

ANALU ZANOTTI

**ESTRUTURAS SECRETORAS EM *Calolisianthus speciosus* (CHAM. & SCHLTDL.) GILG. (GENTIANACEAE): ONTOGENIA E BIOLOGIA DA SECREÇÃO**

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  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Z33e  
2018  
Zanotti, Analu, 1990-  
Estruturas secretoras em *Calolisianthus speciosus* (Cham.  
& Schltl.) Gilg. (Gentianaceae) : ontogenia e biologia da  
secreção / Analu Zanotti. – Viçosa, MG, 2018.  
ix, 62f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Renata Maria Strozi Alves Meira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Calolisianthus speciosus*. 2. Análise foliar. 3. Folhas -  
Anatomia. 4. Fisiologia vegetal. 5. Histoquímica. 6. Microscopia  
eletrônica. 7. Microscopia eletrônica de transmissão.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 581

ANALU ZANOTTI

**ESTRUTURAS SECRETORAS EM *Calolisianthus speciosus* (CHAM. & SCHLTDL.) GILG. (GENTIANACEAE): ONTOGENIA E BIOLOGIA DA SECREÇÃO**

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: 28 de fevereiro de 2018.

---

Aristéa Alves Azevedo  
(Coorientadora)

---

João Marcos de Araújo

---

Renata Maria Strozi Alves Meira  
(Orientadora)

Aos pesquisadores que mesmo nas adversidades não desistem de fazer ciência no Brasil, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pela oportunidade de ter vivido dois anos estudando o que eu gosto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa de MG pelo apoio financeiro.

À Renata M. S. A. Meira pela maestria na orientação e total apoio durante estes dois maravilhosos anos. Sua presença contribuiu de forma inestimável na minha formação profissional e pessoal e me anima saber que tenho muito a aprender com você ainda. Sempre te tomarei como exemplo de como deixar as coisas mais leves com um sorriso. Se tá tudo dominado, é graças a você!

À Aristéa A. Azevedo pela coorientação, ensinamentos, gentileza, bom humor e por sempre tirar minhas dúvidas com mais perguntas ao invés de respostas prontas. Obrigada por me instigar a pensar.

Aos meus pais por terem me dado asas.

Aos meus queridos amigos que fazem meus dias mais felizes, Luana, Katiúscia, Daniel, Ivan, Ana Paula, Ivanilson, Cristielle, Bárbara, Ruan e Miller. Agradeço também à Valéria que se fez presente mesmo tão distante, à Isabel, pelas dicas de histoquímica e ao Ronaldo por toda a ajuda quando cheguei aqui. Obrigada pela amizade, carinho e bom humor de sempre.

Às técnicas Aurora, Rosana e Patrícia pelo apoio nas bancadas do laboratório, pela amizade e carinho.

A todos do laboratório de Anatomia Vegetal pelo convívio e troca de experiências.

À minha família de Viçosa Olga Benário e Karlinha por me fazerem perceber como tem gente doída nesse mundo.

Ao Rodrigo, pelo amor, carinho, apoio, respeito, dicas de futebol, ajuda com arquivos corrompidos e por me manter calma, repetindo mil vezes a mesma coisa com a mesma paciência. Como se não bastasse isso tudo, por ter me ajudado com as análises químicas.

À “pelada” mista dos sábados que me permite passar vergonha em campo sem sofrer *bullying*.

Ao inventor da cerveja e do chocolate amargo.

A tudo e todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para esse dia feliz.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	4
<b>CAPÍTULO 1:</b> Elucidando a secreção dos coléteres foliares e calicinais de <i>Calolisianthus speciosus</i> (Cham. & Schltdl.) Gilg (Helieae – Gentianaceae): um estudo morfoanatômico e ultraestrutural.....	6
Resumo.....	6
1. Introdução.....	7
2. Material e métodos.....	8
2.1 Área de coleta.....	8
2.2 Microscopia de luz.....	8
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).....	9
3. Resultados .....	9
4. Discussão.....	11
5. Conclusão.....	14
6. Tabelas e figuras.....	15
7. Referências bibliográficas.....	21
<b>CAPÍTULO 2:</b> Anatomia comparada dos nectários foliares e florais de <i>Calolisianthus speciosus</i> (Cham. & Schltdl.) Gilg (Helieae - Gentianaceae): ontogenia e implicações ecológicas.....	24
Resumo.....	24
1. Introdução.....	26
2. Material e métodos.....	28
2.1 Amostragem e área de coleta.....	28
2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
2.3 Análise química do néctar.....	29
2.4 Identificação dos visitantes.....	29
3. Resultados .....	30
4. Discussão.....	31
5. Conclusão.....	34
6. Tabelas e figuras.....	36
7. Referências bibliográficas.....	43

<b>CAPÍTULO 3: Ultraestrutura e histoquímica nos nectários das folhas, pétalas e sépalas de <i>Calolisianthus speciosus</i> (Cham. &amp; Schltdl.) Gilg (Helieae - Gentianaceae): desvendando o papel das paredes labirínticas no processo de exsudação.....</b>	<b>46</b>
Resumo.....	46
1. Introdução.....	47
2. Material e métodos.....	48
2.1 Microscopia de luz.....	48
2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).....	48
3. Resultados .....	49
3.1 Testes histoquímicos.....	49
3.2 Caracterização ultraestrutural dos nectários.....	50
3.3 Mecanismo de secreção e exsudação do néctar.....	50
4. Discussão.....	51
5. Conclusão.....	52
6. Tabelas e figuras.....	54
7. Referências bibliográficas.....	60
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>62</b>

## RESUMO

ZANOTTI, Analu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Estruturas secretoras em *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schldl.) Gilg. (Gentianaceae): ontogenia e biologia da secreção.** Orientadora: Renata Maria Strozi Alves Meira. Coorientadora: Aristéa Alves Azevedo.

Em *Calolisianthus speciosus*, espécie endêmica do cerrado e dos campos rupestres no Brasil, estruturas secretoras diversas foram reportadas. Coléteres ocorrem na inserção das folhas e no interior do cálice, nectários florais (nas sépalas e pétalas), nectários extraflorais (na lâmina foliar) e disco glandular na base do ovário. Nos trabalhos de campo realizados foram notadas formigas se alimentando da secreção presente no ápice das pétalas de *C. speciosus*. Anatomicamente os coléteres e os nectários foliares foram descritos, entretanto, faltam informações que esclareçam se existe diferenças entre as estruturas foliares e florais, sobre a estrutura secretora do disco floral e da pétala. No presente estudo objetivamos 1. comparar anatomicamente os coléteres e os nectários foliares e calicinais; 2. descrever anatomicamente a glândula relatada para a base do ovário; 3. Identificar que estrutura é responsável pela secreção observada no ápice das pétalas; 4. investigar os compartimentos celulares envolvidos no processo de síntese e exsudação da secreção produzida pelos nectários e pelos coléteres. Amostras de sépalas, pétalas, folhas e disco do ovário foram coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento e processadas conforme metodologia usual para os estudos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais. Os **coléteres** foliares e calicinais são sésseis ou curto pedunculados e apresentam uma cabeça multicelular secretora com grandes espaços intercelulares onde se acumula a secreção mucilaginosa. Compostos fenólicos, carboidratos e proteínas também foram detectados nos coléteres foliares e sepalares. Numerosos dictiossomos e mitocôndrias estão em consonância com a produção de secreção predominantemente mucilaginosa, embora REG e leucoplastos também sejam observados e devam estar relacionados com a síntese de proteínas, compostos lipídicos e fenólicos. A secreção produzida no citoplasma atravessa a membrana plasmática e permanece nos espaços periplasmáticos, até atravessar a parede que exhibe um afrouxamento e dissolução da lamela média. Posteriormente, a secreção de aspecto granuloso e denso (fases hidrofílica e lipofílica) se acumula nos amplos espaços intercelulares das células centrais. A exsudação ocorre sem o rompimento da cutícula pelas células secretoras superficiais. Os **nectários florais e foliares** são

microscópicos, avascularizados e constituídos por 3 a 5 células de paredes labirínticas que delimitam uma célula secretora central e formam agregados na base e ápice das folhas, face abaxial do cálice e ápice das pétalas. A secreção produzida é rica em polissacarídeos, e o açúcar predominante no néctar é a glicose. Polissacarídeos também foram evidentes na região da parede labiríntica e proteínas no citoplasma das células radiadas dos nectários. As paredes labirínticas aumentam a superfície de contato com o citoplasma das células radiadas onde o pré-néctar é convertido em néctar e conduzem a secreção até a célula central, onde é acumulado. A exsudação ocorre através do rompimento da cutícula da célula central devido acúmulo da secreção no espaço subcuticular. As células epidérmicas do **disco do ovário**, embora apresentem características secretoras e sejam intensamente vascularizadas por floema, reagiram somente aos testes para compostos lipídicos. Assim, estudos futuros são necessários para esclarecer a funcionalidade desta estrutura.

## ABSTRACT

ZANOTTI, Analu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Secretory structures in *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schltld.) Gilg. (Gentianaceae): ontogeny and mechanism of secretion.** Advisor: Renata Maria Strozi Alves Meira. Co-advisor: Aristéa Alves Azevedo.

*Calolisianthus speciosus* is an endemic specie to the Brazilian “cerrado” and “campos rupestres”. Secretory structures have already been reported in such species. Colleters are found on the base of both leaves and sepals, floral nectaries (on sepals and petals), extrafloral nectaries (on leaf blade) and a glandular disc at the base of the ovary. Ants feeding on the secretion present at the petal apex of *C. speciosus* were observed during field expeditions. Although colleters and leaf nectaries have been anatomically described, studies are still required to make clear whether there are or not differences between the foliar and floral secretory structures. Moreover, the secretory activity of the the glandular disc at the base of the ovary has not been yet elucidated as well as the anatomical structure responsible for the exudates at the petal apex. Therefore, this study aimed at (1) anatomically comparing the foliar and sepal colleters and nectaries, (2) anatomically describing the gland reported at the base of the ovary, (3) identifying which structure is responsible for the exudates secretion observed at the petal apex, and (4) investigating the cellular structures involved in the process of synthesis and exudation of the secretion produced by both nectaries and colleters. Samples of sepals, petals, leaves and glandular disc were collected at distinct stages of development and subject to standard techniques for anatomical, histochemical and ultrastructural studies. The leaf and sepal colleters are sessile or short stalked and present a multicellular secretory head with large intercellular spaces where mucilaginous secretion is accumulated. Phenolic compounds, carbohydrates and proteins were also detected in leaf and sepal colleters. Numerous dictyosomes and mitochondria are in accordance with the predominance of mucilaginous secretion, although granular endoplasmic reticulum and leucoplasts are also observed and are likely related to the synthesis of proteins, lipid and phenolic compounds. The secretion produced in the cytoplasm go through plasma membrane and remains at the periplasmic space until trespassing the cell wall where it is accumulated in the intercellular spaces formed by dissolution of the middle lamella. Subsequently, the granular dense secretion (hydrophilic and lipophilic phases) accumulated exudes without bursting of the epidermal cell cuticle. Flower and leaf nectaries are

microscopic, non-vascularized and made up of 3-5 cells with labyrinthic walls which make the boundaries of a central secretory cell. Such secretory cells form aggregates at the base and apex of the leaves, on the abaxial side of the sepals and petal apex. The secretion produced is rich in polysaccharides, and the predominant sugar is glucose. Polysaccharides were also evident in the region of the labyrinthic wall and proteins in the cytoplasm of the radiated cells of nectaries. The labyrinthic walls increase the surface contact with the cytoplasm of the radiated cells where the photo-assimilates are converted into nectar and transferred to the central cell, where it is accumulated. Exudation occurs through rupture of the cuticle of the central cell due to accumulation of secretion at the subcuticular space. The epidermal cells of the glandular disc bear secretory features and are intensely vascularized by phloem, only positive results to lipid compounds were observed. Future studies are required to clarify the functionality of such structure.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Calolisianthus* pertence às Gentianaceae Juss., terceira maior família da ordem Gentianales que possui a maior diversidade de gêneros nas Américas do Sul e Central (Struwe et al. 2002; Calió 2009). Em espécies de Gentianaceae foi mencionada a presença de estruturas secretoras tais como coléteres na face adaxial da folha próximo a inserção com o caule e/ou no interior do cálice (Struwe et al. 1994) e nectários nas folhas, sépalas, e caule (Delgado et al. 2011a; b; Dalvi et al. 2013; 2017).

Coléteres são estruturas usualmente encontradas na face adaxial de órgãos vegetativos (folhas e estípulas) ou reprodutivos (brácteas e sépalas) que secretam exsudado viscoso envolvido na lubrificação de órgãos jovens e em desenvolvimento, prevenindo a dessecação e promovendo a proteção contra os ataques de fitófagos e microrganismos (Fahn 1979; Thomas 1991; Mayer et al. 2013). Em Gentianaceae foram anatomicamente descritos para folha de *Macrocarpea obtusifolia* (Griseb.) Gilg (Dalvi et al. 2013) e de *Calolisianthus speciosus* (Delgado 2008). Em *C. speciosus* os coléteres são avascularizados, sésseis ou curto pedunculados, formados por uma cabeça multicelular secretora. As células superficiais da cabeça estão unidas pela cutícula enquanto que as células do interior estão frouxamente arranjadas, formando amplos espaços intercelulares onde a secreção mucilagínosa se acumula (Delgado et al. 2011b). Já os coléteres calicinais de *Calolisianthus*, embora tenham sido mencionados para todas as espécies (Delgado 2008), carecem de uma caracterização anatômica.

As células secretoras nos coléteres de *C. speciosus* podem produzir secreção mucilagínosa ou mista, constituída por fase hidrofílica e lipofílica. A porção mucilagínosa é produzida pela cooperação entre o retículo endoplasmático granular (REG) e o complexo de Golgi, formado por vários dictiossomas, como observado em Lüttge e Schnepf (1976). Os leucoplastos são citados como o sítio de secreção da fração lipídica (lipofílica) e fenólica em coléteres (Huang et al. 2008; Brillouet et al. 2013). Núcleo proeminente imersos num citoplasma denso, com pequenos e numerosos vacúolos também são características comuns às células secretoras dos coléteres (Fernandes et al. 2017; Paiva e Machado 2006). A exsudação nos coléteres pode se dar por poro, rompimento da cutícula, permeabilidade da cutícula ou canais cuticulares (Paiva e Machado 2006; Dalvi et al. 2013; Miguel et al. 2017).

Assim, dados ultraestruturais são importantes para elucidar o mecanismo de secreção e exsudação da secreção nos coléteres. No primeiro capítulo da dissertação objetivamos verificar se existem diferenças morfoanatômicas e histoquímicas entre os coléteres foliares e calicinais em *C. speciosus*, bem como elucidar o mecanismo de secreção e exsudação nos coléteres calicinais dessa mesma espécie.

Nectários são estruturas especializadas em secretar néctar, uma solução açucarada importante na interação da planta com animais (Rudgers 2004; Nicolson et al. 2007). O termo nectário extrafloral (NEF) remete à localização da estrutura nos órgãos vegetativos, exceto a raiz, e nectário floral (NF) nos órgãos florais, como sépalas, pétalas, androceu e gineceu (Caspary 1848). Quando o néctar está envolvido na polinização, foi proposto o termo nectário nupcial e nectários extra nupciais são aqueles não relacionados com a polinização (Delpino 1873). Entretanto, algumas vezes têm-se utilizado essa terminologia de forma inapropriada denominando-se nectários presentes em sépalas como extraflorais porque o néctar produzido não promove a interação com os polinizadores (Elias e Gelband 1975, 1976; Baker et al. 1978; Beattie 1985). Tais equívocos podem resultar em problemas, especialmente quando se pretende utilizar os nectários em estudos sobre evolução de caracteres e para abordagens filogenéticas. Neste trabalho utilizaremos o termo nectário floral para todo e qualquer nectário presente nas peças florais, e nectário extrafloral para os nectários presentes nos órgãos vegetativos, a fim de fazermos um estudo comparativo quanto aos açúcares presentes na secreção e quanto à anatomia. Em Gentianaceae, nectários foram anatomicamente descritos para as folhas de 29 espécies (Delgado et al. 2011a; b; Dalvi et al. 2013) e caule de 18 espécies (Dalvi et al. 2017) sendo considerados estruturas úteis para a taxonomia (Delgado 2008; Guimarães et al. 2013; Dalvi et al. 2013; 2017). Em sépalas de *Calolisianthus* foi mencionada a presença de glândulas visíveis a olho nu (Struwe et al. 2007) e em *Calolisianthus speciosus*, Delgado (2008) reportou estas glândulas como nectários extraflorais. Em *C. speciosus* foi reportada a presença de nectários nas folhas e sépalas (Delgado 2008) e um disco glandular na base do ovário (Struwe et al. 2007), entretanto, somente os nectários das folhas foram anatomicamente descritos (Delgado 2008; Delgado et al. 2011a; b; Dalvi et al. 2013). Eles são avascularizados, compostos por 3 a 5 células epidérmicas de paredes labirínticas que formam uma roseta em torno de uma região secretora central, antes descrita como um canal secretor (Delgado et al. 2011a; b).

Nectários em folhas e sépalas são frequentemente visitados por insetos, especialmente formigas (Oliveira e Freitas 2004), em um comportamento mutualístico que confere proteção contra o ataque de fitófagos ou herbívoros (Do Nascimento e Del-Claro 2010). A composição do néctar pode variar de acordo com a localização e função do nectário (Cruden et al. 1983) e está intimamente ligada aos eventos de visitação (Baker e Baker 1977; Cruden et al. 1983; Nepi 2017). Em *C. speciosus*, formigas são vistas se alimentando de néctar exsudado nas folhas e sépalas (Delgado 2008; Delgado et al. 2011a). Adicionalmente, em trabalhos de campo, foram notadas formigas patrulhando os ápices das pétalas de flores em pré-antese e antese, indicando a existência de estruturas secretoras nessa região que não foram ainda investigadas. A caracterização química da secreção é um dado importante nos estudos ecológicos que visam avaliar a interação entre *C. speciosus* e os insetos visitantes, tanto polinizadores quanto defensores. Assim, nos capítulos 2 e 3 da dissertação objetivamos comparar anatomicamente os nectários da folha, sépala, pétala, averiguar se existe assincronia na fase secretora dos nectários, qual a natureza química do néctar exsudado e sua relação com os visitantes e se o disco glandular exibe padrão anatômico de uma estrutura secretora de néctar. Considerando que o mecanismo de secreção e exsudação do néctar nos nectários incomuns de Gentianaceae não foi esclarecido, pretende-se, através deste trabalho elucidar os compartimentos celulares envolvidos na secreção e exsudação do néctar nos nectários foliares e sepalares de *C. speciosus*, esclarecer a função das paredes labirínticas e avaliar como a célula central atua na exsudação do néctar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker DA, Hall JL, Thorpe JR. 1978. A study of the extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. *New Phytologist* 81: 129-137.
- Baker HG, Baker I. 1977. Intraspecific constancy of floral nectar amino acid complements. *Botanical Gazette* 138: 183-191.
- Beattie AJ. 1985. The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. Cambridge University Press, New York.
- Brillouet MC, Romieu C, Schoefs B, Solymosi K, Cheynier V, Fulcrand H, Verdeil JL, Conéjéro G. 2013. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany* 112: 1003–1014.
- Calió MF. 2009. Sistemática de Helieae Gilg (Gentianaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Caspary R 1848. De Nectariis. PhD Thesis. Bonn: Elverfeldae.
- Cruden RW, Herman SM, Peterson S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. In: Bentley, B. and Elias, T.S. (Eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2013. Extrafloral nectaries in zeotropical Gentianaceae: Occurrence, distribution patterns, and anatomical characterization. *American Journal of Botany* 100: 1779-1789.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2017. Are stem nectaries common in Gentianaceae Juss.?. *Acta Botanica Brasilica* 31: 403 - 410.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2013. Extrafloral nectaries in neotropical Gentianaceae: Occurrence, distribution patterns, and anatomical characterization. *American Journal of Botany* 100: 1779-1789.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2017. Are stem nectaries common in Gentianaceae Juss.?. *Acta Botanica Brasilica* 31: 403 - 410.
- Dejean A, Corbara B, Leroy C, Delabie JH, Rossi V, Céréghino R. 2011. Inherited biotic protection in a Neotropical pioneer plant. *Plos One* 6: 18071.
- Del-Claro K, Rico-Gray V, Torezan-Silingardi HM, Alves-Silva E, Fagundes R, Lange D, Rodriguez-Morales D. 2016. Loss and gains in ant-plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux* 63: 207-221.
- Delgado MN, Azevedo AA, Valente GE, Kasuya MCM. 2011b. Comparative anatomy of *Calolisianthus* species (Gentianaceae-Helieae) from Brazil: taxonomic aspects. *Edinburgh Journal of Botany* 68: 139-155.
- Delgado MN, Silva LC, Bão SN, Morais HC, Azevedo AA. 2011a. Distribution, structural and ecological aspects of the unusual leaf nectaries of *Calolisianthus* species (Gentianaceae). *Flora* 206: 676-683.

- Delgado MN. 2008. Caracterização morfoanatômica de espécies de Gentianaceae ocorrentes em áreas de cerrado e campo rupestre em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Delpino F. 1873. Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla Dicogamia nel regno vegetale. Delle piante zooifile. Atti della Società italiana di scienze naturali 16: 151–349.
- Do Nascimento EA, Del-Claro K. 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora* 205: 754–756.
- Durkee LT. 1983. The ultrastructure of floral nectaries. In: Bentley, B., Elias, T.S. The biology of nectaries. Columbia University Press, New York.
- Elias TS, Gelband H. 1975. Nectar, its production and functions in trumpet creeper. *Science* 189: 289-291.
- Elias TS, Gelband H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63: 1349-1353.
- Huang SS, Kirchoff BK, Liao JP. 2008. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): histochemistry, ultrastructure, and secretion. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 135: 155–167.
- Miguel EDC, Pireda S, Barros CF, Zottich U, Gomes VM, Miguens FC, Cunha MD. 2017. Outer cell wall structure and the secretion mechanism of colleters of *Bathysa nicholsonii* K. Schum.(Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 31: 411-219.
- Nepi M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In *Nectaries and nectar* (pp. 129-166). Springer, Dordrecht.
- Nepi M. 2017. New perspectives in nectar evolution and ecology: simple alimentary reward or a complex multiorganism interaction?. *Acta Agrobotanica* 70: 1704.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007. *Nectaries and nectar* (Vol. 4). Dordrecht: Springer.
- Oliveira PS, Freitas AVL. 2004. Ant–plant–herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557–570.
- Paiva EAS. 2017. How does the nectar of stomata-free nectaries cross the cuticle?. *Acta Botanica Brasilica* 31: 525-530.
- Struwe L, Albert VA, Bremer B. 1994. Cladistics and family level classification of the Gentianales. *Cladistics* 10: 175-206.
- Struwe L, Albert VA. 2002. *Gentianaceae: systematics and natural history*. Cambridge University Press, Cambridge.

## CAPÍTULO 1

### **Elucidando a secreção dos coléteres foliares e calicinais de *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schltdl.) Gilg (Helieae – Gentianaceae): um estudo morfoanatômico e ultraestrutural**

#### **Resumo**

*Calolisianthus speciosus*, espécie endêmica do cerrado e dos campos rupestres no Brasil, que possui coléteres na inserção das folhas que foram anatomicamente descritos e no interior do cálice ainda não avaliados. Os coléteres foliares são sésseis ou curto pedunculados e apresentam uma cabeça multicelular secretora com grandes espaços intercelulares onde se acumula a secreção mucilaginosa. Assim, o presente trabalho objetiva verificar se existem diferenças anatômicas e histoquímicas entre os coléteres foliares e calicinais de *C. speciosus*, bem como elucidar o mecanismo de secreção e exsudação dessas estruturas. Amostras de sépalas e folhas em diferentes estágios foram coletadas e processadas conforme metodologia usual para os estudos anatômicos e ultraestruturais. Os coléteres calicinais são anatomicamente semelhantes aos foliares. São avascularizados, curto pedunculados e a células da cabeça multicelular possuem citoplasma denso, são frouxamente arranjadas, sendo a secreção predominantemente mucilaginosa acumulada nos amplos espaços intercelulares. Compostos fenólicos, carboidratos e proteínas foram detectados nos coléteres foliares e sepalares. Numerosos dictiosomos e mitocôndrias estão em consonância com a produção de secreção predominantemente mucilaginosa, embora REG e leucoplastos também sejam observados e possam estar relacionados com a síntese de proteínas, compostos lipídicos e fenólicos. A secreção sai do citoplasma para os espaços periplasmáticos, atravessa a parede que exhibe um afrouxamento e dissolução da lamela média, e se acumula nos espaços intercelulares. A secreção apresenta-se granulosa e densa, indicando fases hidrofílica e lipofílica, que é exsudada sem o rompimento da cutícula. A secreção lipofílica é diretamente eliminada por permeabilidade da cutícula enquanto a hidrofílica passa por canais na camada superficial.

**Palavras-chave:** Estruturas secretoras, mucilagem, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão.

## 1. Introdução

Coléteres são estruturas usualmente encontradas na face adaxial de órgãos vegetativos (folhas e estípulas) ou reprodutivos (brácteas e sépalas) que secretam exsudado viscoso envolvido na lubrificação de órgãos jovens e em desenvolvimento, prevenindo a dessecação e promovendo a proteção contra os ataques de fitófagos e microrganismos (Fahn 1979; Thomas 1991; Mayer et al. 2013). Em ambientes xéricos, permite a redução da perda de água pelas estruturas jovens (Mayer et al. 2013). Assim, coléteres podem promover vantagens seletivas nos eventos evolutivos.

*Calolisianthus* pertence às Gentianaceae Juss., terceira maior família da ordem Gentianales e possui a maior diversidade de gêneros nas Américas do Sul e Central (Struwe et al. 2002). Na grande maioria das espécies de Gentianaceae foi mencionada a presença de coléteres na face adaxial da folha próximo a inserção com o caule e/ou no interior do cálice (Struwe et al. 1994), embora essa referencia tenha sido baseada em observações ao microscópio estereoscópio, sem uma caracterização estrutural. Coléteres foram anatomicamente descritos para folha de *Macrocarpea obtusifolia* (Griseb.) Gilg (Dalvi et al. 2013) *Calolisianthus speciosus*, *C. pendulus* e *C. amplissimus* (Delgado 2008). Em *C. speciosus* eles são avascularizados, formados por pedúnculo curto e cabeça multisseriada de células secretoras, as quais recobrem a estrutura e formam uma massa de células frouxamente arrançadas no interior, sendo a secreção mucilaginosa acumula nos amplos espaços intercelulares formados (Delgado et al. 2011). Já os coléteres calicinais de *Calolisianthus* embora tenham sido mencionados para todas as espécies (Delgado 2008), carecem de uma caracterização anatômica.

Anatomicamente os coléteres podem assumir formas distintas, sendo o tipo padrão (“standard”) o mais comum. Esse tipo consiste em um eixo parenquimático recoberto por epiderme secretora em paliçada com cutícula fina (Thomas 1991). Em geral, a secreção se acumula no espaço periplasmático e é exsudada para o meio externo (Simões 2002; da Silva 2012; Martins 2012; Paiva 2016).

As células secretoras nos coléteres podem produzir secreção mucilaginosa ou secreção mista constituída por fase hidrofílica e lipofílica. A porção mucilaginosa é produzida pela cooperação entre o retículo endoplasmático granular (REG) e o complexo de Golgi, formado por vários dictiossomos, compartimento responsável pela transformação dos mono e dissacarídeos em polissacarídeos (Lüttge e Schnepf

1976). Os leucoplastos são citados como o sítio de secreção da fração lipídica (lipofílica) em coléteres (Huang et al. 2008), embora mais recentemente leucoplastos também tenham sido identificados como sítios de secreção de compostos fenólicos (Brillouet et al. 2013). Núcleo proeminente imerso num citoplasma denso, com pequenos e numerosos vacúolos também são características comuns às células secretoras dos coléteres (Fernandes 2017; Paiva e Machado 2006). A exsudação nos coléteres pode se dar por poro, rompimento da cutícula, permeabilidade da cutícula ou canais cuticulares (Paiva e Machado 2006; Dalvi et al. 2013; Miguel et al. 2017). Assim, dados ultraestruturais são importantes para elucidar o mecanismo de secreção e exsudação da secreção nos coléteres.

Esse trabalho tem por objetivos verificar se existem diferenças morfoanatômicas e histoquímicas entre os coléteres foliares e calicinais em *C. speciosos*, bem como elucidar o mecanismo de secreção e exsudação nos coléteres calicinais dessa espécie.

## **2. Materiais e métodos**

### 2.1 Área de coleta

Tanto para a microscopia eletrônica como para a microscopia de luz as amostras foram coletas nos campos rupestres do Parque Estadual Serra de Ouro Branco (Ouro Branco, MG, Brazil), entre as coordenadas geográficas S 20°30'115.7'' W 043°38'29.5'' e S 20°30'12.9'' W 043°38'43.1''. Foram coletadas amostras de folhas do primeiro ao terceiro nó em direção a base, botões florais e flores expandidas. O espécime Voucher foi depositado no herbário da Universidade Federal de Viçosa sob o número VIC 49368.

### 2.2 Microscopia de luz

Amostras da base das folhas e sépalas jovens de *Calolisianthus speciosus* foram fixadas em formalina neutra tamponada (Lillie 1965) e conservadas em etanol 70% (Jensen 1962). Para a caracterização anatômica as amostras das sépalas e folhas foram desidratadas em série etanólica e incluídas em metacrilato (Historesina Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Germany). Secções transversais e

longitudinais, com 5  $\mu\text{m}$  de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e coradas em azul de toluidina pH 4,7 (O'Brien et al. 1964). Os testes histoquímicos para detecção de carboidratos e proteínas foram realizados nas amostras incluídas em metacrilato. Para detecção de lipídeos e compostos fenólicos, foram obtidos cortes transversais em micrótomo de mesa (modelo LPC; Rolemberg & Bhering Trade and Bhering LTDA, Belo Horizonte, Brazil). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (AX70TRF, Olympus Optical, Japão) equipado com sistema de captura de imagens (Ax Cam, Zeiss, Alemanha) do laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

### 2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

Para as análises micromorfológicas, parte das amostras da base das folhas e das sépalas fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50% 1:1:18) foi submetida à desidratação em série etanólica, secagem a ponto crítico (modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), montada em suporte metálico e coberta com ouro em metalizador (modelo SCA 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A observação e registro fotográfico foram realizados em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra), no Núcleo de Microscopia e Micoranálise da UFV.

Para as análises ultraestruturais, amostras da base das folhas e das sépalas foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (10-12 horas), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série etanólica e incluídas em resina LR White. Secções de 60-70 nm foram obtidas em ultramicrótomo (modelo LEICA EM FC6), e contrastadas com acetato de uranila 5%, em solução aquosa, e citrato de chumbo (Reynolds 1963) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Bahia (BA), Brazil. A captura de imagens foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (modelo Zeiss, EM 109) em 50 kV, com câmera digital acoplada no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

## 3. Resultados

Os coléteres presentes no interior do cálice (Fig. 1A, B) são anatomicamente semelhantes aos presentes na inserção das folhas ao caule (Fig. 1C, D). São sésseis ou curto pedunculados, cujas células são isodiamétricas, vacuolizadas e possuem paredes finas (Fig. 1A, B, C, D, E). A porção secretora é formada por uma cabeça de células secretoras em uma massa multicelular frouxamente arranjada com grandes espaços intercelulares onde a secreção se acumula (Fig. 1A, D). A camada superficial dessa cabeça é formada por células semelhantes às células centrais, mas que se mantém aderidas pela cutícula (Fig. 1A, C).

O desenvolvimento dos coléteres é assincrônico e é possível verificar diferentes fases em botões jovens que antecedem a pré-antese (Fig. 2). As primeiras fases foram reconhecidas por células protodérmicas que se dividem anticlinalmente, formando uma elevação na superfície (Fig. 2B, C). As divisões celulares originam a massa multicelular de células secretoras (Fig. 2D, E). No estágio final de desenvolvimento surgem espaços intercelulares na porção central do coléter (Fig. 2F), onde a secreção se acumula precedendo a exsudação (Fig. 1A, D).

Reação positiva foi detectada nas células da cabeça secretora dos coléteres tanto do cálice quanto da folha para proteínas (Tabela 2, Fig. 3A, B) e polissacarídeos, que também exibiu reação nos espaços intercelulares e no meio externo da cabeça secretora (tabela 2, Fig. 3C). Amido foi detectado apenas nos coléteres foliares (Tabela 2, Fig. 3D), enquanto pectinas/mucilagem somente nos coléteres das sépalas (Fig. 3E). As células secretoras dos coléteres das sépalas exibiram reação positiva aos compostos fenólicos (Tabela 2, Fig. 3F). Reação negativa foi registrada para os compostos lipídicos para ambos coléteres (Tabela 2).

Na fase secretora (botões florais em pré-antese), as células da cabeça do coléter apresentam paredes finas, citoplasma denso com pequenos vacúolos, e amplos espaços intercelulares (Fig. 4A). No citoplasma são visualizados muitos dictiossomos associados ao REG (Fig. 4B), muitas mitocôndrias, núcleo com posição parietal e cromatina descondensada (Fig. 4C). Leucoplastos com formato ameboide contendo material eletrôn-denso foram observados em algumas células (Fig. 4A, D). Vacúolos contendo material fibrilar e figuras mielínicas são evidentes (Fig. 4E).

A parede entre as células adjacentes da região central da cabeça dos coléteres é fina e primária, e em vários pontos sofre dissolução da lamela média, provocando a separação (Fig. 4E) e o surgimento de espaços intercelulares onde são visualizados grânulos e material homogêneo (Fig. 4F). São observados também espaços

periplasmáticos, onde o mesmo tipo de material visualizado nos vacúolos e no espaço intercelular é observado (Fig. 4A). Nas células secretoras que recobrem o coléter, a principal diferença é a presença da cutícula (Fig. 5A), que se mantém contínua e mantém a superfície íntegra. Foram reconhecidas três camadas nas células superficiais a serem ultrapassadas pela secreção acumulada: a parede primária, rica em polissacarídeos, o estrato cuticular (subdividido em camada reticulada e arborescente) e a cutícula propriamente dita (Fig. 5 D). Tanto a secreção acumulada no espaço periplasmático quanto a dos espaços intercelulares atravessam a cutícula para atingir o meio externo (Fig. 5C, D). Entretanto, nota-se uma alteração nas camadas tanto da parede periclinal externa das células superficiais, quanto da própria cutícula (Fig. 5D). A camada péctica da parede parece ser digerida enquanto a porção celulósica assume um aspecto lamelar (Fig. 5D seta branca).

No espaço periplasmático formado na face externa das células superficiais observa-se material fibrilar e homogêneo (Fig. 5B). Na cutícula propriamente dita notam-se pequenos canais eletrondensos e imediatamente abaixo desta, pequenas vesículas são evidentes (Fig. 5D).

#### 4. Discussão

Os coléteres anatomicamente descritos no presente trabalho para as folhas e sépalas de *C. speciosus*, desenvolvem-se precocemente e produzem secreção predominantemente polissacarídica que recobre os ápices dos meristemas foliares e botões florais. Estas estruturas já haviam sido relatadas para esta e outras espécies de *Calolisianthus* (Delgado 2008) e para *Macrocarpea obtusifolia* (Dalvi et al. 2014). Estes resultados estão de acordo com a principal função atribuída aos exsudados dos coléteres, que é a proteção de gemas e botões florais contra a dessecação, e contra o ataque de microrganismos patogênicos e pequenos fitófagos (da Silva et al. 2012). Esta proteção pode ter sido um importante fator de seleção às condições xéricas e de intensa luminosidade solar dos campos rupestres e cerrado (Thomas 1991; Mayer et al. 2013; Ribeiro et al. 2017) onde a espécie ocorre (Calió 2009).

Anatomicamente os coléteres foliares e calicinais de *C. speciosus* são similares, avascularizados e formados por uma cabeça multicelular secretora com amplos espaços intercelulares onde secreção se acumula antes de ser exsudada (Delgado 2008). Embora coléteres sejam mencionados como uma característica comum em

Gentianaceae (Judd et al. 2009) e típica para *Calolisianthus* (Struwe et al. 2002), são poucos os trabalhos que apresentam tal caracterização. Coléteres semelhantes aos observados no presente trabalho em *C. speciosus* foram relatados para a região intrapeciolar de *C. amplíssimus* e *C. pendulus*, bem como no cálice de *C. speciosus* (Delgado 2008). Coléteres morfoanatômicamente distintos foram reportados na literatura (Lersten 2008; Thomas 1991; Silva et al. 2017), as quais podem ser de utilidade para a taxonomia. O tipo padrão formado por um eixo parenquimático não secretor recoberto por epiderme secretora em paliçada (Fahn 1976; Thomas 1991) é o mais comum, tendo sido registrado em diversas famílias não relacionadas como Euphorbiaceae (Machado et al. 2014), Rubiaceae (Judkevich et al. 2017), Apocianaceae (Ribeiro et al. 2017), bem como para *Macrocarpea obtusifolia* (Gentianaceae) (Dalvi et al. 2014). Entretanto, a estrutura anatômica observada nos coléteres de *C. speciosus* não se enquadra nas tipologias descritas até o presente momento, especialmente quanto a presença dos amplos espaços intercelulares que acumulam secreção.

A origem dos coléters de *C. speciosus* é exclusivamente protodérmica, o que nos permite afirmar que são do tipo tricoma. Os coléteres de *Macrocarpea obtusifolia* (Gentianaceae) embora sejam do tipo padrão, anatomicamente diferente de *C. speciosus*, também são derivados exclusivamente da protoderme (Dalvi et al. 2014). Os estádios finais de desenvolvimento dos coléteres e início da fase secretora são marcados pelo surgimento de grandes espaços intercelulares, aparentemente pela dissolução da lamela média, já que não foi visualizado evidência de lise celular, o que indica uma origem esquizógena, conforme Evert (2013). As células externas também sofreram essa dissolução, entretanto, continuam unidas através da cutícula. Este arranjo frouxo no interior dos coléteres e entre as células periféricas permite o acúmulo de secreção e é uma característica ainda não descrita para coléteres, indicando que o processo secretor desse tipo de estrutura pode ser diferente do que se conhece na literatura. Zhou et al. (2012) e Marinho et al. (2016) relataram coléteres em Fabaceae e Rutaceae com cavidades ocas causadas por lise celular. Assim, os coléteres de *C. speciosus* representam um bom modelo para verificar a ocorrência de morte celular programada, que será esclarecido em trabalho futuro.

Nos coléteres calicinais e foliares de *C. speciosus* foram detectados polissacarídeos e proteínas, componentes comuns a secreção produzida por coléteres em diferentes espécies de famílias não relacionadas (Machado et al. 2014; Dalvi et al. 2014;

Judkevich et al. 2017; Ribeiro et al. 2017). A secreção mucilagínosa é atribuída a função de proteção contra dessecação, já que esses polissacarídeos são higroscópicos (Mayer et al. 2013). Adicionalmente, por apresentar consistência pegajosa, as mucilagens aderem os pequenos fitófagos e herbívoros, protegendo as folhas e flores no início do seu desenvolvimento (Machado et al. 2015), bem como lubrificando a superfície durante a expansão do órgão (Thomas 1991). Quanto a presença de proteínas, trabalhos têm demonstrado atividade enzimática, o que atuaria como defesa contra o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (Maffei 2010; Chern et al. 2013).

Amido foi detectado apenas nos coléteres foliares de *C. speciosus*, em folhas coletadas durante a fenofase floral. Na fase vegetativa, os meristemas vegetativos e folhas jovens atuam como um forte dreno, estocando amido de reserva que permaneceria disponível para ser utilizado durante a fenofase floral, onde a flor representa o dreno mais forte.

A presença de compostos fenólicos pode estar relacionada a senescência dos coléteres, conforme reportado na literatura (Souza 2014; Fernandes et al. 2017). Nos coléteres de *C. speciosus*, compostos fenólicos foram detectados apenas nas sépalas, o que pode indicar que as coletas não abrangeram a fase senescente dos coléteres foliares.

As características ultraestruturais estão de acordo com os resultados dos testes histoquímicos obtidos para os coléteres calicinais e foliares de *C. speciosus*, já que os numerosos dictiosomos, mitocôndrias e cisternas do retículo endoplasmático granular são os sítios de síntese de proteínas e polissacarídeos (Kristen e Lockhausen 1985), e são comuns no citoplasma de coléteres (Zhou et al. 2012; Marinho et al. 2016; Fernandes et al. 2017).

O mecanismo de secreção e exsudação dos coléteres de *C. speciosus* é incomum. Inicialmente a secreção produzida no citoplasma atravessa a membrana plasmática e permanece no espaço periplasmático até ser eliminada da célula para os espaços intercelulares. Esse mecanismo pode ser explicado pelo modelo proposto por Paiva (2016), onde a pressão causada pelo acúmulo da secreção facilita a sua passagem pela parede celular, sendo assim acumulada nos grandes espaços intercelulares. Da mesma forma, o acúmulo de secreção nos espaços intercelulares dos coléteres de *C. speciosus* impulsiona a secreção em direção a cutícula das células superficiais. A cutícula representa a última barreira para que a secreção seja

exsudada. Os canais cuticulares e gotas observadas nas camadas da parede externa dos coléteres de *C. speciosus* condizem com o modelo de exsudação proposto por Miguel et al. (2016) para os coléteres de Rubiaceae. Como observado por esses autores, é possível reconhecer 3 camadas na face externa das células epidérmicas secretoras dos coleteres de *C. speciosus*: a parede rica em polissacarídeos, o estrato cuticular (subdividido em camada reticulada e arborescente) e a cutícula propriamente dita. Devido ao acúmulo de mucilagem, a camada rica em polissacarídeos sofre deformação e a secreção é impulsionada atravessando a camada reticulada e arborescente. A exsudação se dá pela passagem através dos canais cuticulares, permanecendo a cutícula propriamente dita intacta durante o processo como reportado em coléteres de Rubiaceae. Tais eventos corroboram o modelo de exsudação proposto por Miguel et al. (2016).

## **5. Conclusão**

Os coléteres calicinais e foliares de *C. speciosus* são morfoanatômicamente semelhantes e distintos das tipologias descritas na literatura. A secreção mista com predomínio de polisacarídios está em consonância com características ultraestruturais onde foi evidenciada fração hidrofílica e hidrofóbica, as quais são exsudadas por permeabilidade da cutícula ou por canais cuticulares. Os espaços intercelulares onde a secreção é acumulada antes de ser exsudada, aparentemente é formado por esquizogenia, entretanto análises complementares são necessárias para se verificar se eventos de morte celular programada estão envolvidos no processo.

## 6. Tabelas e figuras

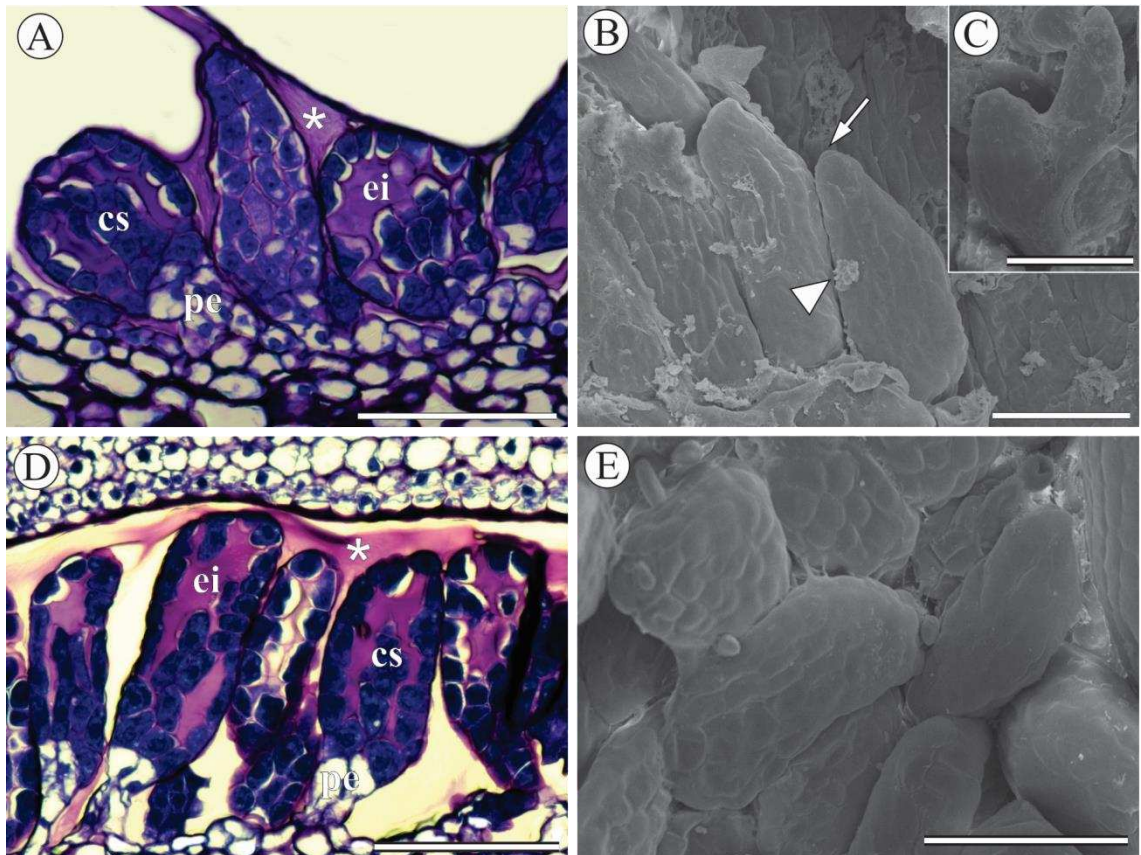
Tabela 1: Testes histoquímicos realizados nos coléteres foliares e sepalares de *Calolisianthus speciosus*.

<b>Grupo metabólico</b>		<b>Reagente</b>	<b>Referência</b>
Carboidratos	Polissacarídeos neutros	PAS (reagente de Schiff/ácido periódico)	O'Brien e McCully (1981)
	Amido	Lugol	Johansen (1940)
	Pectinas	Vermelho de rutênio	Johansen (1940)
Proteínas		Xilidine Ponceau	O'Brien e McCully (1981)
		Azul de Coomassie	Fisher (1968)
Lipídeos gerais		Sudan IV	Johansen (1940)
		Sudan Black B	Pearse (1980)
Fenóis		Cloreto férrico	Johansen (1940)
Taninos		Vanilina clorídrica	Mace e Howell (1974)

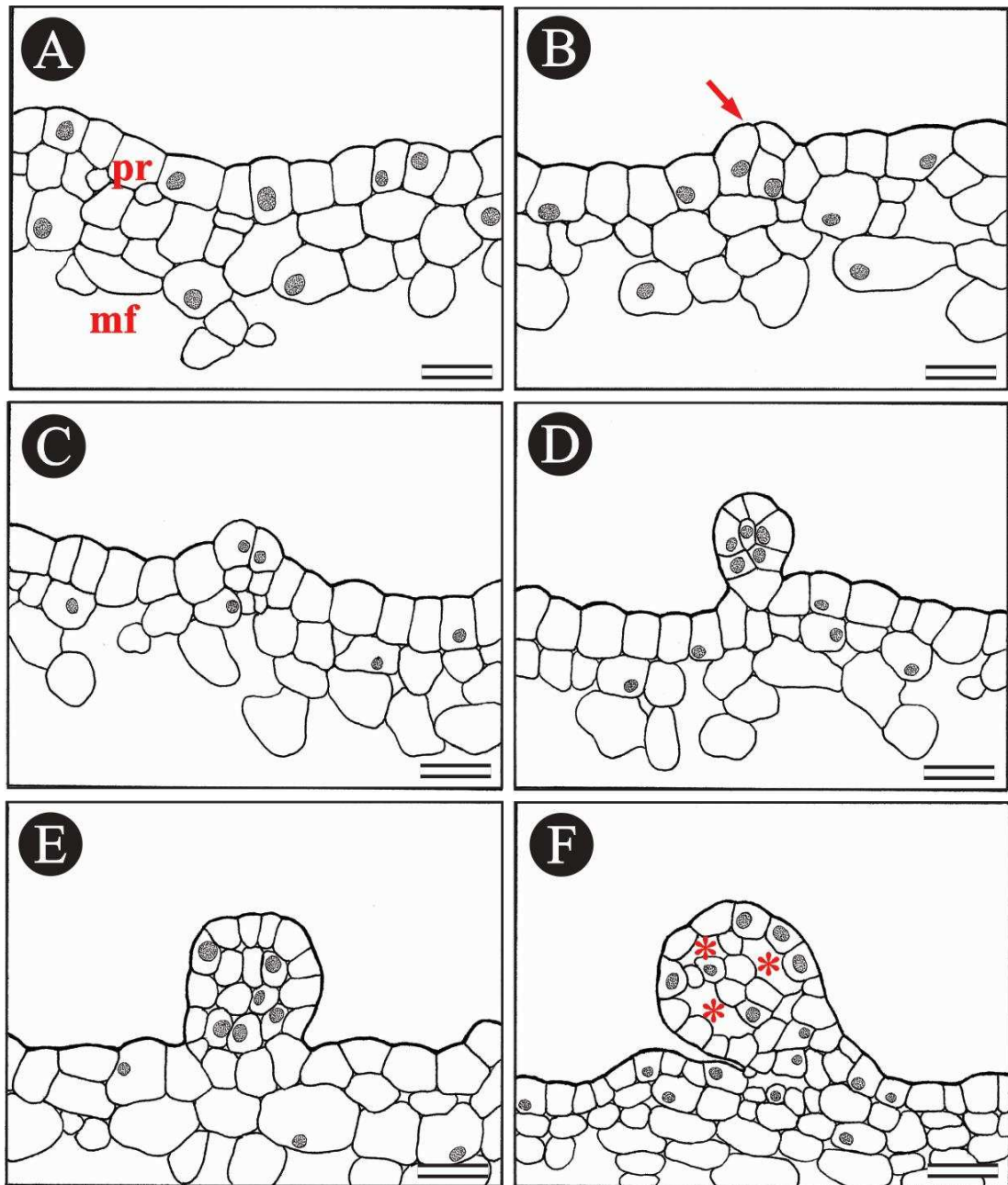
Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos realizados nos coléteres calicinais e foliares de *Calolisianthus speciosus*.

<b>Compostos</b>	<b>Coléter</b>	
	sépala	folha
Lipídios totais	-	-
Proteínas	+	+
Polissacarídeos neutros	+	+
Amido	-	+
Pectinas	+	-
Compostos fenólicos	+	-

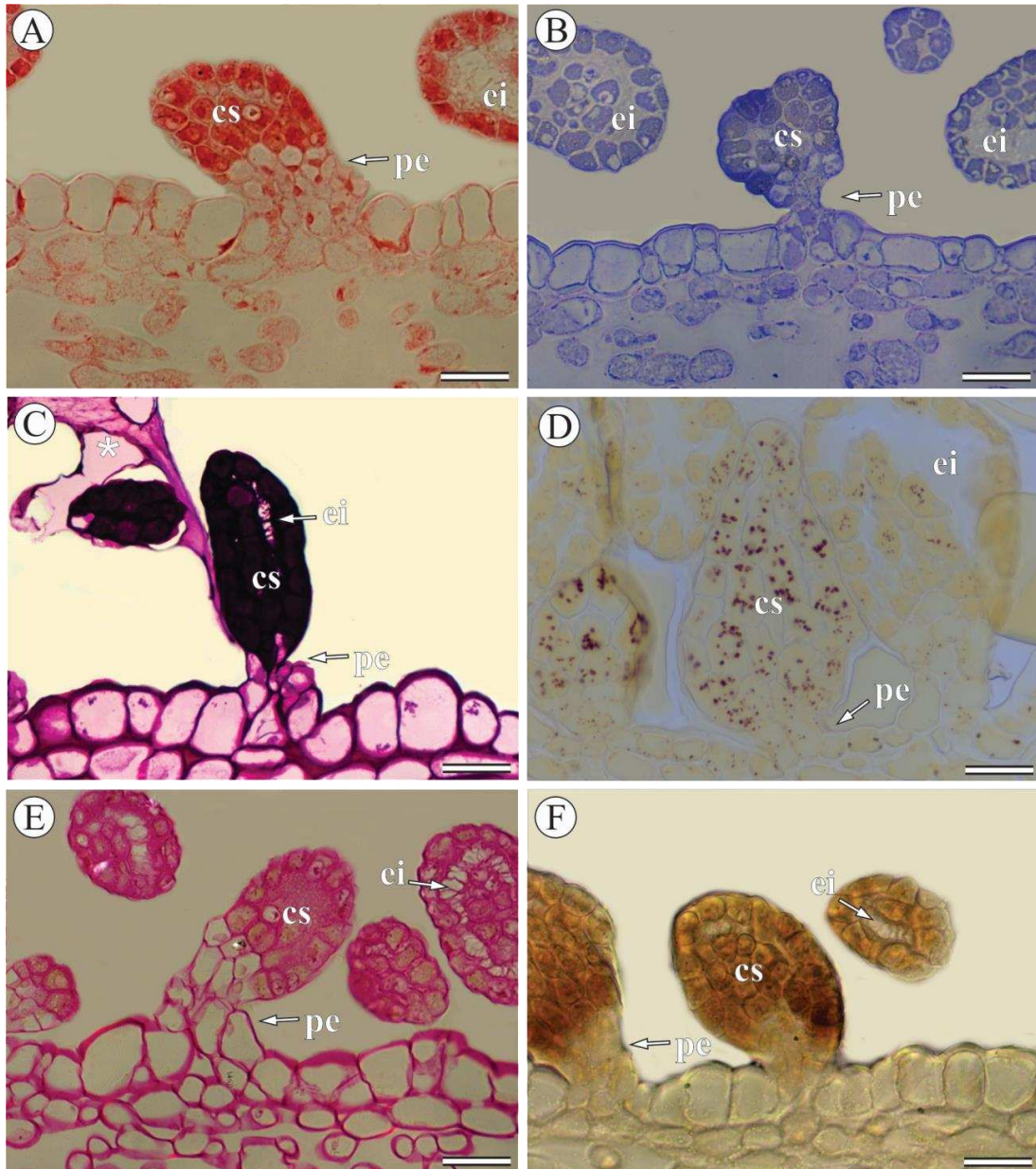
+ (reação positiva); - (reação negativa)



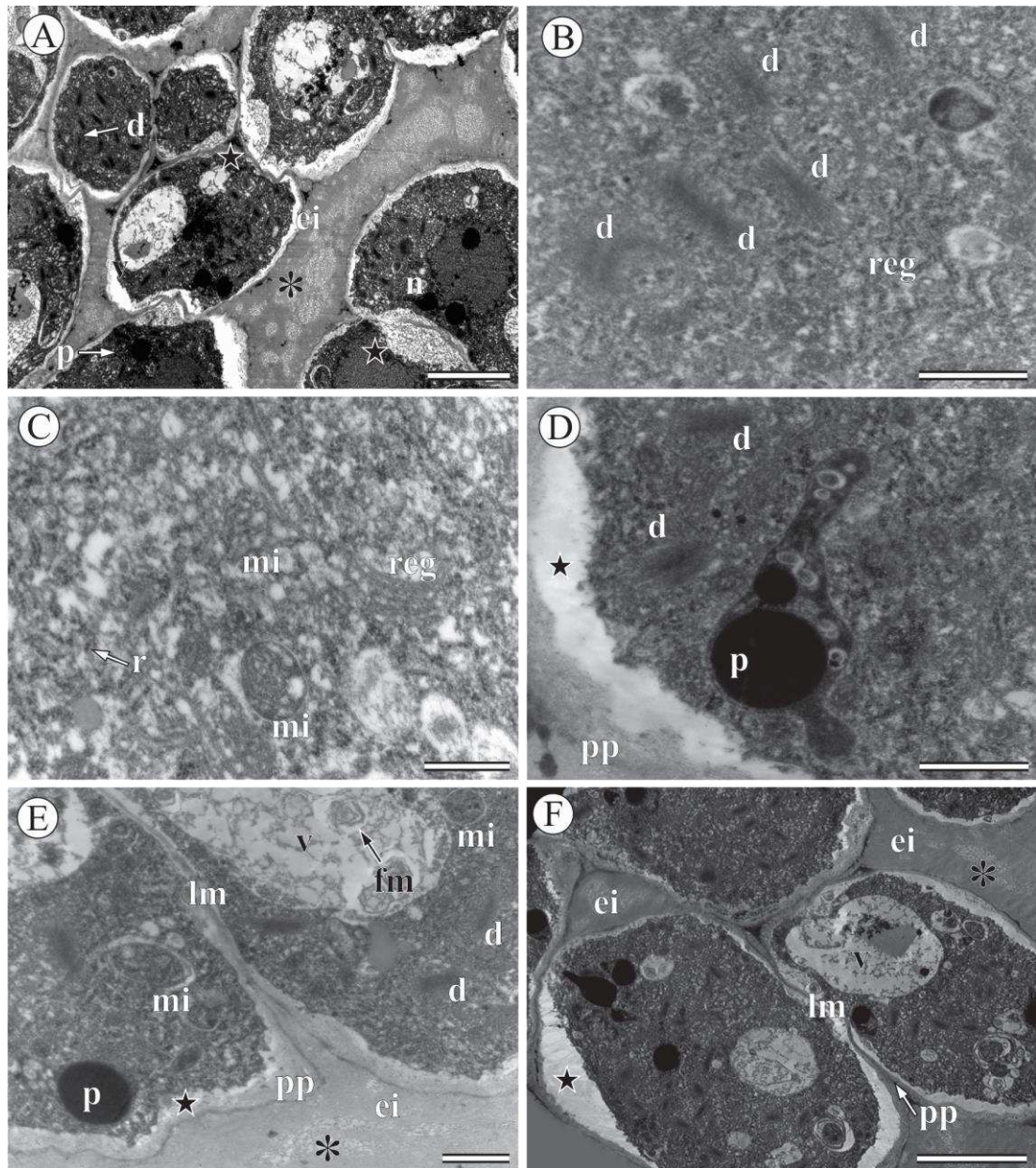
**Figura 1.** Morfoanatomia dos coléteres sepales (A-C) e foliares (D, E) de *Calolisianthus speciosus*. **A, D.** Cortes longitudinais dos coléteres corados com azul de toluidina; **B, C, E.** Microscopia eletrônica de varredura. **A, D.** Coléteres sésseis e curto pedunculados com uma cabeça multicelular de células com citoplasma denso e núcleo relativamente grande. Note o acúmulo de secreção nos espaços intercelulares da cabeça e no meio externo (asterisco). **B.** Coléteres sepales. Note a cutícula levemente distendida (seta) e secreção na superfície externa (ponta de seta). **C.** Detalhe de um coléter bifurcado. **E.** Coléteres foliares. cs= cabeça secretora, ei= espaço intercelular, pe= pedúnculo. Barra: 100  $\mu$ m.



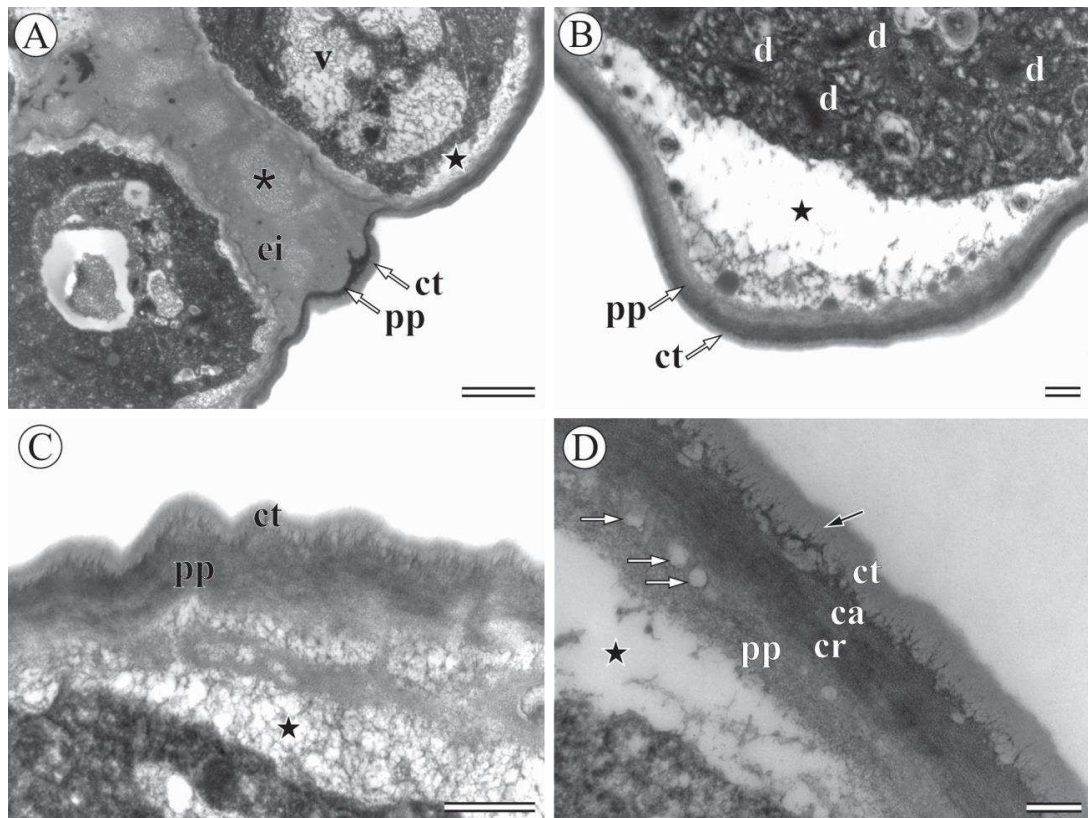
**Figura 2.** Desenvolvimento dos coléteres foliares e calicinais de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Células protodérmicas comuns. **B.** Início das divisões anticlinais de células protodérmicas que irão formar os coléteres. **C, D.** As sucessivas divisões originam as células basais que irão forma o pedúnculo e as células apicais que formarão a cabeça secretora. **E.** Células da cabeça secretora em um coléter séssil. **F.** Fase final do desenvolvimento do coléter onde os espaços intercelulares se tornam evidentes (asterisco). pr= protoderme, mf= meristema fundamental. Barra: 30  $\mu$ m.



**Figura 3.** Reações positivas aos testes histoquímicos realizados nos coléteres calicinais (A, B, C, E, F) e foliares (D) de *Calolisianthus speciosus*. A, B. Xilidina de Ponceau e azul de Coomassie, respectivamente, detectando proteínas no citoplasma das células da cabeça secretora. C. Reagente de Schiff/Ácido periódico detectando polissacarídeos neutros em toda a cabeça secretora (células e espaços intercelulares) e no meio externo (asterisco). D. Reagente Lugol evidenciando amido no citoplasma das células secretoras da cabeça somente dos coléteres foliares. E. Vermelho de Rutênio evidenciando pectinas/mucilagens nos espaços intercelulares e nas células da cabeça secretora. F. Cloreto férrico evidenciando compostos fenólicos na cabeça secretora somente dos coléteres calicinais. ei= espaço intercelular, pe= pedúnculo, cs= cabeça secretora. Barra: 30 µm.



**Figura 4.** Ultraestrutura dos coléteres calicinais de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Células da cabeça secretora com citoplasma denso, núcleo volumoso e paredes finas; note o espaço periplasmático (estrela) e o intercelular (asterisco) com acúmulo de secreção. **B.** Detalhe do citoplasma demonstrando os numerosos dictiossomas associados ao REG. **C.** Detalhe da região do citoplasma com muitas mitocôndrias, REG e ribossomos livres. **D.** Detalhe de um leucoplasto com formato ameboide e conteúdo eletron-denso. **E.** Região entre células adjacentes da porção central da cabeça secretora evidenciando a separação entre as células em consequência da dissolução da lamela média. Note o espaço intercelular repleto de secreção formada (asterisco). **F.** Células adjacentes da porção central da cabeça secretora com espaços intercelulares (asterisco) e espaço periplasmático (estrela) com secreção. d= dictiossomo, ei= espaço intercelular, lm= laméla média, mi= mitocôndria, n= núcleo, pp= parede celular primária, p= plastídio, r= ribossomos, reg= retículo endoplasmático granular, v= vacúolo. A, F: Barra: 5  $\mu$ m. B, D, E: Barra: 1  $\mu$ m. C: Barra: 500  $\mu$ m.



**Figura 5.** Evidências ultraestruturais do mecanismo de exsudação da secreção produzida pelos coléteres de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Detalhe das células superficiais da cabeça secretora evidenciando o espaço intercelular repleto de secreção amorfa (asterisco). **B.** Detalhe do espaço periplasmático formado pelo acúmulo de secreção (estrela) entre a membrana plasmática de uma célula superficial e a parede recoberta por cutícula. **C.** Detalhe do conteúdo acumulado no espaço periplasmático (estrela) por entre as camadas da parede externa até a cutícula propriamente dita. **D.** Detalhe das camadas da parede externa, note a deformação da parede polissacarídica (seta branca) e os canais cuticulares (seta preta). ca= camada arborescente, cr= camada reticulada, ct= cutícula, d= dictiossomo, ei= espaço intercelular, pp= parede polissacarídica, v= vacúolo. A: Barra: 2  $\mu\text{m}$ . B: Barra: 1  $\mu\text{m}$ . C: Barra: 500  $\mu\text{m}$ . D: Barra: 200  $\mu\text{m}$ .

## 7. Referências

- Brillouet MC, Romieu C, Schoefs B, Solymosi K, Cheynier V, Fulcrand H, Verdeil JL, Conéjéro G. 2013. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany* 112: 1003–1014.
- Calió MF. 2009. Sistemática de Helieae Gilg (Gentianaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Chern LY, Shukor MY, Muse R. 2013. Monoterpenes in plants – a mini review. *Asian Journal of Plant Biology* 1: 15-19.
- Coutinho IAC, Francino, DMT, Meira RMSA. 2015. New records of colleter in Chamaecrista (Leguminosae, Caesalpinioideae S.L.): structural diversity, secretion, functional role, and taxonomic importance. *International Journal of Plant Sciences* 176: 72-85.
- Delgado MN, Azevedo AA, Valente GE, Kasuya MCM. 2011. Comparative anatomy of *Calolisianthus* species (Gentianaceae-Helieae) from Brazil: taxonomic aspects. *Edinburgh Journal of Botany* 68: 139-155.
- Delgado MN. 2008. Caracterização morfoanatômica de espécies de Gentianaceae ocorrentes em áreas de cerrado e de campo rupestre em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Evert RF. 2013. Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento. Blucher.
- Fahn A. 1979. Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- Fisher DB. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
- Huang SS, Kirchoff BK, Liao JP. 2008. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): histochemistry, ultrastructure, and secretion. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 135:155–167.
- Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. WH Freeman, San Francisco.
- Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. McGraw- Hill, New York.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre. 612p.
- Judkevich MD, Salas RM, Gonzalez AM. 2017. Colleters in American Spermaceae Genera (Rubiaceae): Morphoanatomical and Evolutionary Aspects. *International Journal of Plant Sciences* 178: 378-397.
- Kristen U, Lockhausen J. 1985. The leaf glands of *Veronica beccabunga* L.: ultrastructure and a possible pathway of secretion. *Israel Journal of Botany* 34:147-156.
- Langenheim JH. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280.

- Lersten NR. 1977. Trichome forms in *Ardisia* (Myrsinaceae) in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 75: 229-244.
- Lillie RD. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd ed. McGrawHill, New York.
- Lüttge U, Schnepf E. 1976. Elimination processes by glands. Organic substances. In: Lüttge U Pitman MG. eds. *Transport in plants II*, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 2B . New York: Springer, 244–277.
- Mace ME, Howell CR. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52: 2423-2426.
- Machado SR, Barreiro DP, Rocha JF, Rodrigues TM. 2012. Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207: 868-877.
- Machado SR, Paleari LM, Paiva ÉA, Rodrigues TM. 2014. Colleters on the inflorescence axis of *Croton glandulosus* (Euphorbiaceae): structural and functional characterization. *International Journal of Plant Sciences* 176: 86-93.
- Maffei ME. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76: 612-631.
- Marinho CR, Oliveira RB, Teixeira SP. 2015. The uncommon cavitated secretory trichomes in *Bauhinia* s.s. (Fabaceae): the same roles in different organs. *Botanical journal of the Linnean Society* 180: 104-122.
- Martins FM. 2012. Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae-Apocynoideae-Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Brazilian Journal of Botany* 35: 59-69.
- Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Mazzafera P. 2013. A functional role for the colleters of coffee flowers. *Annals of Botany* 5: 1-13.
- Mayer JLS, SM Carmello-Guerreiro, P Mazzafera. 2013. A functional role for the colleters of coffee flowers. *Annals of Botany* 5:1–13.
- Miguel EDC, Pireda S, Barros CF, Zottich U, Gomes VM, Miguens FC, Cunha MD. 2017. Outer cell wall structure and the secretion mechanism of colleters of *Bathysa nicholsonii* K. Schum.(Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 31: 411-219.
- O'Brien TP, McCully ME. 1981. *The study of plant structure principles and select methods*. Termarcarphi Pty. Ltd., Melburne.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006. Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) colleters. *Revista de Biología Tropical* 54: 943-950.
- Paiva EAS. 2016. How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of botany* 117: 533-540.

- Paiva EAS. 2016. How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of Botany* 117: 533-540.
- Pearse AGE. 1972. *Histochemistry: Theoretical and applied*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque staining in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Ribeiro JC, Ferreira MJP, Demarco D. 2017. Colleters in Asclepiadoideae (Apocynaceae): protection of meristems against desiccation and new functions assigned. *International Journal of Plant Sciences* 178: 465-477.
- Silva CJ, Barbosa LCD, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira R MAS. 2012. Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 60: 707-717.
- Silva MDS, Coutinho ÍAC, Araújo MN, Meira RMSA. 2017. Colleters in *Chamaecrista* (L.) Moench sect. *Chamaecrista* and sect. *Caliciopsis* (Leguminosae-Caesalpinioideae): anatomy and taxonomic implications. *Acta Botanica Brasilica* 31: 382-391.
- Simões AO, Kinoshita LS. 2002. The Apocynaceae s. str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. *Darwiniana* 127-169.
- Souza LM. 2014. Estruturas secretoras em espécies de leguminosas da subtribo Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae). PhD diss. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Struwe L, Albert VA, Bremer B. 1994. Cladistics and family level classification of the Gentianales. *Cladistics* 10: 175-206.
- Thomas V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68: 287-305.
- Tresmondi F, Canaveze Y, Guimarães E, Machado SR. 2017. Colleters in Rubiaceae from forest and savanna: the link between secretion and environment. *The Science of Nature* 104:17.
- Zhou YF, Shi HY, Liu WZ. 2012. Ontogenesis of trichome-like cavities in *Dictamnus dasycarpus*. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207: 63-73.

## CAPÍTULO 2

### **Anatomia comparada dos nectários foliares e florais de *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schltl.) Gilg (Helieae - Gentianaceae): ontogenia e implicações ecológicas**

#### **Resumo**

A presença de um disco glandular na base do ovário e nectários nas folhas, sépalas e caule é mencionada como característica comum da família Gentianaceae Juss.. Estudos anteriores indicaram que nectários caulinares também são comuns à família. Esses nectários tem anatomia peculiar e em *Calolisianthus* são avascularizados e constituídos por 3 a 5 células de paredes labirínticas que delimitam uma célula secretora central, visíveis em observações microscópicas quando isolados ou a olho nu quando formam agregados na base e ápice das folhas e na face abaxial do cálice. Em nossas observações de campo, formigas foram visualizadas se alimentando das gotas de secreção exsudadas nos ápices petalares de *Calolisianthus speciosus*, embora não haja menção sobre a presença de estruturas secretoras nesta região. Objetivamos desvendar o quão anatomicamente semelhantes são os nectários foliares e sepalares, bem como confirmar se as estruturas nos ápices das pétalas são nectários; como se dá o mecanismo de secreção de néctar; se existe assincronia na fase secretora dos nectários e qual a natureza química do néctar exsudado. Amostras de folhas e flores em diferentes estádios de desenvolvimento foram submetidas às técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A detecção da presença de açúcares, proteínas e aminoácidos nos exsudados foi avaliada pelo método enzimático. Os nectários das pétalas são anatomicamente semelhantes aos do caule, folhas e sépalas previamente descritos em Gentianaceae. Eles se desenvolvem exclusivamente da protoderme. O néctar produzido nas células radiadas se acumula no espaço subcuticular da célula central antes de ser liberada e sua composição química varia em relação ao órgão. A glândula na base do ovário é formada por epiderme em paliçada com conteúdo citoplasmático rico em lipídeos e parênquima subepidérmico predominantemente vascularizado por floema. As estruturas glandulares nas pétalas foram reconhecidas como nectários e são anatomicamente semelhantes aos presentes nas folhas e sépalas. Os nectários petalares são uma novidade para o gênero e precisam ser avaliados quanto à função. A atividade dos

nectários é assincrônica e a liberação do néctar ocorre por rompimento de cutícula devido pressão de acúmulo. Não foi confirmada atividade secretora na glândula do ovário.

**Palavras-chave:** estruturas secretoras, néctar, microscopia eletrônica de varredura, relações mutualísticas.

## 1. Introdução

*Calolisianthus* pertence à família Gentianaceae Juss. sendo constituído por seis espécies de ervas perenes que ocorrem na Bolívia e Sudeste do Brasil (Struwe e Albert 2002). *Calolisianthus speciosus* (Cham. e Schltdl.) Gilg é endêmica do Brasil ocupando uma faixa contínua desde as porções meridionais das serras de Minas Gerais até as serras de Goiás, em vegetação de cerrado e de campos rupestres (Calió 2009).

Em Gentianaceae, nectários foram anatomicamente descritos para as folhas de 29 espécies (Delgado et al. 2011a; b; Dalvi et al. 2013) e caule de 18 espécies (Dalvi et al. 2017) sendo consideradas estruturas úteis para a taxonomia (Delgado 2008; Guimarães et al. 2013; Dalvi et al. 2013; 2017). Em sépalas, foi mencionada a presença de glândulas visíveis a olho nu (Struwe et al. 2007) e em *Calolisianthus speciosus*, Delgado (2008) reportou estas glândulas como nectários extraflorais.

Nectários são estruturas especializadas em secretar néctar, uma solução açucarada importante na interação da planta com animais (Rudgers 2004; Nicolson et al. 2007). O termo nectário extrafloral (NEF) remete à localização da estrutura nos órgãos vegetativos, como caule, folha, cotilédones, e nectário floral (NF) nos órgãos florais, como sépalas, pétalas, androceu e gineceu (Caspary 1848). Quando o néctar está envolvido na polinização, foi proposto o termo nectário nupcial e nectários extra nupciais são aqueles não relacionados com a polinização (Delpino 1873). Entretanto, algumas vezes têm-se utilizado essa terminologia de forma inapropriada denominando-se nectários presentes em sépalas como extraflorais porque o néctar produzido não promove a interação com os polinizadores (Elias e Gelband 1975; 1976; Baker et al. 1978; Beattie 1985). Tais equívocos podem resultar em problemas, especialmente quando se pretende utilizar os nectários em estudos sobre evolução de caracteres e para abordagens filogenéticas. Neste trabalho utilizaremos o termo nectário floral para todo e qualquer nectário presente nas peças florais, e nectário extrafloral para os nectários presentes nos órgãos vegetativos, a fim de fazermos um estudo comparativo quanto aos açúcares presentes na secreção e quanto à anatomia.

Os nectários podem apresentar epiderme especializada com tricomas secretores, epiderme secretora em paliçada ou epiderme com estômatos, e parênquima nectarífero subepidérmico, podendo ser vascularizados ou não (Fahn 1979). Em *C. speciosus* foi reportada a presença de nectários nas folhas e sépalas

(Delgado 2008) e um disco glandular no ovário (Struwe et al. 2007), entretanto, somente os nectários das folhas e sépalas foram anatomicamente descritos (Delgado 2008; Delgado et al. 2011a; b; Dalvi et al. 2013). Delgado (2008) descreveu as chamadas glândulas por Struwe et al. (2007) presentes nas sépalas como NEF vascularizados compostos de 3 a 8 células em arranjo de roseta com um canal central por onde o néctar é eliminado. A mesma descrição foi obtida para os nectários foliares da mesma espécie (Delgado 2008; Delgado et al. 2011a; b).

Nectários em Gentianaceae foram descritos por Dalvi et al. (2013; 2017) como avascularizados, compostos por 3 a 5 células epidérmicas de paredes labirínticas que formam uma roseta em torno de uma região secretora central, antes descrita como um canal secretor (Delgado et al. 2011a; b).

Nectários em folhas e sépalas são frequentemente visitados por insetos, especialmente formigas (Oliveira e Freitas 2004), em um comportamento mutualístico que confere proteção contra o ataque de fitófagos ou herbívoros (Do Nascimento e Del-Claro 2010). A composição do néctar pode variar de acordo com a localização e função do nectário (Cruden et al. 1983), podendo conter, em diferentes proporções, glicose, frutose, sacarose, maltose, rafinose, melobiose, mucilagem, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, íons minerais, fosfatos, vitaminas, compostos fenólicos, oxidases, tirosinases e hormônios (Fahn 1979; Baker e Baker 1983; Durkee 1983; Roshchina e Roshchina 1993; Nicolson et al. 2007; Nepi 2017). A composição do néctar produzido está intimamente ligada aos eventos de visitaçã (Baker e Baker 1977; Cruden et al. 1983; Nepi 2017). Em *C. speciosus*, formigas são vistas se alimentando de néctar exsudado nas folhas e sépalas. Adicionalmente, em trabalhos de campo, foram notadas formigas patrulhando os ápices das pétalas de flores em pré-antese e antese, indicando a existência de estruturas secretoras nessa região que não foram ainda investigadas. A caracterização química da secreção é um dado importante nos estudos ecológicos que visam avaliar a interação entre *C. speciosus* e os insetos visitantes, tanto polinizadores quanto defensores.

Pretende-se por meio deste estudo responder aos seguintes questionamentos: Anatomicamente os nectários da folha, sépala, pétala são semelhantes? Existe assincronia na fase secretora dos nectários? Qual a natureza química do néctar exsudado e sua relação com os visitantes? O disco glandular exhibe padrão anatômico de uma estrutura secretora de néctar?

## 2. Material e métodos

### 2.1 Amostragem e área de coleta

As coletas foram realizadas no Parque Estadual Serra de Ouro Branco (Ouro Branco, MG, Brazil), uma área de proteção ambiental de interesse ecológico e social de 7.520 hectares, cuja fitofisionomia predominante é de campo rupestre (Fig. 1A), situada entre as coordenadas geográficas S 20°30'115.7'' W 043°38'29.5'' e S 20°30'12.9'' W043°38'43.1''. As expedições de campo foram realizadas tanto nos períodos mais secos, de Maio a Outubro como nos períodos chuvosos de Novembro a Abril. Foram coletadas amostras de folhas do terceiro nó em direção ao ápice, botões florais e flores expandidas, exsudado nas sépalas e folhas e formigas que foram vistas visitando os nectários. Registros fotográficos foram obtidos com câmera fotográfica modelo Nikon D7000 com resolução de 16.2 megapixels. O espécime Voucher foi depositado no herbário da Universidade Federal de Viçosa sob o número VIC 49368.

### 2.2 Microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV)

Para o estudo anatômico, as amostras foram fixadas em FAA (Formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50% 1:1:18, por volume) durante 48h sob vácuo e armazenadas em etanol 70% (Johansen 1940). Posteriormente foram desidratadas em série etanólica e incluídas em resina metacrilato (Historesin Leica, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). Para a descrição anatômica e ontogenia foram obtidas secções transversais e paradérmicas (5 µm de espessura), utilizando um microtomo rotativo automático (Leica RM2265; Deerfield, IL), que foram coradas com azul de toluidina em pH 4.7 (O'Brien e McCully 1964) e montadas em resina sintética (Permount; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas utilizando um microscópio de luz (AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com um sistema U-photo e uma câmera digital AxioCam HRc (Carl Zeiss Microscopy, Gottingen, Alemanha).

Para MEV, parte das amostras de folhas, sépalas, pétalas e disco glandular fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50% 1:1:18) foram submetidas à desidratação em série etanólica, secagem a ponto crítico (modelo CPD

030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), montagem em suporte metálico e cobertura com ouro em metalizador (modelo SCA 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A observação e registro fotográfico foram realizados em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### 2.3 Análise química do néctar

O néctar exsudado pelos nectários das sépalas e folhas foi coletado em microtubos (Eppendorf), congelado em nitrogênio líquido e mantido em ultra freezer a - 80°C. Quando não foi possível a coleta em campo, espécimes inteiros foram mantidos em casa de vegetação, plantados em vasos com o mesmo solo em que foram coletados e inseridos em campânulas de vidro até a exsudação e coleta da secreção em quantidades suficientes para análise (Fig. 2A, B, C), o que durou cerca de 6 horas. A coleta nas sépalas foi realizada no mês de abril que caracteriza o período de alta floração. Nas folhas, a coleta ocorreu no mês de novembro, período que se observa maior exsudação de néctar nessas estruturas. Açúcares (glicose, frutose e sacarose), proteínas e aminoácidos foram avaliados quimicamente. Cinco microlitros de secreção foram transferidos para um microtubo contendo 5 µL de etanol 70%. Deste volume, foi retirada uma alíquota de 5 µL para reação em meio contendo NAD<sup>+</sup>, ATP, tampão imidazol, desidrogenase da glicose-6-fosfato. As concentrações de hexoses (glicose, frutose e sacarose), aminoácidos totais e proteínas (método de Bradford) foram quantificadas em três etapas por meio de adição das enzimas hexocinase, fosfoglicoisomerase e por último invertase, sendo quantificada a redução do NAD<sup>+</sup> a NADH (Praxedes et al. 2006).

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas da UFV.

### 2.4 Identificação dos visitantes

Formigas vistas se alimentando de néctar nas folhas, sépalas e pétalas foram coletadas e mantidas em etanol 70%. A identificação das espécies visitantes foi realizada no Laboratório de Ecologia de Comunidades da UFV.

### 3. Resultados

Gotas de secreção são acumuladas na face externa das sépalas e ápices das pétalas e são visitadas por formigas (Fig. 1B, C, D). O comportamento agressivo e de patrulhamento contínuo de formigas foi registrado no período seco e no período chuvoso, sendo *Camponotus crassus* Santschi e *C. rufipes* Fabricius as espécies de formigas que visitaram os nectários das folhas, sépalas e pétalas (Fig. 1B, C, D). Durante a fenofase floral, notou-se maior visitação nas sépalas e pétalas, do que nas folhas, onde as gotas de néctar eram mais volumosas. Em contrapartida, na fenofase vegetativa, a exsudação nos nectários foliares é abundante, principalmente nas folhas jovens.

As gotas secretadas pelas sépalas e folhas são incolores e translúcidas e foram detectadas variações discrepantes na concentração de açúcares nas análises químicas realizadas (Tab. 1). A concentração geral de açúcares na secreção das sépalas é 25 vezes maior que das folhas (Tab. 1), o que pode estar correlacionado às diferenças notadas em campo quanto à viscosidade da secreção produzida pelas sépalas (mais viscosa) e pelas folhas (mais líquida). Nos exsudados da folha não foi possível detectar glicose, contrastando com o resultado obtido para o exsudado das sépalas que apresentou 100.53 g/L de glicose, sendo essa a maior concentração dentre todos os açúcares analisados. Frutose se apresentou 1,39 vezes maior na secreção da sépala em relação à secreção na folha e sacarose 819 vezes maior na sépala que na folha. Embora proteínas não tenham sido detectadas, os aminoácidos estavam presentes em concentrações equivalentes nas amostras dos exsudados das sépalas e folhas, em concentração 1,10 vezes maior no exsudado das sépalas que no foliar (Tab. 1).

Os nectários das sépalas, pétalas e folhas são anatomicamente semelhantes (Fig. 3). São avascularizados e formados por 3 a 5 células de paredes labirínticas em torno de uma célula secretora central, configurando uma estrutura em forma da roseta (Fig. 3B, C, D). Estas estruturas têm origem protodérmica e seguem o mesmo padrão de diferenciação nos diferentes órgãos. O estágio inicial é marcado por um conjunto de células que se tornam mais volumosas e possuem núcleos proeminentes, citoplasma denso e paredes finas e pectocelulósicas (Fig. 4A). Três a quatro células começam a se dispor em um arranjo radiado com os núcleos voltados para a porção central que é demarcada por uma célula de citoplasma denso (Fig. 4B). Na etapa seguinte, as células externas assumem um tamanho mais volumoso que a central e,

com o deslocamento do núcleo para o polo oposto, forma-se na porção voltada para a célula central a parede labiríntica (Fig. 4C). No estágio final as células radiadas ficam maiores, ocupadas em grande parte pelas paredes labirínticas e o núcleo é deslocado para a posição contrária à célula central (Fig. 3B detalhe, 4D). A parede celular da célula central é duplamente mais espessa do que as células da radiadas.

Na base do ovário, existe uma região levemente mais dilatada, com aspecto glandular (Fig. 5A). Esse tecido apresenta estrutura anatômica constituída por epiderme em paliçada cujas células apresentam núcleos proeminentes e paredes finas (Fig. 5B, D). O parênquima subepidérmico é formado por células isodiamétricas que apresentam paredes finas e núcleos proeminentes como as células em paliçada formando a epiderme (Fig. 5C, D). Terminações vasculares xilemáticas e floemáticas confluem para o parênquima subepidérmico, vascularizado predominantemente por floema (Fig. 5 C). Durante o período de coleta, não foram observados visitantes na glândula do ovário, tampouco foi visualizada exsudação em quantidade suficiente para proceder às análises químicas.

Testes histoquímicos foram realizados na glândula (Tab. 2). Os testes para detecção de lipídeos foram fortemente positivos na região da epiderme em paliçada (Fig. 6A, Tabela 3) e amido foi detectado tanto na epiderme em paliçada quanto no parênquima subepidérmico (Fig. 6B, Tabela 3). Conteúdo citoplasmático de natureza péctica, polissacarídica e proteica não foi detectado a partir dos testes realizados, sendo observada apenas a coloração específica de parede celular e núcleo (Fig. 6C, D, E, F, Tabela 3).

#### **4. Discussão**

A análise química das gotas coletadas nas sépalas e folhas de *C. speciosus* no presente trabalho demonstrou a presença de açúcares e aminoácidos em concentrações variadas. Delgado et al. (2011a) analisou quimicamente o néctar exsudado nas folhas, apresentando concentrações de 3.34, 3.38, e 1.04  $\mu\text{M}$  de glicose, frutose e sacarose, respectivamente. As diferenças na composição de açúcares no néctar produzido pelas folhas nessa mesma espécie (Delgado et al. 2011) pode ser devida a diferença no procedimento de coleta, já que o período foi o mesmo (novembro para os dois estudos). No presente trabalho, as gotas foram diretamente coletadas na folha e acondicionadas em tubos plásticos os quais foram imediatamente

armazenados em um recipiente térmico contendo nitrogênio líquido, evitando assim que a sacarose fosse quebrada em seus constituintes, glicose e frutose (Vollhardt e Schore 2013). No trabalho que foi conduzido anteriormente (Delgado et al. 2011), as gotas foram submetidas a diluição para se proceder as análises e o congelamento nas amostras não foi instantâneo a coleta o que pode ter gerado quebra de sacarose em glicose e frutose, além da alta diluição em água, que também compromete os resultados. Isso explica a presença de glicose nas análises anteriores de Delgado et al. (2011) e a não detecção da glicose nesse estudo para o néctar secretado nas folhas no mesmo período do ano.

A atividade secretora dos nectários se dá de forma precoce, sendo facilmente observado nos trabalhos de campo realizados nectários sendo visitados por formigas desde o início do botão floral. Nas análises do desenvolvimento anatômico, sépalas ainda indiferenciadas já apresentam nectários totalmente expandidos e em funcionamento. A atividade dos nectários em atrair formigas se encaixa na hipótese proposta por Del-Claro et al. (2016), onde a planta responde a pressão ecológica exercida pelos herbívoros de forma defensiva química, secretando, através de NEF, alimento que irá atrair predadores, como formigas, aranhas ou vespas. Em *C. speciosus*, essa hipótese se estende aos NF localizados nas sépalas e pétalas, que exercem a mesma função dos nectários foliares, atraindo formigas que os forrageiam de forma ininterrupta durante a floração. Da mesma forma, durante o período vegetativo, os nectários foliares são visitados continuamente. A assincronia da fase secretora depende do tipo de nectário, sendo os NEF mais ativos durante a fenofase vegetativa, quando não há demanda de fotoassimilados a serem destinados a produção de frutos numa alta razão fonte-dreno. Em contrapartida, no início da floração até completa senescência das flores, a exsudação de néctar é visivelmente maior nas sépalas e pétalas em relação as folhas. O aumento da produção de néctar nos órgãos florais atrai mais formigas, conferindo mais proteção às flores até a produção de sementes. Apesar da baixa produção de néctar nas folhas no período de floração, a proteção contra herbívoros ainda é oferecida por formigas.

A composição do néctar também influencia os eventos de visitação. Estudos sugerem hipóteses mais aprofundadas sobre a função do néctar em suas diferentes composições (Heil 2016), porém é sabido que a composição da secreção envolve dois fatores principais, sendo eles a atração mutualística ou a repelência de agentes pilhadores e ladrões de néctar (Torezan-Silingard 2012). A dieta dos consumidores

de néctar varia e é a composição da secreção que determina o tipo de consumidor (Nepi 2012), sendo os carboidratos e aminoácidos contidos no néctar mais importantes na função de atração. Apesar de algumas espécies de formigas não possuírem invertase, enzima de clivagem de sacarose, optando assim por néctar sem sacarose (Heil et al. 2005; Martínez del Rio 1990), formigas nectaríferas em geral preferem NEF que secretam néctar com quantidades consideráveis de açúcares e presença de aminoácidos (Nicolson et al. 2007). Entretanto, segundo Pacini e Nicolson (2007), o néctar mais aquoso é um recurso importante para visitantes, como ocorre nos nectários foliares de *C. speciosus*, que secreta néctar com concentrações mais baixas de açúcares. Na fenofase floral da espécie, o néctar exsudado nos NF se apresenta 25 vezes mais concentrado em açúcares que o exsudado nos NEF na fenofase vegetativa.

Os nectários presentes nas folhas, sépalas e pétalas são anatomicamente semelhantes. Cada unidade secretora de aproximadamente 50 µm é constituída de 3 a 5 células com núcleos proeminentes e paredes invaginadas - paredes labirínticas - em torno de uma célula central, constituindo a configuração de uma roseta. Agrupados, formam uma estrutura macroscópica visível a olho nu, onde também se observa a gota de secreção. Dejean et al. (2011) ao observar tais estruturas com o auxílio de um estereomicroscópio nos ápices petalares e exterior do cálice em *Chelonanthus alatus* (Aubl.) Pulle (Gentianaceae), os classificou como poros estomáticos por onde a secreção nectarífera é exsudada. Esta classificação está equivocada, sendo necessários estudos anatômicos que comprovem a anatomia da estrutura secretora em questão. Pelas características observadas em comum a *C. speciosus*, como gotas de secreção consumidas por formigas no exterior do cálice e ápices das pétalas, é possível inferir que, como é amplamente observado em Gentianaceae, essas estruturas em *Chelonanthus alatus* se tratam de nectários livres de estômatos.

Através dos estudos anatômicos realizados nos nectários de *C. speciosus* foi possível perceber que as paredes da célula central são duplamente mais espessas que as paredes das células da radiadas. Paredes labirínticas têm como função aumentar a área de absorção e promover com mais eficiência uma série de transportes intensos de curta distancia (Gunning e Pate 1969). Essa espessura menor na parede das células radiadas pode favorecer a atividade de transporte do material a ser exsudado. Em geral, a membrana plasmática acompanha o arranjo das paredes labirínticas e em *C. speciosus* ainda se desconhece a conexão estabelecida entre as células radiadas e a

célula central da em relação as paredes labirínticas. Assim, somente estudos ultraestruturais complementares poderão esclarecer as dúvidas e elucidar os mecanismos de produção e exsudação de néctar por esse tipo incomum de nectário.

É incomum a observação de nectários florais não envolvidos na função de polinização. Este estudo coloca em evidência essas características atribuídas a NEF ao NF presente na sépala, que apresenta a mesma função de defesa oferecida por formigas que visitam os nectários foliares. Apesar de não ter sido possível proceder as análises químicas do néctar secretado nas pétalas, de acordo com as observações de campo (onde as formigas apresentam o mesmo comportamento nos nectários foliares, sepalares e petalares), os nectários presentes nos três órgãos possuem a mesma função em atrair formigas que protegem a planta de eventuais ataques de herbívoros. A prevenção contra os ataques de microrganismos está relacionada com a presença de compostos secundários e proteínas antimicrobianas como *nectarins* (Heil 2011), substâncias não detectadas nas análises químicas.

Os testes histoquímicos e caracterização estrutural realizados na glândula do ovário não permitem afirmar que essa estrutura secreta néctar. Diferentemente do observado nos NF e NEF a reação para lipídeos foi positiva e se deu fortemente na região das células em paliçada. O néctar é uma substância hidrofílica e não há relatos de sua passagem por células de conteúdo citoplasmático altamente lipofílico em direção ao meio externo. A reação positiva para amido tanto na epiderme em paliçada quanto no parênquima subepidérmico representa uma característica comum à órgãos florais, não apresentando relação direta ou conclusiva sobre produção de exsudados no parênquima.

## **5. Conclusão**

As unidades secretoras presentes nos ápices das pétalas são nectários e são anatomicamente semelhantes às descritas para as folhas e sépalas. Não são vascularizadas e com um canal secretor central, como se pensava. Existe assincronia nas fases de secreção dos nectários florais e extraflorais e diferenças evidentes nas concentrações de açúcares no néctar das sépalas e folhas. A produção de aminoácidos é equivalente e proteínas não foram detectadas nas análises.

Tanto os NF quanto os NEF da espécie estudada são extra nupciais, e a secreção produzida por tais estruturas promove a interação com as formigas, em uma relação mutualística.

Embora a glândula na base do ovário se apresente com aparência de tecido secretor, os testes histoquímicos não sugeriram atividade secretora como foi observado nos NF e NEF através dos mesmos testes.

Este trabalho representa o primeiro estudo da secreção, anatomia e ontogenia de nectários florais em *Calolisianthus*.

## 6. Tabelas e figuras

Tabela 1. Concentrações de açúcares (g/L), proteínas e aminoácidos gerais (mM) exsudados pelos nectários das folhas e sépalas de *Calolisianthus speciosus*. ND = Não detectado.

Secreção	Açúcares				Proteínas	Aminoácidos
	Glicose	Frutose	Sacarose	Geral		
Folha	ND	4.81	0.02	4.83	ND	2.06
Sépala	100.53	6.73	16.38	123,64	ND	2.28

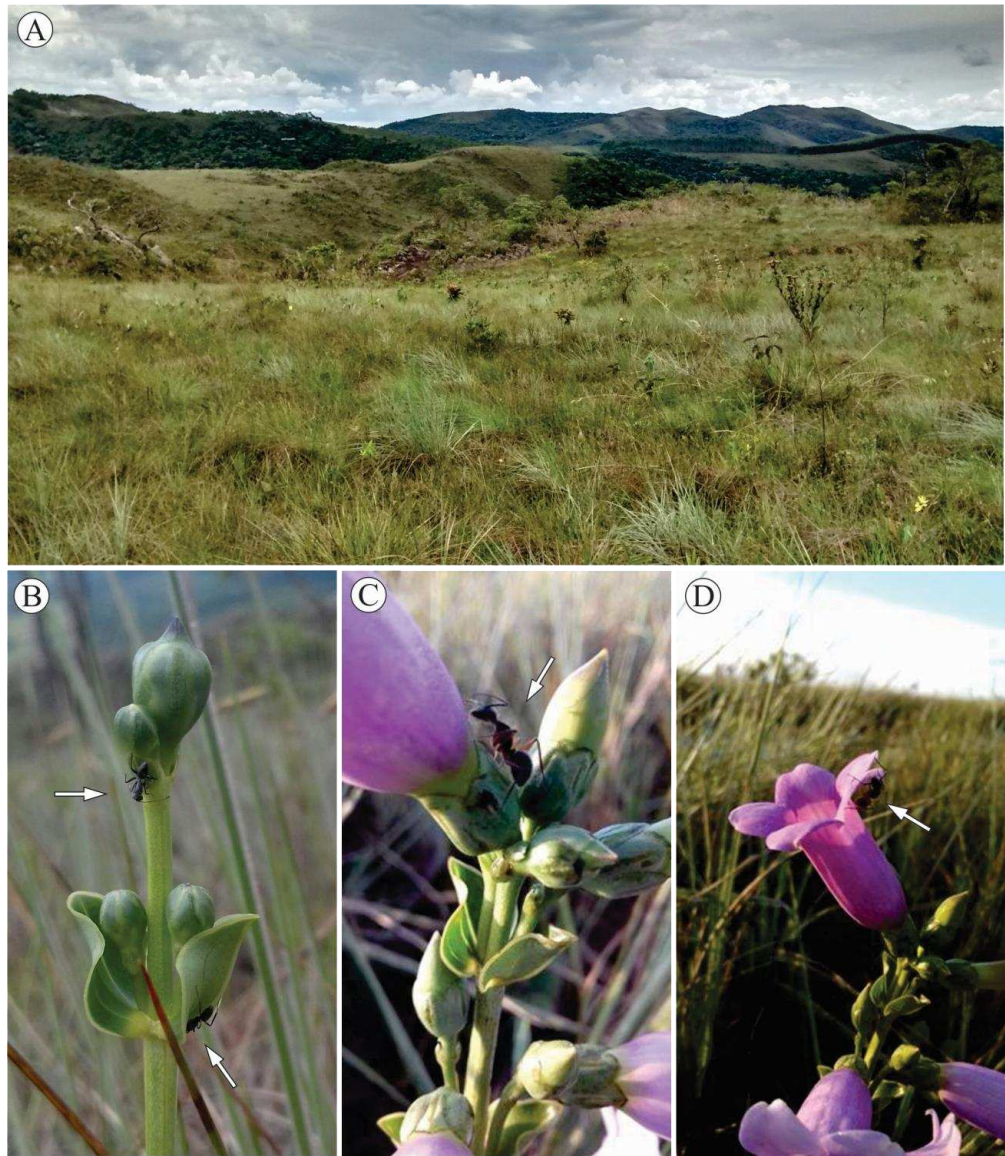
Tabela 2: Testes histoquímicos realizados na glândula do ovário de *Calolisianthus speciosus*.

Grupo metabólico	Reagente	Referência
Carboidratos	Polissacarídeos neutros	PAS (reagente de Schiff/ácido periódico) (1981)
	Amido	Lugol
	Pectinas	Vermelho de rutênio
Proteínas	Xilidine Ponceau	O'Brien e McCully (1981)
	Azul de Coomassie	Fisher (1968)
Lipídeos gerais	Sudan IV	Johansen (1940)
	Sudan Black B	Pearse (1980)

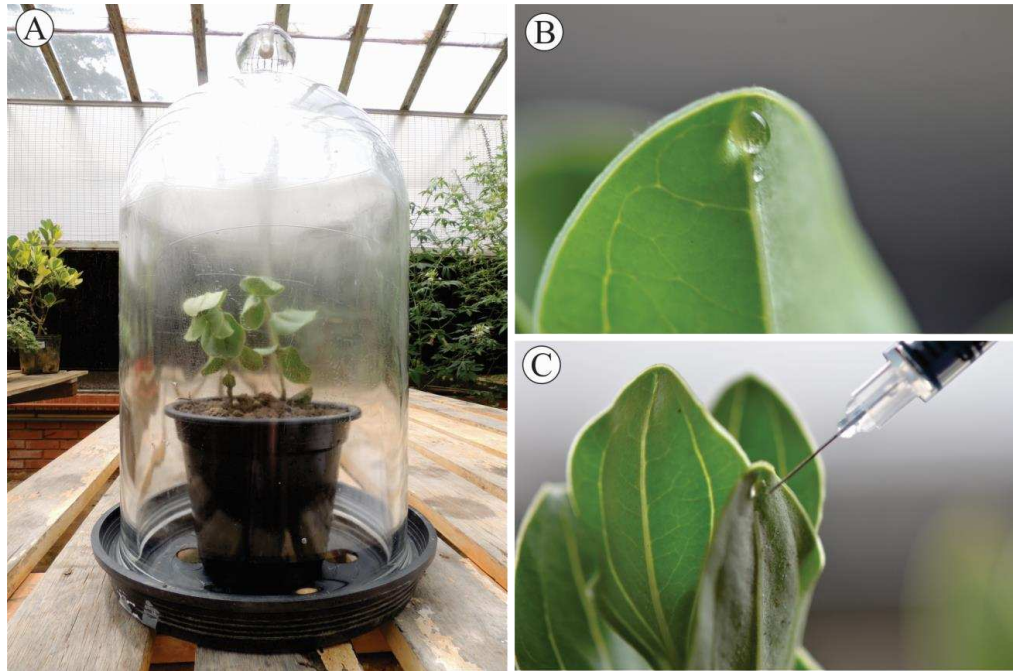
Tabela 3. Reações aos testes histoquímicos realizados na glândula do ovário em *Calolisianthus speciosus*.

Compostos	Reação	Compostos	Reação
Lipídios totais	+	Amido	+
Proteínas	-	Pectinas	-
Polissacarídeos neutros	-	Fenóis	-

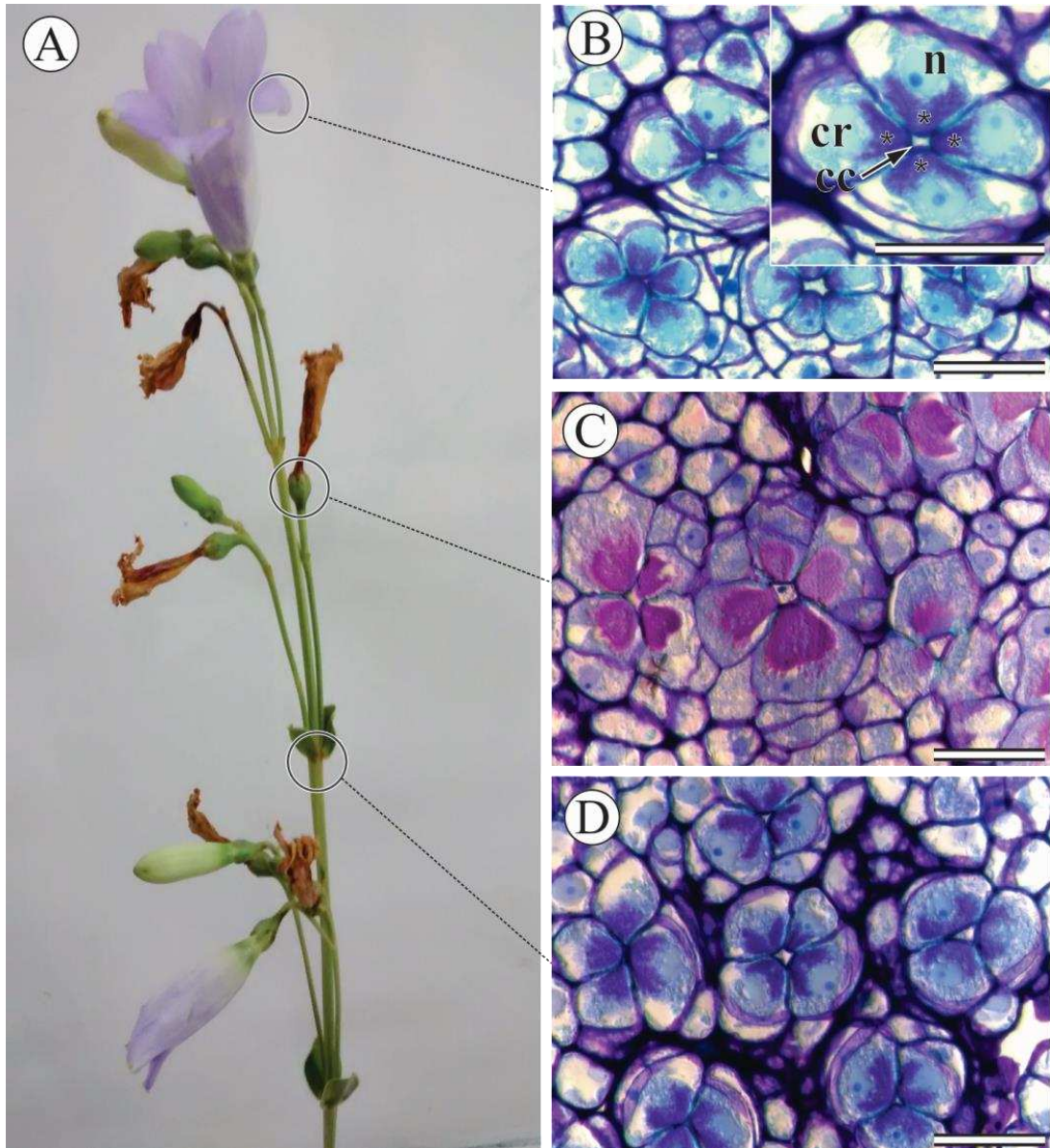
+ (reação positiva); - (reação negativa)



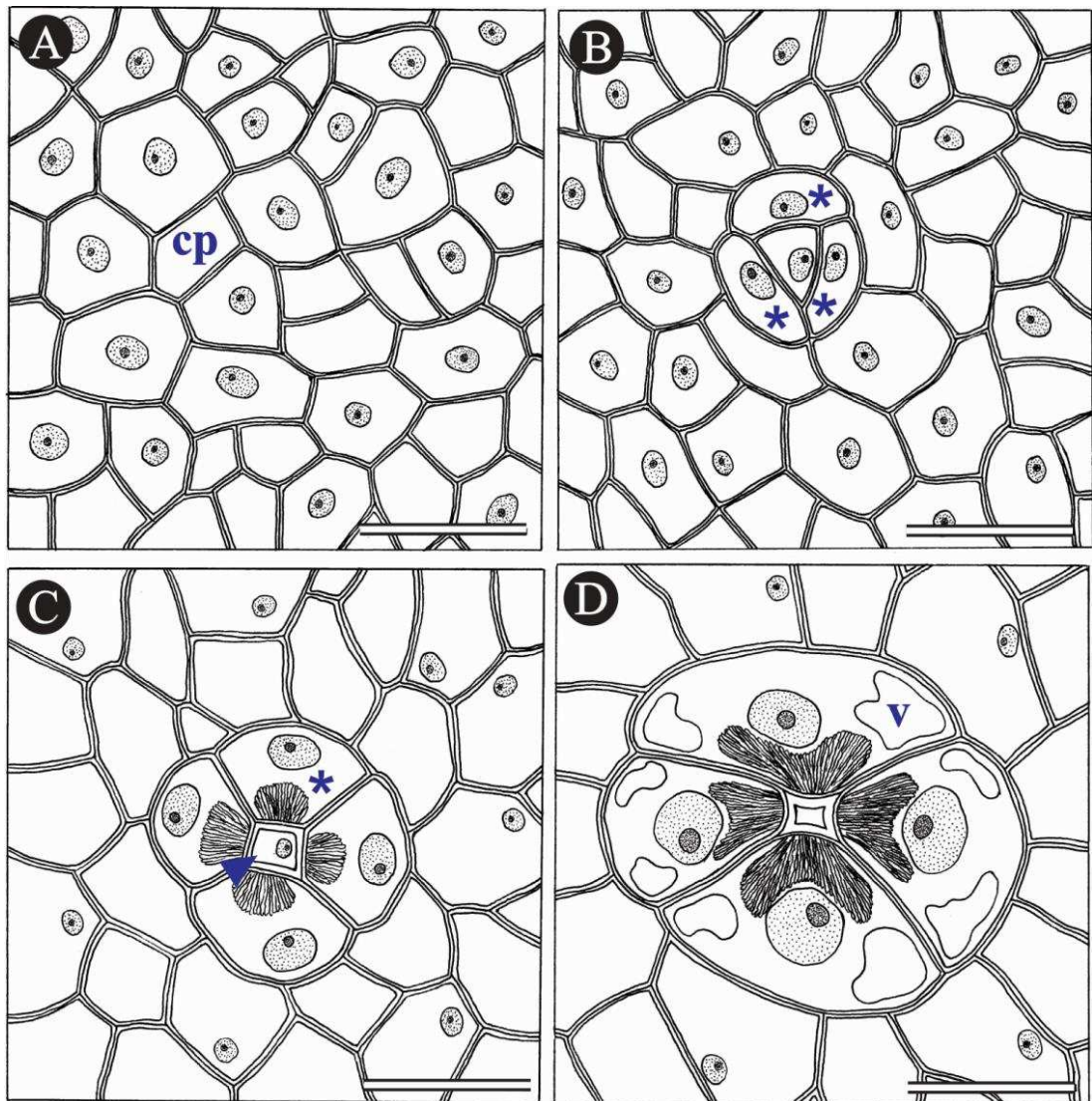
**Figura. 1.** Área de coleta e localização dos nectários de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Área de coleta na Serra de Ouro Branco (MG). **B.** Formigas do gênero *Camponotus* forrageando os nectários foliares e sepalares ainda no botão floral (seta). **C.** Formiga do gênero *Camponotus* no nectário das sépalas expandidas (seta). **D.** Formiga do gênero *Camponotus* coletando gota de secreção no ápice da pétala (seta).



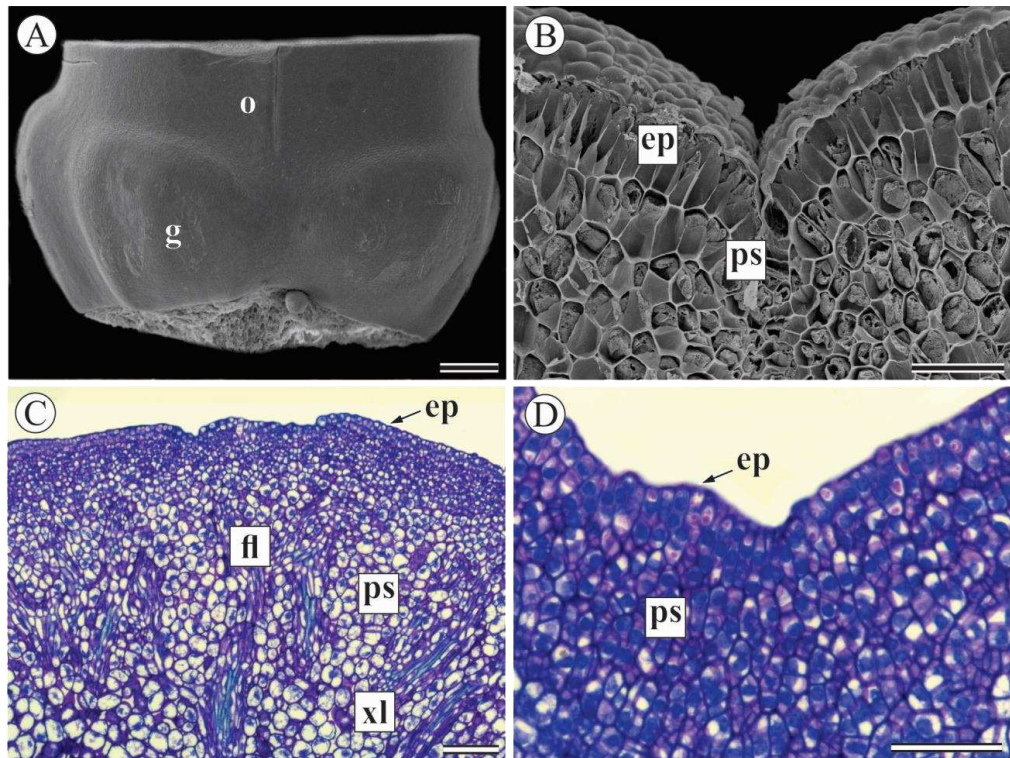
**Figura. 2.** **A.** *Calolisianthus speciosus* mantido isolado em casa de vegetação até exsudação suficiente de néctar para coleta e análise. **B.** Gota de secreção nos nectários presentes no ápice da folha. **C.** Coleta realizada com o auxílio de uma seringa.



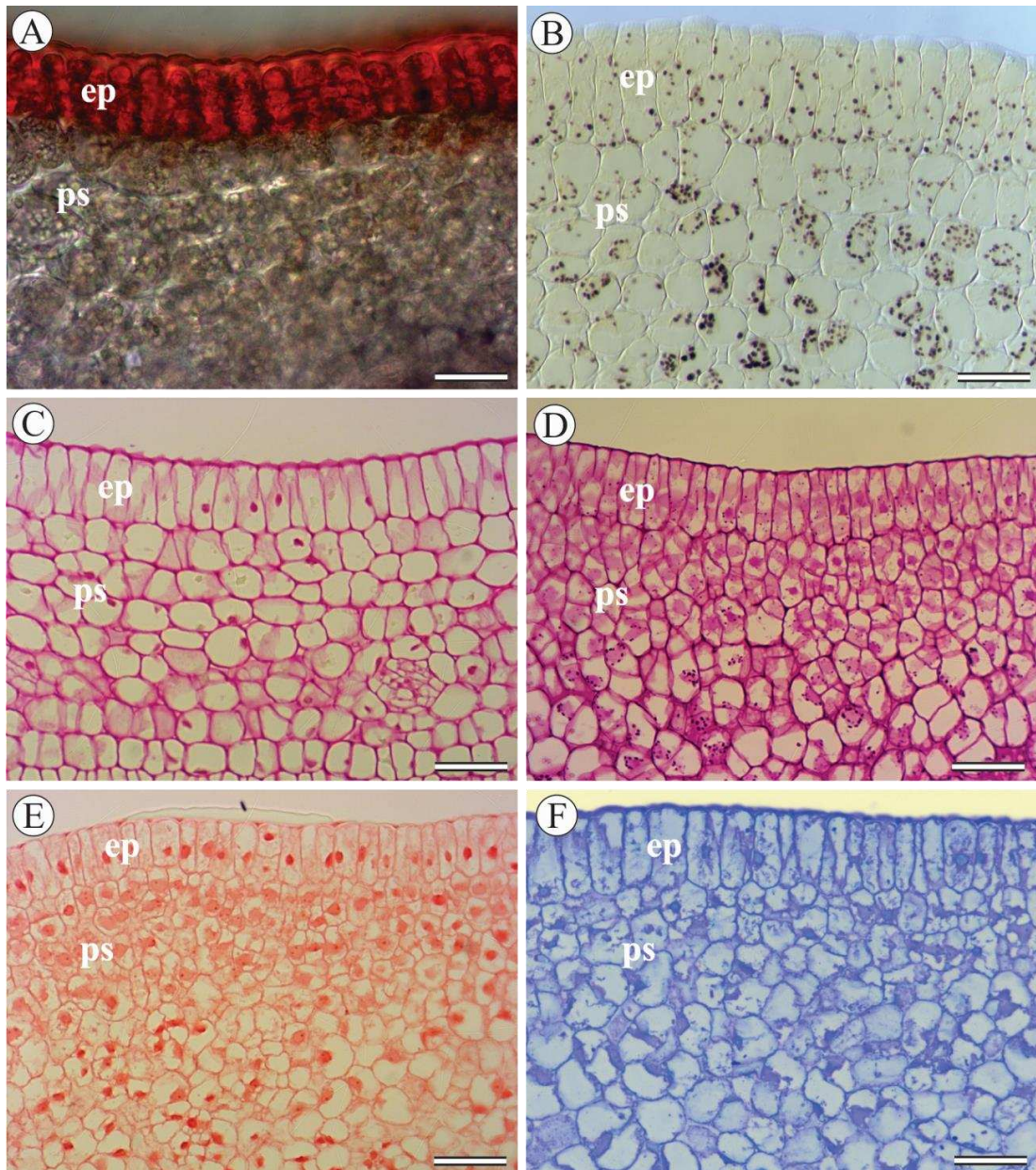
**Figura. 3.** Anatomia dos nectários de *Calolisianthus speciosus*. Vista frontal. **A.** Localização dos nectários. **B.** Aglomerados de nectários no ápice das pétalas com detalhe da unidade secretora. **C.** Nectários na face abaxial das sépalas e **D.** Nectários na base das folhas. asterísco= paredes labirínticas, cc= célula secretora central, cr = célula radiada, n = núcleo. Coloração azul de toluidina. Barra: 50 µm.



**Figura. 4.** Ontogenia dos nectários das folhas, sépalas e pétalas de *Calolisianthus speciosus* **A.** Células protodérmicas comuns. **B.** Arranjo das células secretoras radiadas (asterisco) e delimitação da célula central. Note o núcleo posicionado na região voltada para a célula central. **C.** Início da formação das paredes labirínticas e em consequência o deslocamento do núcleo para o polo oposto, note que a célula central possui tamanho um pouco menor que as células radiadas. **D.** Estádio final de diferenciação com as células radiadas maiores que a central, paredes labirínticas ocupando grande parte da célula e núcleo das células radiadas opostos a célula central. cp= célula protodérmica, n= núcleo, v= vacúolo. Barra 30  $\mu$ m.



**Figura 5.** Glândula na base do ovário em microscopia eletrônica de varredura (**A, B**) e corte transversal corado em azul de toluidina (**C, D**). **A.** visão frontal da glândula. **B.** Sessão transversal da epiderme em paliçada. **C.** Vascularização predominante em floema no disco. **D.** Detalhe da epiderme em paliçada e parênquima subepidérmico. dg= disco glandular; ep= epiderme em paliçada, fl= floema, o=ovário, ps= parênquima subepidérmico, xl= xilema. A: Barra: 400  $\mu\text{m}$ . B: Barra: 80  $\mu\text{m}$ . C: Barra: 100  $\mu\text{m}$ . D: Barra: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.** Testes histoquímicos realizados na glândula da base do ovário de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Reação positiva para lipídeos na epiderme em paliçada através do reagente Sudan III. **B.** Confirmação da presença de amido através do reagente Lugol. **C.** Vermelho de rutênio evidenciando pectinas coradas em rosa. **D.** Reagente de Schiff/ácido periódico indicando presença de polissacarídeos neutros. **E,** **F.** Testes para detecção de proteínas através dos reagentes Xilidine Ponceau e azul de Coomassie, respectivamente. ep= epiderme em paliçada, ps= parênquima subepidérmico. Barra= 30 µm.

## 7. Referências

- Agostini K, Lopes AV, Machado IC. 2014. Recursos florais. In: Rech, A.R.; Agostini, K.; Oliveira, P.E., Machado, I.C. (eds.). *Biologia da Polinização*. Pp 135. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, Brasil.
- Agostini K, Sazima M, Galetto L. 2011. Nectar production dynamics and sugar composition in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae) with different specialized pollinators. *Naturwissenschaften* 98: 933-942.
- Baker DA, Hall JL, Thorpe JR. 1978. A study of the extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. *New Phytologist* 81: 129-137.
- Baker HG, Baker I. 1977. Intraspecific constancy of floral nectar amino acid complements. *Botanical Gazette* 138: 183-191.
- Baker HG, Baker I. 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley, B., Elias, T.S. *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- Beattie AJ. 1985. *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*. Cambridge University Press, New York.
- Bentley B, Elias TS. 1983. *The Biology of Nectaries*. Columbia University Press, local. pp. 174-203.
- Martínez del Rio C. 1990. Phylogenetic and ecological correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiological Zoology* 63: 987-1011.
- Calió MF. 2009. *Sistemática de Helieae Gilg (Gentianaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Caspary R. 1848. *De Nectariis*. PhD Thesis. Bonn: Elverfeldae.
- Cruden RW, Herman SM, Peterson S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. In: Bentley, B. and Elias, T.S. (Eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2013. Extrafloral nectaries in neotropical Gentianaceae: Occurrence, distribution patterns, and anatomical characterization. *American Journal of Botany* 100: 1779-1789.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2017. Are stem nectaries common in Gentianaceae Juss.?. *Acta Botanica Brasilica* 31: 403 - 410.
- Dejean A, Corbara B, Leroy C, Delabie JH, Rossi V, Céréghino R. 2011. Inherited biotic protection in a Neotropical pioneer plant. *Plos One* 6: 18071.
- Del-Claro K, Rico-Gray V, Torezan-Silingardi HM, Alves-Silva E, Fagundes R, Lange D, Rodriguez-Morales D. 2016. Loss and gains in ant-plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux* 63: 207-221.

- Delgado MN. 2008. Caracterização morfoanatômica de espécies de Gentianaceae ocorrentes em áreas de cerrado e campo rupestre em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Delgado MN, Azevedo AA, Valente GE, Kasuya MCM. 2011b. Comparative anatomy of *Calolisianthus* species (Gentianaceae-Helieae) from Brazil: taxonomic aspects. *Edinburgh Journal of Botany* 68: 139-155.
- Delgado MN, Silva LC, Bão SN, Morais HC, Azevedo AA. 2011a. Distribution, structural and ecological aspects of the unusual leaf nectaries of *Calolisianthus* species (Gentianaceae). *Flora* 206: 676-683.
- Delpino F. 1873. Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla Dicogamia nel regno vegetale. Delle piante zooifile. *Atti della Società italiana di scienze naturali* 16: 151–349.
- Do Nascimento EA, Del-Claro K. 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora* 205: 754–756.
- Durkee LT. 1983. The ultrastructure of floral nectaries. In: Bentley, B., Elias, T.S. *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- Elias TS, Gelband H. 1975. Nectar, its production and functions in trumpet creeper. *Science* 189: 289-291.
- Elias TS, Gelband H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63: 1349-1353.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, New York.
- Galetto L, Bernardello G. 1995. Characteristics of nectar secretion by *Lycium cestroides*, *L. ciliatum* (Solanaceae), and their hybrid. *Plant Species Biology* 11: 157-163.
- Guimarães EF, Dalvi VC, Azevedo AA. 2013. Morphoanatomy of *Schultesia pachyphylla* (Gentianaceae): a discordant pattern in the genus. *Botany* 91: 830-839.
- Gunning BES, Pate JS. 1969. "Transfer cells" plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes - their occurrence, structure, and development. *Protoplasma* 68: 107-13.
- Heil M, Rattke J, Boland W. 2005. "Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism." *Science* 308: 560-563.
- Heil Martin. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science* 16: 191-200.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw- Hill, New York.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro, Brasil.

- Nepi M. 2017. New perspectives in nectar evolution and ecology: simple alimentary reward or a complex multiorganism interaction?. *Acta Agrobotanica* 70: 1704.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007. *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007. *Nectaries and Nectar*, Springer, New York.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 367-373.
- Oliveira PS, Freitas AVL. 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557-570.
- Passini E, Nepi M. 2007. Nectar production and presentation. *In*: Nicolson SW, Nepi M, Passini E. (eds.) *Nectaries and Nectar*. Springer, New York.
- Peil RMN, Gálvez JL. 2005. Reparto de materia seca como factor determinante de la producción de las hortalizas de fruto cultivadas em invernadero. *Revista Brasileira Agrociência* 11: 05-11.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Maria MA, Cordeiro AT. 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 263-273
- Roshchina VV, Roshchina VD. 1993. *The excretory function of higher plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Rudgers JA. 2004. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. *Ecology* 85: 192-205.
- Struwe L, Albert VA. 2002. *Gentianaceae: systematics and natural history*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Torezan-Silingard HM. 2012. Flores e animais: uma introdução a história natural da polinização. *In*: Del-Claro K, Torezan-Silingard HM. (eds.) *Ecologia das Interações Plantas-Animais: uma abordagem ecológico-evolutiva*. Technical Books, Rio de Janeiro.
- Vollhardt P, Schore N. 2013. *Química orgânica: estrutura e função*. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 1416 p.

## CAPÍTULO 3

### **Ultraestrutura e histoquímica nos nectários das folhas, pétalas e sépalas de *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schltdl.) Gilg (Helieae - Gentianaceae): desvendando o papel das paredes labirínticas no processo de exsudação**

#### **Resumo**

Gentianaceae Juss., apresenta nectários anatomicamente incomuns. Eles são pequenos, avascularizados, formados por 3 a 5 células radiadas com paredes labirínticas em torno de uma célula secretora central. Em *Calolisianthus speciosus* tais estruturas formam agregados visíveis a olho nu na base abaxial e ápice da lâmina foliar, exterior do cálice e ápices das pétalas com gotas de secreção. Objetivamos desvendar o papel das paredes labirínticas e da célula central no mecanismo de secreção e exsudação de néctar. Amostras de folhas, sépalas e pétalas foram processadas conforme metodologia usual para microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Testes histoquímicos detectaram polissacarídeos na região da parede labiríntica e proteínas no citoplasma. Os dados histoquímicos estão de acordo com as análises ultraestruturais realizadas. As paredes labirínticas aumentam a superfície de contato com o citoplasma das células radiadas onde o pré-néctar é convertido em néctar e conduzem a secreção até a célula central, onde é acumulado. A exsudação ocorre através do rompimento da cutícula da célula central devido acúmulo da secreção no espaço subcuticular. O mecanismo de secreção e exsudação do néctar foi elucidado, bem como as organelas celulares envolvidas nesses processos. Este trabalho representa os primeiros estudos histoquímicos e ultraestruturais em nectários florais de *Calolisianthus*.

**Palavras-chave:** nectários florais, nectários extraflorais, néctar, testes histoquímicos, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura.

## 1. Introdução

Nectários secretam néctar, uma solução açucarada que permite interação entre plantas e animais (Rudgers 2004; Nicolson et al. 2007), contribuindo com os mecanismos de polinização (Torezan-Silingard 2012) ou defesa (Del-Claro 2016) em diferentes espécies de plantas. Embora existam variações morfoanatômicas, em forma geral, os nectários são vascularizados predominantemente por floema, sendo o néctar exsudado via epiderme que pode ser secretora ou possuir poros, os quais correspondem a estômatos que perderam a habilidade de fechar o ostíolo (Nepi 2007). Modelos foram propostos para explicar a exsudação do néctar por epidermes destituídas de estômatos (Paiva 2017), e esse tema tem sido assunto de amplo debate (Gaffal 2012).

*Calolisianthus speciosus* Gilg. (Gentianaceae) apresenta nectários microscópicos que formam agregados visíveis a olho nu na base e ápice da lâmina foliar, exterior do cálice e ápices das pétalas (Delgado et al. 2011 a; b; Dalvi et al. 2013; Capítulo 2). Essas estruturas exsudam néctar que atrai insetos, tendo sido observadas visitas de Formigas dos gêneros *Crematogaster*, *Camponotus*, *Brachymyrmex* e *Linepithema* (Delgado et al. 2011a; Capítulo 2).

Anatomicamente os nectários de *C. speciosus* (Delgado, 2008; Capítulo 1) e de outras espécies de Gentianaceae (Dalvi et al. 2013; 2017) foram considerados incomuns. Esses nectários foram primeiramente descritos como unidades nectaríferas (nectariólos) que eram vascularizados e constituídos por 3 a 8 células epidérmicas secretoras, radialmente dispostas, em torno de um canal central por onde o néctar é exsudado (Delgado et al. 2011a). As células secretoras com paredes labirínticas foram relatadas, mas não foi esclarecido o modo de secreção e exsudação do néctar (Delgado et al. 2011a). Em trabalhos posteriores, foi esclarecido que os nectários de Gentianaceae são avascularizados e que as células secretoras radiadas delimitam uma célula central por onde o néctar é eliminado (Dalvi et al. 2014; 2017; Capítulo 2). Entretanto a função da parede labiríntica das células radiadas e o envolvimento da célula central na exsudação do néctar não foram esclarecidos.

Os nectários de *C. speciosus* diferenciam-se precocemente a partir de células exclusivamente protodérmicas, que apresentam paredes primárias e finas, citoplasma denso, núcleo relativamente grande, voltado para a face da célula que mantém contato com a célula central. As células radiadas aumentam de tamanho e formam

paredes labirínticas nesta mesma face, e em consequência o núcleo é deslocado para a região oposta. Os nectários totalmente diferenciados são formados por uma célula central e por 3 a 5 células radiadas (Capítulo 2).

O presente trabalho tem por objetivo elucidar os compartimentos celulares envolvidos na secreção e exsudação do néctar nos nectários foliares e sepalares de *C. speciosus*. Pretende-se esclarecer a função das paredes labirínticas e avaliar como a célula central atua na exsudação do néctar.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Microscopia de luz**

Para as análises histoquímicas, amostras de folhas completamente expandidas, sépalas e pétalas em flores abertas foram fixadas em formalina neutra tamponada (Lillie, 1965) e conservadas em etanol 70% (Jensen, 1962). Cortes transversais das amostras foram obtidos em micrótomo de mesa (modelo LPC; Rolemberg & Bhering Trade and Bhering LTDA, Belo Horizonte, Brazil) e submetidos aos testes para detecção de lipídeos e compostos fenólicos descritos na tabela 1. As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada. O material também foi desidratado em série etanólica e incluído em metacrilato (Historesina Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Germany). Secções transversais e longitudinais do material vegetal, com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e submetidas aos testes histoquímicos para detecção de carboidratos e proteínas (tabela 1). As lâminas foram montadas em resina sintética Permount.

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (AX70TRF, Olympus Optical, Japão) equipado com sistema de captura de imagens (Ax Cam, Zeiss, Alemanha).

### **2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)**

Para MEV, amostras das regiões nectaríferas de folhas completamente expandidas, sépalas e pétalas em flores abertas fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético, etanol 50% 1:1:18) (Johansen 1940) foram submetidas à desidratação em

série etanólica, secagem a ponto crítico (modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), montadas em suporte metálico e cobertas com ouro em metalizador (modelo SCA 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein).

A observação e registro fotográfico foram realizados em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para a MET, amostras das sépalas e folhas foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (10-12 horas), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série etanólica e incluídas em resina LR White. Secções de 60-70 nm foram obtidas em ultramicrótomo (modelo LEICA EM FC6), e contrastadas com acetato de uranila 5%, em solução aquosa, e citrato de chumbo (Reynolds 1963).

A captura de imagens foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (modelo Morgani 268D, FEI Company e modelo Zeiss EM 109), com câmera digital acoplada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **3. Resultados**

#### **3.1 Testes histoquímicos**

Os nectários florais (sépalas e pétalas) e extraflorais (folhas) reagiram de forma similar aos testes histoquímicos (Tabela 2), exceto para a detecção de amido (reagente lugol), que foi positivo para as células radiadas e centrais apenas nos nectários foliares (Fig. 1A). Os testes para detecção de polissacarídeos evidenciaram reação forte na região do citoplasma onde se concentram as paredes labirínticas através do PAS para polissacarídeos neutros (Fig. 1B), pectinas/mucilagem pelo vermelho de Rutênio (Fig. C) e pelo azul da Alcian para polissacarídeos ácidos, embora a coloração dessa reação tenha sido menos intensa (Fig. 1D). Em contraste, os testes para detecção de proteínas através dos reagentes azul de Coomassie e Xilidine de Ponceau demonstraram reação mais intensa na região citoplasmática oposta a paredes labirínticas (Fig. 1E, F).

### 3.2 Caracterização ultraestrutural dos nectários

As células radiadas são mais volumosas que a célula central e estão em contato direto com as células parenquimáticas (Fig. 2A). A célula central apresenta formato em cunha, com a extremidade menor voltada para o interior, mas não mantém contato com o parênquima, pois as células radiadas se unem nessa região (Fig. 2A). As paredes das células radiadas que estão voltadas para a da célula central são primárias, labirínticas, enquanto que as paredes entre as células radiadas são primárias, retilíneas, finas, com lamela média evidente e plasmodesmos (Fig. 2B, C). Mitocôndrias e REG acompanham as invaginações das paredes labirínticas (Fig. 2D). O núcleo destas células está na região oposta à parede labiríntica, apresenta cromatina descondensada e muitas mitocôndrias e leucoplastos nas proximidades (Fig. 2E, F). São comuns no citoplasma pequenos vacúolos que se concentram nas proximidades das paredes adjacentes entre as células radiadas (Fig. 2G).

No citoplasma da célula central existem amplos vacúolos com material granuloso e as organelas citoplasmáticas e o núcleo ocupam posição parietal (Fig. 2A, 3A, B, C, D). A parede desta célula é mais espessa que as das células radiadas, porém apresenta aspecto estriado devido ao afrouxamento na estrutura (Fig. 3E, F).

### 3.3 Mecanismo de secreção e exsudação do néctar

Diferentes compartimentos estão envolvidos no processo de síntese nos nectários foliares e sepalares de *C. speciosus*. As mitocôndrias, os ribossomos livres, o REG e os dictiossomos visualizados no citoplasma destas células (Fig. 2D) estão envolvidos com a síntese dos polissacarídeos, proteínas (histoquimicamente detectados), e com o empacotamento e exportação via granulócina dos componentes do néctar, das células radiadas para as células centrais. O pré-nectar é oriundo dos fotoassimilados, água e sais minerais que são transportados pelo xilema e floema. Como a estrutura é avascularizada, esses componentes são transportados via simplasto e apoplasto, célula a célula até as células radiadas do nectário (Fig. 4). Uma vez dentro do citoplasma das células radiadas, o pré-néctar é transformado em néctar e é então transferido para a célula central via paredes labirínticas. Essas estruturas invaginadas aumentam a superfície de contato com o citoplasma, direcionando maiores quantidades de néctar até a célula central. Nas células centrais,

existe um acúmulo de secreção em vacúolos que pressionam as organelas citoplasmáticas contra a parede. Na face externa da célula central a cutícula encontra-se dilatada e em alguns locais nota-se um poro e/ou rompimento da cutícula (Fig. 5B, C, D, E). Em folhas e sépalas mais velhas foram comuns hifas fúngicas sobre a célula central (Fig. 5F).

#### 4. Discussão

Os testes histoquímicos demonstraram a presença de polissacarídeos, incluindo mucilagens tanto na região das paredes labirínticas quanto no citoplasma das células radiadas dos nectários estudados de *C. speciosus*. A reação mais intensa na região das paredes labirínticas das células radiadas que reagiu fortemente à polissacarídeos, era esperada, visto que os polissacarídeos são os principais constituintes das paredes primárias (Evert 2013). A mucilagem é um secretado rico em polissacarídeos que já foi mencionada na composição do néctar e está relacionada com a maior viscosidade (Santos et al. 2017). Considerando o ambiente dos campos rupestres, a maior viscosidade da secreção contribui para diminuição da evaporação da água presente no néctar e assim, torna-lo acessível aos visitantes por um tempo maior. Amido foi detectado somente nas células dos nectários foliares de *C. speciosus* em amostras coletadas durante a fenofase floral, quando a exsudação nas folhas era imperceptível e intensa nas sépalas e pétalas. Assim, é possível que a reserva de amido nas folhas garanta o restabelecimento inicial de secreção nas folhas após a senescência das flores. O amido de reserva comumente encontrado nos nectários florais, pode ser quebrado a qualquer momento do dia garantindo uma produção rápida de néctar (Peng et al. 2004; Nicolson et al. 2007). Proteínas, assim como as mucilagens também podem ser constituintes de néctar (Rocha e Machado 2009; Paiva e Machado 2006).

A reação forte para proteínas no citoplasma das células radiadas de *C. speciosus* pode indicar a fonte dos aminoácidos detectados no néctar exsudado pelos nectários das folhas e das sépalas desta espécie (Capítulo 2). Trabalhos experimentais demonstraram que formigas têm preferência por néctar rico em aminoácidos (Lanza et al. 1989; Wagner e Kay 2002). Nos nectários foliares, sepalares e petalares de *C. speciosus* formigas são visitantes comuns (Delgado et al. 2011a; Capítulo 2) e a existência de aminoácidos no néctar pode atuar como um

atrativo para esses animais.

Modificações ultraestruturas semelhantes às observadas nos nectários de *C. speciosus* foram reportadas para nectários de outras espécies (Fahn 1979; Davis et al. 1988; Avalos et al. 2017). A produção de néctar é influenciada por fatores ambientais e fisiológicos como os eventos de visitação de insetos e taxas fotossintéticas (Del-Claro et al. 2016; Pacini et al. 2003). Peng et al. (2004) afirmaram que o centro da transformação dinâmica do néctar envolve um complexo combinado de amiloplastos e vacúolo, sendo observado o desaparecimento dos amiloplastos em detrimento do crescimento vacuolar em NF de *Cucumis sativus* L, como evidenciado no presente estudo, onde os vacúolos são numerosos e repletos de conteúdo granuloso, e os amiloplastos não são evidentes, embora leucoplastos estejam presentes.

A transferência dos componentes do néctar das células radiadas para as células centrais via invaginações na parede é um mecanismo incomum que foi relatado para nectários que exsudam o néctar via tricomas secretores (Fahn, 1979). Células de transferências são mencionadas em estruturas secretoras ou não onde ocorre transporte ativo, em elevadas quantidades, a curta distância, uma vez que as invaginações permitem um aumento na superfície de contato com citoplasma (Nguyen e McCurdy 2017). Assim, o néctar que é produzido pelas células radiadas é transferido para a célula central e desta é exsudado. Embora a ultraestrutura dos nectários de *C. speciosus* tenha sido investigada em trabalho prévio, o papel das paredes labirínticas e a existência da célula central não foram abordados (Delgado et al. 2011a).

Em *C. speciosus* o néctar que se acumula no espaço subcuticular da célula central é exsudado pelo rompimento da cutícula. Esta forma de secreção e exsudação não é comum, visto que na maioria dos casos a rota de liberação da secreção envolve poros (estômatos modificados) ou epiderme secretora em paliçada ou com tricomas (Fahn 1979; Elias e Bentley 1983; Nepi et al. 2007). Embora incomum, o mecanismo de exsudação do néctar nos nectários de *C. speciosus* é compatível com o modelo proposto por Paiva (2017) para nectários destituídos de poros, onde o processo é cíclico e dependente do acúmulo na célula central que viabiliza o processo de eliminação por pressão.

## 5. Conclusão

Os NF e NEF de *C. speciosus* apresentam mecanismo de produção e eliminação do néctar incomum que envolve a via granulócrica. As paredes labirínticas aumentam a superfície de contato das células radiadas, responsáveis pela transformação do pre-néctar em néctar, com a célula central, onde o néctar acumulado no espaço subcuticular é eliminado pelo rompimento da cutícula. Este trabalho esclarece os compartimentos envolvidos com o mecanismo de produção e exsudação do néctar nos nectários incomuns de *Calolisianthus*.

## 6. Tabelas e figuras

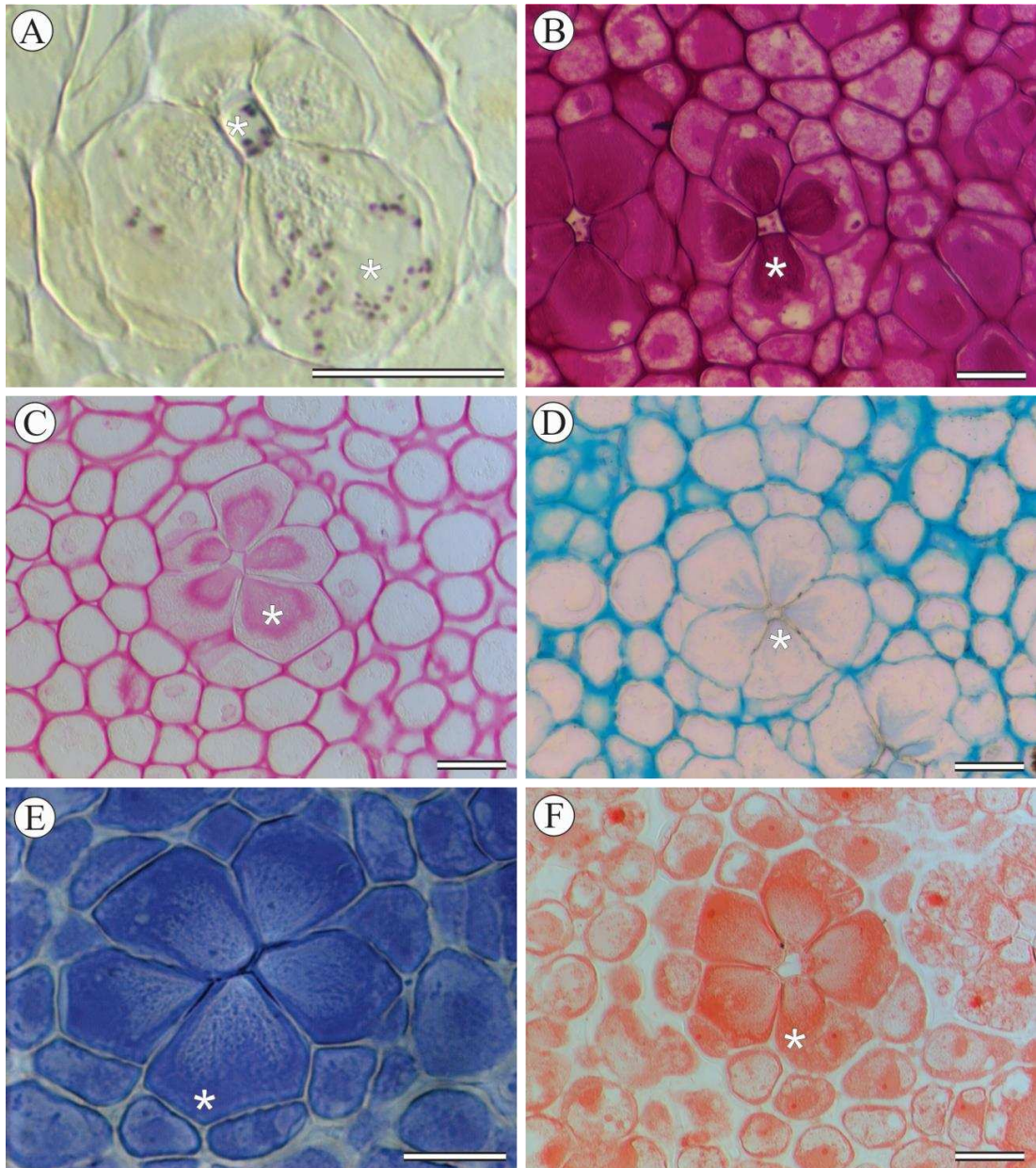
Tabela 1: Testes histoquímicos realizados nos materiais seccionados a mão livre após fixação (lipídeos e compostos fenólicos) e incluídos em metacrilato (carboidratos e proteínas).

Grupo metabólico		Reagente	Referência
Lipídeos gerais		Sudan IV	Johansen (1940)
		Sudan Black B	Pearse (1980)
Compostos fenólicos não estruturais	Fenóis	Cloreto férrico	Johansen (1940)
	Taninos	Vanilina clorídrica	Mace e Howell (1974)
Carboidratos	Polissacarídeos neutros	PAS (reagente de Schiff/ácido periódico)	O'Brien e McCully (1981) Pearse (1972)
	Polissacarídeos ácidos	Azul de Alcian	
	Amido	Lugol	Johansen (1940)
	Pectinas	Vermelho de rutênio	Johansen (1940)
Proteínas		Xilidine Ponceau	O'Brien e McCully (1981)
		Azul de Coomassie	Fisher (1968)

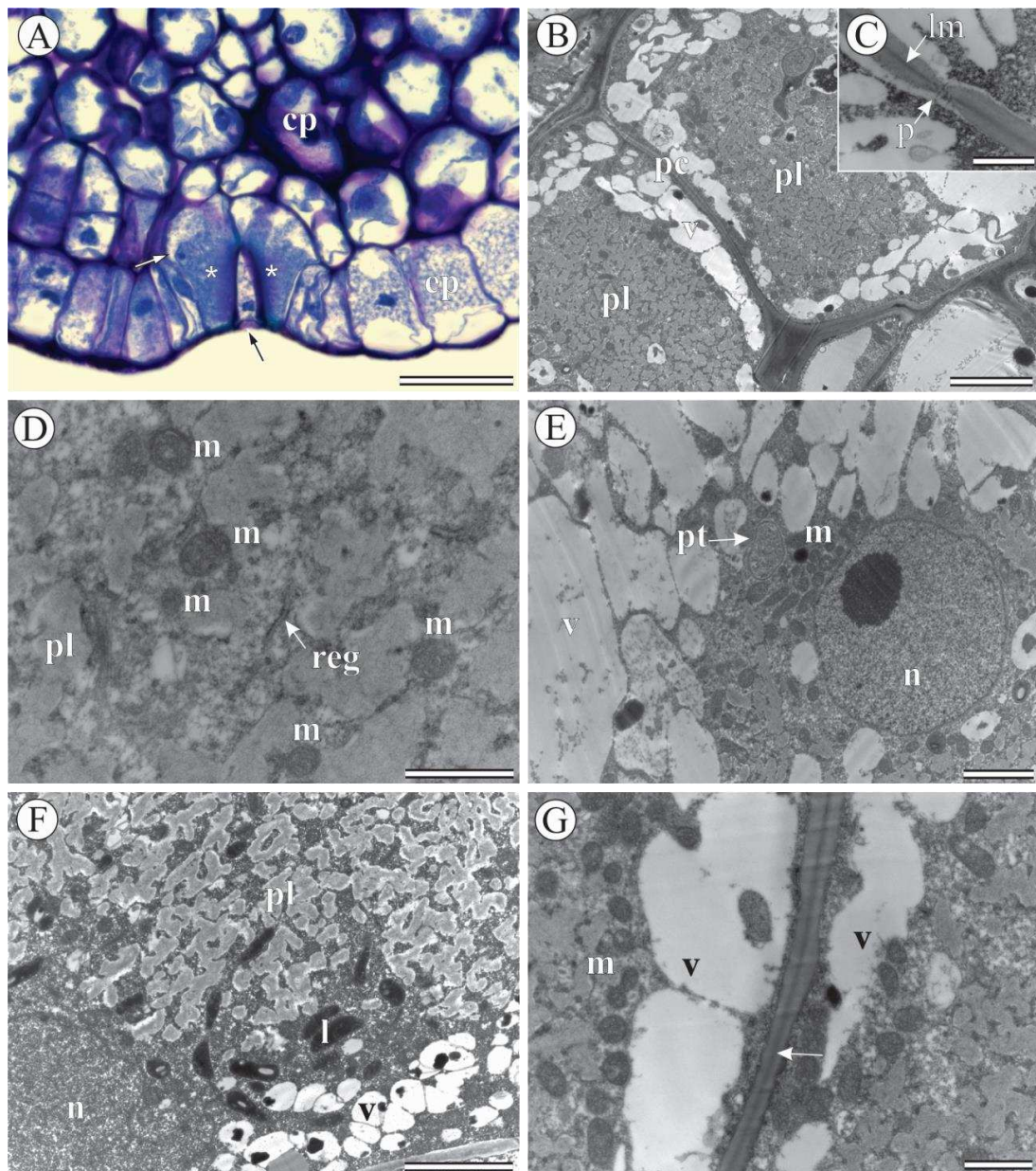
Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos realizados nos nectários das folhas, sépalas e pétalas de *Calolisianthus speciosus*.

Compostos	Nectário da pétala	Nectário da sépala	Nectário da folha
Lipídios totais	-	-	-
Proteínas	+	+	+
Polissacarídeos neutros	+	+	+
Polissacarídeos ácidos	+	+	+
Amido	-	-	+
Pectinas	+	+	+
Compostos fenólicos	-	-	-

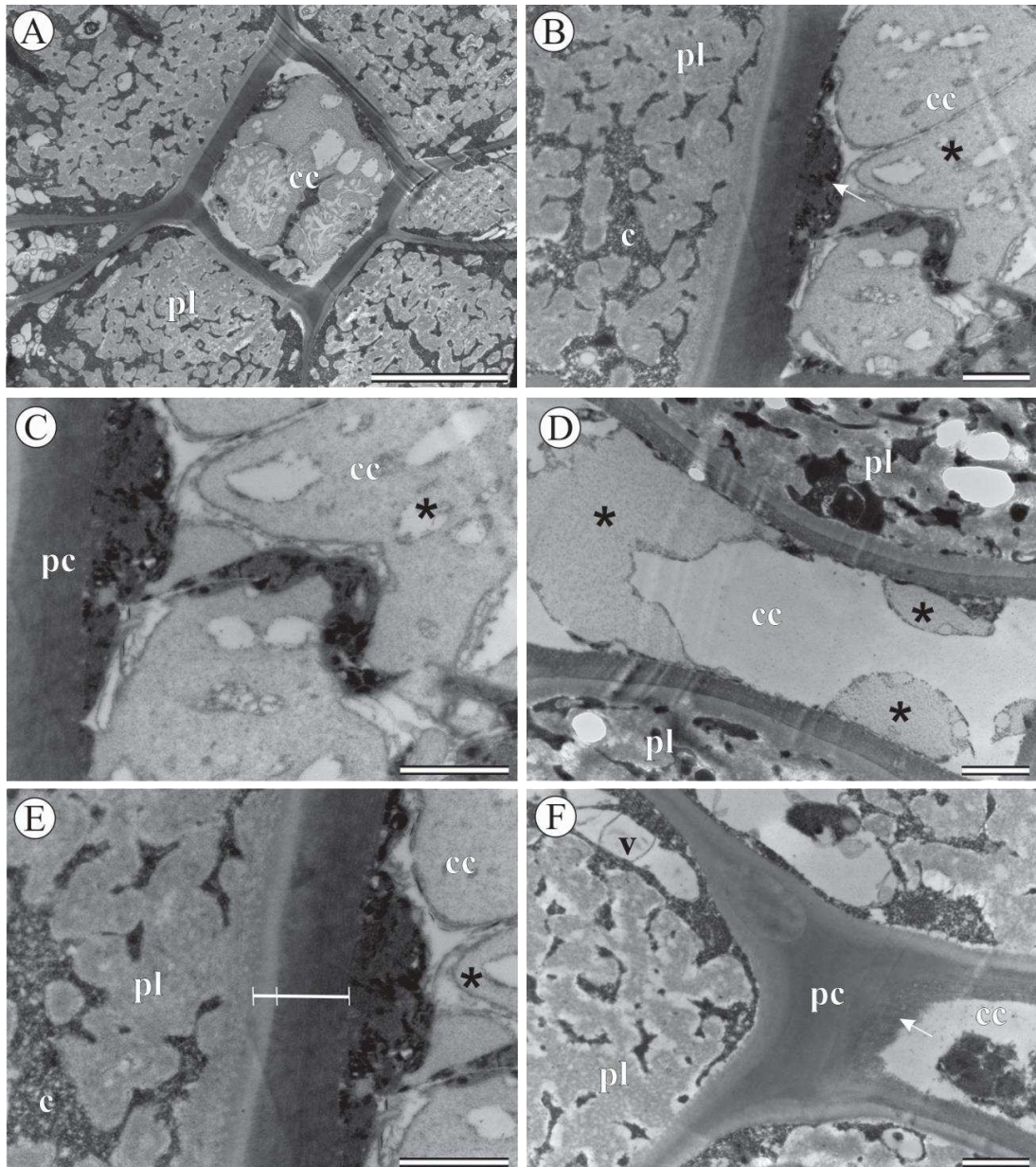
+ (reação positiva); - (reação negativa).



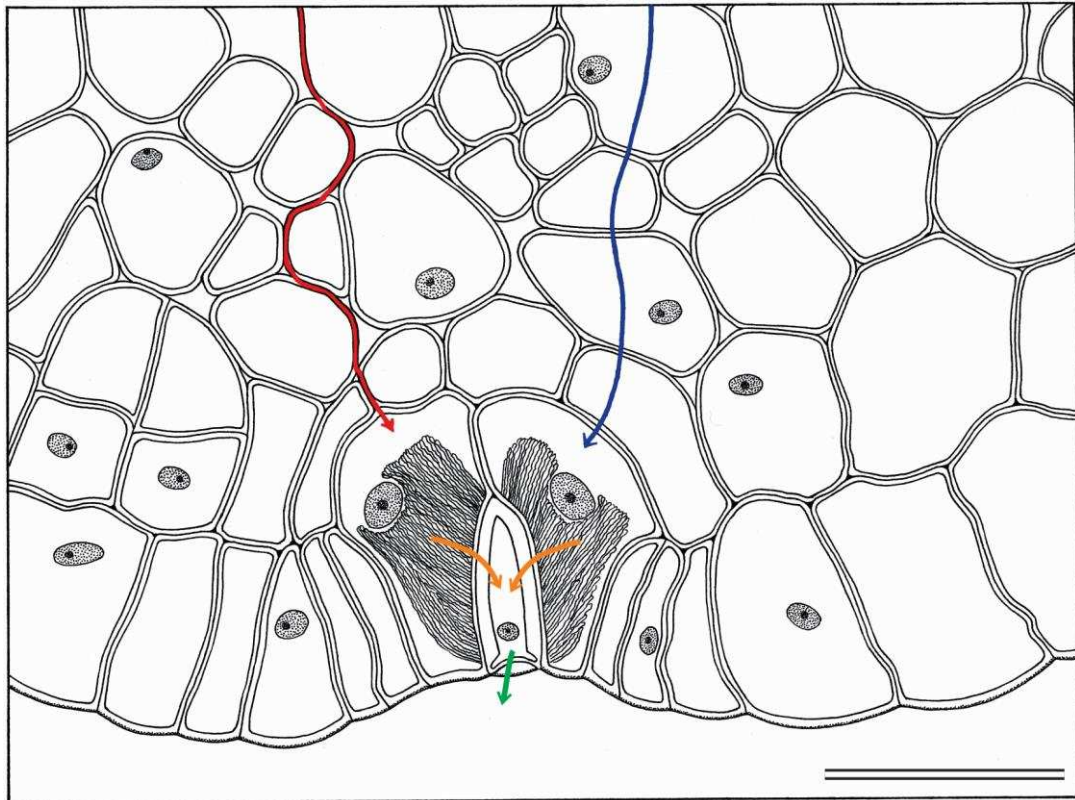
**Figura 1.** Reações positivas (asterisco) aos testes histoquímicos realizados nos nectários da folha (A) e sépala (B-F) de *Calolisianthus speciosus*. A. Presença de amido tanto nas células radiadas quanto na célula secretora central evidenciado pelo reagente Lugol. B. PAS corando fortemente a região das paredes labirínticas. C. Pectinas coradas em rosa na região das paredes labirínticas, principalmente na região voltada para o citoplasma, evidenciadas pelo reagente vermelho de rutênio. D. região das paredes labirínticas apresentando reação fraca para polissacarídeos ácidos através do azul de alcian. E, F. conteúdo citoplasmático rico em proteínas evidenciadas pelos testes azul de coomassie (E) e Xilidine Ponceau (F). Barra= 30 µm.



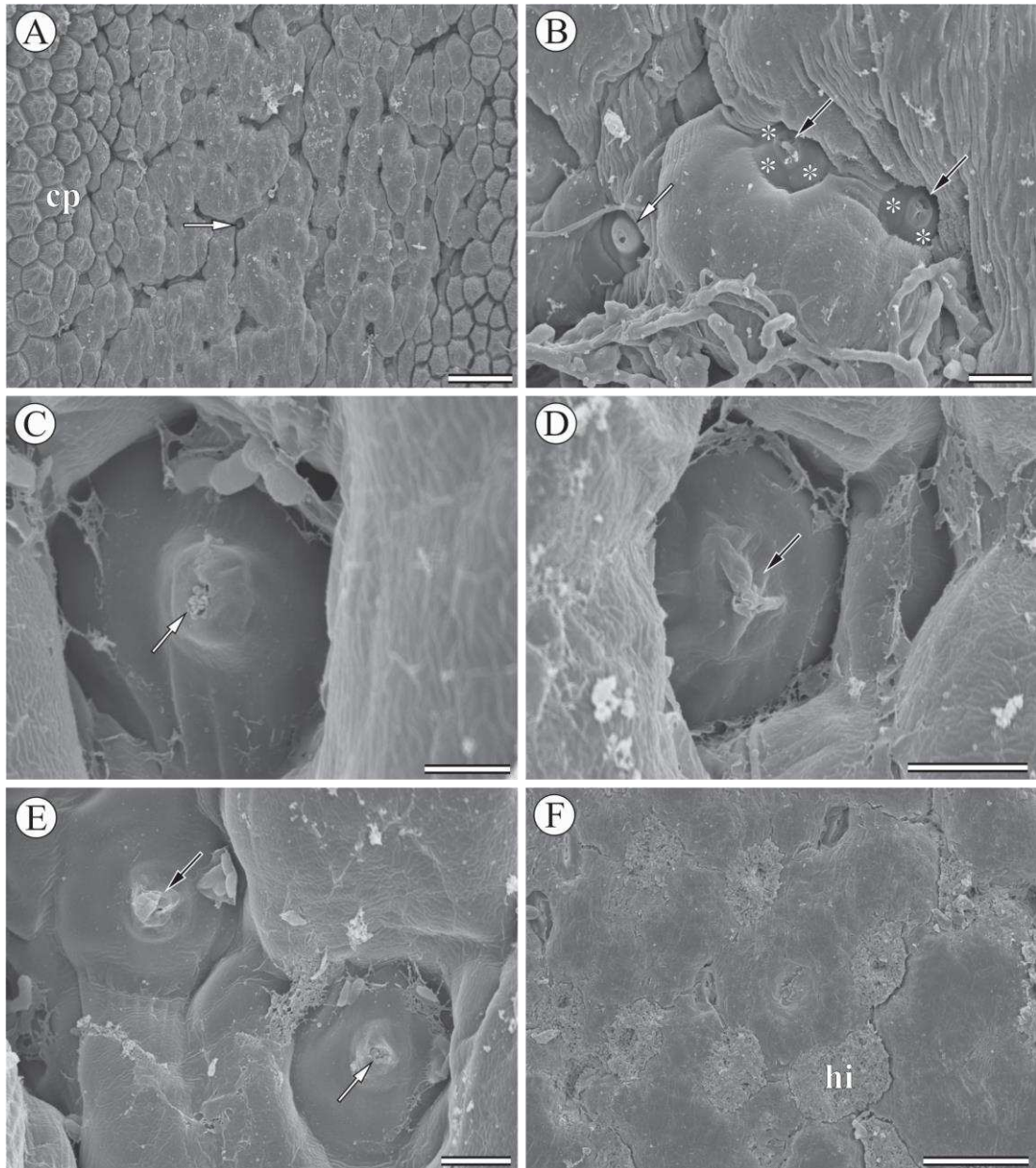
**Figura 2:** Estrutura dos nectários foliares e sepalares de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Corte longitudinal do nectário da sépala corado em azul de toluidina. Note núcleo (seta branca) voltado na face oposta às paredes labirínticas (asterisco) e célula secretora central (seta preta) em forma de cunha. **B.** Células radiadas com paredes primárias finas e numerosos vacúolos. **C.** Plasmodesmos entre células radiadas adjacentes. **D-G.** Detalhe de uma célula radiada evidenciando numerosas mitocôndrias e REG acompanhando as paredes labirínticas (D), núcleo com cromatina descondensada e numerosas mitocôndrias nas proximidades (E), leucoplastos e pequenos e numerosos vacúolos próximos a parede lateral (F) e vacúolos e mitocôndrias pressionados entre as paredes de células adjacentes (note a lamela media evidente indicada pela seta branca) (G). cp= célula parenquimática, ep= epiderme, l= leucoplasto, m= mitocôndria, n= núcleo, pc= parede celular primária, pl= parede labiríntica, pt= plastídio, reg= retículo endoplasmático granular, v= vacúolo. A. Barra: 50  $\mu$ m. B. Barra= 5  $\mu$ m. C, D, G. Barra= 1  $\mu$ m. E, F: Barra= 2  $\mu$ m.



**Figura 3.** Ultraestrutura da célula secretora central dos nectários das folhas e sépalas de *Calolisianthus speciosus*. **A.** Disposição radiada das células com paredes labirínticas em torno da célula secretora central. **B.** Conexão estabelecida entre a parede labiríntica e a parede da célula secretora central. Note a secreção atravessando a parede da célula central por permeabilidade (seta branca) onde se acumula (asterisco). **C, D.** Acúmulo de secreção no interior da célula central (asterisco). **E.** Espessura das paredes na célula radiada (menor) e central (maior). **F.** secreção direcionada pelas paredes labirínticas atravessando a parede celular da célula central (seta branca). c= citoplasma, cc= célula secretora central, pc= parede celular primária, pl= parede labiríntica, v= vacúolo. A. Barra= 5  $\mu$ m. B-F. Barra= 1  $\mu$ m.



**Figura 4.** Rotas de síntese dos fotoassimilados até as células radiadas e exsudação do néctar nos nectários das folhas, sépalas e pétalas de *Calolisanthus speciosus*. O pré-néctar oriundo do parênquima é transferido para as células radiadas via apoplasto (seta vermelha) e simplasto (seta azul) onde serão convertidos em néctar. O néctar é então conduzido pelas paredes labirínticas até a célula secretora central (seta laranja). O acúmulo de secreção no espaço subcuticular da célula central causa o rompimento da cutícula e subsequente liberação do néctar para o meio externo (seta verde). Barra: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.** Fases da exsudação de néctar nos nectários petalares de *Calolisianthus speciosus* em microscopia eletrônica de varredura. **A.** Aglomerados de nectários em depressões no ápice das pétalas. **B.** Acúmulo de secreção e poro cuticular (seta branca). Células radiadas (asterisco) em torno da célula central apresentando cutícula rompida (seta preta). **C-E.** Poro cuticular com exsudação de secreção (seta branca) e cutícula rompida após liberação do néctar acumulado no espaço subcuticular (seta preta). **F.** Nectários obstruídos por hifas na fase pós secretora. cp= células papilosas, hi= hifas. A, F. Barra= 100  $\mu\text{m}$ . B. Barra= 20  $\mu\text{m}$ . C. Barra= 5  $\mu\text{m}$ . D, E. Barra= 10  $\mu\text{m}$ .

## 7. Referências

- Avalos AA, Lattar EC, Galati BG, Ferrucci MS. 2017. Nectary structure and ultrastructure in two floral morphs of *Koelreuteria elegans* subsp. *formosana* (Sapindaceae). *Flora* 226: 29-37.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2013. Extrafloral nectaries in neotropical Gentianaceae: Occurrence, distribution patterns, and anatomical characterization. *American Journal of Botany* 100: 1779-1789.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Azevedo AA. 2017. Are stem nectaries common in Gentianaceae Juss.?. *Acta Botanica Brasilica*. 31: 403 - 410.
- Davis AR, Peterson RL, Shuel RW. 1988. Vasculature and ultrastructure of the floral and stipular nectaries of *Vicia faba* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 66: 1435-1448.
- Del-Claro K, Rico-Gray V, Torezan-Silingardi HM, Alves-Silva E, Fagundes R, Lange D, Rodriguez-Morales D. 2016. Loss and gains in ant-plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux* 63: 207-221.
- Delgado MN. 2008. Caracterização morfoanatômica de espécies de Gentianaceae ocorrentes em áreas de cerrado e campo rupestre em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Delgado MN, Azevedo AA, Valente GE, Kasuya MCM. 2011b. Comparative anatomy of *Calolisianthus* species (Gentianaceae-Helieae) from Brazil: taxonomic aspects. *Edinburgh Journal of Botany*. 68: 139-155.
- Delgado MN, Silva LC, Bão SN, Morais HC, Azevedo AA. 2011a. Distribution, structural and ecological aspects of the unusual leaf nectaries of *Calolisianthus* species (Gentianaceae). *Flora*. 206: 676-683.
- Evert RF. 2013. Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento. Blucher.
- Fahn A. 1979. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany* 977-985.
- Fisher DB. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
- Gaffal KP. 2012. How common is the ability of extrafloral nectaries to produce nectar droplets, to secrete nectar during the night and to store starch?. *Plant Biology* 14: 691-695.
- Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. WH Freeman, San Francisco.
- Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. McGraw- Hill, New York.
- Lillie RD. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed. McGrawHill, New York.

- Mace ME, Howell CR. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52: 2423-2426.
- Nepi M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In *Nectaries and nectar* (pp. 129-166). Springer, Dordrecht.
- Nguyen ST, McCurdy DW. 2017. Wall ingrowth deposition in phloem parenchyma transfer cells in *Arabidopsis*: Heteroblastic variations and a potential role in pathogen defence. *Plant signaling & behavior* 12: 1676-91.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007. *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007. *Nectaries and nectar* (Vol. 4). Dordrecht: Springer.
- O'Brien TP, McCully ME. 1981. *The study of plant structure principles and select methods*. Termarcarphi Pty. Ltd., Melbourne.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003. Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* 238: 7–21.
- Paiva ÉAS, Machado SR. 2006. Ontogenesis, anatomy, and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae-Caesalpinioideae) extrafloral nectaries. *Acta Botanica Brasilica* 20: 471-482.
- Paiva EAS. 2017. How does the nectar of stomata-free nectaries cross the cuticle?. *Acta Botanica Brasilica* 31: 525-530.
- Pearse AGE. 1972. *Histochemistry: Theoretical and applied*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Pearse AGE. 1980. *Histochemistry*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Peng YB, Li YQ, Hao YJ, Xu ZH, Bai SN. 2004. Nectar production and transportation in the nectaries of the female *Cucumis sativus* L. flower during anthesis. *Protoplasma* 224: 71-78.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque staining in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Rocha JF, Machado SR. 2009. Anatomy, ultrastructure and secretion of *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae) extrafloral nectary. *Brazilian Journal of Botany* 32: 489-498.
- Rudgers JA. 2004. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. *Ecology* 85: 192-205.
- Santos VH, Minatel IO, Reco PC, Garcia A, Lima GP, Silva RM. 2017. Peptide composition, oxidative and insecticidal activities of nectar from flowers of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *Industrial crops and products* 97: 211-217.
- Torezan-Silingard HM. 2012. Flores e animais: uma introdução a história natural da polinização. In: Del-Claro K, Torezan-Silingard HM. (eds.) *Ecologia das Interações Plantas-Animais: uma abordagem ecológico-evolutiva*. Technical Books, Rio de Janeiro.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os coléteres calicinais e foliares de *C. speciosus* são morfoanatômicamente semelhantes e distintos das tipologias descritas na literatura. A secreção mista com predomínio de polissacarídeos está em consonância com características ultraestruturais onde foi evidenciada fração hidrofílica e hidrofóbica, as quais são exsudadas por permeabilidade da cutícula ou por canais cuticulares.

As estruturas secretoras presentes nos ápices das pétalas são nectários e são anatomicamente semelhantes aos descritos para a folha e sépalas. Não são vascularizados e com um canal secretor central, como se pensava. Existe assincronia nas fases de secreção dos nectários florais e extraflorais e diferenças evidentes nas concentrações de açúcares no néctar das sépalas e folhas.

Tanto os NF quanto os NEF da espécie estudada são extra nupciais, e a secreção produzida por tais estruturas promove a interação com as formigas, em uma relação mutualística.

Embora a glândula na base do ovário se apresente com aparência de tecido secretor, os testes histoquímicos não sugeriram atividade secretora como foi observado nos NF e NEF.

Os NF e NEF de *C. speciosus* apresentam mecanismo de produção e eliminação do néctar incomum que envolve a via granulócrica. As paredes labirínticas aumentam a superfície de contato das células radiadas, responsáveis pela transformação do pre-néctar em néctar, com a célula central, onde o néctar acumulado no espaço subcuticular é eliminado pelo rompimento da cutícula.

Este trabalho esclarece os compartimentos envolvidos com o mecanismo de produção e exsudação do néctar nos nectários incomuns de *Calolisianthus speciosus*.