

LAYS ARAÚJO NERY

ESTRUTURAS SECRETORAS EM
BANISTERIOPSIS MURICATA (CAV.) CUATREC.
(MALPIGHIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS, QUÍMICOS E
ECOLÓGICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

N456e
2013

Nery, Lays Araújo, 1988-

Estruturas secretoras em *Banisteriopsis muricata* (Cav.)
Cuatrec. (Malpighiaceae): aspectos estruturais, químicos e
ecológicos / Lays Araújo Nery. – Viçosa, MG, 2013.
x, 54 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marília Contin Ventrella.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Banisteriopsis muricata*. 2. Plantas - Anatomia.
3. Histoquímica. 4. Ontogenia. 5. Malpighiaceae.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.79

LAYS ARAÚJO NERY

ESTRUTURAS SECRETORAS EM
BANISTERIOPSIS MURICATA (CAV.) CUATREC.
(MALPIGHIACEAE): ASPECTOS ESTRUTURAIS, QUÍMICOS E
ECOLÓGICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 22 de março de 2013

Prof.a. Aristéa Alves Azevedo

Prof.a. Maria Olívia Mercadante Simões

Prof.a. Milene Faria Vieira
(Coorientadora)

Prof.a. Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

Às minhas avós (gatinhas), Cida e Mariana, exemplos de que a sabedoria é um dom que deve ser cultivado no coração e seus frutos compartilhados com o próximo e aos meus pais e às minhas irmãs, fontes inesgotáveis de amor e alegria, capazes de transpor a distância e fazer-me sentir amada como sempre, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela infraestrutura disponível para a especialização do Mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais FAPEMIG pelo auxílio financeiro concedido durante o desenvolvimento do projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Botânica na pessoa do Ângelo Valentin.

À professora Marília pela confiança depositada, pela disponibilidade em ensinar e contribuir para meu crescimento.

Aos professores João Paulo Vianna Leite e Milene Faria Vieira pela coorientação.

À Rúbia Fonseca por toda a colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal (UFV), especialmente à Aristéa A. Azevedo, Renata M. S. Meira, Luzimar C. Silva, Rita Carvalho-Okano, Milene Faria Vieira, Flávia Garcia, Ana Paula Gonçalves, João Marcus Araújo, Edgard Picolli de Toledo e Adriano Nunes Nesi pelos valiosos ensinamentos.

Aos membros da banca Aristéa Alves Azevedo, Maria Olívia Mercadante Simões e Milene Faria Vieira por aceitarem contribuir com este trabalho.

Ao Gilmar Valente, Karla Ribeiro e Arthur Vieira pelo auxílio durante as análises no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Ao Departamento de Transportes da UFV pelo auxílio durante as expedições ao campo.

À Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (ETEAMP) pela colaboração durante as coletas e apoio à pesquisa da Mata do Paraíso.

A todos que me ajudaram na saga por flores em campo e que torceram imensamente por chuvas e floração: Marília, Rúbia, Tiago Augusto, Luana, Patrícia, Caroline, Thaline, Victor e Pedro. Ela floriu de novo! E é linda!

Às técnicas do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, Aurora e Patrícia, pelo profissionalismo constante, pelo carinho e amizade estabelecida.

A todos os colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV pela convivência e disponibilidade em ajudar.

Aos presentes que ganhei em Viçosa: Andrea, Cathie, Deborah, Eliza, Haynna, Laísa, Mariana, Narah (obrigada por ter “emprestado” o vô e a vó), Sara, Thaline e

Tiago Augusto. Obrigada pelos risos, conversas, enriquecimento cultural (nordestino) que guardarei e sentirei saudades. Serei sempre a “baiana”, mas Moc City não fica na Bahia hein?!

Ao Pedro Paulo e ao Victor, os melhores irmãos que eu podia ter ganhado no mestrado. Obrigada pela amizade confiada e que ela perdure além Viçosa.

Aos professores, Leonardo Monteiro Ribeiro e Maria Olívia Mercadante Simões, que sempre contribuíram com seu exemplo, responsabilidade com a pesquisa científica, dedicação ao ensino e incentivo.

Ao Alan, Carol, Claudiane, Cláudia Fernanda, Flávia, Hellen Cássia, Ivan, Jannyne, Jéssica, Juliana, Luís, Laura, Patrícia, Pollyane, Priscila Leocádio, Raquel e Rodrigo por terem compreendido minha ausência, serem sempre tão presentes e por me permitirem saber o que é ter tesouros.

Ao Edivan, que mesmo longe foi tão presente e tão atencioso comigo, o meu carinho, amizade.

Aos amigos montes clarenses que torceram e rezaram por mim. É sempre bom voltar para casa e “me sentir em casa”.

Às “meninas lá de casa”, Baiana (Patrícia), Cila (Priscila), Itas (Itaina) e Luh (Luana). Vocês sabem tudo o que vivemos juntas. Recebi de vocês, em muitos momentos, a força, a alegria e a coragem que eu precisava. Foi um crescimento conjunto. A vocês o meu respeito e gratidão. Ao Rafael pela amizade e alegria que sempre me dedicou.

Às minhas avós gatinhas e a todos os meus familiares, na pessoa de tia Rita (minha “Ritolina”), exemplo de fé e coragem. Amo muito vocês e obrigada por tanto amor.

Ao Humberto, meu amor, amigo e abrigo. Obrigada pelo amor, pela confiança, incentivo, paciência e espera.

Às minhas irmãs princesas, Nayara e Mariana. Obrigada pela amizade, carinho e por sempre acreditarem em mim. Aos irmãos de coração, Vivi e Léo. Amo vocês.

Aos meus pais. A vocês o meu eterno agradecimento simplesmente por serem minha “mainha” e meu “painha”, os melhores pais e amigos que eu poderia ter. Sou fruto do amor e exemplo que dedicaram a mim. Amo vocês.

A Deus e a doce Mãe Maria pela força, coragem e amor com o qual me acolheram, me ensinaram e me mantiveram firme diante dos meus medos e em busca dos meus sonhos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPÍTULO 1. GLÂNDULAS FLORAIS DE <i>BANISTERIOPSIS MURICATA</i> (MALPIGHIACEAE): ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS	
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2. NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS DE <i>BANISTERIOPSIS</i> <i>MURICATA</i> (CAV.) CUATREC. (MALPIGHIACEAE): ANATOMIA E COMPOSIÇÃO DA SECREÇÃO	
RESUMO	45
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

NERY, Lays Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Estruturas secretoras em *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cuatrec. (Malpighiaceae): aspectos estruturais, químicos e ecológicos.** Orientadora: Marília Contin Ventrella. Coorientadores: Milene Faria Vieira e João Paulo Viana Leite.

Banisteriopsis muricata (Malpighiaceae) ocorre em todos os domínios fitogeográficos do Brasil e apresenta populações mistas constituídas flores com cálice glandulado e eglandulado, pétalas posteriores com fimbrias glandulosas, glândulas no conectivo das anteras e nectários extraflorais. Assim, o presente estudo propõe analisar a anatomia e a composição química das glândulas florais e foliares de *B. muricata*, e o papel destas estruturas sobre a atração de polinizadores e demais visitantes. Botões florais, flores em antese e folhas em diferentes estádios de desenvolvimento foram processados de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A natureza química da secreção foi determinada por testes histoquímicos e químicos e a funcionalidade foi observada em campo. As glândulas calicinais desenvolvem-se na face abaxial das sépalas, se constituem por epiderme secretora unisseriada, cutícula espessa e parênquima secretor vascularizado por xilema e floema. A secreção que acumula-se no espaço subcuticular conspícuo compõe-se apenas por glicose. As glândulas do conectivo das anteras se constituem de duas regiões distintas, uma secretora e uma região não secretora. A epiderme de ambas as regiões é constituída por células volumosas com cutícula e paredes delgadas. As células da epiderme secretora acumulam proteínas e polissacarídeos, que são liberados pela ruptura dos poros, o que parece ser efeito do contato com o corpo de polinizadores. As fimbrias glandulosas das pétalas posteriores possuem características anatômicas semelhantes às das glândulas calicinais, não apresenta nenhuma secreção, mas acumulam antocianinas. As glândulas calicinais de *B. muricata* não constituem elaióforos e sim nectários; as glândulas das pétalas atuam como sinalizadores para visitantes florais e a secreção liberada pelas glândulas do conectivo constituem um veículo de transferência de grãos de pólen. As folhas apresentam NEF que se desenvolvem na face abaxial. Os NEF são do tipo elevado e constituídos por epiderme secretora unisseriada, parênquima nectarífero com poucas camadas de células e parênquima subnectarífero vascularizado. Não se observou poros ou rupturas cuticulares para liberação da secreção que se acumula no espaço subcuticular. A secreção é escassa,

viscosa e apresenta glicose, pectinas e proteínas. A observação da visita de formigas reforçam a ocorrência da interação inseto-planta e o papel de proteção contra herbivoria. A ocorrência de flores com cálice glandulado e eglandulado, a ausência de elaióforos, a presença de pétalas de orientação, glândula no conectivo sugerem que *B. muricata* pode estar desenvolvendo novas estratégias de atração de polinizadores.

ABSTRACT

NERY, Lays Araújo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Secretory structures of *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cuatrec. (Malpighiaceae): structural, chemical and ecological aspects.** Advisor: Marília Contin Ventrella. Co-adviseurs: Milene Faria Vieira and João Paulo Viana Leite.

Banisteriopsis muricata (Malpighiaceae) occurs in all phytogeographic areas from Brazil and presents mixed populations consisting of morphotypes with glandular and eglandular flowers. Petals with glandular fimbriae and connective with glandular protrusions and extrafloral nectarines at leaf are common to both types. The aim of this study was to monitor the development and characterize the structural and chemical aspects of the secreting glands present in *B. muricata* and correlate them to the ecological role of these. Flower buds, flowers at anthesis and leaves in different developmental stages were processed under usual techniques of light microscopy and scanning electron microscopy, the chemical nature of the secretion was determined by chemical and histochemical tests and functionality was observed in the field. Calycine glands develop on the abaxial sepal. These glands are composed of secretory uniseriate epidermis; thick cuticle; subcuticular space, pores and stomata absent and secretory parenchyma vascularized by xylem and phloem. Secretion was not identified in the space subcuticular and chemical analyzes identified only glucose secretion. The epidermis of the secretory region consists by bulky cell with thin cuticle and thin walls with pores and presents content translucent. The non secretory cells are bulky and have thin walls and accumulate phenolics. Chemical analysis showed the accumulation of proteins and polysaccharides that are released by rupture of the pore, which seems to be an effect of the contact with pollinators. The fringes of the petals have anatomical features similar of calycine glands and accumulate anthocyanins. The calyx glands of *B. muricata* are not elaiophores and seem to act as floral nectaries; glands petals act as signaling for floral visitors and secretion released by glands of the connective are a vehicle for the transfer of pollen grains favoring cross pollination. The leaves have EFN that develop on the abaxial surface. The EFN are the type elevated and consists of secretory uniseriate epidermis, nectary parenchyma with few layers of cells and vascularized subnectariferous parenchyma. There was no pores or cuticular ruptures to release the secretion which accumulates in the subcuticular space. The secretion is scanty, viscous and has glucose, proteins and pectins. The observation of the visit of

ants reinforce the occurrence of insect-plant interactions and the EFN exert protective role against herbivory. Considering the occurrence of two morphotypes, no elaiophores, the presence of orientation petals, appearance of the connective gland and presence of EFN, *B. muricata* can be used as a model for understanding of the ecological aspects of the secretory structures and the study of these may contribute to the phylogeny of Malpighiaceae. Furthermore, our findings indicate that *B. muricata* has developed new strategies to attract pollinators.

INTRODUÇÃO GERAL

Malpighiaceae é uma família representada por aproximadamente 77 gêneros e 1.300 espécies arbóreas, arbustivas, herbáceas perenes e lianas que ocorrem regiões neo e paleotropicais (Anderson, 1979; 1990; Anderson e Davies, 2007). Aproximadamente 85% das espécies são neotropicais e a América do Sul é o maior centro de diversidade da família (Anderson, 1979). No Brasil, ocorrem 38 gêneros e 300 espécies, em distintas formações vegetacionais (Barroso, 1991; Souza e Lorenzi, 2005). *Banisteriopsis*, gênero inteiramente neotropical e o mais representativo, com 100 espécies neotropicais (Anderson e Gates, 1975; Gates, 1992), apresenta 47 espécies em território brasileiro (Mamede, 2012).

Aproximadamente 90% das malpigiáceas neotropicais possuem estruturas secretoras, as quais estão presentes em 52% das espécies paleotropicais (Vogel, 1974 *apud* Buchmann, 1987; Anderson, 1979; 1990). Nas espécies neotropicais são relatados elaióforos, estruturas secretoras de óleos não voláteis, no cálice, glândulas no conectivo dos estames (Anderson, 1979; 1990; Coccuci et al., 1996; Castro et al., 2001; Carvalho et al., 2005) e nectários extraflorais (NEF), estruturas secretoras de açúcares, na lâmina foliar e no pecíolo (Anderson, 1990; Possobom et al., 2010; Castro et al., 2001). Nas espécies paleotropicais ocorrem glândulas calicinais que atuam como nectários, em razão da secreção de açúcares (Vogel, 1990; Anderson, 1990; Endress, 1994). Elaióforos e nectários em Malpighiaceae ocorrem em posições análogas (Anderson, 1990) e, embora apresentem secreções distintas, são estruturas evolutivamente homólogas (Vogel, 1990).

Os elaióforos calicinais, observados nas angiospermas, apresentam morfologias distintas, ou seja, são tricomatosos ou epiteliais (Buchmann, 1987; Endress, 1994). Os tricomatosos caracterizam-se por apresentar pelos glandulares com secreção ativa, diretamente exposta à superfície, sem que haja retenção subcuticular (Endress, 1994). Os epiteliais se caracterizam como regiões epidérmicas, cuja secreção pode ser liberada diretamente ou mantida no espaço subcuticular (Vogel, 1990; Coccuci e Vogel, 2001; Stpiczyńska e Davies, 2008).

Em Malpighiaceae foram verificados apenas elaióforos epiteliais, que se apresentam como glândulas conspícuas, observadas aos pares em cada sépala de flores de várias espécies (Vogel, 1990; Sigrist e Sazima, 2004). Citam-se, como exemplos, *Dinemandra ericoides* (Coccuci et al., 1996), *Galphimia brasiliensis* (Castro et al.,

2001) e *Diplopterys pubipetala* (Possobom, 2008), cujos estudos confirmaram a secreção predominantemente composta por óleos não voláteis e sua interação com fêmeas de abelhas da tribo Centridini. Estas abelhas são especializadas na coleta de óleo, utilizado como fonte de alimentação para as larvas e impermeabilizante das paredes dos ninhos (Vogel, 1990; Buchmann, 1987; Endress, 1994; Vinson et al., 1996; Stpiczyńska e Davies, 2008).

Estudos indicam que algumas espécies de Malpighiaceae neotropicais não possuem ou estão perdendo as glândulas calicinais, mas apresentam protrusões glandulares no conectivo das anteras (Anderson, 1979). A presença ou a ausência das glândulas calicinais e as protrusões glandulares do conectivo podem compor estratégias reprodutivas das Malpighiaceae do Novo Mundo (Anderson, 1979; Cappellari et al., 2010).

A presença de NEF na maioria dos representantes de Malpighiaceae do Novo Mundo é um caractere diagnóstico para a família (Anderson, 1990) e são comuns às lianas, incluindo as espécies de *Banisteriopsis* (Gates, 1982; Elias, 1983). Os NEF ocorrem predominantemente na face abaxial da lamina foliar como glândulas pequenas e sésseis (Gates, 1982), e são frequentemente visitados por formigas, forrageadores que conferem proteção contra herbívoros (Bentley, 1977; Koptur, 1992; Possobom et al., 2010).

Os NEF secretam soluções aquosas predominantemente açucaradas, embora outros compostos possam ocorrer em pequenas concentrações, como proteínas e lipídeos (Elias, 1983; Koptur, 1992; Nicolson et al., 2007). Glândulas foliares de *Diplopterys pubipetala* apresentam secreção rica em glicose e atuam como NEF (Possobom et al., 2010). Entretanto, glândulas foliares e glândulas calicinais de *Galphimia brasiliensis* apresentam secreção predominantemente lipídica com traços de açúcares (Castro et al., 2001). A partir da presença de lipídeos e açúcares na secreção, os autores concluíram que as glândulas calicinais de *G. brasiliensis* são estruturas derivadas de nectários, constituem a continuação da expressão genética da folha e, portanto, glândulas calicinais e nectários seriam estruturas homólogas, mas não análogas.

Banisteriopsis muricata distribui-se amplamente em todos os domínios fitogeográficos do Brasil (Gates, 1982; Mamede, 2012) e pode apresentar as três estruturas secretoras já mencionadas para Malpighiaceae, como glândulas calicinais, glândulas do conectivo e NEF. Porém, a espécie também apresenta um morfotipo com

cálice eglandulado ou apenas com vestígios de glândulas calicinais (Gates, 1982; Anderson, 1990; Sigrist e Sazima, 2004). Considerando tais aspectos, *B. muricata* pode constituir um bom modelo para o entendimento das estruturas secretoras em Malpighiaceae e suas relações ontogenéticas e funcionais.

Há carência de estudos que conjuguem abordagens anatômicas, químicas e funcionais das estruturas secretoras de malpighiáceas (Anderson, 1990; Gates, 1992; Coccuci, 1996; Castro et al., 2001; Possobom et al., 2010), embora a origem, o padrão anatômico, a posição e o tipo de secreção tenham importância filogenética e ecológica (Castro et al., 2001). Assim, o presente estudo propõe analisar a anatomia e a composição química das glândulas florais e foliares de *B. muricata*, e o papel destas estruturas sobre a atração de polinizadores e demais visitantes.

O trabalho foi redigido sob a forma de dois capítulos intitulados: “Glândulas florais de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae): aspectos anatômicos e químicos?” e “Aspectos estruturais e funcionais dos nectários extraflorais em *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae)”, ambos escritos sob as normas da Revista Flora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Silva, E., Barônio G.J., Torezan-Silingardi, H.M., Del-Claro, K., 2012. Post fire resprouting of *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) and the role of extrafloral nectaries on the associated ant fauna in a brazilian savanna. *Sociobiology* 58: 327-340.
- Anderson, W.R., Gates, B., 1975. Notes on *Banisteriopsis* from south central Brazil. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 11: 51-55.
- Anderson, W.R., 1979. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. *Biotropica* 11: 219–223.
- Anderson, W.R. 1990. The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. *Memories New York Botanical Garden* 64: 210-224.
- Anderson, W., Davis, C., 2007. Generic adjustments in neotropical Malpighiaceae. *University of Michigan Herbarium*. 25: 137-166.
- Barroso, G.M., 1991. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, v.3, 326p.
- Bentley, B.L., 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *The Annual Review of Ecology* 8: 407-27.

Buchmann, S.L., 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 343-396.

Cappellari, S.C., Haleem, M.A., Marsaioli, A.J., Tidon, R., Simpson, B.B. 2010. *Pterandra pyroidea*: a case of pollination shift within Neotropical Malpighiaceae. *Annals of Botany* 107: 1323-1334.

Carvalho, P.D., Borbal, E.L., Lucchese, A.M. 2005. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 19: 209-214.

Castro, M.A., Vega, A.S., Múlgura, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). *American Journal of Botany* 88: 1935-1944.

Cocucci, A.A., Holgado, A., Anton, A.M., 1996. Estudio morfológico y anatómico de los eleóforos pedicelados de *Dinemandra ericoides*, malpigiácea endêmica Del desierto del Atacama, Chile. *Darwiniana* 34: 183-192.

Cocucci, A.A, Vogel, S., 2001. Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* 196: 26-46.

Elias, T.S., 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: Bentley, B., Elias, T.S. (Eds.), *The Biology of Nectaries*. Columbia University Press, New York, pp. 174-203.

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

Gates, B., 1982. *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monograph* 30: 1-237.

Koptur, S., 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants in: E. Bernays (Ed.) *Insect-plant interactions*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Mamede, M.C.H., 2012. *Banisteriopsis* in: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Nicolson, S.W., Thornburg, R.W., 2007. Nectar chemistry. In: Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Dordrecht: Springer, pp. 215-264.

Possobom, C.C.F., 2008. Estrutura e função das glândulas florais e dos nectários foliares em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis (Malpighiaceae). Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu.

Possobom, C.C.F., Guimarães E., Machado, S.R., 2010. Leaf glands act as nectaries in

Diplopterys pubipetala (Malpighiaceae). *Plant Biology* 12: 863–870.

Stpiczyńska, M., Davies, K.L., 2008. Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). *Annals of Botany* 101: 375–384.

Sigrist, M.R., Sazima, M., 2004. Pollination and reproductive biology of twelve Species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany* 94: 33-41.

Souza, V.C., Lorenzi, H., 2005. *Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa.

Vogel, S., 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* 7: 1–267.

Vogel, S., 1990. History of Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 130–142.

CAPÍTULO I

GLÂNDULAS FLORAIS DE *BANISTERIOPSIS MURICATA* (MALPIGHIACEAE): ASPECTOS ANATÔMICOS E QUÍMICOS

Resumo

Indivíduos de *Banisteriopsis muricata* podem apresentar cálice glandulado ou eglandulado enquanto glândulas nas anteras e nas fímbrias das pétalas são comuns a todos os morfotipos. Os aspectos anatômicos e funcionais são pouco estudados. Desse modo, este trabalho visou determinar aspectos do desenvolvimento, estrutura, secreção e funcionalidade das glândulas florais de *B. muricata*. Flores e botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento foram processados de acordo com técnicas usuais em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A natureza química da secreção foi determinada por testes histoquímicos e químicos. As glândulas calicinais desenvolvem-se na face abaxial das sépalas, e apresentam epiderme secretora unisseriada, sem estômatos, cutícula espessa sem poros e parênquima secretor vascularizado por xilema e floema. Há apenas glicose compondo a secreção, que se acumula num espaço subcuticular conspícuo. As fímbrias glandulosas da pétala posterior possuem características anatômicas semelhantes às glândulas calicinais; nenhuma secreção é identificada, mas há antocianinas na epiderme secretora. As glândulas do conectivo são constituídas por duas regiões distintas, uma secretora e uma região não secretora, ambas com epiderme constituída por células volumosas com paredes e cutícula delgadas. Na região secretora, há acúmulo de proteínas e polissacarídeos no interior das células, nos espaços intercelulares e, mais raramente, em espaços subcuticulares, liberados pela ruptura de poros, o que parece ser um efeito do contato com polinizadores. As glândulas do cálice de *B. muricata* são nectários; as glândulas das pétalas atuam como sinalizadores para visitantes florais e a secreção das glândulas do conectivo podem constituir um veículo na transferência de grãos de pólen pelo corpo do polinizador. A ocorrência de morfotipos com cálice com nectários ou eglandulado, ausência de elaióforos, presença de pétalas de orientação e glândula no conectivo indicam que *B. muricata* tem desenvolvido novas estratégias de atração de polinizadores.

Abstract

Individuals of *Banisteriopsis muricata* may present flowers with glandular and eglandular calyx while glands on anthers and on the fringes of the petals are common to all morphotypes. The study of anatomical and functional aspects are scarce. Thus, this work aimed to determine aspects of the development, structure, function and secretion of the glands of *B. muricata*. Secretory floral glands in different developmental stages were processed under usual techniques of light microscopy and scanning electron microscopy, the chemical nature of the secretion was determined by chemical and histochemical tests. Calycine glands develop on the abaxial sepal and presents secretory uniseriate epidermis, without stomata, thick cuticle without pores and secretory parenchyma vascularized by xylem and phloem. There is only glucose composing the secretion, which accumulates in the conspicuous subcuticular space. The fringes of the posterior petals have anatomical features similar of calycine glands; no secretion was identified, but there are anthocyanins in the secretory epidermis. The glands of connective are constituted by two distinct regions, a secretory and a non-secretory, both with epidermis composed of bulky cells with thin walls and cuticle. In the secretory area, there is an accumulation of proteins and polysaccharides within cells, in the intercellular spaces and, more rarely, in subcuticular spaces, released by the rupture of the pores, which seems to be an effect of the contact with pollinators. The calyx glands of *B. muricata* are nectaries; the glands of petals act as signaling for floral visitors and secretion released by glands of the connective are a vehicle for the transfer of pollen grains by the pollinator body. The occurrence of morphotypes with nectarines in the calyx or eglandulate, no elaiophores, the presence of orientation petals and appearance of the connective gland indicate that *B. muricata* has developed new strategies to attract pollinators.

INTRODUÇÃO

As adaptações convergentes entre caracteres florais e polinizadores são reconhecidas como síndromes de polinização (Buchmann, 1987; Campbell, 2008; Ollerton et al., 2009). Em flores de Malpighiaceae neotropicais esses caracteres são conservados e uniformes (Anderson, 1979; Zhang et al., 2010); as flores são denominadas de flores-de-óleo e produzem óleo em glândulas calicinais (elaióforos), que é o recurso coletado por grupos específicos de abelhas. Este mutualismo tem sido alvo de estudos com diferentes enfoques (Anderson, 1979; Coccuci et al., 1996; Teixeira e Machado, 2000; Sigrist e Sazima, 2004; Carvalho et al., 2005; Zhang et al., 2010), e é compreendido como fator fundamental para a irradiação das malpigiáceas no Novo Mundo (Vogel, 1974 *apud* Buchmann, 1987; Campbell, 2008; Cappellari et al., 2010).

Espécies paleotropicais são eglanduladas, mas apresentam anteras volumosas que são compreendidas como recompensa para polinizadores com pólen (Anderson, 1990). Estudos indicam que algumas espécies neotropicais apresentam morfotipos com cálice totalmente eglandulado, glandulado ou com glândulas vestigiais (Anderson, 1979), tal como observado em *Pterandra* (Cappellari et al., 2010), *Galphimia* (Anderson, 2007) e *Dinemandra ericoides* (Coccuci et al., 1996) *Banisteriopsis* (Gates, 1982; Sazima e Sazima, 1989). Adicionalmente, algumas destas espécies, por sua vez, podem apresentar anteras com glândulas no conectivo (Anderson, 1990). Os fatores que têm ocasionado esta perda ou redução das glândulas calicinais, sua relação com o surgimento de protrusões glandulares no conectivo e, ainda, seus efeitos sobre a síndrome de polinização das espécies são pouco compreendidos. Além disso, espécies de Malpighiaceae podem apresentar uma pétala diferenciada, denominada pétala estandarte (Anderson, 1990). Tal pétala é diferente das demais pétalas por apresentar coloração e espessura diferenciadas e ainda fímbrias glandulosas. A espessura e coloração são correlacionadas à orientação de visitantes florais (Sazima e Sazima, 1989; Anderson, 1990; Possobom, 2008), mas informações sobre as terminações glandulares são incipientes.

Banisteriopsis, um dos maiores gêneros de Malpighiaceae (Gates, 1992), é inteiramente neotropical, apresenta 47 espécies em território nacional (Mamede, 2012), com morfotipos com cálice glandulado ou eglandulado e com pétala estandarte. Este é o caso de *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cruatec, espécie do presente estudo, uma liana

perenifolia amplamente distribuída em todas as fitofisionomias do país (Gates, 2012; Mamede, 2012). Nessa espécie, indivíduos com cálice glandulado, incluindo glândulas calicinais vestigiais, eglandulado e pétalas estandarte foram reportados em áreas de cerrado e florestas semidecíduas (Sazima e Sazima, 1989; Sigrist e Sazima, 2004) e protrusões glandulares no conectivo foram comumente observadas em ambos os morfotipos (Gates, 1982; Sazima e Sazima, 1989).

Considerando a ocorrência de glândulas calicinais, pétalas com fímbrias glandulosas, glândulas no conectivo das anteras e existência de morfotipos eglandulados em *B. muricata*, esta espécie constitui um modelo para o conhecimento dos aspectos estruturais e químicos dessas estruturas secretoras e, ainda, para a compreensão da relação entre presença, posição, composição química e classificação das glândulas florais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e área de coleta

Foram coletados botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e flores em antese, de indivíduos adultos de população natural de *B. muricata* ocorrente na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (ETEAMP), localizada no município de Viçosa - MG (20° 48' 08. 4" S e 42° 51' 50. 9" W). A ETEAMP abrange uma área florestal de 194 hectares, cuja vegetação foi definida como Floresta Estacional Semidecidual (Velloso, 1991), incluída nos domínios da Floresta Atlântica (Rizzini, 1992). O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), sob o número 36.941.

O material vegetal foi coletado e observado em estereomicroscópio para a análise dos aspectos morfológicos. Para a descrição dos caracteres morfoanatômicos florais, usou-se as terminologias propostas por Gates (1982), Anderson (1990), Sazima e Sazima (1989) e Possobom (2008).

Microscopia de luz (ML)

Os estudos em microscopia de luz foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Análise estrutural – Para acompanhar a ontogenia das glândulas do cálice, corola e conectivo, oito fases do desenvolvimento foram identificadas a partir de botões florais de ambos os morfotipos, que apresentaram comprimento médio de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,07; 0,11 e 0,13 mm (pré- antese identificada mediante o início da elevação de uma pétala), desde a base do cálice ao ápice dos botões, e a fase de flor (0,6 cm de comprimento). As medidas foram realizadas em estereomicroscópio (modelo Stemi 2000, Zeiss, Göttinger, Germany) acoplado a câmera digital (modelo Zeiss AxioCam ERc, Göttinger, Germany) e programa de captura de imagens AxioVision v 4.8.2 (Zeiss, Germany). O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05 M pH 7, por 24 horas, desidratado em série etanólica e conservado em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, amostras de aproximadamente 0,06 mm² foram desidratadas em série etanólica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin – Leica) de acordo com Paiva et al., (2011). O material emblocado foi seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964 modificado) pH 4,4 para metacromasia e montado sob lamínula com resina sintética (Permount).

Análise histoquímica – As glândulas florais de botões em pré-antese (0,13mm) e de flores frescas ou fixadas em FAA₅₀ (Johansen, 1940) foram seccionados em micrótomo de mesa, e também fixadas, incluídas e seccionadas para a análise estrutural. O material seccionado foi submetido aos seguintes reagentes: sudan black B (Pearse, 1980), sudan IV (Johansen, 1940), vermelho neutro (Kirk, 1970) e auramina O (Heslop-Harrison, 1977) para lipídeos totais; sulfato azul do Nilo (Cain, 1947) para lipídeos ácidos e neutros; reagente NADI (David e Carde, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas; cloreto férrico 10% (Johansen, 1940) para compostos fenólicos totais, reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981) para alcalóides, lugol (Johansen, 1940) para amido, ácido periódico-reagente de Schiff (PAS) (Maia, 1979) para polissacarídeos neutros, corifosfina (Ueda e Yoshioka, 1976) para substâncias pécticas e xylidine

Ponceau (Vidal, 1970) para proteínas. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com a especificação de cada autor.

Documentação fotográfica

As imagens das análises estrutural e histoquímica foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens AxioVision v 4.8.2 (Zeiss, Germany). A análise com fluorocromos (auramina O, corifosfina, vermelho neutro) e a autofluorescência foram realizadas no mesmo microscópio, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WU: 340-380nm), espelho dicróico (400nm) e filtro de barreira (420nm).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observação dos caracteres micromorfológicos das glândulas, fragmentos das sépalas, pétalas e estames de 0,25 a 0,5 cm² foram fixados em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Amostras foram desidratadas em série etanólica e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂ (modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Após a fixação das amostras nos suportes com uso de solução de esmalte e grafite, foi realizada a deposição metálica com ouro (equipamento Sputter Coater, modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo Zeiss, LEO 1430 VP, Cambridge, Inglaterra), no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Análise química da secreção das glândulas florais

Tiras-teste – Para a análise da secreção das glândulas calicinais e das glândulas do conectivo foram utilizadas tiras-teste (Combur Test, Roche) para indicar a presença de nitritos, proteínas e glicose. Devido à escassez de secreção apresentada, as peças com as respectivas glândulas florais foram comprimidas contra as regiões específicas das fitas para identificação dos compostos. Para cada composto analisado foram realizadas

cinco repetições (um botão e uma flor por repetição). A avaliação dos resultados foi realizada através da leitura de escala indicada pelo fabricante.

Cromatografia de camada delgada (CCD) – Para esta análise, glândulas do conectivo foram excisadas de 30 botões florais em pré-antese com auxílio de bisturi e lâmina de barbear. Os fragmentos das glândulas do conectivo foram transferidos para tubos plásticos (Eppendorf®) distintos e submetidos a ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente, de modo a favorecer a separação do exudado dos componentes celulares. Obteve-se um volume total aproximadamente de 0,05 mL de secreção. Alíquotas de 100 µL ambas as amostras foram diluídas em 300 µL de metanol e 300 µL de hexano, para a extração dos constituintes químicos polares e apolares da secreção, respectivamente. Os extratos polares foram submetidos às análises cromatográficas para compostos fenólicos, taninos e flavonoides, e para alcaloides, enquanto, os extratos apolares foram submetidos às análises para identificação de lipídeos (óleos essenciais e triterpenos), esteroides e cumarinas. As amostras e os padrões específicos para cada classe química estudada foram aplicados com tubo capilar em placas de sílica gel 60G, com 0,25 mm de espessura de acordo com Wagner et al., (1984).

As fases móveis utilizadas foram acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (67:7:7:18) para taninos e flavonoides, acetato de etila:metanol:água (50:7:5) para alcaloides, hexano: acetato de etila (1:1) para triterpenos e éster, acetato de etila: metanol: água (100:17:13) para cumarinas. Os resultados foram obtidos a partir da coloração apresentada após revelação das placas de gel com uso de reveladores específicos para cada classe. Para flavonoides o resultado foi obtido através da observação da placa sob luz ultravioleta com filtro UV (WU: 254-365 nm) (Wagner et al., 1894).

RESULTADOS

Características gerais das flores - As flores (Figura 1A) são zigomorfas e pentâmeras (Figura 1B). Os morfotipos com cálice glandulado (Figura 1B, 1D) e eglandulado (Figura 1C) ocorrem em uma mesma área (observação pessoal). Morfotipos com cálice glandulado possuem quatro das cinco sépalas com um par de glândulas na face abaxial, as quais apresentam coloração amarela translúcida, são alongadas longitudinalmente desde a base ao ápice das sépalas, apresentam superfície

irregular e base levemente rósea (Figura 1D). Alguns indivíduos podem exibir vestígios das glândulas calicinais (Figura 1E). A corola apresenta pétalas unguiculadas de coloração rosa, branca ou rosa e branca (Figuras 1A). A pétala estandarte possui unha relativamente plana e espessa, ápice convexo e margem com terminações glandulosas (Figuras 1B e 1F); as pétalas laterais são acentuadamente convexas; as pétalas posteriores são relativamente planas e todas possuem margens fimbriadas com terminações pontiagudas (Figuras 1B e 1G). O androceu apresenta anteras amarelas, introrsas, filetes curtos basalmente conados e com inserção basifixa (Figura 1H). As glândulas do conectivo diferenciam-se pela coloração em duas regiões, a apical e a basal. A região apical apresenta coloração levemente amarelo-translúcida e a região basal apresenta coloração amarela intensa (Figura 1H).

Ontogenia e histoquímica

Glândulas calicinais - O desenvolvimento das glândulas calicinais inicia-se na face abaxial das margens das sépalas em diferenciação. As iniciais glandulares são constituídas por células protodérmicas e do meristema fundamental, que apresentam conteúdo citoplasmático denso, núcleo grande e volume celular mais proeminente que as demais células vizinhas (Figura 2A-B). As células protodérmicas dividem-se anticlinalmente, alongam-se e se tornam levemente mais altas e estreitas que as demais células vizinhas, concomitantemente às divisões celulares do meristema fundamental em variados planos (Figura 2C). A proliferação celular associada ao volume celular contribuem para a formação do primórdio glandular, que se apresenta levemente elevado em relação à superfície da sépala (Figura 2D). As glândulas do cálice em estágio secretor apresentam epiderme secretora unisseriada, revestida por cutícula espessa, e composta por células colunares, justapostas de paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo conspícuo (Figura 2E). O parênquima glandular é constituído por células volumosas, com vacúolos desenvolvidos, ocupando grande parte do volume celular e comprimindo o citoplasma à camada parietal. Entre as células parenquimáticas ocorrem células contendo compostos fenólicos e células contendo drusas (Figura 2F). As glândulas dispõem-se aos pares nas sépalas (Figura 2G) e apresentam invaginações na superfície: geralmente uma invaginação longitudinal mais acentuada e, várias invaginações menores transversais à primeira (Figura 2H). A cutícula distende-se gradativamente, formando um espaço subcuticular conspícuo, onde a secreção é

acumulada (Figura 2I, 2J e 2K). A vascularização é proveniente dos feixes vasculares da sépala e constituída por xilema e floema (Figura 2H). Quando as glândulas são visitadas apresentam ruptura na superfície (Figura 2L).

Glândulas das pétalas posteriores - As glândulas das pétalas são mais volumosas e apresentam ápice dilatado (Figuras 3A e 3B). Quanto aos aspectos estruturais apresentam epiderme secretora com células altas dispostas em paliçada e com citoplasma denso; o parênquima glandular é composto por células diminutas que podem acumular fenólicos, apresentar drusas; nota-se que o parênquima glandular é vascularizado por xilema e floema provenientes do tecido vascular da pétala (Figura 3C). Em secção transversal nota-se que o parênquima glandular é composto por poucas camadas de células que circundam o feixe vascular (Figura 3D).

Glândulas do conectivo – O desenvolvimento glandular no conectivo é precoce e concomitante à diferenciação de todos os meristemas dos primórdios estaminais (Figura 4A). Os primórdios estaminais constituem-se de um corpo meristemático, achatado em secção transversal, constituído por protoderme uniestratificada com células cúbicas de paredes retas, enquanto as células parenquimáticas são volumosas (Figura 4B). Divisões celulares anticlinais na protoderme e em diferentes planos no parênquima resultam em primórdios estaminais achatados dorsiventralmente com cordão procambial em posição central e quatro lobos da antera, microsporângios com células esporógenas de tamanho diminuto, citoplasma denso e núcleo conspícuo (Figura 4C). As iniciais protodérmicas que revestem o conectivo proliferam-se por divisões anticlinais e aumentam de volume, apresentam citoplasma denso, diminutos vacúolos e parede periclinal externa levemente côncava (Figura 4D). Nesse estágio nota-se que a camada celular subepidérmica dá origem às camadas do endotécio através de divisões anticlinais e periclinais, simultaneamente à diferenciação do tapete interno e externo, evidenciados pelo alongamento e alinhamento radial das células. No conectivo nota-se a ocorrência de cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa e células com compostos fenólicos que podem ocupar todo o volume celular ou se apresentar como gotículas (Figura 4C e 4E). Em plano frontal (Figura 4F), nota-se que o conectivo se apresenta levemente plano, ao mesmo nível das células das anteras.

A epiderme do conectivo constitui-se de células com paredes delgadas, volumosas e com acúmulo de compostos fenólicos; internamente à epiderme observa-se

que o número e o volume das células parenquimáticas do conectivo e do endotécio também aumentam e apresentam células com compostos fenólicos e células com drusas (Figura 4G). Posteriormente, nota-se a diferenciação morfológica da glândula do conectivo, evidenciada pelo maior volume das células da região apical do conectivo em relação às células da porção basal da glândula do conectivo. As paredes periclinais externas da região apical são convexas (Figura 4H). As células parenquimáticas do conectivo e do endotécio proliferam-se e diferenciam-se em células volumosas, túrgidas com poucos espaços intercelulares. O aumento do número e do volume destas células resulta na elevação da porção apical da glândula do conectivo (Figura 4I), que pode (Figura 4J) ou não, sobrepor às tecas das anteras. A glândula do conectivo totalmente diferenciada apresenta aspecto volumoso e túrgido e as anteras e estratos parietais dos microsporângios apresentam paredes celulares lignificadas e grãos de pólen individualizados (Figuras 4K). As duas regiões da glândula diferem quanto aos aspectos celulares: as células epidérmicas do ápice são altas, volumosas, vacuoladas e apresentam citoplasma parietal, enquanto que as células epidérmicas da base são túrgidas e com vacúolos com acúmulo de fenólicos (Figura 4K). As paredes periclinais externas das células da região apical da glândula do conectivo apresentam poros na parede periclinal externa da epiderme da porção apical apresenta projeções, identificadas como poros (Figura 4L), os quais se encontram fechados nesta fase e indicam a função secretora das células da porção apical (Figura 4M e 4N).

Em glândulas maduras (Figura 5A) e em atividade secretora as células apicais apresentam paredes periclinais levemente côncavas (Figura 5B), indicando a diminuição do conteúdo celular, ao passo que as células da região não secretora permanecem com as características relatadas anteriormente (Figura 5C). Em visão frontal nota-se que os poros encontram-se abertos (Figura 5E). No final da atividade secretora a glândula apresenta porção apical menos túrgida (Figura 5F), as células da epiderme secretora encontram-se plasmolisadas e com superfície côncava (Figura 5G). O endotécio encontra-se totalmente lignificado (Figura 5H). A turgidez da glândula do conectivo diminui (Figura 5I). A secreção encontra-se depositada sobre a superfície epidérmica (Figura 5J). Grãos de pólen podem ser observados sobre a superfície glandular de estames adjacentes, associados ou não à secreção (Figura 5I).

Histoquímica

Glândulas calicinais - Os testes histoquímicos realizados (Tabela 1 e Figura 6) indicam que em material incluído em metacrilato, sem aplicação de reagentes (branco) (Figura 6A), as células epiteliais secretoras possuem conteúdo translúcido, enquanto algumas células do parênquima possuem conteúdo amarelado que indica a presença de fenólicos. A cutícula espessa é evidenciada pela autofluorescência (Figura 6B) e fluorescência secundária azul-esverdeada emitida pelo fluorocromo auramine O (Figura 6C). Polissacarídeos (Figura 6D), pectinas (Figura 6E) e proteínas (Figura 6F) foram evidenciados no citoplasma das células do epitélio secretor pelo PAS, corifosfina e xylydine Ponceau, respectivamente. Nenhuma reação positiva foi observada no espaço subcuticular para os testes realizados.

Glândulas das pétalas – Os testes histoquímicos (Tabela 1 e Figura 7) indicam que, em material incluído em metacrilato sem aplicação de reagentes (branco) (Figura 7A), as células epiteliais secretoras possuem conteúdo translúcido, enquanto as células do parênquima possuem conteúdo amarelado indicando a presença de compostos fenólicos. A cutícula mais espessa na extremidade da fímbria foi evidenciada pela autofluorescência (Figura 7B) e pela fluorescência secundária amarela esverdeada pelo fluorocromo vermelho neutro (Figura 7C). As paredes das células da epiderme secretora são delgadas e apresentam natureza celulósica, evidenciada pela coloração magenta pelo ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) (Figura 7D) e pela fluorescência secundária alaranjada emitida pelo fluorocromo corifosfina (Figura 7E). Proteínas foram evidenciadas no citoplasma das células secretoras pelo reagente xylydine Ponceau (Figura 7F).

Glândula do conectivo - Os testes histoquímicos (Tabela 1 e Figura 8) indicam que as células da epiderme secretora sem aplicação de corantes (branco) apresentam conteúdo translúcido e algumas as células parenquimáticas apresentam conteúdo amarelado (Figura 8A). A cutícula é bastante delgada e foi evidenciada pela autofluorescência (Figura 8B) e pela fluorescência secundária verde-azulada emitida pelo fluorocromo auramina O; nota-se a formação de pequenos espaços subcuticulares entre poros adjacentes (Figura 8C). As paredes das células da epiderme secretora são delgadas e apresentam natureza pectocelulósica evidenciada pela coloração roxo-

azulada do azul de toluidina (Figura 8D), fluorescência secundária alaranjada emitida pelo fluorocromo corifosfina (Figura 8E) e magenta pelo PAS. A secreção possui aspecto denso e pegajoso, constituída por pectinas, polissacarídeos e proteínas, identificados pelos reagentes corifosfina, PAS, e xylydine ponceau, respectivamente (Figuras 8E e 8F e 8G). A secreção é identificada no citoplasma e no vacúolo das células do epitélio secretor, acumulada nos espaços intercelulares, no espaço subcuticular e nos poros epidérmicos.

Tiras-teste – Os testes realizados identificaram a presença de glicose na secreção das glândulas calcinais na concentração de 50 mg/dL e a presença de proteínas na secreção das glândulas do conectivo na concentração de 30 mg/dL.

Cromatografia de camada delgada – os testes cromatográficos realizados evidenciaram a presença de flavonóides e taninos como constituintes das glândulas do conectivo. Terpenoides, óleos essenciais, esteroides e cumarinas não foram identificados.

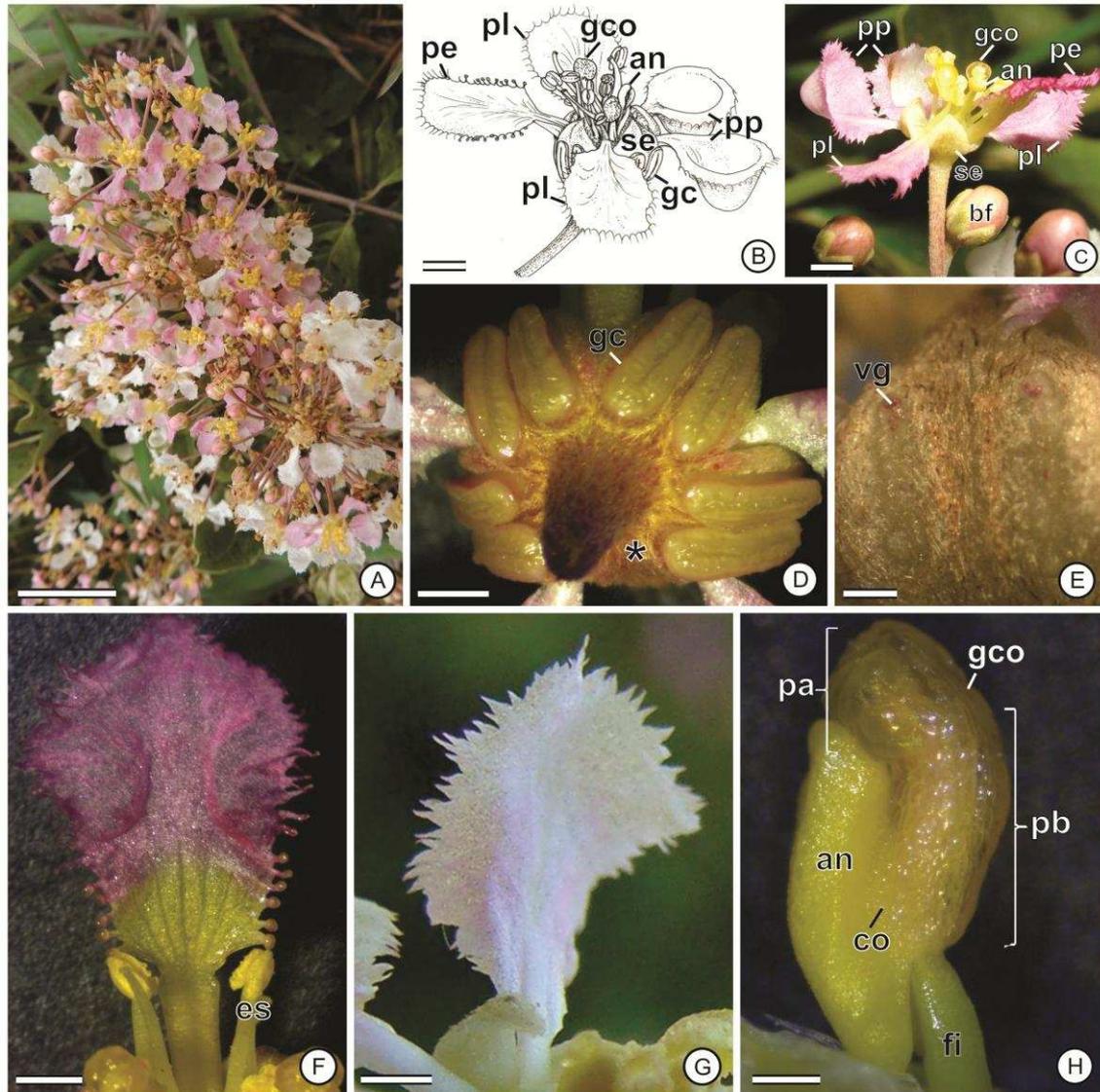


Figura 1. Flores de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae). A. Aspecto geral das inflorescências. B. Desenho esquemático de flor com cálice glandulado. C. Flor com cálice eglandulado. D. Detalhe do cálice glandulado. Notar a sépala sem glândulas (*). E. Sépala eglandulada. F. Pétala estandarte. G. Pétala lateral com terminações não glandulosas. H. Estame. an: antera; bf: botão floral; co: conectivo; es: estame; fi: filete; gc: glândula calicinal; gco: glândula do conectivo; pa: porção apical; pb: porção basal; pe; pétala estandarte; pp: pétala posterior; pl: pétala lateral; se: sépala; vg: vestígio glandular. Barras: A, 1,2 cm; B, E, G-H, 0,20 mm; C, 0,1 mm; D, 0,5 mm. E, 0,4 mm; F, 0,1 mm.

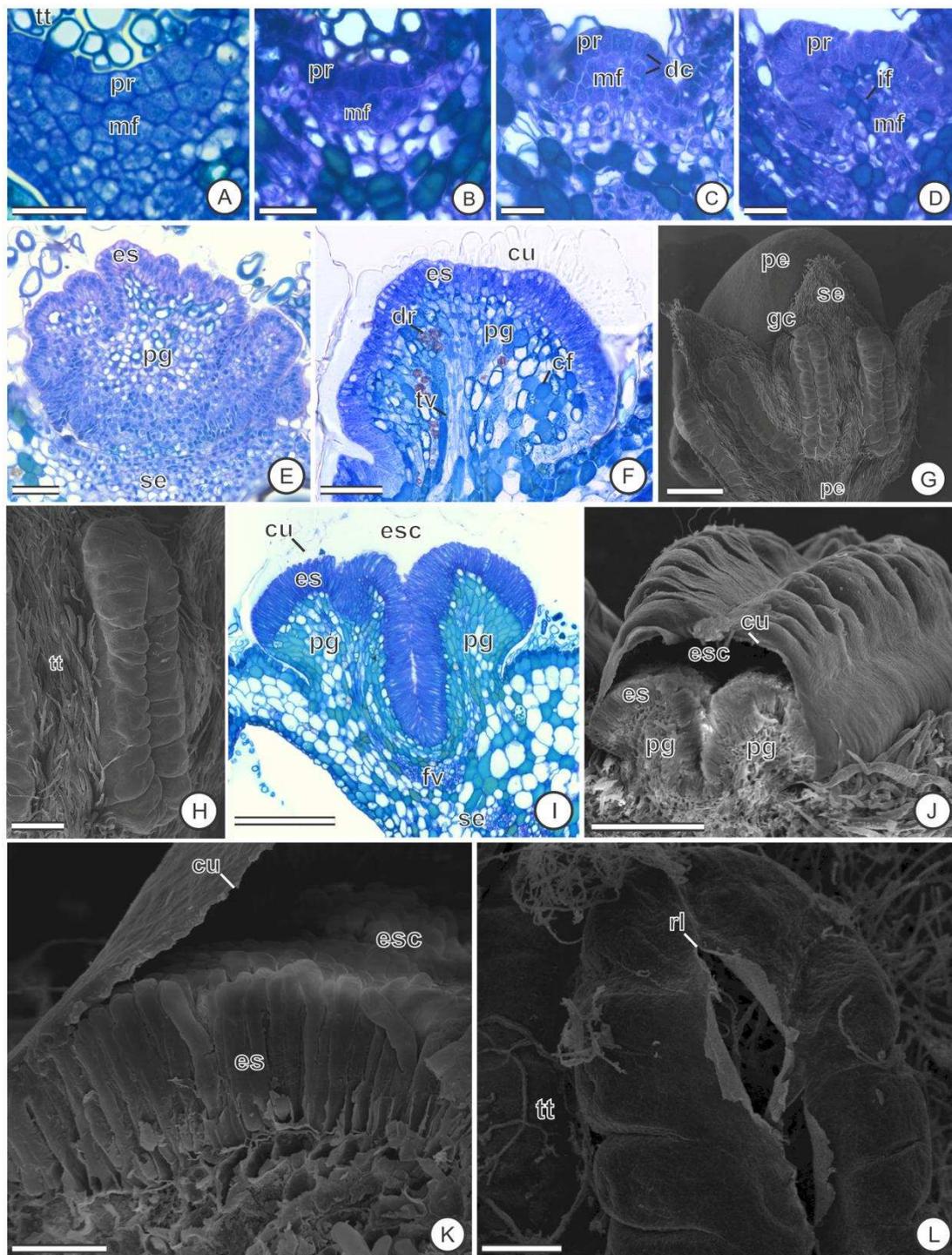


Figura 2. Ontogenia das glândulas calicinais de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae). Fotomicrografias de secções transversais de sépalas coradas com azul de toluidina em microscopia de luz (A-F, I) e eletromicrografias de varredura (H, J-L). A. Primórdio calicinal. B-D. Início do desenvolvimento glandular. E. Invaginações da glândula (setas). F. Glândula calicinal em estágio secretor. G. Par de glândulas calicinais em estágio secretor. H. Superfície com invaginações. I. Glândula calicinal em estágio pós-secretor. J. Espaço subcuticular conspícuo. K. Detalhe da cutícula distendida. K. Ruptura na superfície glandular. cf: célula com conteúdo fenólico; cu: cutícula; es: epiderme secretora; esc: espaço subcuticular; dr: drusa; if: idioblasto fenólico; mf: meristema fundamental; pe: pedúnculo; pg: parênquima glandular; pr:

protoderme; rl: ruptura longitudinal; se: sépala; tv: traço vascular; tt: tricomas tectores.
Barras: A, B, C, D. 25 μm ; E. 75 μm ; F. 125; G. 200 μm ; H. 75 μm ; I. 150 μm ; J. 125 μm ; K. 40 μm ; L. 75 μm .

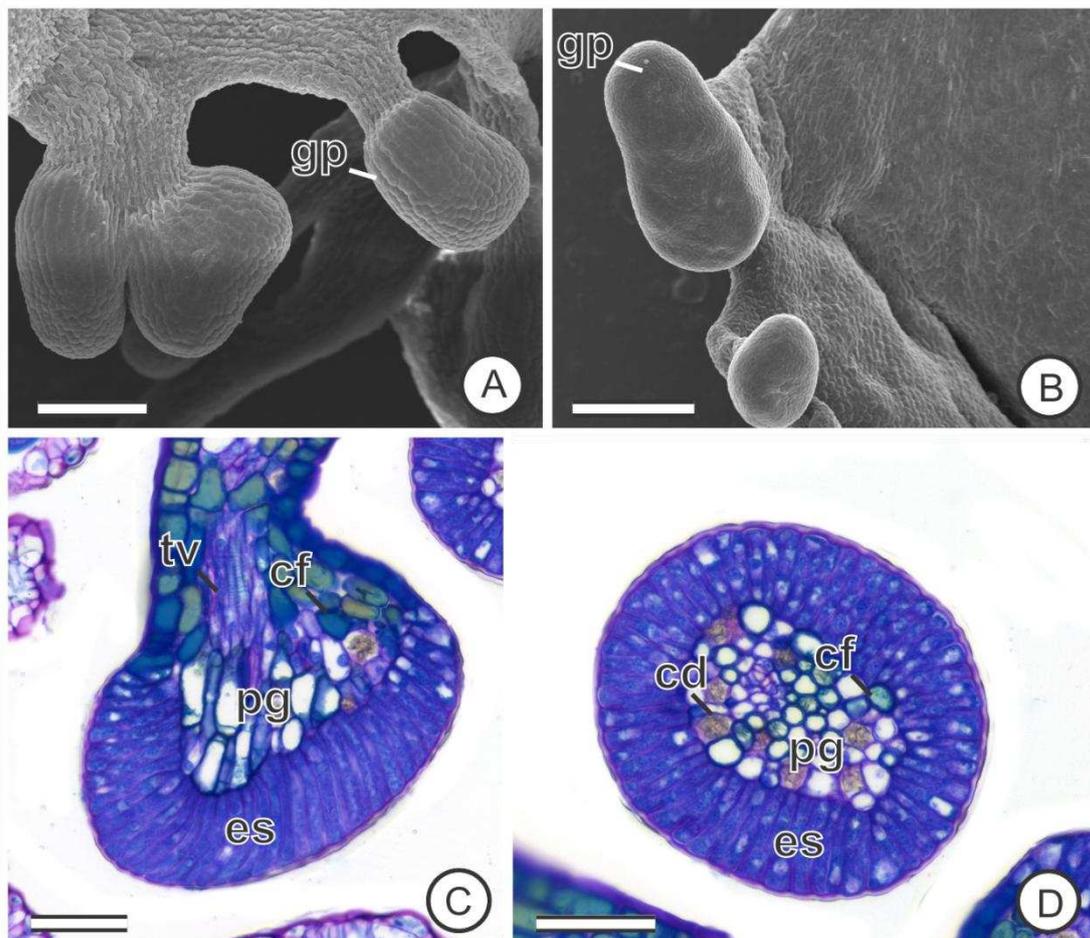


Figura 3. Glândulas da base da pétala posterior de *Banisteriopsis muricata*. Eletromicrografia de varredura (A-B). Fotomicrografias de secção longitudinal (C) e transversal (D) coradas com azul de toluidina. A. Aspecto geral das glândulas da pétala. B. Superfície apical das glândulas da pétala. C-D. Epiderme secretora em paliçada e parênquima glandular vascularizado. cf: célula com conteúdo fenólico; cd: célula contendo drusa; es: epiderme secretora; gp: glândula da pétala; pg parênquima glandular; tv: traço vascular. Barras: A-B. 100 μ m; C-E. 50 μ m;

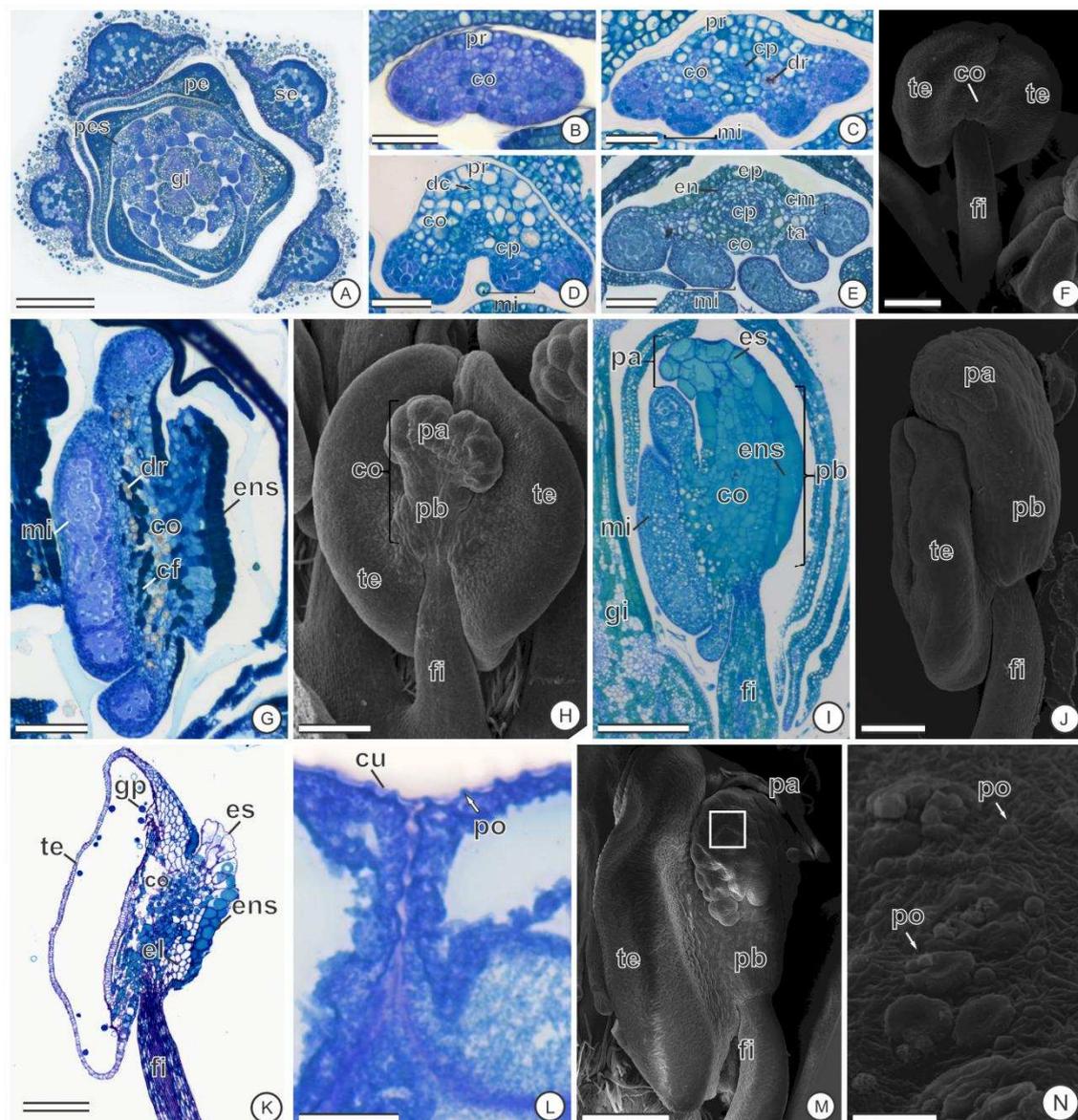


Figura 4. Ontogenia das glândulas do conectivo de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae). Fotomicrografias de secções transversais (A-E) e longitudinais (G, I, K-L) coradas com azul de toluidina. Eletromicrografias de varredura (H, J, M-N). A. Aspecto geral do primórdio floral. B-F. Desenvolvimento inicial. G. Início das modificações do conectivo. H. Diferenciação da região apical e basal da glândula. I- J. Aspecto geral da glândula em estágio pré-secretor. K-N. Glândula em estágio secretor. K, M. Aspecto geral dos estames. L. Detalhe da epiderme secretora. N. Detalhe da área do quadrado marcado em M, evidenciando os poros fechados. an: antera; cf: compostos fenólicos; cm: camadas parietais; co: conectivo; cp: cordão procambial; cu: cutícula; dc: divisão celular; dr: drusas; en: endotécio; el: endotécio lignificado; ep: epiderme; es: epiderme secretora; ens: epiderme não-secretora; fi: filete; gi: gineceu; gp: grão de pólen; mi: microsporângio. pe: pétala; protoderme; se: sépala; pr: ta: tapete; te: teca; pa: porção apical; pb: porção basal; pes: primórdio estaminal. Barras: A-B. 25 µm; C. 50 µm; D. 100 µm; E. 250 µm; F-G. 150 µm; H-I. 200 µm; J. 300 µm; L. 100 µm; K. 100 µm; L. 75 µm; M. 300; N. 10 µm.

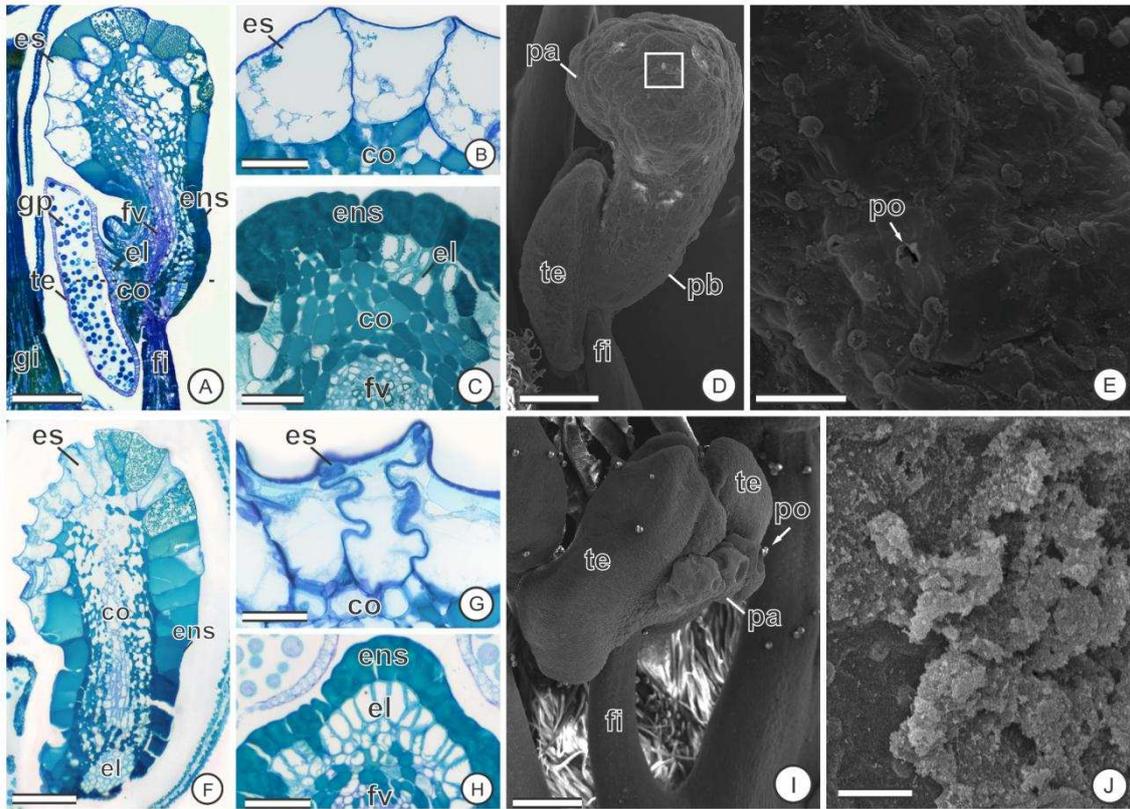


Figura 5. Glândulas do conectivo de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae) em estágio secretor. Fotomicrografias de seções longitudinais (A-C, F-H) coradas com azul de toluidina e eletromicrografias de varredura (D-E, I-J). A, D. Aspecto geral da glândula do conectivo. B. Células epidérmicas da região secretora com paredes periclinais externas levemente côncavas. C. Região basal da glândula com aspecto túrgido. E. Detalhe da superfície da epiderme secretora com poros fechados e abertos (setas), indicando o início da liberação da secreção. F, I. Glândula do conectivo em flores em antese. G. Aspecto plasmolisado da glândula secretora. H. Endotécio totalmente lignificado. J. Secreção depositada sobre a superfície secretora. co: conectivo; el: endotécio lignificado; es: epiderme secretora; ens: epiderme não secretora; fi: filete; fv: feixe vascular; gi: gineceu; gp: grão de pólen; pa: porção apical; pb: porção basal; po: poro; te: teca. Barras: A- D-F. 250 μm ; B. 75 μm ; C. 100 μm ; E- J. 10 μm ; G-H. 50 μm ; I. 300 μm .

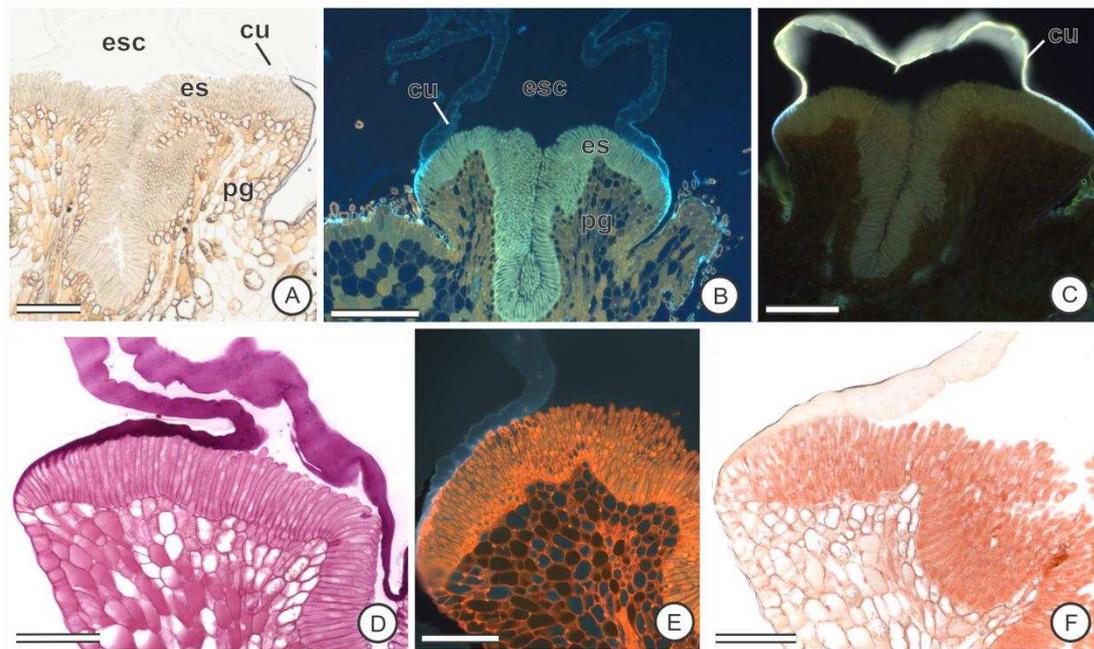


Figura 6. Análise histoquímica das glândulas calicinais de flores de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae) em pré-antese. Fotomicrografias de seções transversais de material incluído em metacrilato (A-B, D-F) e de material fixado sem inclusão seccionado em micrótomo de mesa (C). A. Branco. B. Autofluorescência. C. Auramina O; fluorescência secundária amarela esverdeada indica lipídeos. D. Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS); coloração magenta indica polissacarídeos neutros. E. Corifosfina; fluorescência secundária alaranjada indica pectinas. F. Xylidine Ponceau; coloração avermelhada indica proteínas. cu: cutícula; es: epiderme secretora; esc: espaço subcuticular; dr: drusa; pg: parênquima glandular. Barras: A. 300 µm; B-C. 150 µm; D-F. 100 µm.

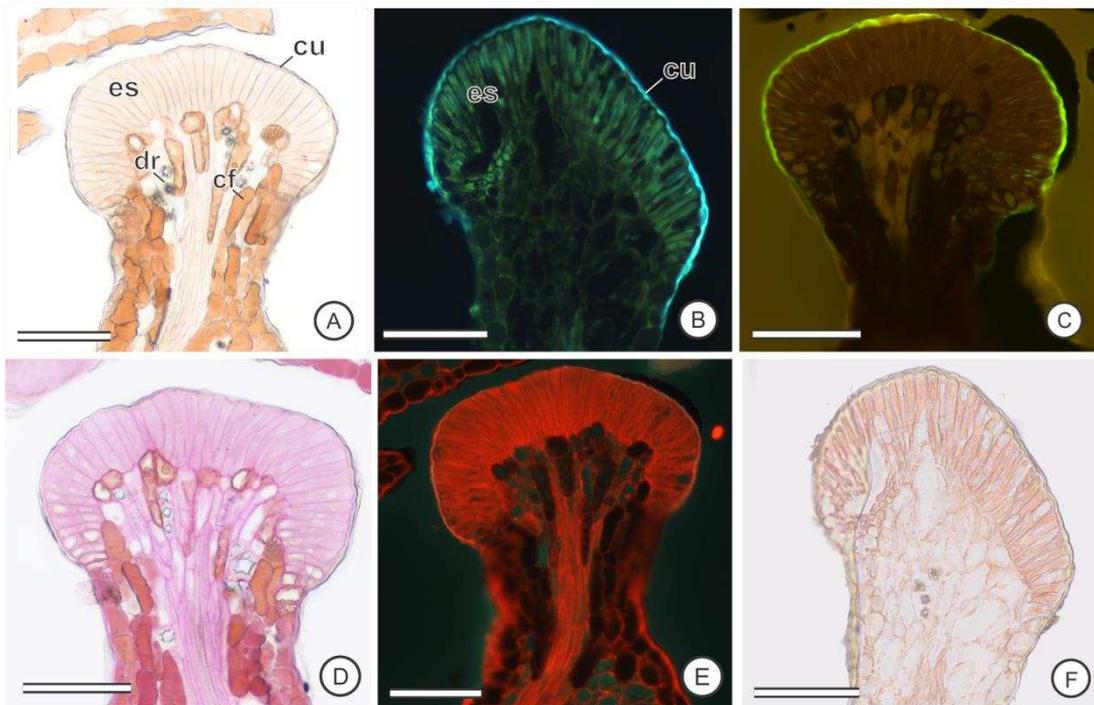


Figura 7. Análise histoquímica das glândulas das pétalas de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae). Secções longitudinais das fimbrias glandulosas das pétalas incluídas em metacrilato sob microscopia de luz (A, D, F) e fluorescência (B-C, E). A. Branco. B. Autofluorescência. C. Vermelho neutro; fluorescência secundária amarela esverdeada indica lipídeos. D. Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS); coloração magenta indica polissacarídeos neutros. E. Corifosfina; fluorescência secundária alaranjada indica pectinas. E. Xylidine Ponceau; coloração avermelhada indica proteínas. cf: célula com conteúdo fenólico; cu: cutícula; es: epiderme secretora; dr: drusa; pg: parênquima glandular. Barras: A-F. 75 μm .

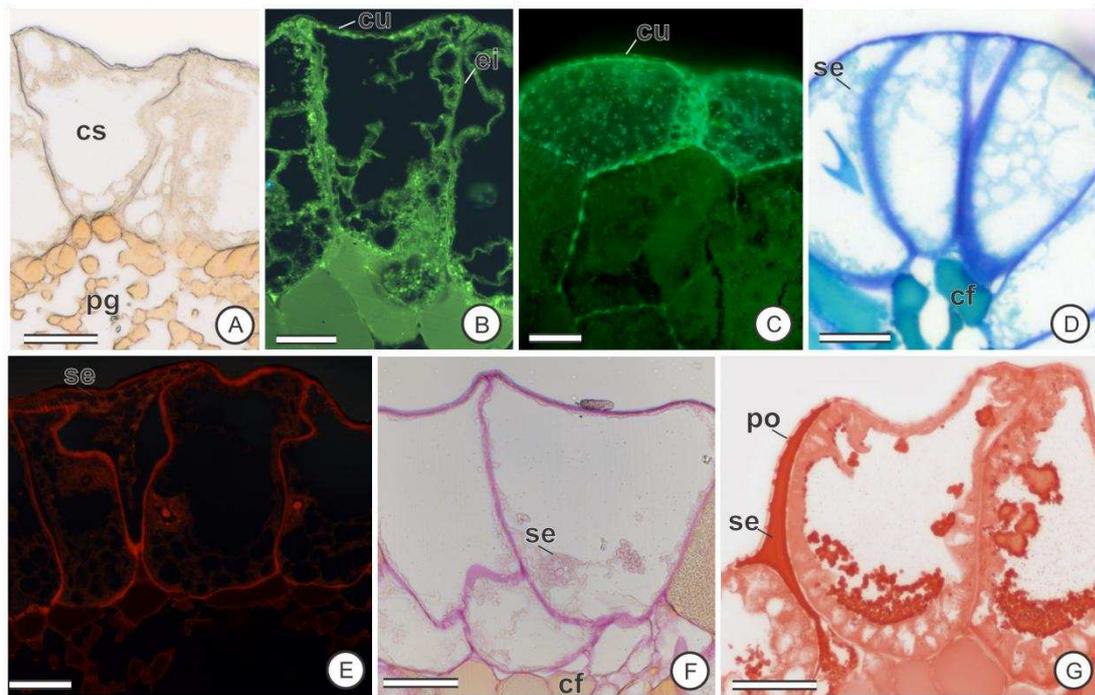


Figura 8. Análise histoquímica das glândulas do conectivo de *Banisteriopsis muricata* em estágio secretor. Fotomicrografias de seções longitudinais incluídas em metacrilato (A, B, D-G) e de peça inteira (C). A. Branco. B. Autofluorescência. C. Auramine O; fluorescência secundária amarela esverdeada indica lipídeos. D. Azul de Toluidina; coloração esverdeada indica fenólicos. E. Corifosfina; fluorescência secundária alaranjada indica pectinas. F. Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS); coloração magenta indica polissacarídeos neutros. G. Xylidine Ponceau; coloração avermelhada indica proteínas. Barras: A. 100 μm ; B-D, F-G. 75 μm . E. 125 μm .

Tabela 1: Caracterização histoquímica das glândulas florais de *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cuatrec. (Malpighiaceae).

Classes químicas	Reagente	Glândulas					
		Sépala		Pétala		Conectivo	
		Epiderme secretora	Secreção	Epiderme secretora	Secreção	Epiderme secretora	Secreção
Lipídeos	sudan IV	_*	_*	_*	_*	_*	_*
	sudan black B	_*	_*	_*	_*	_*	_*
	Vermelho Neutro	_*	_*	_*	_*	_*	_*
	Auramine O	_*	_*	_*	_*	_*	_*
Terpenoides	reagente de NADI	_*	_*	_*	_*	_*	_*
Compostos fenólicos	Cloreto férrico 10%	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	reagente de Wagner	-	-	-	-	-	-
Carboidratos	Reagente de ácido Periódico de Schiff (PAS)	+	-	+	-	+	+
	reagente de Lugol	-	-	-	-	-	-
	vermelho de rutênio	+	-	+	-	++	++
	Corifosfina	+	-	+	-	++	++
Proteínas	xylidine Ponceau (XP)	+	-	+	-	++	++

+ Reação positiva, ++ Reação positiva para a secreção; * Reação positiva apenas para cutícula; - Reação negativa;

DISCUSSÃO

A ausência de lipídeos e a presença de glicose na secreção indicam que as glândulas calicinais de *Banisteriopsis muricata* são nectários, e não elaióforos, como sugere a literatura. Lipídeos foram identificados apenas em células epidérmicas secretoras de glândulas calicinais de Malpighiaceae, classificadas como elaióforos (Vogel, 1990; Coccuci et al., 1996, Castro et al., 2001). Entretanto, a presença de traços de lipídeos e compostos fenólicos apenas na epiderme secretora sugere a ocorrência do processo de morte celular programada das células secretoras, mas não indicam que esses compostos fazem parte da secreção (Papini et al., 2010).

A origem e estrutura anatômica dos nectários do cálice são semelhantes a nectários extraflorais e elaióforos encontrados em outras espécies de Malpighiaceae, caracteristicamente constituídos por epiderme secretora em paliçada e parênquima glandular vascularizado (Coccuci et al., 1996; Castro et al., 2001; Possobom, 2008). Entretanto, mediante a secreção rica em açúcar confirma que as glândulas calicinais são nectários extraflorais.

Não existem relatos de outra composição química da secreção de glândulas calicinais de Malpighiaceae (Cappellari et al., 2010), mas algumas espécies como *Pterandra pyroidea* têm apresentado redução na qualidade do óleo (Cappellari et al., 2010). Estudos com outras espécies de Malpighiaceae (Davis, 2002; Anderson, 2007; Anderson e Corso, 2007; Cappellari et al., 2010) indicam que algumas espécies têm sofrido modificações nas estratégias de polinização que são características da família que parecem convergir para adaptações a outros sistemas de polinização.

Concomitante à perda de glândulas de óleo, tem sido evidenciado que espécies de Malpighiaceae podem apresentar aumento das anteras, glândulas no conectivo, liberação de fragrâncias e, principalmente maior oferta de grãos de pólen (Anderson, 1979; Teixeira e Machado, 2000; Davis, 2002; Anderson, 2007; Anderson e Corso, 2007; Cappellari et al., 2010). A presença de glicose e frutose foi reportada em glândulas calicinais de flores-de-óleo de Krameriaceae, o que foi associado à atração de machos de abelhas para coleta de néctar utilizado na alimentação de larvas (Simpson e Neff, 1981). Considerando a ocorrência de nectários no cálice e a glândulas no conectivo, *Banisteriopsis muricata* pode estar desenvolvendo estratégias de polinização atração de abelhas especializadas na coleta de grãos de pólen.

A presença de ambos os morfotipos de *B. muricata* em regiões onde as abelhas coletoras de óleo pertencentes aos gêneros *Centris*, *Epicharis*, *Monoeca* e *Paratetrapedia* estão presentes (Sazima e Sazima; 1989) indica que a ausência de glândulas calicinais provavelmente não está correlacionada à ausência das abelhas, mas pode estar correlacionada à mudança no recurso oferecido, uma vez que as abelhas também realizam o forrageio em indivíduos eglandulados e coletam grãos de pólen (Sazima e Sazima, 1989; Sigrist e Sazima, 2004).

A superfície da glândula calicinal de *B. muricata* é irregular e não apresenta nenhum tipo de abertura previamente determinada pela qual a secreção possa ser liberada. Em *Dinemandra ericoides* algumas regiões cuticulares são mais delgadas ou constituem poros por onde a secreção é liberada, ao passo que glândulas de outras espécies apresentam rupturas longitudinais em toda a sua extensão como resultado da pressão exercida pela secreção ou raspagem realizada pelos visitantes florais coletores de óleo (Coccuci et al., 1996; Castro et al., 2001; Possobom, 2008). Embora as glândulas do cálice de *B. muricata* não sejam elaióforos, rupturas longitudinais também são observadas. Considerando a posição das glândulas calicinais e os relatos de visitas de abelhas coletoras de óleo e pólen, as rupturas em glândulas de *B. muricata* podem acontecer durante estas visitas ou pela própria pressão da secreção.

A estrutura anatômica das glândulas da pétala é semelhante à estrutura de nectários, com epiderme secretora em paliçada e parênquima subjacente vascularizado. Porém, não há desenvolvimento de espaço subcuticular para acúmulo de secreção e tampouco estômatos, tricomas ou poros cuticulares conspícuos para a liberação da secreção. Apesar da anatomia semelhante aos nectários, não foi detectada a secreção nessas glândulas, mas apenas lipídio nas células epidérmicas secretoras. Esse lipídio detectado pode estar relacionado a um processo de morte celular programada ou à possibilidade de eliminação desses compostos pela cutícula, por volatilização, o que as caracterizaria como osmóforos (Fahn, 1979).

Em razão da identificação de óleos voláteis nas fimbrias glandulosas de *Diplopterys pubipetala* (Possobom, 2008), estas foram classificadas como osmóforos, estruturas secretoras que emitem voláteis para atrair polinizadores (Fahn, 1979). Mediante o aspecto morfológico diferenciado das pétalas nas quais se encontram, essas glândulas podem ter sido mantidas em razão de sua função sinalizadora, que pode ser importante para abelhas polinizadoras, haja vista que o papel de orientação de visitantes

pelas pétalas é observado em Malpighiaceae e em outras famílias como Krameriaceae (Simpson e Neff, 1981).

A estrutura anatômica das glândulas do conectivo e a secreção heterogênea, constituída por polissacarídeos e proteínas, não diferem entre os morfotipos de *B. muricata*. As glândulas do conectivo são anatômica e quimicamente distintas das demais glândulas florais de *B. muricata*. A disposição dos pistilos em posição central e anteras introrsas favorecem o contato dos polinizadores com ambas as estruturas durante as visitas (Sigrist e Sazima, 2004) e a presença de polissacarídeos e proteínas na secreção sugerem que as glândulas do conectivo podem estar relacionadas aos processos de polinização da espécie, pois constituem uma secreção pegajosa que pode atuar na transferência de grãos de pólen aderidos ao corpo de visitantes florais, como observado em *Prosopis juliflora* e *D. pubipetala* (Chaudhry e Vijayaraghavan, 1992; Possobom, 2008), podendo atuar como polinizadores efetivos.

A estrutura anatômica das glândulas do conectivo de *B. muricata* assemelha-se à estrutura descrita para as glândulas de *Dinemandra ericoides* (Coccuci et al., 1996) e *Diplopterys pubipetala* (Possobom, 2008). Os poros presentes nas paredes das células epidérmicas secretoras, comuns às demais espécies citadas, são a via de liberação da secreção, o foi evidenciado pela observação de poros abertos e da secreção depositada sobre a superfície da glândula. Projeções são comuns em epidermes de estruturas secretoras (Lüttge, 1971) e estão relacionadas ao aumento da superfície de contato entre a parede celular e membrana plasmática (Lüttge, 1971), podendo constituir regiões de cutícula mais delgada que ao se romperem permitem a liberação da secreção (Coccuci et al., 1996).

As características anatômicas da região basal, não-secretora, são importantes ao processo de liberação da secreção da região secretora. A turgidez das células epidérmicas da região basal do conectivo indica que estas atuam como células motoras, tal como as células buliformes, mantendo a elevação das células secretoras (Possobom, 2008). O espessamento das paredes do endotécio e demais camadas parietais das anteras possuem função mecânica durante a sua abertura (Gupta e Nanda, 1973) e podem conferir sustentação às glândulas no momento em que estas são pressionadas pelo corpo dos visitantes. O aumento de pressão dentro das células secretoras túrgidas pelo acúmulo de secreção e contato com o corpo dos polinizadores pode resultar no rompimento dos poros, pontos de fragilidade da parede e da cutícula, e liberação a secreção para a superfície. O acúmulo de compostos fenólicos no vacúolo das células

não secretoras pode conferir proteção às glândulas e aos tecidos dos esporângios contra a radiação solar e herbivoria, considerando os efeitos fotoprotetores e características pouco palatáveis desta classe de compostos (Taiz e Zeiger, 2012).

CONCLUSÕES

As glândulas calicinais de *Banisteriopsis muricata* secretam glicose e constituem nectários; a glândula do conectivo apresenta secreção hidrofílica, com proteínas e polissacarídeos, que atua como veículo de transferência de grãos de pólen ao aderirem ao corpo dos polinizadores; a presença de antocianinas na pétala e possível secreção de óleos voláteis pelas fimbrias glandulosas indicam que estas pétalas atuam como sinalizadoras para visitantes florais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, W.R., 1979. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. *Biotropica* 11: 219–223.
- Anderson, W.R., 1990. The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. *Memories New York Botanical Garden* 64: 210–224.
- Anderson, W., Davis, C., 2007. Generic adjustments in neotropical Malpighiaceae. *University of Michigan Herbarium*. 25: 137- 166.
- Anderson, W.R., Corso, S., 2007. *Psychopterys*, a new genus of Malpighiaceae from Mexico and Central America. . *Memories New York Botanical Garden* 25: 113-115.
- Beardsell, D.V., Williams, E.G., Knox, R.B., 1969. the structure and histochemistry of the nectary and anther secretory tissue of the flowers of *Thryptomene calycina* (Lindl) Stapf (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 37:65-80.
- Buchmann, S.L., 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 343–396.
- Cain, A.J., 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88:383-392.
- Campbell, D.R., 2008. Pollinator shifts and the origin and loss of plant species. *Annals Missouri Botanical Garden* 95: 264–274.
- Cappellari, S.C, Haleem, M.A., Marsaioli, A.J., Tidon, R., Simpson, B.B., 2010. *Pterandra pyroidea*: a case of pollination shift within neotropical Malpighiaceae. *Annals of Botany* 107: 1323–1334.

- Carvalho, P.D.; Borbal, E.L.; Lucchese, A.M., 2005. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). Acta Botanica Brasilica 19: 209-214.
- Castro, M.A., Vega, A.S., Múlgura, M.E., 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). American Journal of Botany 88: 1935-1944.
- Chaudry, B, Vijayaraghavan, M.R., 1992. Structure and function of the anther gland in *Prosopis juliflora* (Leguminosae, Mimosoideae) - a histochemical analysis. Phyton-Annales Rei Botanicae 32:1-7.
- Cocucci, A.A., Holgado, A., Anton, A.M., 1996. Estudio morfológico y anatómico de los eleóforos pedicelados de *Dinemandra ericoides*, malpigiácea endêmica mel desiserto de Atacama, Chile. Darwiniana 34: 183- 192.
- David, R., Carde, J.P., 1964. Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l' Academie dès Sciences Paris, série D258, p.1338-1340.
- Davis, C.C., 2002. *Madagasikaria* (Malpighiaceae): a new genus from Madagascar with implications for floral evolution in Malpighiaceae. American Journal of Botany 89: 699-706.
- Endress, P.K., 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.
- Endress, P.K., Stump, S., 1991. The diversity of stamen structures in 'Lower' Rosidae (Rosales, Fabales, Proteales, Sapindales) 107: 217-293.
- Furr, M.; Mahlberg, P.G., 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44: 153-159.
- Gates, B., 1982. *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). Flora Neotropica Monograph 30: 1-237.
- Gupta, S.C., Nanda, K., 1972. Occurrence and histochemistry of the anther tapetal membrane. Grana 12: 99-101.
- Heslop-Harrison, Y., 1977. The pollen-stigma interaction: pollen-tube penetration in *Crocus*. Annals of Botany 41: 913-922.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Kirk, P.W., 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. Stain Technology 45: 1-4.
- Ladd, P.G., Parnell, J.A.N., Thomson, G., 1999. Anther diversity and function in *Verticordia* DC. (Myrtaceae). Plant Systematic Evolution 219, 79-97.

- Luckow, M., Grimes, J., 1997. A survey of anther glands in the Mimosoid legume tribes Parkieae and Mimoseae. *Am. J. Bot.* 84, 285-297.
- Lüttge, U., 1971. Structure and function of plant glands. *Annual Review of Plant Physiology* 22: 23-44.
- Maia, V., 1979. Técnica histológica. Atheneu, São Paulo.
- Mamede, M.C.H., 2012. *Banisteriopsis* in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Nepi, M., 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht, pp. 129-166.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidina blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N.M., Price, M.V., Watts, S., Cranmer, L., Hingston, A., Peter, C.I., Rotenberry, J., 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103: 1471–1480.
- Papini, A., Tani, G., Di Falco, P., Brighigna, L., 2010. The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. *Flora* 205, 94–100.
- Paiva, E.A.S., Pinho, S.Z., Oliveira, D.M.T., 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? *Methods in Molecular Biology* 689, 37-49.
- Possobom, C.C.F., 2008. Estrutura e função das glândulas florais e dos nectários foliares em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis (Malpighiaceae). Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu.
- Rasmussen, C., Olesen, J.M., 2000. Oil flowers and oil-collecting bee. *Scandinavian Association for pollination ecology honours knut Faegri* 39: 23-31.
- Renner, S.S., Schaefer, H., 2010. The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 423-435.
- Rizzini, C.T., 1992. Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos e florísticos. Âmbito Cultural Edições, São Paulo.
- Sazima, M., Sazima, I., 1989. Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oil-producing Malpighiaceae. *Botanica Acta* 102: 106-111.
- Sérsic, A.N., Coccuci, C.C., 1996. A remarkable case of ornitophily in *Calceolaria*: foods body as rewards for a nectarivorous bird. *Botanica Acta* 109: 172-176.

- Sigrist, M.R., Sazima, M., 2004. Pollination and reproductive biology of twelve Species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany* 94: 33-41.
- Simpson, B.B., Neff, J.L., 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals Missouri Botanical Garden* 68:301-322.
- Taiz, L.; Zeiger, E., 2012. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: ARTMED, 5. Ed. 709 pp.
- Teixeira, L.A.G., Machado, I.C., 2000. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 14: 347-357.
- Ueda K., Yoshida S., 1976. Cell wall development of *Micrasterias americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. *Journal of Cell Science* 21:617.
- Vidal, B.C., 1970. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22:45-64.
- Vinson, S.B., Williams, H.J., Frankie, G.W., Shrum, G., 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipids by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae). *Biotropica* 29: 76-83.
- Vogel, S., 1990. History of Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 130–142.
- Wagner, H., Blat, S., Zganinsk, E.M., 1984. *Plant drug analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 384 p.
- Zhang, D., Wilson, Z. A., 2009. Stamen specification and anther development in rice. *Chinese Science Bulletin* 54: 2342-2353.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS GLÂNDULAS FOLIARES DE *BANISTERIOPSIS MURICATA* (MALPIGHIACEAE)

Resumo

Glândulas foliares são comuns em Malpighiaceae, mas os aspectos anatômicos e funcionais são pouco estudados. Desse modo, este trabalho teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento, a estrutura, a secreção e a funcionalidade das glândulas foliares de *B. muricata*. Folhas em diferentes estádios de desenvolvimento foram processadas sob técnicas usuais de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura; a natureza química da secreção foi determinada por testes histoquímicos e químicos, e a funcionalidade das glândulas foi observada em campo. Considerando os aspectos anatômicos, químicos e funcionais, as glândulas foliares são nectários extraflorais (NEF) que desenvolvem-se na face abaxial do terço basal da lâmina foliar e no pecíolo. Os tecidos secretores desenvolvem-se a partir da protoderme e meristema fundamental. Os NEF são elevados e estruturados, constituídos por epiderme secretora unisseriada; cutícula espessa; poros e estômatos ausentes; e parênquima secretor vascularizado por xilema e floema. Tiras-teste para identificação de compostos químicos reagiram positivamente para glicose e proteína e testes histoquímicos evidenciaram a presença de polissacarídeos (pectinas) e confirmam a presença de proteínas. A observação de formigas forrageando as glândulas foliares corrobora a interação mutualística estabelecida contra herbivoria.

Abstract

Foliar glands are common in Malpighiaceae, but the study of anatomical and functional aspects are scarce. Thus, this study aimed to determine the aspects of the development, structure, secretion and function of the glands of *B. muricata*. Leaves at different developmental stages were processed under usual techniques of light microscopy and scanning electron microscopy; the chemical nature of the secretion was determined by chemical and histochemical tests, and the functionality of glands was observed in field. Considering the anatomical, chemical and functional glands are foliar extrafloral (EFN) The EFN develop on the abaxial surface of the basal third of the leaf blade and petiole. The secretory tissues develop from protoderm and ground meristem. The EFN are elevated and structural, consisting of uniseriate secretory epidermis, thick cuticle; pores and stomata are absent; secretory parenchyma are vascularized by xylem and phloem. Test strips for the identification of chemical compounds reacted positively to glucose and protein and histochemical tests revealed the presence of polysaccharides and corroborated the presence of protein. The observation of ants foraging for leaf glands corroborate the mutualistic interaction established in favor of defense against herbivory.

INTRODUÇÃO

Glândulas foliares são amplamente distribuídas nas espécies neo- e paleotropicals de Malpighiaceae, comumente observados na lâmina foliar e pecíolo (Anderson, 1990). Estudos indicam que as glândulas foliares apresentam grande diversidade estrutural (Elias, 1983; Anderson, 1990; Machado et al., 2008), apresentam secreção açucarada e estão associados à defesa contra herbivoria, podendo ser classificados como nectários extraflorais (NEF) (Possobom et al., 2010).

Além da grande representatividade, diversidade morfológica e importância em interações ecológicas, a ocorrência de NEF em Malpighiaceae representa um recurso importante para a compreensão de seus aspectos filogenéticos (Castro et al., 2001). Isso porque NEF ocorrem aos pares na base de folhas e brácteas, posição análoga à de elaióforos em sépalas de espécies neotropicais, com os quais apresentam similaridade morfoanatômica, sendo considerados evolutivamente homólogos (Anderson, 1990; Castro, 2001; Possobom et al., 2010). Embora as glândulas foliares sejam comuns em malpigiáceas herbáceas (Elias, 1983), os aspectos ontogenéticos são inexistentes e estudos anatômicos são restritos (Castro et al., 2001; Machado et al., 2008; Possobom et al., 2010).

Os estudos estruturais e químicos dos NEF em Malpighiaceae são recentes e têm a perspectiva de compreender os eventos evolutivos da família Malpighiaceae. Glândulas calicinais estruturalmente semelhantes são encontradas em *Dinemandra ericoides* (Coccuci et al., 1996), *Galphimia brasiliensis* (Castro et al., 2001) e *Diplopterys pubipetala* (Possobom et al., 2010), mas a secreção das glândulas foliares é quimicamente distinta. Embora a secreção nectarífera seja comumente descrita para as malpigiáceas (Coccuci et al., 1996; Possobom et al., 2010), a presença de lipídeos na secreção de glândulas foliares foi encontrada em *Galphimia brasiliensis*, reforçando a hipótese de homologia entre NEF e elaióforos na família Malpighiaceae (Castro et al., 2001).

Banisteriopsis, um dos gêneros neotropicais mais representativos da família Malpighiaceae, é nativo do Brasil e com ampla distribuição em todos os seus domínios fitogeográficos (Gates, 1982; Mamede, 2012). Os estudos estruturais das glândulas da folha para o gênero *Banisteriopsis* indicaram que estas constituem nectários extraflorais (Machado et al., 2008), embora a constituição da secreção não tenha sido analisada. Os

NEF descritos variam em tamanho, morfologia e anatomia entre seus representantes, constituindo um valor diagnóstico a ser considerado na identificação das espécies do gênero (Gates, 1982; Machado et al., 2008).

Banisteriopsis muricata é uma liana nativa do Brasil, com ampla distribuição em todos os biomas do país (Mamede, 2012). Segundo Gates (1982), esta espécie apresenta folhas eglanduladas ou com um par de glândulas em forma de cúpula no terço basal da lâmina foliar e no pecíolo, porém anatomia das glândulas foliares e a composição química da secreção não foram estudadas. Considerando a grande representatividade de *Banisteriopsis* entre as malpiguiáceas neotropicais e a hipótese de homologia entre elaióforos e NEF na família Malpighiaceae, o presente estudo pretende responder às seguintes questões em relação às glândulas foliares de *B. muricata*: 1) Qual o padrão anatômico das glândulas foliares? 2) Qual o perfil químico da secreção? 3) Qual a função das glândulas foliares e sua relação com visitantes? 4) Com base na anatomia, composição da secreção e função, as glândulas foliares podem ser classificadas como NEF?

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e área de coleta

Foram coletadas folhas em diferentes estádios de desenvolvimento, de indivíduos adultos de *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cuatrec. (Malpighiaceae) de uma população natural ocorrente sob as coordenadas geográficas 20° 48' 08.4" S e 42° 51' 50.9" W, na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (ETEAMP), fragmento florestal localizado no município de Viçosa – MG, cuja vegetação é definida como Floresta Estacional Semidecidual (Veloso, 1991), e está incluída nos domínios da Floresta Atlântica (Rizzini, 1992). O material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), em Viçosa, MG, sob o número 36.941.

Microscopia de luz

Os estudos em microscopia de luz foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Análise estrutural – Foram utilizados meristemas de parte aérea e fragmentos do terço basal e pecíolo de folhas do primeiro ao sexto nó para acompanhar o desenvolvimento das glândulas foliares. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05 M, pH 7, por 48 horas, desidratado em série etanólica e conservado em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, amostras de aproximadamente 0,06 mm² foram desidratadas em série etanólica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Germany), de acordo com Paiva et al. (2011). As amostras foram seccionadas transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) com 5 µm de espessura, coradas com azul de toluidina, pH 4,4 (O'Brien et al., 1964) e montadas sob lamínula com resina sintética (Permout, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA).

Análise histoquímica – Foram utilizadas amostras de folhas do sexto nó, frescas ou fixadas em FAA₅₀, seccionadas em micrótomo de mesa e, também, amostras fixadas, incluídas e seccionadas para a análise estrutural. As seções foram submetidas aos seguintes reagentes: sudan black B (Pearse, 1980), sudan IV (Johansen, 1940), vermelho neutro (Kirk, 1970) e auramina O (Heslop-Harrison, 1977) para lipídeos; sulfato azul do Nilo (Cain, 1947) para lipídeos ácidos e neutros; reagente NADI (David e Carde, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas; cloreto férrico 10% (Johansen, 1940) para compostos fenólicos totais, reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981) para alcalóides, lugol (Johansen, 1940) para amido, ácido periódico-reagente de Shiff (PAS) (Maia, 1979) para polissacarídeos, corifosfina (Ueda e Yoshioka, 1976) para substâncias pécticas e xylidine Ponceau (Vidal, 1970) para proteínas. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com a especificação de cada autor.

As imagens das análises estrutural e histoquímica foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision. A análise com fluorocromos e a autofluorescência foram realizadas no mesmo microscópio, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WU: 340-380nm), espelho dicróico (400nm) e filtro de barreira (420nm).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observação dos caracteres micromorfológicos das glândulas, fragmentos de 0,25 a 0,5 cm² foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70%. Amostras foram desidratadas em série etanólica e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂ (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Após a fixação das amostras nos suportes com uso de solução de esmalte contendo grafite, foi realizada a deposição metálica com ouro (equipamento Sputter Coater, modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo Zeiss, LEO 1430 VP, Cambridge, Inglaterra), no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

Análise química da secreção

Ramos de *B. muricata* foram mantidos em um balde com água de torneira e envoltos por sacos plásticos durante 12 horas em laboratório para estimular a secreção das glândulas foliares. Devido à pequena quantidade de secreção, não foi possível a coleta do exsudado para análises químicas. Desse modo, glândulas foram pressionadas sobre tiras-teste (Combur Test, Roche) para a determinação de nitritos, proteínas e glicose da secreção.

Visitantes das glândulas foliares

Durante as coletas, foram feitas observações para determinar a diversidade de insetos visitantes. As coletas foram realizadas pela manhã (08 às 09 h) e no fim da tarde (16 às 17 h), horários nos quais se observou maior frequência de visitas de insetos às folhas. Os visitantes observados foram coletados, conservados em etanol 70% e identificados por Júlio César Mário Chaul, do Laboratório de Ecologia de Comunidades do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa. O comportamento dos visitantes foi observado com auxílio de estereomicroscópio, no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

RESULTADOS

Localização – As folhas de *Banisteriopsis muricata* são simples e apresentam filotaxia oposta dística (Figura 1A). As glândulas observadas no terço basal da face abaxial do limbo e no pecíolo são diminutas e morfologicamente semelhantes. As glândulas ocorrem em número variável de um a oito no limbo, e no pecíolo observa-se apenas uma glândula ou um par de glândulas, opostas entre si, predominantemente nas laterais (Figuras 1B e 1C). As glândulas são pedunculadas e apresentam região apical dilatada (Figura 1C). A secreção pode ser observada na região central das glândulas, como uma gota de aspecto translúcido (Figura 1D).

Visitantes - Formigas dos gêneros *Solenopsis*, *Pheidole* e *Camponotus* foram observadas forrageando as folhas e ramos de *B. muricata*. Entretanto, somente as aquelas pertencentes ao gênero *Solenopsis* foram observadas em contato direto com as glândulas (Figura 1E). O comportamento das formigas caracteriza-se pela sua aproximação das glândulas e projeção das patas dianteiras e das antenas sobre os mesmos, passando-as em movimentos rápidos sobre a superfície das glândulas (Figura 1F). Cerdas foram observadas nas patas dianteiras e nas antenas, o que indica que essas estruturas são utilizadas para “varrer” a superfície das glândulas e coletar a secreção. Após o forrageio, patas e antenas se tocam, como se estivessem se limpando e, em seguida, tocam o aparelho bucal, onde parece ser depositada a secreção glandular.

Microscopia

As glândulas observadas na lâmina foliar e no pecíolo, além dos aspectos morfológicos, apresentam aspectos anatômicos e histoquímicos semelhantes.

Ontogenia – O desenvolvimento glandular é precoce, desenvolvendo-se na face abaxial dos primórdios foliares, que apresentam protoderme com células cúbicas, meristema fundamental com células poliédricas e células procambiais (Figura 2A). Um grupo de iniciais protodérmicas com citoplasma denso e núcleo proeminente sofre divisões anticlinais, alongam-se, tomando aspecto justaposto e colunar, concomitantemente às divisões em diferentes planos do meristema fundamental, permitindo a identificação do sítio de formação das glândulas foliares (Figura 2B). A proliferação contínua da protoderme e do meristema fundamental resulta na elevação do

primórdio glandular em relação à superfície da folha (Figura 2C). As divisões celulares da protoderme e meristema fundamental resultam no aumento do volume da porção apical projetada acima do nível das demais células (Figura 2D). Observa-se a dilatação da porção apical do NEF e o início da diferenciação dos tecidos glandulares (Figura 2E). O início da atividade secretora da glândula é observado em folhas jovens e estas, em estágio secretor apresentam formato de taça, com pedúnculo e porção apical discoide, com superfície ligeiramente côncava (Figuras 2F e 2G). A epiderme secretora é restrita à região central das glândulas e constitui-se de células alongadas, justapostas, com paredes finas, citoplasma denso e núcleo evidente (Figura 2F). As células epidérmicas comuns, que circundam a região secretora e revestem o pedúnculo do NEF, são cuboídes, menos volumosas e acumulam compostos fenólicos (Figura 2F). A epiderme secretora é glabra, mas tricomas tectores da folha desenvolvem-se na base dos NEF e recobrem parcialmente o pedúnculo (Figuras 2G e 2H). O parênquima glandular compõe a porção apical das glândulas, localiza-se subjacente à epiderme secretora e se constitui de uma a duas camadas de células isodiamétricas, volumosas, com paredes delgadas, citoplasma denso, vacúolos diminutos e núcleo periférico e conspícuo (Figura 2F). O parênquima subglandular, subjacente ao parênquima glandular, se estende até o pedúnculo, e se constitui de várias camadas de células mais volumosas, com paredes mais espessadas, citoplasma denso e parietal, altamente vacuoladas, com cloroplastos e apresenta espaços intercelulares mais conspícuos (Figura 2F). Células do xilema e floema, provenientes da ramificação dos feixes vasculares da folha, atravessam o parênquima subnectarífero e margeiam o parênquima glandular (Figura 2F e 2G). Células contendo compostos fenólicos já ocorrem nos primórdios foliares e estão presentes no parênquima glandular, no parênquima subglandular e também associadas aos tecidos vasculares no pedúnculo das glândulas. Células contendo drusas são observadas nas células parenquimáticas ao redor do feixe vascular (Figura 2I).

A secreção acumula-se no espaço subcuticular (Figura 2H), o que é evidenciado pela elevação da cutícula na porção apical discoide das glândulas (Figura 2H, 2I e 2J). Não ocorrem poros ou estômatos na superfície secretora. (Figura 2K). As glândulas foliares visitadas por formigas não apresentaram nenhuma alteração ou lesão sobre a superfície dos mesmos.

Histoquímica e análise química da secreção - Os testes histoquímicos realizados nas glândulas foliares (Tabela 1 e Figura 3) indicam que a secreção acumula-se,

inicialmente, no espaço subcuticular. Algumas células dos parênquima glandular e subglandular e a secreção subcuticular apresentam coloração amarelada (Figura 3A). A cutícula espessa é evidenciada pela autofluorescência (Figura 3B) e pela coloração negra do sudan black B (Figura 3C) e pela fluorescência secundária amarelo-esverdeada emitida pelo fluorocromo vermelho neutro (Figura 3D), mas lipídios não foram identificados na secreção subcuticular. As células da epiderme secretora e a secreção subcuticular apresentam pectinas, evidenciadas pela fluorescência secundária alaranjada emitida pelo fluorocromo corifosfina (Figura 3E). Polissacarídeos neutros também são encontrados na epiderme secretora e na secreção subcuticular, como indica a coloração magenta com o PAS (Figura 3F). A presença de compostos fenólicos em células do parênquima nectarífero é confirmada pela coloração esverdeada com o azul de toluidina (Figura 3G). Proteínas foram identificadas pelo xylydine Ponceau nas células do parênquima glandular, na epiderme secretora e, principalmente, na secreção subcuticular (Figura 3H). A secreção das glândulas é escassa, não permitindo a mensuração do volume da secreção, mas nota-se que a secreção é viscosa. A análise da secreção através das fitas-teste indicou a presença de glicose, com concentração entre 50 a 100 mg/dL, e proteínas, com concentração de aproximadamente 30 mg/dL, confirmando e complementando os dados histoquímicos. Nitritos não foram identificados na secreção.

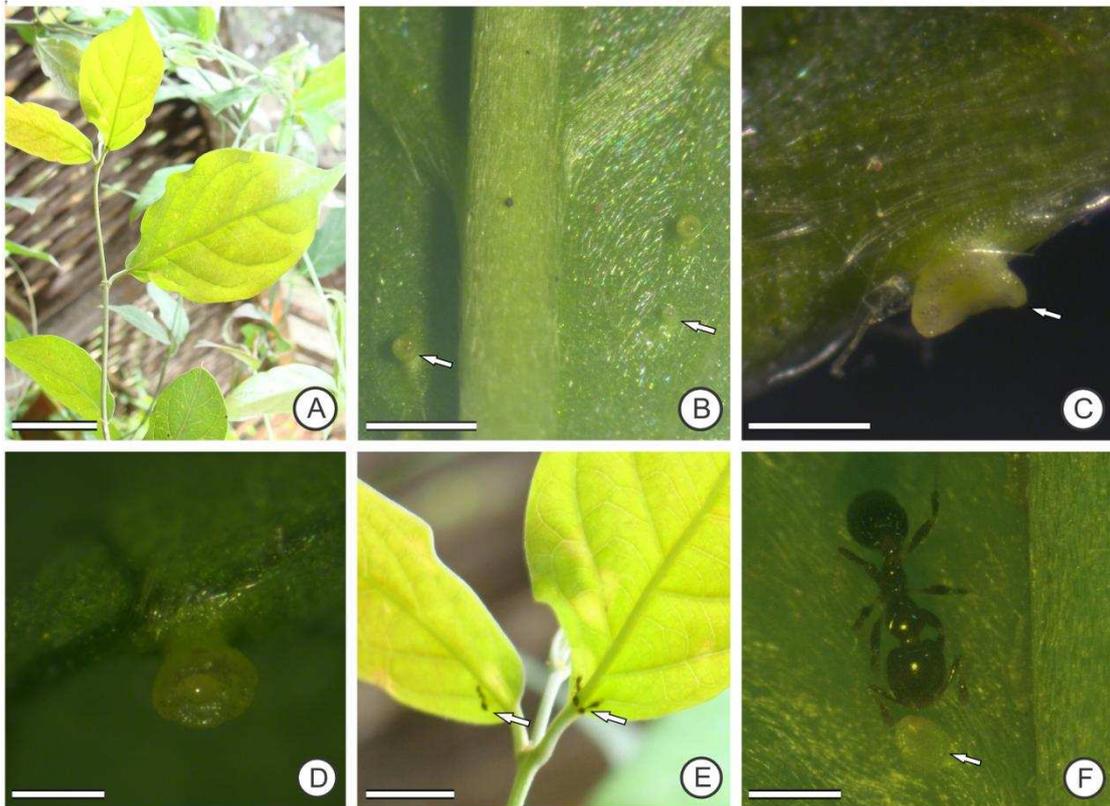


Figura 1. Localização das glândulas foliares e visitantes foliares de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae). A. Aspecto geral do ramo vegetativo. B. NEF na base da lâmina foliar. C. Glândulas no pecíolo. D. Glândulas foliares com secreção translúcida sobre a superfície secretora. E. Formigas forrageando a lâmina foliar. F. Formiga (*Solenopsis* sp.) forrageando uma glândula. Barras: A. 1,0 cm; B. 0,1 mm; C. 0,25 mm; D. 0,02 mm; E. 0,5 mm; F. 0,05 mm.

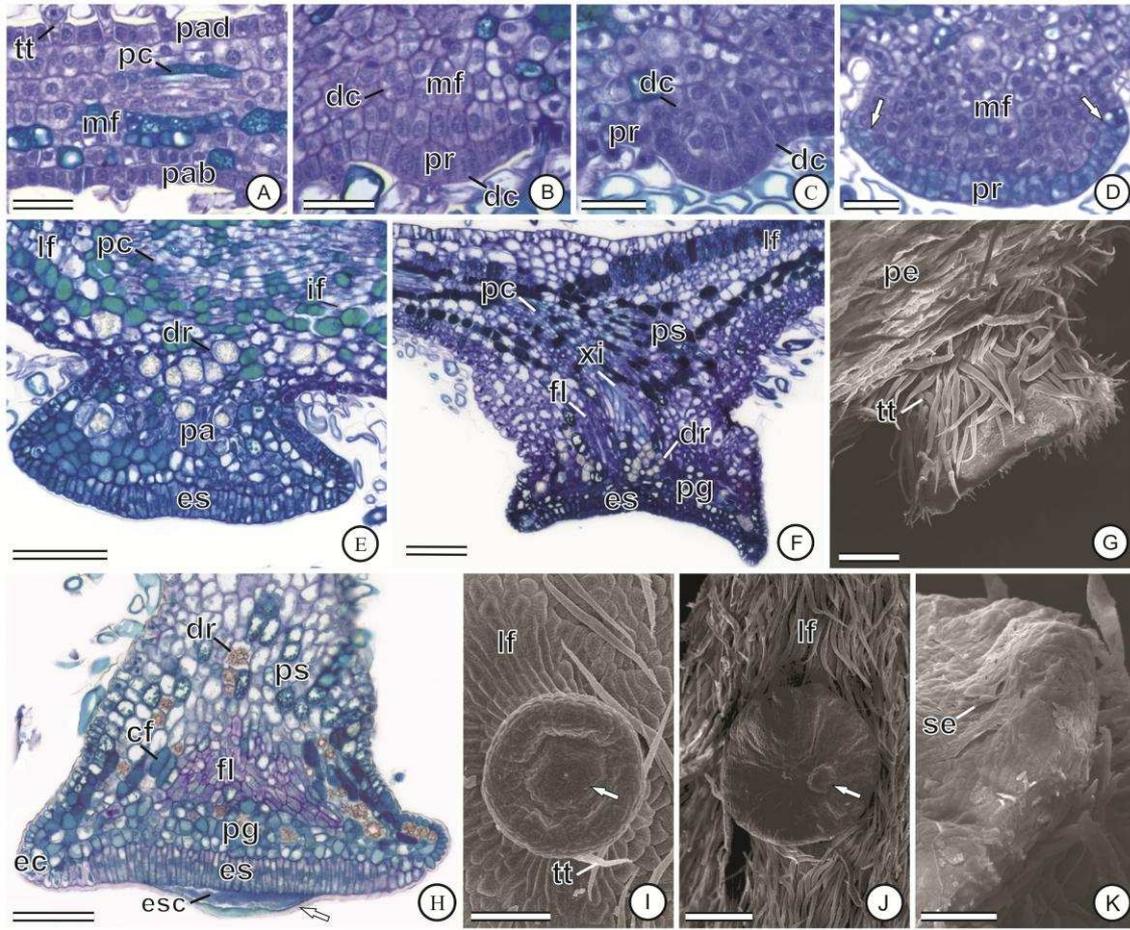


Figura 2. Ontogenia das glândulas da folha de *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cuatrec. (Malpighiaceae). Fotomicrografias de seções transversais de primórdios foliares e folhas coradas com azul de toluidina (A-H) e eletromicrografias de varredura (I-K). A-F, I-K. Lâmina foliar. G-H. Pecíolo. A. Primórdio foliar. B-C. Divisões celulares para formação da glândula. D. Dilatação da porção apical da glândula. E. Acúmulo de compostos fenólicos e drusas no parênquima glandular. F-G. Glândula diferenciada. H-J. Glândula com cutícula distendida (setas) e secreção acumulada no espaço subcuticular. K. Secreção depositada sobre a superfície da glândula cf: célula com conteúdo fenólico; cu: cutícula; dc: divisão celular; ep: epiderme comum; es: epiderme secretora; esc: espaço subcuticular; dr: drusa; lf: lâmina foliar; mf: meristema fundamental; pc: procâmbio; pe: pecíolo; pa: parênquima; pg: parênquima glandular; ps: parênquima subglandular; pr: protoderme; tv: traço vascular; tt: tricomas tectores. Barras: A-D. 25 μ m; E. 75 μ m; F. 125; G. 40 μ m; H. 125 μ m; I. 75 μ m; J. 200 μ m; K. 50 μ m.

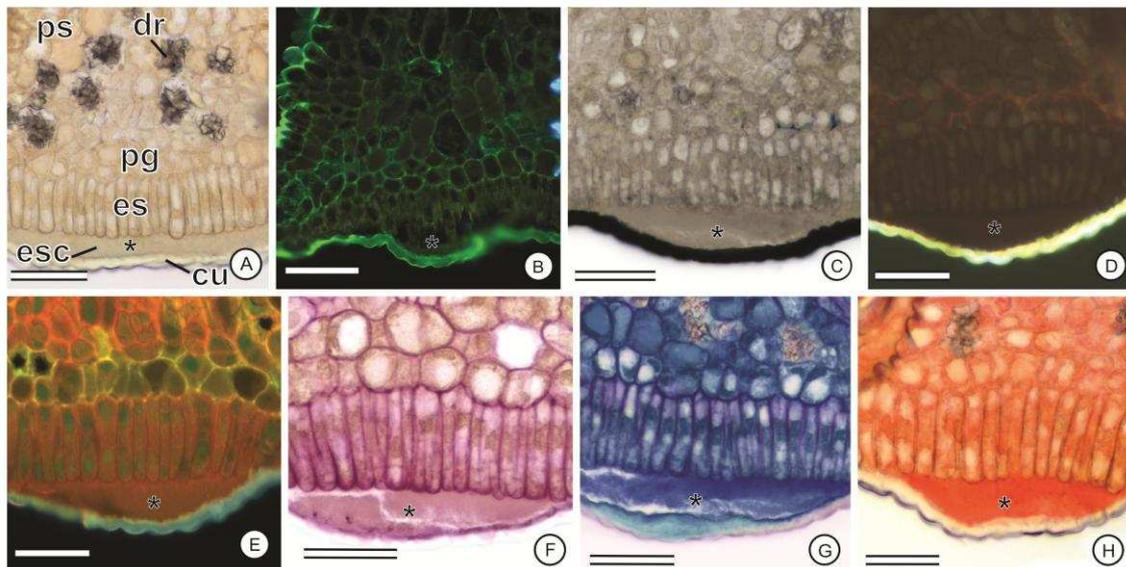


Figura 3. Análises histoquímicas das glândulas da folha de *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae). A-H. Fotomicrografias de secções longitudinais de material incluído em metacrilato. A. Sem aplicação de corantes ou reagentes (branco). B. Autofluorescência. C. Sudan black B; coloração negra indica lipídeos. D. Vermelho neutro; fluorescência secundária amarelo-esverdeada indica lipídeos. E. Corifosfina; fluorescência secundária alaranjada indica pectinas. F. Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS); coloração magenta indica polissacarídeos neutros. G. Azul de toluidina; coloração esverdeada indica compostos fenólicos e coloração azulada indica polissacarídeos. H. Xylidine Ponceau; coloração avermelhada indica proteínas. Barras: A-D. 50 μm ; E-H. 30 μm . *: secreção.

Tabela 1. Caracterização histoquímica das glândulas foliares de *Banisteriopsis muricata*.

Classes químicas	Reagente	Regiões das glândulas foliares			
		Cutícula	Secreção	Epiderme secretora	Parênquimas glandulares
Carboidratos	Reagente de Schiff (PAS)	-	+	+	-
	reagente de Lugol	-	-	-	-
Proteínas	vermelho de rutênio	-	+	+	-
	Corifosfina	-	+	+	-
	xylidine Ponceau (XP)	-	+	+	+
	sudan IV	+	-	-	-
Lipídeos	sudan black B	+	-	-	-
	vermelho neutro	+	-	-	-
	Auramine O	+	-	-	-
Terpenoides	reagente NADI	+	-	-	-
Compostos fenólicos	Cloreto férrico 10%	-	-	+	+
Alcaloides	reagente de Wagner	-	-	-	-

+ Reação positiva, - reação negativa.

DISCUSSÃO

As glândulas foliares de *B. muricata* são nectários extraflorais (NEF), considerando a ocorrência em órgãos vegetativos, a estrutura anatômica e a secreção hidrofílica açucarada (Caspary, 1848, *apud* Simpson, 1983). Os NEFs são comuns em angiospermas (Bentley, 1977), e em Malpighiaceae são comumente observados na lâmina foliar e no pecíolo (Anderson, 1990), como em *Banisteriopsis muricata* e outras espécies do gênero, como *B. stellaris*, *B. campestris* (Machado et al., 2008), *B. malifolia* (Alves-Silva et al., 2012) e outras malpigiáceas como *Diplopterys pubipetala* (Possobom et al., 2010).

Os NEFs em Malpighiaceae ocorrem predominantemente na face abaxial (Anderson 1990), mas a distribuição e o número são variáveis entre as espécies, podendo apresentar uma a dez glândulas por folha, que podem distribuir-se no ápice, base, margem ou por toda a lâmina foliar e pecíolo (Castro et al., 2001; Machado et al., 2008; Alves-Silva, 2012). Em *Banisteriopsis* predominam NEF localizados no terço basal da lâmina foliar e pecíolo, mas o número de glândulas é variável em uma mesma espécie (Anderson, 1990). O presente estudo identificou a ocorrência de um número variável de glândulas na lâmina foliar, contrariando as informações de (Gates, 1992) que afirmou a ocorrência de apenas um par de NEFs em folhas e pecíolos da mesma espécie.

A epiderme em NEF de *B. muricata* é revestida por cutícula espessa e não foram observados estômatos ou qualquer abertura para liberação da secreção, assim como observado em espécies de outras famílias (Nepi et al., 1996; Stpicyńska et al., 2003; Coutinho et al., 2010). Embora a espessura cuticular possa afetar a permeabilidade, estudos ultraestruturais indicam que a secreção pode ser liberada através de microcanais de aspecto fibrilar presentes na parede celular e que são contínuos à cutícula (Fahn, 1988; Nepi et al., 1996). Dessa maneira, para a compreensão do modo de liberação da secreção dos NEFs de *B. muricata* faz-se necessário a realização de estudos ultraestruturais.

A presença de cristais de oxalato de cálcio é precoce durante o desenvolvimento dos NEF em *B. muricata*, tendo sido observada em fases iniciais da diferenciação dos tecidos nectaríferos. A fixação do cálcio em cristais de oxalato de cálcio em NEF é compreendida como defesa contra a herbivoria (Paiva e Machado, 2006) Entretanto, a fixação de cálcio em cristais pode representar um

mecanismo de adaptação fisiológica, uma vez que em altas concentrações, os íons de cálcio são tóxicos às plantas (Paiva e Machado, 2005). Os íons de cálcio também podem afetar o processo de secreção, em razão dos seus efeitos inibitórios sobre a ATPase da membrana plasmática (Horner et al., 2003; Nepi, 2007).

A secreção dos NEFs em *B. muricata* é escassa, mas apresenta viscosidade. A viscosidade do néctar é correspondente ao tipo e proporção dos constituintes presentes (Garcia et al., 2005), e na espécie em estudo, pode ser atribuída à presença de pectina na secreção, resultante da degradação parcial das paredes quando se forma o espaço subcuticular.

Em NEFs de *B. muricata* identificou-se glicose, polissacarídeos e proteínas na secreção. O néctar é uma solução aquosa com fração sólida composta primariamente por mono- e dissacarídeos e aminoácidos, podendo apresentar outras classes químicas, como proteínas, fenóis e alcaloides (Bentley, 1977). A constituição química da secreção é determinante para o estabelecimento de relações mutualísticas entre plantas e diferentes animais (Fahn, 1979; Roshchina e Roshchina, 1993; González-Teuber e Heil, 2009; Heil, 2011). Desse modo, a composição da secreção do NEF de *Banisteriopsis muricata*, rica em proteínas e açúcares, pode ser um recurso importante na atração de formigas, em benefício de proteção à herbivoria (Bentley, 1977; Elias, 1983; Ness et al., 2010), como também observado em *Banisteriopsis malifolia* (Alves-Santos, 2012). Além disso, estudos recentes indicam que as proteínas podem ainda interferir negativamente no crescimento de microrganismos em soluções nectaríferas ricas (Park e Thornburg, 2009).

O valor energético do néctar de *B. muricata* pode justificar a recruta de formigas do gênero *Solenopsis*, uma vez que espécies deste gênero apresentam dieta alimentar baseada em diferentes níveis das substâncias encontradas (Bentley, 1997; Lanza et al., 1993), principalmente proteínas, sendo assim, importantes à manutenção das colônias e satisfação das necessidades nutricionais durante o desenvolvimento de larvas de formigas (Ness et al., 2010; Byk e Del-Claro, 2011). Embora somente o gênero *Solenopsis* tenha sido observado usufruindo dos recursos dos NEF, as formigas dos gêneros *Pheidole* e *Camponotus* podem também atuar na proteção à planta e serem recompensadas com outro recurso alimentar.

A presença de NEF diminutos e dispersos em *B. muricata* pode representar uma estratégia vantajosa em relação à existência de NEF maiores e pouco numerosos em uma única folha. Glândulas podem sofrer lesões e perder a funcionalidade, mas o maior número de glândulas pode atuar como um mecanismo compensatório a eventuais danos (Subramanian e Inamdar, 1985). Um padrão de tamanho e distribuição semelhantes foi descrito em *Cedrella fissilis* (Paiva et al., 2007), onde o maior número de NEF em folhas parece constituir uma compensação ao tamanho reduzido, favorecendo assim a produção de secreção suficiente para atrair formigas e assim, garantir a proteção às folhas jovens e meristemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves-Silva, E., Barônio G.J., Torezan-Silingardi, H.M., Del-Claro, K., 2012. Post fire resprouting of *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) and the role of extrafloral nectaries on the associated ant fauna in a brazilian savanna. *Sociobiology* 58, 327-340.

Anderson, W.R., 1990. The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 64, 210-224.

Baker, H.G., Baker, I., 1986. The occurrence and significance of amino acids in floral nectar. *Plant Systematics and Evolution* 151, 175-186.

Bentley, B.L., 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8, 407-427.

Byk, J., Del-Claro, K., 2011. Ant-plant interaction in the Neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology* 53, 327-332.

Cain, A.J., 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88, 383-392.

Caspary, R.de, 1848. De Nectaries. Elberfeld, Schellhoff.

Castro, M.A., Vega, A.S., Múlgura, M.E., 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). *American Journal of Botany* 88, 1935-1944.

Cocucci, A.A., Holgado, A., Anton, A.M., 1996. Estudio morfológico y anatómico de los eleóforos pedicelados de *Dinemandra ericoides*, Malpigiácea endémica del desierto de Atacama, Chile. *Darwiniana* 34, 183-192.

Coutinho, Í.A.C., Valente, V.M.M., Meira, R.M.S.A., 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). *Australian Journal of Botany* 58, 224-232.

David, R., Carde, J.P., 1964. Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l'Academie dès Sciences Paris* D258, 1338-1340.

Díaz-Castelazo, C., Rico-Gray, V., Ortega, F., Ángeles, G., 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. *Annals of Botany* 96, 1175-1189.

Elias, T.S., 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: Bentley, B., Elias, T.S. (Eds.), *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, pp. 174-203.

Fahn, A., 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.

Fahn, A., 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108, 229-257.

Fahn, A., Benouaiche, P., 1979. Ultrastructure, development and secretion in the Nectary of Banana Flowers. *Annals of Botany* 44, 85-93.

Furr, M., Mahlberg, P.G., 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44, 153-159.

Garcia, J.M., Chambers, E., Matta, Z., Clark, M., 2005. Viscosity measurements of nectar- and honey-thick liquids: product, liquid, and time comparisons. *Dysphagia* 20, 325-335.

Gates, B., 1982. *Banisteriopsis, Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monograph* 30, 1-237.

González-Teuber, M., Heil, M., 2009. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling and Behavior* 4, 809-813.

- Heil, M., 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16, 191-200.
- Heslop-Harrison, Y., 1977. The pollen-stigma interaction: Pollen-tube penetration in *Crocus*. *Annals of Botany* 41, 913-922.
- Horner, H.T., Healy, R.A., Cervantes-Martinez, T., Palmer, R.G., 2003. Floral nectary fine structure and development in *Glycine max* L. (Fabaceae). *International Journal of Plant Sciences* 164, 675-690.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Kirk, P.W., 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* 45, 1-4.
- Lanza, J., Vargo, E.L., Pulim, S., Chang, Y.Z., 1993. Preferences of the fire ants *Solenopsis invicta* and *S. geminate* (Hymenoptera: Formicidae) for amino acid and sugar components of extrafloral nectars. *Environmental Entomology* 22, 411-417.
- Machado, S.R., Morellato, L.P.C., Sajo, M.G., Oliveira, P.S., 2008. Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian cerrado. *Plant Biology* 10, 660-673.
- Maia, V., 1979. *Técnica histológica*. Atheneu, São Paulo.
- Mamede, M.C.H., 2012. *Banisteriopsis*. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Nepi, M., Ciampolini, F., Pacini, E., 1996. Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers. *Annals of Botany* 78, 95-104.
- Nepi, M., 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht, pp. 129-166.
- Ness, J., Mooney, K., Lach, L., 2010. Ants as mutualists. In: Lach, L., Parr, C.L., Abbott, K.L. (Eds.), *Ant ecology*. Oxford, University Press, pp. 97-114.
- Nicolson, S.W., Thornburg, R.W., 2007. Nectar chemistry. In: Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht, pp. 215-264.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.

- Paiva, E.A.S., Machado, S.R., 2005. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 147-153.
- Paiva, E.A.S., Machado, S.R. 2006. Ontogênese, anatomia e ultraestruturados nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Acta Botanica Brasilica* 20: 471–482.
- Paiva, E.A.S., Bueno, R.A., Delgado, M.A., 2007. Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Flora* 202, 455-461.
- Paiva, E.A.S., Pinho, S.Z., Oliveira, D.M.T., 2011. Large plant samples: how to process for GMA embedding? *Methods in Molecular Biology* 689, 37-49.
- Park, S., Thornburg, R.W., 2009. Biochemistry of nectar proteins. *Journal of Plant Biology* 52, 27-34.
- Pearse, A.G.E., 1980. *Histochemistry theoretical and applied*, vol. 2, 4th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Possobom, C.C.F., Guimarães, E., Machado, S.R., 2010. Leaf glands act as nectaries in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae). *Plant Biology* 12, 863-870.
- Rizzini, C.T., 1992. *Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos e florísticos*. Âmbito Cultural Edições, São Paulo.
- Roshchina, V.V., Roshchina, V.D., 1993. *The secretory function of higher plants*. Springer, Berlin.
- Stpicyńska, M., Davies, K.L., Gregg, A., 2003. Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93, 87-95.
- Subramanian, B., Inamdar, J.A., 1985. Occurrence, structure, ontogeny and biology of nectaries in *Kigelia pinnata* DC. *The Botanical Magazine* 98, 67-73.
- Ueda, K., Yoshioka, S., 1976. Cell wall development of *Micrasterias americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. *Journal of Cell Science* 21, 617-631.
- Veloso, H.P., Rangel-Filho, A.L.R., Lima, J.C., 1991. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. IBGE, Rio de Janeiro.

Vidal, B.C., 1970. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* 22, 45-64.

Vogel, S., 1990. History of Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55, 130-142.