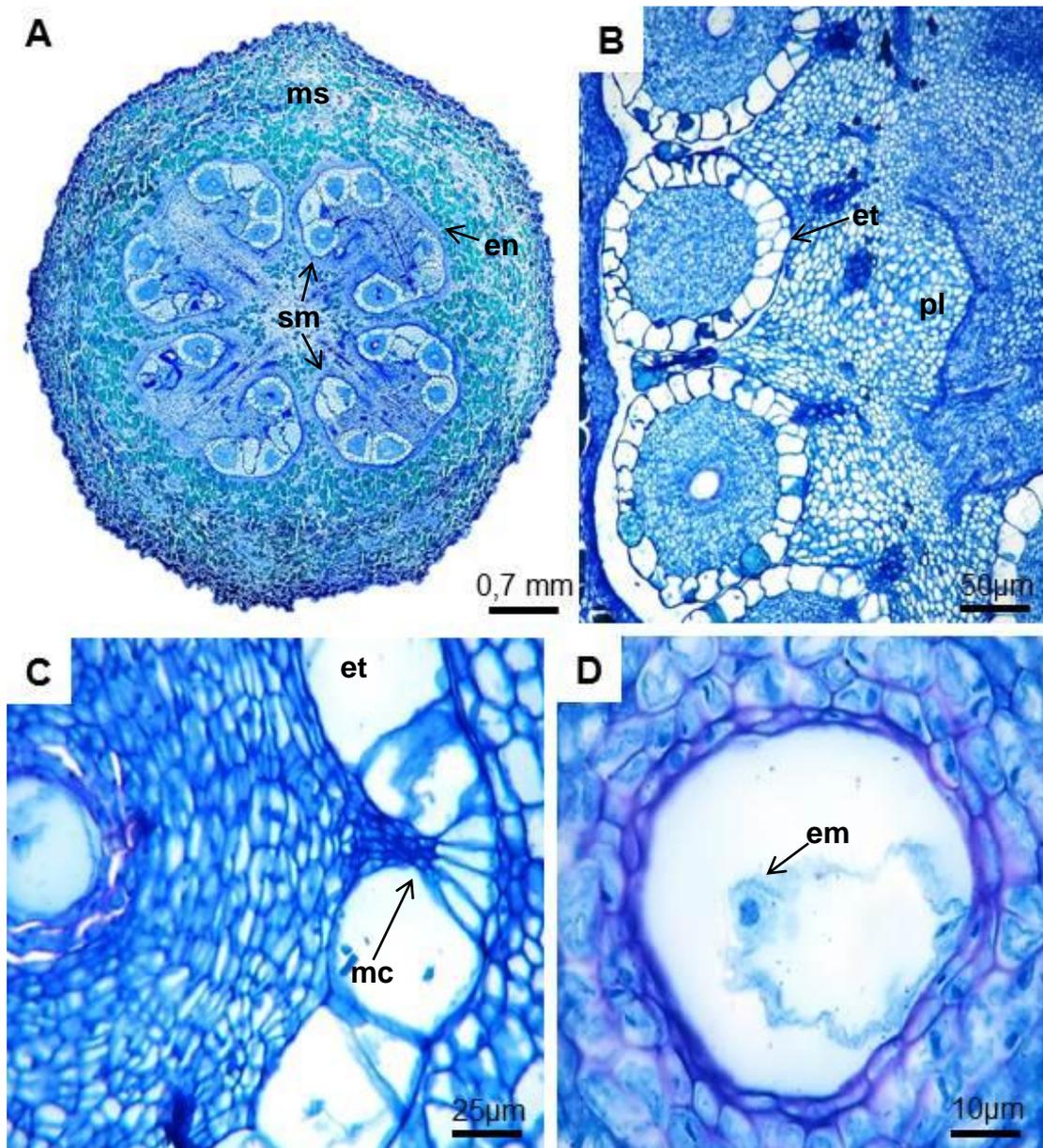


Figura 4. Fruto com 30 a 40 dias de *I. hypoleuca* (A, C e D secção transversal, B secção longitudinal). A) Fruto; B) e C) Semente; D) Embrião. em = embrião, en = endocarpo, et = exotesta, mc = micrópila ms = mesocarpo, mt = mesotesta, nc = nectário, pl = placenta, sm = semente.

do tipo colateral, os principais estão dispostos em arco, com as extremidades fletidas para o centro (Fig. 5-D). As células do endocarpo estão bastante espessadas na porção interna, e na região de contato com o mesocarpo as células ainda estão em processo de diferenciação (Fig. 5-A, B e C). As células da exotesta tem a parede celular tangencial e radial espessada com perfurações nas regiões inferiores da parede e assumem forma de ferradura crenada, dando um aspecto “estelar” à semente. Devido ao crescimento do embrião e desenvolvimento do endosperma, as células da mesotesta mais externas ao saco embrionário se ordenam radialmente e são comprimidas contra as células da

exotesta iniciando o processo de formação da endotesta, enquanto as células contíguas ao saco embrionário são digeridas ou colapsadas (Fig. 5-E e F).

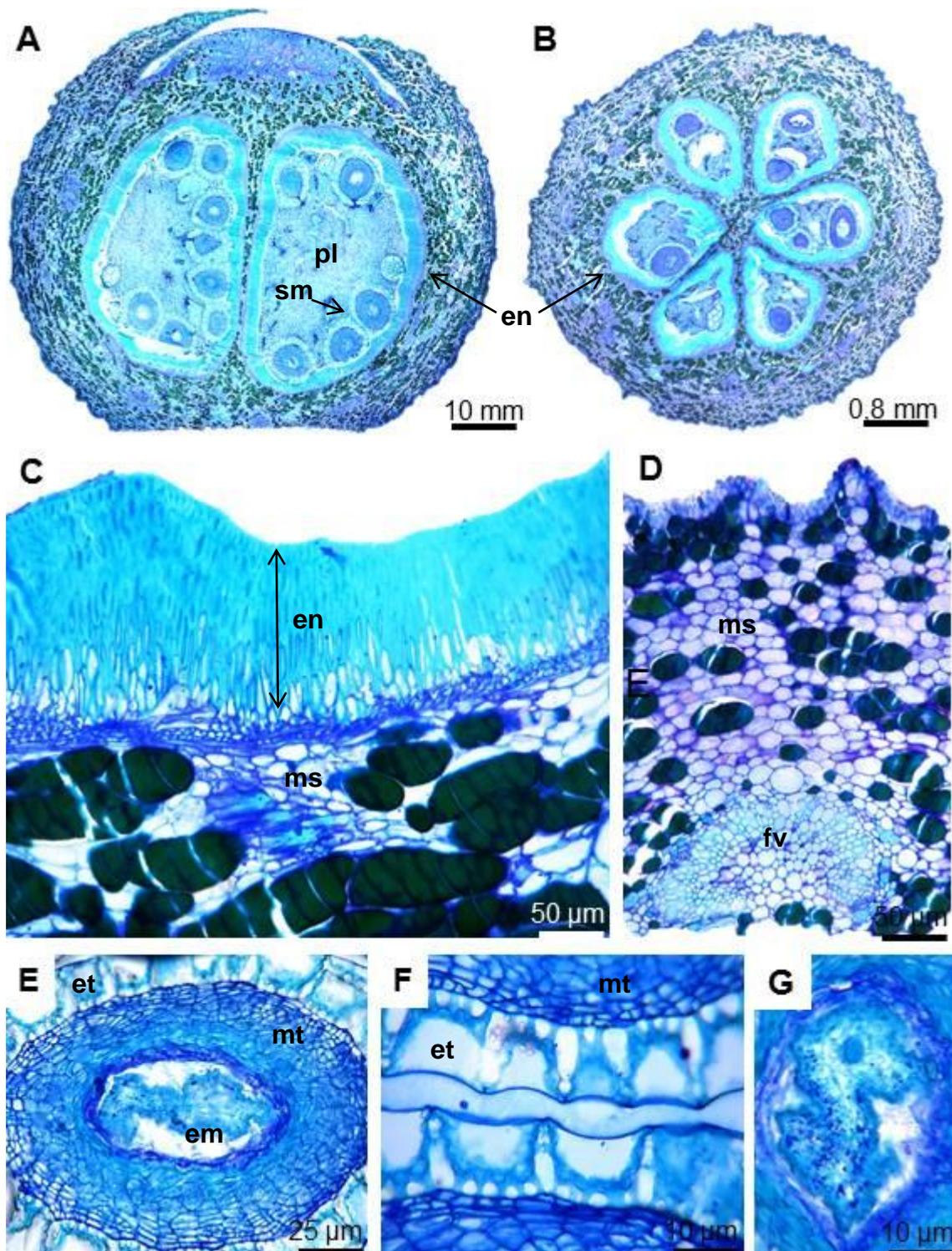


Figura 5. Estádio II do desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca* (A,C, E, Fe G seções longitudinais, B e D seção transversal) A) e B) fruto; D) feixe vascular; C) endocarpo E) semente F) detalhe da exotesta e mesotesta; G) embrião. em = embrião, en = endocarpo, et = exotesta, fv = feixe vascular, ms = mesocarpo, mt = mesotesta, pl = placenta, sm = semente.

3.2.3 Estádio III - Fruto bem desenvolvido – coloração verde

Entre a fase dois e três é o período que o fruto apresenta menos modificações morfológicas, no que diz respeito a padrão de coloração, tamanho e peso. O incremento de massa é reduzido, de 66 g para 77 g, se comparado àquele referente à fase anterior, bem como o teor de umidade que diminui apenas 5% (Tab. 1). No estágio III, é bastante evidente o processo de enrijecimento do endocarpo e tegumento, também é a fase em que ocorre um intenso processo de maturação da semente, devido o desenvolvimento do endosperma e embrião.

Na fase três, o fruto tem de 90 a 210 dias, o exocarpo tem coloração verde acinzentado, o nectário se torna opaco com a mesma coloração que o exocarpo e o mesocarpo é uma massa úmida de coloração verde amarelado e apresenta algumas fibras brancas. O endocarpo está totalmente endurecido e as sementes têm o tegumento com coloração rósea e é rígido (Fig. 1-C). O tamanho do fruto nessa fase é de 11,5 mm \pm 1,44 de comprimento 10,60 mm \pm 1,27 de largura (Tab. 1).

As células esclerenquimáticas que compõe os feixes vasculares parecem chegar ao fim do processo de esclerificação, assim como as células esclerenquimáticas difusas no mesocarpo e as células que compõe o endocarpo, que estão com as paredes totalmente espessadas ao ponto de o lúmen celular estar completamente preenchido pela parede (Figs. 6-A, B, D e E).

A “rede” celular que compõe a exotesta também parece estar completamente desenvolvida. Apresenta paredes bastante espessadas com “perfurações” ou “cavidades” formando uma complexa trama, na qual extensões ligam uma célula à outra e estas à endotesta, esta última em processo final de formação. O endosperma e o embrião também parecem estar completamente desenvolvidos; o endosperma contém paredes delgadas e apresenta bastante conteúdo, o embrião é cilíndrico, ocupa a região central da semente, os cotilédones são curtos em relação ao eixo hipocótilo-radícula (Fig. 6-F, G e H)

3.2.4 Estádio IV - Fruto maduro – coloração violeta intenso

Esta fase é marcada por modificações no exocarpo, mesocarpo e semente. O fruto tem de 230 a 250 dias e adquire odor muito semelhante ao do açaí e sua coloração é violeta intenso (Fig. 2-D). Há uma expressiva perda de peso, na ordem de 47%, e o

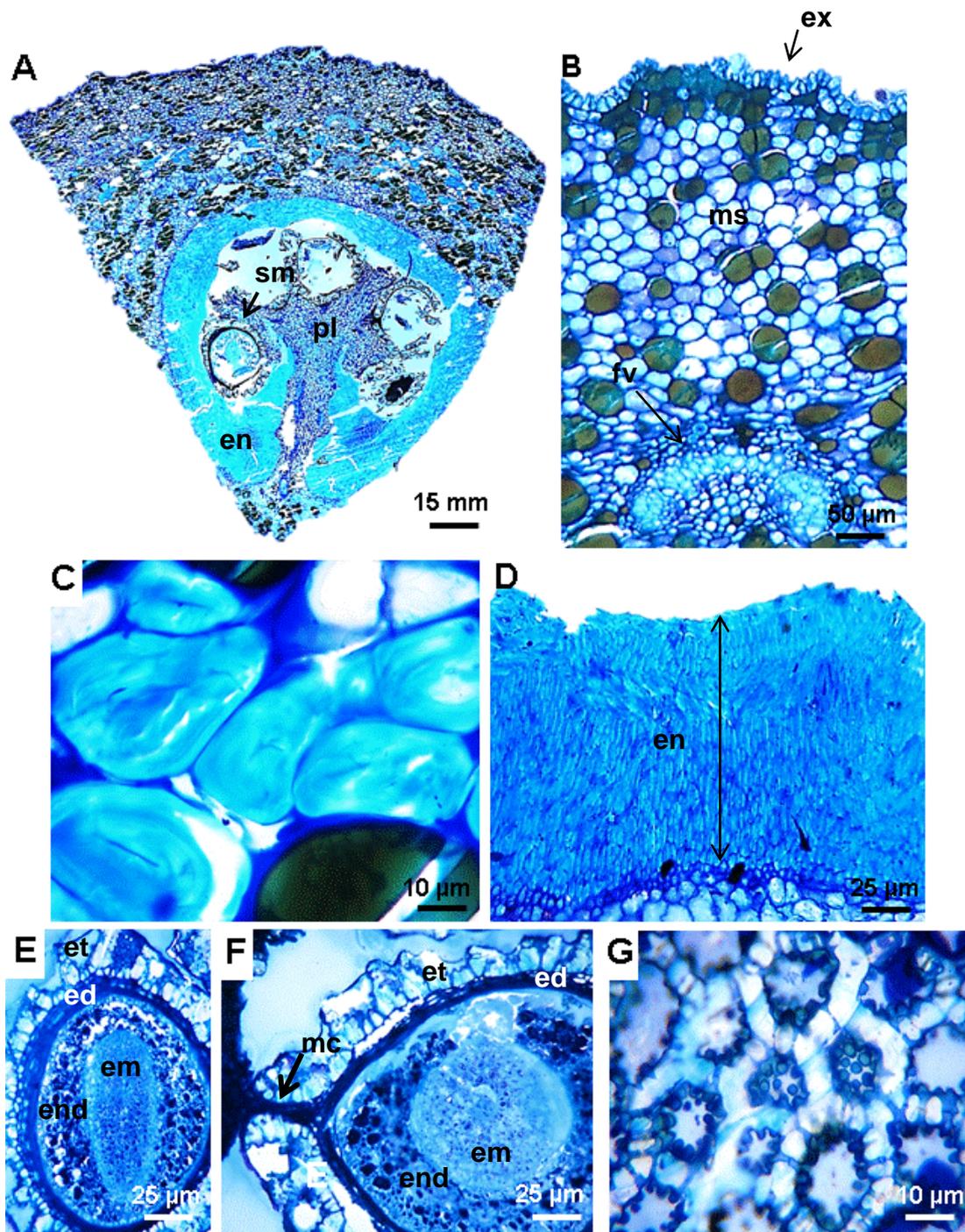


Figura 6. Estádio III do desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca* (A-D,F e G secções transversais, E secção longitudinal). A) fruto; B) pericarpo destacando exocarpo, mesocarpo e feixe vascular; C) células esclerenquimáticas do mesocarpo; D) endocarpo; E) e F) semente; G) exotesta. ed = endotesta, em = embrião, en = endocarpo, end = endosperma, et = exotesta, ex = exocarpo, fv = feixe vascular, mc = micrópila ms = mesocarpo, pl = placenta, sm = semente.

teor de umidade cai drasticamente para 31,9%, o que reflete no tamanho do fruto que se reduz para $9,56 \text{ mm} \pm 1,09$ de comprimento e $8,80 \text{ mm} \pm 1,03$ de largura (Tab. 1). A região do nectário possui a mesma coloração e textura que a do exocarpo. O mesocarpo

se restringe a uma camada delgada carnosa, levemente farinosa e fibrosa de coloração marrom oliva e está fracamente aderida ao exocarpo e ao endocarpo. Este corresponde à formação dos pirênios ocupando grande parte do volume do fruto (Fig. 2- D). Parte do tecido placentar permanece no interior dos pirênios.

O exocarpo é formado tanto pela epiderme como das células subjacentes do mesocarpo, constituída por idioblastos e por outras células parenquimáticas que sofreram compressão, formando camadas mais ou menos intercaladas e enfileiradas (Fig. 7-A, B e C). A região que corresponde ao nectário é reduzida formada pelas células da epiderme, que formam uma espessa parede, poucas camadas de células parenquimáticas, e pequenos agrupamentos de células esclerenquimáticas (Fig. 7-A).

O mesocarpo contém idioblastos, células parenquimáticas total ou parcialmente desintegradas formando uma massa única carnosa e por células esclerenquimáticas isoladas ou em pequenos agrupamentos, que formam fibras (Fig. 7-A, B C e D).

O endocarpo está totalmente esclereificado, em algumas regiões ainda está associado ao mesocarpo e em outras está completamente livre, apresentando uma camada delgada de cutícula (Fig. 7-A e E).

As sementes maduras permanecem com as características do estágio anterior, a única modificação evidente é a completa condensação da endotesta (Fig. 7-F e G).

Além do padrão de coloração do exocarpo e consistência do mesocarpo, o processo de esclerificação do endocarpo e exotesta e desenvolvimento dos demais tecidos da semente são as principais características que marcam o desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca*.

3.2.5 Caracterização do fruto de *I. hypoleuca*

O fruto se configura numa drupa globosa a subglobosa, firme e macia (Fig. 1- D), medindo em média 9,5 mm de comprimento e 8,8 mm de diâmetro e pesando em média 0,4g (Tab. 1). Possui superfície rugosa de consistência coriácea e coloração violeta intensa (Fig. 1- D); o tecido do exocarpo compreende a epiderme e células subjacentes (Fig. 7-A, B e C). A região do nectário é evidente (Fig. 7-A). O mesocarpo é carnoso e o endocarpo é ósseo formado de tecido lignificado e constituído por quatro a seis pirênios livres.

O pirênio é reniforme em vista lateral, com a face dorsal convexa e a ventral plana ou levemente convexa, de coloração amarelo ocre (Fig. 1-E). Cada pirênio contém em média $32 \pm 4,98$ sementes. A semente mede cerca de 1 mm, é marrom avermelhada e

brilhante, angular, com exotesta foveolada e bastante rígida (Fig. 1-F). O endosperma é branco e translúcido, o embrião é cilíndrico branco e opaco e ocupa a região central da semente.

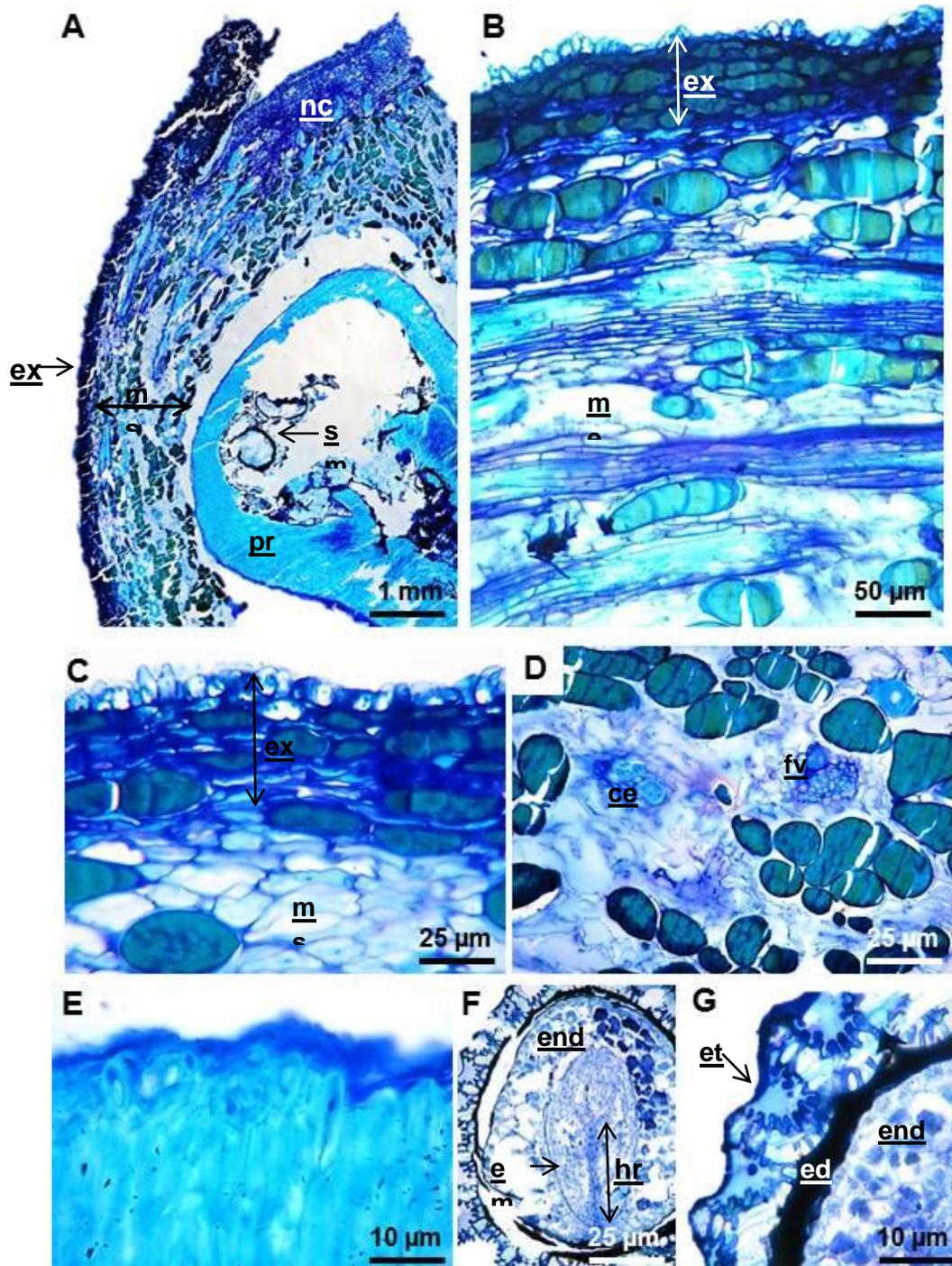


Figura 7. Estádio IV do desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca* (A-C e E-G secções longitudinais, D secção transversal). A) fruto; B) e C) pericarpo destacando exocarpo e mesocarpo; D) mesocarpo destacando células esclerenquimáticas e feixe vascular; E) endocarpo; F) e G) semente. ce = células esclerenquimáticas, ed = endotesta, em = embrião, end endosperma, et = exotesta, ex = exocarpo, fv = feixe vascular, hr = eixo hipocótilo-radícula, ms = mesocarpo, nc = nectário, pr = pirênio, sm = semente.

3.2.6 Estádio Pós-Maturação

Após o estágio considerado como o final da maturação dos frutos, outros eventos ocorrem até que os mesmos sejam desprendidos (Fig. 8):

Durante o período de coleta e observação em campo raramente foi observado frutos maduros com vestígio de predação (Fig. 8-A), entretanto, por vezes ocorreram frutos com indício de que algum animal se alimenta mesmos (Fig. 8-B).

Grande parte dos frutos maduros permanece presa à infrutescência, e se processa uma fase de senescência dos mesmos. Com cerca de um ano, o fruto está totalmente ressecado, apresentando frequentemente rachaduras no exocarpo (Fig. 8-C). O mesocarpo é marrom escuro e farinoso e o endocarpo torna-se mais opaco, entretanto as sementes continuam com as mesmas características da fase anterior. Após esse período, o eixo que sustenta toda a estrutura da infrutescência seca, acarretando na queda de toda a sua estrutura pelo rompimento do pedicelo, ou, raras vezes, ocorre a queda dos frutos e a permanência dos pedúnculos.

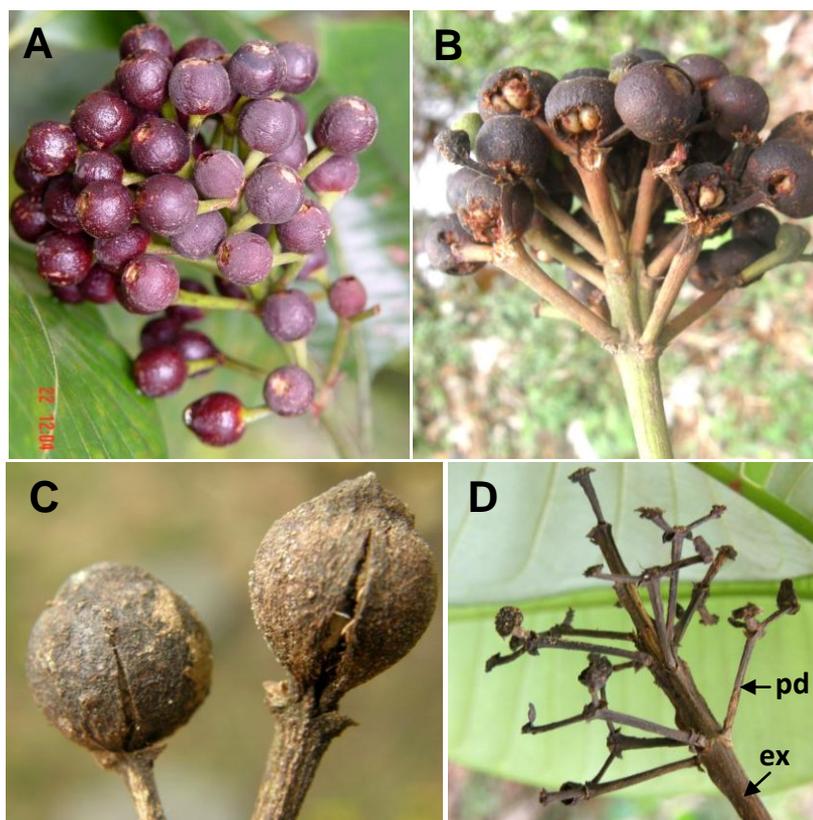


Figura 8. Detalhes da infrutescência de *I. hypoleuca*. A) frutos recém amadurecidos; B) frutos em estágio avançado de maturação; C) frutos pós-maturação; D) pedicelos após a queda dos frutos. ex = eixo, pd = pedúnculo.

4. Discussão

De acordo com Robbrecht (1988), a condição ínfera e bicarpelar do ovário é uma das características mais confiáveis para definir e reconhecer espécies de Rubiaceae. Entretanto, várias tribos e até mesmo gêneros podem apresentar um número variável de carpelos (Robbrecht, 1984) como no caso de *Isertia*. Boom (1984) ao fazer uma revisão do gênero, separou-o em duas sessões, *Cassupa* com 2 ou 3(4) lóculos e *Isertia* com (4) 5 ou 6 (7) lóculos.

A placentação axial é comum a todas as Rubiaceae exceto nos gêneros de Gardeniinae, alguns de Hypobathreae e em Tammsia, que podem apresentar placentação parietal ou transições entre axial e parietal (Robbrecht 1988). Em *I. hypoleuca* os óvulos desenvolvem-se em toda a extensão do septo.

Em Rubiaceae o número de óvulos varia de um a muitos, sendo esse caráter tradicionalmente utilizado para a separação de subfamílias (Robbrecht, 1988). Na classificação de Robbrecht (1988) Rubiaceae é dividida em quatro subfamílias, sendo que Cinchonoideae apresenta quase todas as tribos com o caráter lóculos multiovulados, dentre elas Isertieae, que nessa classificação conta com 26 espécies. Em uma revisão de Isertieae (Bremer e Thulin, 1998), o gênero foi reduzido a apenas dois gêneros: *Isertia* (incluindo *Yutajea*) e *Kerianthera*, todos com lóculos multiovulados. Segundo Puff (2001), a maioria das espécies de Rubiaceae possui óvulos anátropos ou hemianátropos e unitegmentados, como em *I. hypoleuca* que possui óvulo hemianátropo, entretanto existe uma forte tendência, dentro da família, à forma campilótropa.

A espécie estudada, assim como outras Rubiaceae apresenta óvulo unitegmentado, embora alguns táxons apresentem resquícios de um segundo tegumento como *Borreria verticillata* (De Toni & Mariath 2004). É provável que os ancestrais da família possuíssem óvulos bitegmentados, caráter considerado plesiomórfico por Corner (1976).

As características do nucelo assim como o número dos tegumentos, possuem valor taxonômico e filogenético (Rangan & Rangaswamy 1999). O processo de redução nucelar ocorre em algumas famílias simpétalas, incluindo Rubiaceae. Fagerlind (1937) reconheceu três tipos de nucelo na família. Shamrov (1998) constatou somente um único tipo de nucelo e classificou-o como reduzido. Mendes (1941) observou durante o desenvolvimento do óvulo de *Coffea arabica*, que as poucas células do nucelo foram

comprimidas entre o tegumento e o saco embrionário e desapareceram na maturidade. Em *I. hypoleuca* não foi verificado a presença de nucelo.

A delimitação das regiões do pericarpo nos frutos provenientes de ovário ínfero é complexa, pois a parede desses frutos tem origem dupla: carpelar e do hipanto (Souza 2006). Segundo Robbrecht (1988) o cálice em Rubiaceae é restrito às estruturas acima do ovário, portanto o hipanto consiste em apenas tecido receptacular. No presente trabalho, o termo ovário compreende a estrutura de origem carpelar e do hipanto que se apresentam fundidos.

Além do hipanto, o nectário e o cálice fazem parte do pericarpo do fruto de *I. hypoleuca*, o disco nectarífero epígeno é comum em praticamente toda a família, pode ser cilíndrico, anelar ou cônico, e em geral é glabro, mas em algumas espécies apresentam papilas ou pêlos. Já o cálice pode ter variações entre um tubo bem desenvolvido com ou sem lobos e um tubo curto com lobos foliáceos ou mesmo ausentes (Robbrecht, 1988), podendo ou não ser persistente (Barroso, 1991). O cálice persistente e o disco nectarífero proeminente são característicos de *Isertia* (Boom, 1984), em *I. hypoleuca* o nectário é cilíndrico e glabro e mesmo passando por diversas modificações, como na textura e coloração, continua evidente no fruto maduro. O cálice é gamopétalo e compõe a região apical da parede do pericarpo.

Segundo a revisão de Boom (1984) os frutos de *Isertia* são elipsoides, globosos ou subglobosos e variam de 4 a 11 mm de diâmetros, em *I. hypoleuca* estas características morfológicas foram registradas, sendo que o fruto maduro é globoso ou subgloboso com cerca de 9 mm.

Além da origem dos tecidos do pericarpo, a definição anatômica das três camadas da parede do fruto, exocarpo, mesocarpo e endocarpo também é complexa e varia conforme a interpretação do autor. Segundo Roth (1977), a maioria dos autores considera o exocarpo derivado da epiderme externa do ovário, incluindo as camadas subepidérmicas por ela produzidas, o mesocarpo derivado do mesofilo ovariano e endocarpo derivado da epiderme interna do ovário, também abrangendo as camadas subepidérmicas existentes.

O exocarpo de *I. hypoleuca* é composto tanto pela epiderme papilosa do hipanto quanto pelas camadas subepidérmicas de células parenquimáticas do mesocarpo composto por idioblastos contendo compostos fenólicos e por células que foram colapsadas durante o desenvolvimento do fruto.

Roth (1977) afirmou que o mesocarpo das drupas é normalmente parenquimático e desenvolve partes carnosas e suculentas. Ainda segundo a autora, o número de camada de células presentes no mesofilo ovariano pode aumentar ou continuar o mesmo no mesocarpo do fruto maduro. O mesocarpo da espécie estudada é parequimatático e as células, exceto os idioblastos e pequenos agrupamentos de células esclerenquimáticas, são parcialmente colapsadas.

Não foi possível interpretar a origem da camada lignificada do pericarpo que corresponde ao endocarpo (pirênios), se somente devido à multiplicação da epiderme interna do ovário ou em conjunto com as camadas inferiores do mesocarpo, visto que na primeira fase de desenvolvimento o tecido já se encontra bastante desenvolvido, com todas as camadas celulares correspondentes praticamente formadas, e em intenso processo de divisão anticlinal.

Segundo Souza (2006) o processo de desenvolvimento dos frutos que possuem endocarpo ou parte ou mesocarpo esclerenquimáticos, pode ser verificado mediante quatro estádios: 1) ovário da flor em pré-antese ou antese; 2) fruto muito jovem em que as células que correspondem ao endocarpo se encontram em processo de divisão, principalmente periclinal; 3) fruto jovem em que se verifica o alongamento ou crescimento das células do endocarpo ou mesocarpo esclerenquimático e 4) fruto adulto em que o endocarpo inicia e finaliza o processo de esclerificação.

A estrutura do endocarpo descrito pelo autor na terceira fase equivale ao primeiro estágio de desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca* que corresponde ao fruto recém formado. O processo de esclerificação que, segundo o autor, corresponde à quarta fase, em *I. hypoleuca* é verificado no segundo estágio. Dessa forma, as principais características que marcam os quatro estádios ontogenéticos descritos para a espécie é o desenvolvimento do endocarpo, da exotesta, que inclui o processo de esclerificação celular, e endotesta da semente, além do padrão de coloração do exocarpo.

Em Rubiaceae, o pirênio varia consideravelmente na morfologia e mecanismo de abertura, podendo apresentar valor taxômico de gêneros e espécies como verificado por Cortés-B e Delprete (2003) para o gênero *Retiniphyllum*. Eles encontram cinco tipos morfológicos de pirênios para o gênero utilizando os caracteres: tamanho, presença ou ausência de alas laterais, textura da superfície, tipo de base e ápice e local da perfuração de germinação. Segundo a subdivisão de *Isertia* proposta por Boom (1984) a sessão *Cassupa* possui frutos do tipo baga com endocarpo carnoso e a sessão *Isertia*, drupas e formam pirênios livres, entretanto o autor não fez nenhum relato sobre a morfologia dos

pirênios. Os pirênios do fruto de *I. hypoleuca* são bastante semelhantes ao “tipo 1” encontrado pelos autores, sendo este tipo o mais comum para *Retiniphyllum*.

As sementes de *Isertia* são diminutas, com cerca de 1 mm marrom avermelhadas, angulares e com a testa foveolada (Boom, 1984), características também verificadas para a espécie estudada.

Segundo Corner (1976), na maioria das Angiospermas que apresentam óvulos unitegmentados, parte da porção interna e mediana do tegumento é colapsada ou esmagada pelo endosperma em desenvolvimento, e as camadas mais externas, juntamente com a epiderme, formam a testa da semente. Em Rubiaceae, assim como na maioria das Asteridae, a testa das sementes apresenta-se constituída pela exotesta formada por uma única camada de células. A endotesta, de uma maneira geral é formada a partir das camadas de células subjacentes a testa que durante o desenvolvimento da semente são esmagadas e colapsadas pelo desenvolvimento do endosperma (Robbrecht, 1988).

Em *I. hypoleuca* a exotesta é uma camada mecânica que forma uma “coroa” radial com paredes espessadas e perfurações nas regiões inferiores da parede. Segundo Robbrecht (1988), Bremekamp, através de diversas revisões realizadas entre 1947 e 1952, descreveu vários tipos de exotestas em Rubiaceae, introduzindo esse caráter na classificação de táxons da família, e em seu sistema de classificação de Rubiaceae, Bremekamp (1966) relacionou a exotesta com paredes axiais e tangenciais espessadas à subfamília Cinchonoideae. Já no sistema de classificação proposto por Robbrecht (2006) esse tipo de exotesta difere a subtribo Isertiinae da subtribo Cinchoninae. O processo de formação da endotesta de *I. hypoleuca* apresenta o mesmo padrão descrito por Robbrecht (1988).

Todas as espécies pertencentes à Rubiaceae possuem sementes com endosperma (Robbrecht, 1988), e segundo Puff (2001) a quantidade de tecido varia de abundante a apenas algumas camadas de tecido, havendo uma correlação entre a quantidade de endosperma e o tamanho do embrião; quanto maior o embrião menor o endosperma e vice-versa. Rodriguez (1976), ao realizar um estudo sobre frutos carnosos e sementes de Rubiaceae na Venezuela, classificou o endosperma das espécies estudadas como muito abundante, abundante ou escasso, de acordo com o volume ocupado na semente, sendo que *Isertia* foi considerado com endosperma abundante. Essa relação foi confirmada na espécie estudada, uma vez que o volume do endosperma e o embrião são praticamente os mesmos.

Neste mesmo estudo, Rodriguez classificou o endosperma das espécies estudadas como carnosos ou sólido, observando que esta diferenciação apresenta uma relação com a anatomia do tecido. Segundo o autor, endospermas sólidos apresentam paredes celulares espessadas, enquanto endospermas carnosos apresentam paredes delgadas. Seguindo essa classificação, pode-se afirmar que o endosperma de *I. hypoleuca* é carnosos.

I. hypoleuca é uma planta pioneira, característica de florestas secundárias (Boom, 1984). Espécies que ocupam esse tipo de ambiente normalmente produzem grande quantidade de pequenas sementes (Swaine e Withmore, 1988). Em um estudo sobre germinação de espécies pioneiras, Aud e Ferraz (2012) estabeleceram uma relação entre a massa de sementes e germinação em resposta à luz e temperatura e descobriram que pequenas sementes necessitam mais de luz para germinar e que a luz é o principal estímulo para que ocorra a germinação. *I. hypoleuca* foi uma das espécies estudadas e além da grande sensibilidade à luz, apresentou maior capacidade de germinação à temperatura constante.

4.1 Classificação do fruto de *Isertia hypoleuca*

O fruto de *I. hypoleuca* é do tipo drupa proveniente do ovário concrecido com o hipanto, cálice e nectário, e apresenta o endocarpo composto por quatro a seis pirênios polispérmicos e independentes entre si.

Gaertner (1788) definiu o fruto como resultado do amadurecimento do ovário, porém Winkler (1944) considerou que os frutos são formados pelo ovário e por outras partes da flor. As peculiaridades morfológicas do fruto de *I. hypoleuca*, somada ao emprego muitas vezes incoerente e impreciso da terminologia e tipologia de frutos dificultaram a tipificação do mesmo, entretanto, após considerar todos os aspectos discutidos abaixo, o mesmo foi classificado como drupa, amparado nos preceitos de Spjut (1994).

De uma maneira geral, o fruto de *I. hypoleuca* é considerado indeiscente com mesocarpo carnosos: Schumann (1891) e Rodriguez (1976), classifica-o como baga, Boom (1984) como pirênio, Bremer e Thulin (1998) como drupa, Barroso (1999) como nukulânio polispermo e Steyermark *et al.* (1974) e Taylor (2007) como drupáceo. Lorenzi (1998), entretanto, é o único a classificá-lo como “cápsula globosa tardiamente

deiscente”, ou seja, aparentemente o único a considerar o fruto como seco, talvez o autor tenha feito a classificação observando a fase pós-maturação do fruto.

Em Rubiaceae, a “incerteza” quanto à classificação do tipo de fruto e os termos a serem empregados pode ser verificada nos seguintes trabalhos: Rutishauser et al. (1998), que classificaram o fruto de *Theligonum cynocrambe* com noz, sendo antes considerado como drupáceo; Piesschaert (2002) que interpretou a estrutura do fruto de *Pagameopsis* como uma fase intermédia entre drupa e cápsula, De Toni e Mariath (2011) que também encontraram dificuldades em definir o pericarpo de espécies de *Galium* e *Reubunium* como carnosos ou secos, considerando-os como intermediário, e Pietrobon (2008) que classificou os frutos de *Psychotria hoffmannseggiana* e *Psychotria trichophora* como drupáceos, afirmando que não havia uma “solução concreta” para a classificação dos frutos.

Segundo Font Quer (1977) o termo drupa foi introduzido por Linneu e sua origem vem do latim e quer dizer “azeitona que começa a amadurecer”, remetendo de maneira geral a todo fruto carnosos com endocarpo enrijecido. Segundo esse mesmo autor o termo drupa pode ser empregado em um sentido estrito e outro mais amplo. Drupa *strictu sensu* é formada a partir de um ovário súpero e unilocular. Drupa *latu sensu* pode ser formada a partir de um ovário ínfero e sincárpico que origina um fruto unilocular e monospermo, podendo apresentar mesocarpo seco.

Ainda segundo Font Quer (1977) o termo nukulânio deriva de *nucula* que em latim quer dizer “noz”, um fruto com pericarpo seco. Para este autor nukulânio designa um tipo de fruto com as mesmas características de uma drupa, exceto pelo fruto ser plurilocular, com endocarpo loculado ou com pirênios livres. O termo pirênio corresponde à parte óssea (“hueso”) enrijecida do fruto que envolve a semente, o endocarpo enrijecido.

Spjut (1994), ao propor uma chave geral para classificação dos frutos, também faz um estudo etimológico e comparativo da terminologia empregada para classificação e distingue o emprego dos termos drupa e nukulânio apenas pela consistência do epicarpo e mesocarpo. Drupa designa frutos carnosos e nukulânio frutos secos, sendo que ambos possuem endocarpo enrijecido que pode formar uma ou mais pirênios (“stones”) envolvendo uma a muitas sementes.

O autor descarta a utilização do termo pirênio seja para um tipo de fruto seja para caracterizar a estrutura enrijecida do endocarpo, e utiliza para isso o termo “stone” (pedra), e destaca que pirênio foi utilizado por outros autores tanto para designar frutos

tipo drupa ou nukulânio com mais de um pirênio como para frutos de origem inferoovarina com um ou mais pirênios.

Segundo este mesmo autor, frutos descritos como drupáceos, sugerem algumas possibilidades: 1) o autor não definiu se as sementes estão inclusas num endocarpo rígido; 2) o endocarpo pode não ser rígido; 3) o exocarpo pode ser seco; 4) a camada carnosa é formada parcial ou totalmente por um hipanto e 5) o pirênio pode ser deiscente.

É importante ressaltar ainda que para Spjut (1994) a origem superior ou inferior do ovário não deve ser requisito imperativo para classificação, mas sim se há o desenvolvimento acentuado de tecidos extra-ovarianos, quando estes compõem a estrutura carpológica. Outro caráter prescindível é o número de pirênios em frutos com endocarpo enrijecido, já que este caráter varia muito entre espécies e gêneros.

Barroso (1999) propõe uma chave para classificação dos frutos de dicotiledôneas do Brasil e apresenta uma classificação para frutos drupóides, onde estão alocados os frutos tipo drupa e nukulânio, e o que distingue um e outro é o número de pirênios. O termo pirênio é utilizado para designar cada uma das estruturas rígidas que o endocarpo pode formar nesses frutos.

Os drupóides podem ter origem súpero ou inferoovarina, com um ou mais carpelos e é, em geral, carnoso. A drupa é o fruto com um único pirênio e o nukulânio é composto por um pirênio loculado ou por dois ou mais pirênios livres.

Barroso (1999) resalta que o tipo de fruto em *Isertia* é muito particular e enquadrado-o na classificação dos frutos drupóides, empregando uma terminologia bastante específica: nukulânio polispermo.

Gonçalves e Lorenzi (2007) designam os termos drupa, drupóide e nukulânio para frutos com endocarpo coriáceo ou pétreo, e assim como Font Quer (1997) e Barroso (1999) o caráter que distingue um e outro é o número de pirênios. Para os autores, drupa é o fruto com um único pirênio e drupóide ou nukulânio é aquele com mais de um pirênio, sendo que somente para o termo nukulânio há a menção da presença de mesocarpo carnoso. Assim como Font Quer (1977) e Barroso (1999), os autores também empregam o termo pirênio para designar cada unidade enrijecida formada pelo endocarpo do fruto drupóide.

Na literatura clássica o fruto de *Isertia* foi classificado como baga (Schumann, 1891) assim como por Rodriguez (1976), talvez pelo fato do fruto comportar muitas sementes, mas todos os autores supracitados são unânimes em

descrever esse tipo carpológico como aquele em que o mesocarpo e o endocarpo são carnosos ou suculentos, em maior ou menor grau.

Assim, considerando a etimologia dos termos que estão associados à classificação do fruto de *I. hypoleuca*, e considerando as ponderações apresentadas por Spjut (1994), o termo drupa parece ser o mais plausível, já que nukulânio corresponde a um fruto com pericarpo seco, baga a um fruto com ausência de endocarpo enrijecido e drupáceo um termo muito genérico que pode estar associado tanto a uma drupa como a um nukulânio.

A utilização do termo pirênio apresentado por Font Quer (1997), Barroso (1999) e Gonçalves e Lorenzi (2007) como a unidade estrutural enrijecida formada pelo endocarpo também foi adotada no presente trabalho.

Estudos filogenéticos envolvendo Rubiaceae sugerem que o tipo de fruto plesiomórfico para a família é cápsula com muitas sementes (Bremer e Eriksson 1992). De acordo com os autores, os frutos carnosos de Rubiaceae surgiram a partir de um ancestral com fruto seco do tipo cápsula, no mínimo 12 vezes ao longo do processo de diferenciação da família, uma delas na tribo Isertieae. Cabe ressaltar que possivelmente este estudo se baseou na classificação de Robbrecht (1988) e que atualmente o táxon conta com apenas dois gêneros, sendo que apenas *Isertia* continua na tribo, dos 26 propostos anteriormente.

Este estudo considerou o fruto completamente formado de *I. hypoleuca* corresponde ao estágio IV – fruto maduro, período em que a estrutura carpológica chegou ao ápice do seu desenvolvimento. O estágio a seguir, pós-maturação, é entendida como um processo de envelhecimento onde ocorre o declínio e/ou esclerose dos tecidos e/ou estruturas constituintes.

5. Conclusão

As características morfoanatômicas do ovário, óvulo, pericarpo e semente de *I. hypoleuca* condizem com as citadas pela literatura para Rubiaceae.

Na análise ontogenética da formação do endocarpo do fruto de *I. hypoleuca*, não foi possível interpretar sua origem, se somente da epiderme interna do ovário ou em conjunto com o mesocarpo.

Além do padrão de coloração do exocarpo e consistência do mesocarpo, o processo de esclerificação do endocarpo e diferenciação dos tecidos da semente são as principais características que marcam o desenvolvimento do fruto de *I. hypoleuca*.

Diante de todas as observações e discussões levantadas no presente trabalho, a classificação mais adequada para designar a estrutura carpológica de *I. hypoleuca* é a do tipo drupa, entretanto, as observações envolvendo o estágio definido como pós-maturação apontam para a necessidade de investigação continuada para reafirmar ou mesmo refutar essa classificação, além de subsidiar o entendimento referente ao mecanismo de dispersão da espécie.

6. Referências

- ANDERSSON, L., 1992. A provisional checklist of neotropical Rubiaceae. *Scripta Botanica Belgica*. 1: 1-199.
- ANDERSSON, L., 1996. Circumscription of the tribe Isertieae (Rubiaceae). *Opera Bot. Belg.* 7: 139-164.
- 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.
- AUD, F. F.; FERRAZ, I. D. K. 2012. Seed size influence on germination responses to light and temperature of seven pioneer tree species from the Central Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 84(3): 759-766
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. 1999. *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa: UFV.
- BREMEKAMP, C. E. B. 1966. Remarks on the position, the delimitation and subdivision of the Rubiaceae. *Acta Botanica Neerl.* 15: 1-33.
- BREMER, B.; O. ERIKSSON. 1992. Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 47: 79-95.
- BREMER, B.; M. THULIN. 1998. Collapse of Isertieae, reestablishment of Mussaendeae, and a new genus of Sabiceae (Rubiaceae): Phylogenetic relationships based on rbcL data. *Pl. Syst. Evol.* 211: 71-92.
- BREMER, B. 2009. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 96: 4-26.
- BOOM, B. M. 1984. A revision of *Isertia* (Isertieae – Rubiaceae). *Brittonia*. 36: 425-454.

- BOOM, B. M.; CAMPOS, M. T. 1991. A preliminary account of the Rubiaceae of a Central Amazonian terra firme forest. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. sér. Bot.* 7(2): 223-247.
- BROWN, S; LUGO, A. E. 1994. Rehabilitation of tropical lands: a key to sustaining development. *Rest. Eco.* 2: 97-111.
- CHAZDON, R. L., 2003. Tropical forest recovery: legacies of human impact and natural disturbances. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 6(1-2): 51-71.
- CORNER, E. J. H. 1976. *The seeds of dicotyledons.* 2v. Cambridge: Cambridge University Press.
- CORTÉS-B, R.; DELPRETE, P. G. 2003. Estudio morfológico de los pirenos en el género *Retiniplylum* (Rubiaceae). *Colombia Forestal.* 8(16): 21-30.
- DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 152: 465-512.
- DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; RUHSAM, M.; MOAT, J.; BRUMMITT, N. A. 2009. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 96: 68-78.
- DESSEIN, S.; JANSEN S.; HUYSMANS S.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. 2001. A morphological and anatomical survey of *Virectaria* (African Rubiaceae), with a discussion of its taxonomic position. *Bot. Journal of the Linnean Society.* 137: 1-29.
- DE TONI, K. L. G.; MARIATH, J. E. A. 2004. O desenvolvimento do rudimento seminal de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (Rubiaceae, Rubioideae, Spermacoceae). *Revista Brasileira de Botânica.* 27(1): 185-192.
- DIRZO, R.; RAVEN, P. H. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annu Rev Environ Resour.* 28: 137-67.
- FAGERLIND, F. 1937. Embryologische, zytologische und bestäubungsexperimentelle Studien in der Familie Rubiaceae nebst Bemerkungen über einige Polyoliditätsprobleme. *Acta Horti Bergiani.* 2: 196-470.
- FEARNSIDE, P. M. 2005. Deforestation in Brazilian Amazonia: History, rates and consequences. *Conservation Biology.* 19(3): 680-688.
- FONT QUER. 1977. *Diccionario de Botánica.* Barcelona: Labor.
- GAERTNER, J. *De fructibus et seminibus plantarum.* v.I. Leipzig, 1788 *apud* ROTH, I. 1977. *Fruits of Angiosperms.* Berlin: Gebrüder Borntraeger (Handbuch der Pflanzenanatomie).

- GIACOMIN, A. C.; WEBBER, A. C. 2011. Biologia floral, polinização e fenologia de *Isertia hypoleuca* Benth. (Rubiaceae). Resumos. In Congresso Nacional de Botânica, Fortaleza.
- GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. 2007. *Morfologia Vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical Histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book.
- LANG, A. G. 1973. The use of n-butyl alcohol in the paraffin method. *Staining Technology* 12(3): 113-117.
- LAURANCE, W. F. 1999. Reflections on the tropical deforestation crisis. *Biol Conserv* 91: 109-17.
- LAURANCE, W. F.; COCHRANE, M. A.; BERGEN, S.; FEARNSIDE, P. M.; DELAMÔNICA, P.; BARBER, C.; D'ANGELO, S. e FERNANDES, T. 2001. The Future of the Brazilian Amazon. *Science*. 291: 438-439.
- LIMA, L. F.; LIMA, P. B.; ALMEIDA Jr., E. B.; ZICKEL, C. S. Morphology of fruits, seeds and seedlings *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae). *Biota Neotrop*. 10(1): 155-160
- LORENZI, H. 1998. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum.
- MARGULIS, S. *Causas do desmatamento da Amazônia Brasileira*. 2003. Disponível em: <http://www.amazonia.org/AmazonForest/Deforestation/MargulisWorldBank0703.pdf> >. Acesso em: 15 dez. 2014.
- MENDES, A.J.T. 1941. Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. *American Journal of Botany*. 28(6): 784-789.
- MITTERMEIER, R. A.; C.G. Mittermeier, T. M. ; Brooks, J.D. Pilgrim, W.R. Konstant, G.A.B. Fonseca & C. Kormos. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Science* 100: 10309-10313.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59: 368-73.
- OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. 2005. Aspectos florísticos, fitossociológicos e ecológicos de um sub-bosque de terra firme na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 35: 1-16.
- PATIÑO, J. C. 1986. *Microtecnia vegetal*. México: Trillas.

- PERZ, S.G.; SKOLE, D.L. 2003. Secondary forest expansion in the Brazilian Amazon and the refinement of forest transition theory. *Soc. Nat. Res.* 16: 277-294.
- PIESSCHAERT, F.; JANSEN, S.; JAIMES, I.; ROBBRECHT E.; SMETS, E. 2001. Morphology, anatomy, and taxonomic position of *Pagameopsis* (Rubiaceae-Rubioideae). *Brittonia*, 53(4): 490-504.
- PUFF, C.; BUCHNER, R. 1998. Development and structure of the comose seeds of *Hillia* (Rubiaceae). *Pl. Syst. Evol.* 210: 147-157.
- PUFF, C. 2001. The significance of gynoeceum and fruit and seed characters or the classification on the Rubiaceae. *Malayan Nature Journal.* 55(1-2): 133-146.
- RANGAN, T.S. & RANGASWAMY, N.S. 1999. Nucellus – a unique embryologic system. *Phytomorphology* 49(4): 223-335.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. 1999. *Flora da Reserva Ducke*. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica* 1: 1-271.
- ROBBRECHT, E. & J. F. MANEN, 2006. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16, trnL-trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. *Systematic and Geography of Plants.* 76: 85-146.
- RODRIGUEZ, P. 1976. Estudios sobre frutos carnosos e sus semillas de las Rubiaceae de Venezuela. *Acta Botanica Venezuelana.* 11(1-4): 283-383.
- ROTH, I. 1977. *Fruits of Angiosperms*. Berlin: Gebrüder Borntraeger (Handbuch der Pflanzenanatomie).
- RUTISHAUSER, R.; DECRAENE, L. P. R.; SMETS, E.; MENDOZA-HEUER, I. 1998. *Theligonum cynocrambe*: developmental morphology of a peculiar rubiaceous herb. *Pl. Syst. Evol.* 210: 1-24.
- SHAMROV, I.I. 1998. Ovule classification in flowering plants – new approaches and concepts. *Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie.* 154(3): 377-407.
- SCHUMANN, K., 1891: Rubiaceae. - In ENGLER, A., PRANTL, K., (Eds.): Die natürlichen Pflanzenfamilien IV, 4: 1-156. - Leipzig: Engelmann.
- SOHMER, S. H.; A. P. DAVIS. 2007. The genus *Psychotria* (Rubiaceae) in the Philippine Archipelago. *Sida, Bot. Misc.* 27: 1-267.

- SOUZA, L.A. 2006. Fruto. *In Anatomia do fruto e da semente*. Ponta Grossa: UEPG (L.A. Souza ed.).
- SPJUT, R. W. 1994. A Systematic treatment of fruit types. *The New York Botanical Garden*. 70: 1-182.
- STEYERMARK, J. A. 1974. *Rubiaceae*. In: Flora de Venezuela. Caracas: Instituto Botánico, Dirección de Recursos Naturales Renovables, Ministerio de Agricultura y Cria (ed. Laser, T.). 9: 1-2070.
- SWAINE, M. D.; WHITMORE, T. C. 1988. On the definition of ecological species groups in tropical rain forest. *Vegetatio*. 75: 81-86.
- TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. 2007. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. *Rodriguésia* 58(3): 549-616.
- WINKLER, H. 1944. Zur einigung und weiterführung in der frage des fruchtsystems. *Beitr. Biol. Pfl. apud ROTH, I. 1977. Fruits of Angiosperms*. Berlin: Gebrüder Borntraeger (Handbuch der Pflanzenanatomie).
- WRIGHT, S. J. 2005. Tropical forests in a changing environment. *Trends in Ecology and Evolution*. 20(10).
- WOLFF, D.; BRAUN, M.; LIEDE, S. 2003. Nocturnal versus diurnal pollination success in *Isertia laevis* (Rubiaceae): a sphingophilous plant visited by hummingbirds. *Plant Biology*. 5: 71-78.