

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**ELUCIDANDO AS ESTRUTURAS PRODUTORAS DE RECURSOS FLORAIS EM
MICROSTACHYS SERRULATA (HIPPOMANEAE - EUPHORBIACEAE): UMA
ESPÉCIE MIRMECÓFILA**

Giovanna Fernandes Jacovine
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

GIOVANNA FERNANDES JACOVINE

**ELUCIDANDO AS ESTRUTURAS PRODUTORAS DE RECURSOS FLORAIS EM
MICROSTACHYS SERRULATA (HIPPOMANEAE - EUPHORBIACEAE): UMA
ESPÉCIE MIRMECÓFILA**

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*.

Orientadora: Renata M S Alves Meira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

J18e
2024

Jacovine, Giovanna Fernandes, 1999-

Elucidando as estruturas produtoras de recursos florais em *Microstachys serrulata* (Hippomaneae - Euphorbiaceae) : uma espécie mirmecófila / Giovanna Fernandes Jacovine. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (34 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2024.

Referências bibliográficas: f. 23-27.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.791>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Euphorbiaceae. 2. Flores - Anatomia. 3. Folhas - Anatomia. 4. Polinização por insetos. 5. Formigas. 6. Nectários. I. Meira, Renata Maria Strozi Alves, 1964-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 583.69

GIOVANNA FERNANDES JACOVINE

**ELUCIDANDO AS ESTRUTURAS PRODUTORAS DE RECURSOS FLORAIS EM
MICROSTACHYS SERRULATA (HIPPOMANEAE - EUPHORBIACEAE): UMA
ESPÉCIE MIRMECÓFILA**

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: 30 de agosto de 2024.

Assentimento:

Giovanna Fernandes Jacovine
Autora

Renata Maria Strozi Alves Meira
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 28/11/2024 às 12:14:06 e pela orientadora em 29/11/2024 às 18:10:21. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **ZVCU.9VC8.VQ8V** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Desde sempre, o sonho de fazer parte da Universidade Federal de Viçosa existiu, mas só consegui chegar até aqui graças as pessoas que estiveram comigo durante essa caminhada. Por isso, obrigada aos meus queridos pais, Eluiz, por me contar a história do “Coelho e a Cartola” e a Vania, que me ensinou a ser forte. Obrigada por todo apoio, amor e carinho, além de terem me dado a oportunidade de chegar onde cheguei. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Gustavo e Luís Felipe, por sempre me amarem e cuidarem da “caçulinha” com tanto amor e carinho. Sei que posso contar para sempre com vocês. Ao meu noivo e melhor amigo, Dias, por sempre estar comigo, me amando, me apoiando todas as vezes que pensei em desistir e que aceitou viver essa aventura que é a vida, junto a mim. Te amo, meu amor.

As minhas “irmãs” Giovanna, Raphaella e Isabella, vocês me mostram e me ensinam todos os dias o real significado de irmandade. Obrigada por se fazerem presente, mesmo que de longe. Com certeza não chegaria até aqui sem vocês.

Aos queridos(as), Glauco, Juliano, Pedro Henrique, Larissa, Livia, Wendelo, Augusto, Estela, Náthaly, Sabrina, João e Luis Henrique. Obrigada por se fazerem presente em todos os momentos. Amo vocês.

Aos meus amigos de laboratório que conquistei ao longo da caminhada. Obrigada por cada risada, abraço, companhia, apoio e pelos momentos de acolhimento.

A professora Renata Meira, por sempre ter acreditado em mim e me aceito com tanto carinho ao grupo de pesquisa. Você sempre será uma inspiração para mim.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal e as queridas técnicas Aurora e Rosana.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e toda a infraestrutura disponível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

JACOVINE, Giovanna Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Elucidando as Estruturas Produtoras de Recursos Florais em *Microstachys serrulata* (Hippomaneae - Euphorbiaceae): uma Espécie Mirmecófila.** Orientadora: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Microstachys serrulata (Euphorbiaceae) é uma espécie que ocorre naturalmente no cerrado e nos campos rupestres brasileiros e é polinizada por formigas (mirmecofilia), uma síndrome considerada rara. Espécies de formigas pertencentes ao gênero *Camponotus*, que exibiam comportamento de forrageamento, foram apontadas como polinizadoras de *M. serrulata*. Entretanto, não foi esclarecido o recurso vegetal que atua na interação mutualística com esse polinizador nesta espécie. Embora nectários tenham sido descritos para as folhas, não existem descrições anatômicas das glândulas na inflorescência ou nas flores desta espécie. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar e descrever as estruturas que possam estar produzindo recursos florais relacionados com a atração e a interação das formigas na polinização de *M. serrulata*. Amostras das flores pistiladas e estaminadas de *M. serrulata* foram coletadas em populações naturais ocorrentes no Santuário do Caraça, Minas Gerais (Brasil) fixadas em campo e processadas seguindo as técnicas usuais para observação em microscópio de luz e microscópio eletrônico de varredura. Nectários florais anatomicamente semelhantes foram encontrados tanto nas brácteas das flores pistiladas quanto na das estaminadas. Os nectários são formados por um pedúnculo curto nas flores pistiladas e são sésseis nas estaminadas. Ambos possuem a cabeça secretora dilatada, que tem coloração avermelhada nas flores pistiladas. Xilema e floema derivados da vascularização da bráctea se ramificam em direção ao parênquima nectarífero subepidérmico, sendo a epiderme formada por células secretoras organizadas em paliçada. Polissacarídeos, proteína e açúcar redutor foram detectados na epiderme secretora da estrutura, enquanto lipídeos estavam restritos à cutícula fina, a qual é espessa na porção secretora. A descrição de nectários florais nas brácteas das flores estaminadas, assim como a constatação da presença desta estrutura também nas flores pistiladas são registros inéditos para a inflorescências desta espécie. O néctar produzido pelos nectários das brácteas é usado pelas formigas polinizadoras como recurso alimentar, atuando na síndrome de polinização de *M. serrulata*. Os dados obtidos ampliam o conhecimento sobre a diversidade de estruturas secretoras em representantes da tribo Hippomaneae, com potencial aplicação em estudos taxonômicos e ecológicos.

Palavras-chave: anatomia. glândula na bráctea. histoquímica. nectário. polinização por formiga.

ABSTRACT

JACOVINE, Giovanna Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **Elucidating the structures producing floral resources in *Microstachys serrulata* (Hippomaneae - Euphorbiaceae): an myrmecophilous species..** Adviser: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Microstachys serrulata (Euphorbiaceae) is a species that naturally occurs in the Brazilian cerrado and rupestrian grassland. It is pollinated by ants, which is considered a rare syndrome. Ants from the *Camponotus* genera, known for their foraging behavior, were identified as the pollinators of *M. serrulata*. However, the plant resource that engages in the mutually beneficial interaction with this pollinator in this species has not been identified. Although nectaries have been documented on the leaves, there are no anatomical descriptions of the glands in the inflorescence or flowers of this species. Thus, the objective of the present study was to investigate and describe the structures that may be producing floral resources related to the attraction and interaction of ants in the pollination of *M. serrulata*. Samples of pistillate and staminate flowers of *M. serrulata* were collected from natural populations occurring in the Santuário do Caraça, Minas Gerais (Brazil), fixed in the field, and processed following the usual techniques for observation under a light microscope and scanning electron microscope. The bracts of both pistillate and staminate flowers contain anatomically similar floral nectaries. In pistillate flowers, the nectaries are formed by a short peduncle, while in staminate flowers they are sessile. Both types of nectaries have a dilated secretory head, which appears reddish in color in pistillate flowers. Xylem and phloem derived from the bract vasculature extend toward the subepidermal nectariferous parenchyma. The epidermis is formed by secretory cells organized in a palisade. Polysaccharides, protein, and reducing sugar were detected in the secretory epidermis, with lipids restricted to the thin cuticle covering the secretory portion. The presence of floral nectaries in the bracts of staminate flowers and their occurrence in pistillate flowers are novel findings for this species' inflorescences. The nectar produced by the bract nectaries is utilized by pollinating ants as a food resource, playing a role in the pollination of *M. serrulata*. The data obtained enhance our understanding of the diversity of secretory structures in members of the Hippomaneae tribe, with potential applications in taxonomic and ecological studies.

Keywords: anatomy. ant pollination. gland on the bract. histochemistry. nectary.

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho encontra-se organizado sob a forma de um artigo científico, como disposto nas normas de redação de dissertação da Universidade Federal de Viçosa. O texto foi redigido conforme as normas da *Acta Botanica Brasilica*, periódico escolhido para a submissão do manuscrito.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS	13
Morfologia externa de <i>Microstachys serrulata</i> e visitação por formigas.....	13
Caracterização dos nectários das brácteas florais	14
DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
FIGURAS E TABELAS	26

INTRODUÇÃO

O gênero *Microstachys* compreende 24 espécies que ocorrem em regiões savânicas espalhadas pelo mundo, sendo o Brasil o local onde ocorre a maior diversidade, com 19 espécies registradas (Pscheidt, 2015). Possui hábito herbáceo a subarbustivo, as folhas apresentam dentículos na margem, inflorescências opostas às folhas e presença de cornículos no ovário e fruto (Esser, 2001; 2012), características estas taxonomicamente importante para a segregação de *Microstachys* do gênero *Sebastiania*, compreendendo as espécies que eram circunscritas em *Sebastiania* seção de *Microstachys* (Esser, 2012; Pscheidt, 2015). As inflorescências são tirsos com vários cúmulos estaminados e na base de cada inflorescência encontram-se as flores pistiladas, com estruturas glandulares presentes nas brácteas da maioria das espécies no gênero (Esser, 2001; 2012), as quais não foram identificadas quanto à tipologia ou função.

Microstachys serrulata (Mart. & Zucc.) Müll.Arg. é uma espécie de ampla distribuição ocorrendo em populações naturais do Cerrado e Campos Rupestres no Brasil, mas também com registros na Argentina, Bolívia e Paraguai (Pscheidt, 2015). As estruturas secretoras presentes na margem foliar foram anatomicamente investigadas e caracterizadas como nectários crateriformes (Pereira, 2019). Também nesta espécie, o látex branco que é exsudado quando as folhas e caules são fragmentados é sintetizado por laticíferos não-articulados ramificados e estão presentes no pecíolo e lâmina foliar (Pereira, 2019).

Em um trabalho sobre a biologia da polinização de *M. serrulata*, formigas do gênero *Camponotus* que exibiam comportamento de forrageamento nas inflorescências foram reconhecidas como polinizadoras da espécie (Faria *et al.*, 2022). Neste trabalho, fica claro para os pesquisadores que *M. serrulata* consegue atingir maiores picos de frutificação graças à

presença das formigas que são abundantes em regiões onde vive a espécie vegetal, como no Cerrado e Campo Rupestre. *Microstachys serrulata* apresenta características importantes para relacionar a esse tipo de interação mutualística, como por exemplo flores pequenas e com grãos de pólen acessíveis, o que permite a visita de polinizadores considerados generalistas como foi proposto em Bawa *et al.* (1985).

Segundo a hipótese antimicrobiótica (Beattie *et al.*, 1984), a polinização mediada por formigas é um evento relativamente raro na natureza, se for comparada com o número de espécies que são polinizadas por abelhas, a qual é a síndrome de polinização mais comum. Neste contexto, os autores sugerem que as formigas desenvolveram alta habilidade de se protegerem contra atividade microbiana causada por fungos e bactérias presentes na cutícula da epiderme foliar, principalmente em regiões tropicais. Essa estratégia de defesa, consiste na atividade de glândulas metapleurais, presentes no corpo das formigas, na produção de uma substância com atividade antimicrobiana o que, conseqüentemente, afeta a sobrevivência e viabilidade dos grãos de pólen, o que explica os baixos índices de espécies polinizadas por formigas.

A síndrome de polinização por formigas foi registrada em 23 famílias de angiospermas (Das e Das, 2023) sendo duas espécies de *Euphorbia* e uma de *Jatropha* para a família Euphorbiaceae (Das e Das, 2023). Adicionalmente, esta síndrome foi descrita para *Euphorbia hirta* L. (Samuel e Rostagi, 2022). Um conjunto de características é descrito para essa síndrome de polinização, o qual inclui o oferecimento de recursos que a planta produz que viabiliza a interação mutualística inseto-planta (Davidson e McKey, 1993). A presença de nectários florais e extraflorais é destacada como importante, já que formigas são atraídas pelo néctar exsudado pelos nectários, recurso constituído por glicose, frutose e sacarose, que são utilizadas como alimento para as formigas, as quais fornecem proteção à planta que é a sua fonte de recursos nutritivos (Beattie, 1984; Heil e McKey, 2003; Hernandez-Cumplido *et al.*, 2016). Entretanto,

os trabalhos sobre a polinização por formigas não focam na descrição de estruturas secretoras florais, como nectários e secreção de néctar.

Na descrição taxonômica de *M. serrulata*, consta que nas brácteas das flores estaminadas ocorrem glândulas sésseis e as flores pistiladas são aglandulares (Pscheidt, 2015). Considerando o relato do comportamento de forrageamento de formigas ao longo da inflorescência de *M. serrulata* (Faria *et al.*, 2022), formulamos as seguintes hipóteses: 1. As glândulas sésseis das brácteas das flores estaminadas de *M. serrulata* são nectários e secretam o néctar que é utilizado como recurso floral na polinização pelas formigas. 2. Existem estruturas ainda não reportadas para a espécie nas brácteas das flores pistiladas, as quais exsudam compostos que contribuem para a amplitude do forrageamento das formigas descrito por Faria *et al.* (2022). Espera-se que este trabalho elucide a presença e o tipo de glândulas florais produtoras de exsudado que possam estar relacionados com a rara síndrome de polinização por formigas.

Portanto, os objetivos do presente trabalho são identificar e descrever anatomicamente as glândulas na inflorescência, bem como aquelas descritas morfolologicamente para às brácteas das flores estaminadas e investigar se existe alguma estrutura secretora ainda não relatada para as brácteas das flores pistiladas.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material vegetal foi feita em julho de 2023 no Santuário do Caraça, localizado na cidade de Santa Bárbara (MG), Brasil. Foram coletados ramos contendo flores pistiladas e flores estaminadas de *Microstachys serrulata* (Mart. & Zucc.) Müll.Arg. para confecção de exsicatas que foram incorporadas ao acervo do herbário VIC na Universidade Federal de Viçosa (VIC 57583). Amostras das flores pistiladas e estaminadas foram

segmentadas e fixadas em campo em formalina neutra tamponada (FNT) e posteriormente armazenadas etanol 70% (Johansen, 1940).

Durante os meses de floração (Novembro - Março) foram realizadas observações em campo da atividade de forrageamento de formigas ao longo da inflorescência, e visitação nas flores pistiladas e estaminadas. As observações foram feitas em intervalos de 2h ao longo do dia, iniciando às 7h e terminando às 17h, quatro dias por semana. Toda a atividade foi registrada com equipamento fotográfico (Câmera digital Nikon modelo D7000 com lente Nikon AF-S 105mm f/2.8 G IF ED VR Micro). As formigas foram coletadas e identificadas por um entomologista.

Foram ainda, feito registros fotográficos das flores pistiladas e estaminadas em microscópio estereoscópio (Olympus SZX7, que tem acoplada uma câmera Olympus EP50) no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais -BIOAGRO na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Também foram feitas medições em largura e altura das estruturas observadas na base das brácteas das flores pistiladas e estaminadas usando o software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

Parte do material foi fixado em campo com FNT e armazenado no etanol 70%, depois desidratada em série etílica, incluída e emblocada em Histoiresina Leica (Heidelberg, Alemanha) seguindo os protocolos estabelecidos pelo fabricante. Foram obtidos cortes transversais e longitudinais do material emblocado, com 5 µm de espessura, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Cortes foram corados com Azul de toluidina em pH 4,7 (O'brien *et al.*, 1964) para caracterização anatômica e detecção de compostos fenólicos (Ribeiro e Leitão, 2020). Também foram aplicados os seguintes testes histoquímicos: para proteínas, utilizou-se Xylidine Ponceau (O'Brien e McCully, 1981); para evidenciar polissacarídeos totais, o PAS (O'brien e Mccully,

1981); para amido, utilizou-se o Lugol (Johansen, 1940); para compostos fenólicos gerais, o Cloreto Férrico (Johansen, 1940). Materiais frescos segmentados à mão livre foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos: Vermelho neutro (Kirk Jr, 1970) para detecção de lipídios totais, visualizados sob luz azul fluorescente UV e o reagente de Fehling (Purvis *et al.*, 1964) para detecção de açúcares redutores (glicose e frutose).

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

Para análise micromorfológica, amostras de flores pistiladas e estaminadas fixadas em campo em FNT (Johansen, 1940) foram desidratadas em série etanólica e secas ao ponto crítico (aparelho Critical Point Dryer, Modelo CPD 030, Balzers, Liechtenstein). Posteriormente, as amostras foram aderidas em suportes metálicos tipo “stub”, recobertas com ouro (Quorum150TE) e observadas/fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo Jeol/JSM-IT700HR) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

RESULTADOS

Morfologia externa de *Microstachys serrulata* e visitação por formigas

A flor pistilada está posicionada na base de cada inflorescência (Fig. 1A), enquanto as numerosas flores estaminadas (Fig. 1B) ocupam todo o eixo da inflorescência. Na base de cada flor pistilada (Fig. 1C, D) e estaminada (Fig. 1E) está inserida uma bráctea com um par de glândulas de cada lado, que é visível na flor pistilada (Fig. 1C, D), mas imperceptível à vista desarmada na flor estaminada (Fig. 1B), embora evidente em amostras frescas e usando

equipamento de ampliação de imagem (Fig. 1E). As glândulas nas brácteas das flores pistiladas também são evidentes pela coloração avermelhada que exibem, que contrasta com a base de coloração verde da bráctea (Fig. 1C, D).

Durante as observações em campo foram registradas as visitas de duas espécies de formigas, *Camponotus rufipes* e *Crematogaster cf. rochai* (Fig. 1 A-C, F). Ambas exibiram atividade de forrageamento por todo o corpo da planta, inclusive no eixo da inflorescência (Fig. 1A-C, F). Apesar de não ter sido observada secreção acumulada na superfície das glândulas, as formigas permaneciam paradas e em comportamento alimentar nas glândulas das brácteas, tanto das flores pistiladas (Fig. 1A, B), quanto das estaminadas (Fig. 1F).

Caracterização dos nectários das brácteas florais

A morfologia dos nectários da bráctea da flor pistilada difere do nectário da flor estaminada (Fig. 2A-F). Na flor pistilada ocorre um par de nectário curto pedunculado na base da bráctea que tem formato triangular (Fig. 2A), onde o comprimento do pedúnculo mede até 2 vezes a altura do ápice secretor dilatado (Fig. 2A). Na flor estaminada o nectário é sésil, possuindo a porção dilatada secretora inserida diretamente na base da bráctea (Fig. 2D). O nectário da flor pistilada é maior que o da estaminada, medindo aproximadamente 3,6 mm de largura e 6 mm de altura (Fig. 2A), enquanto que o nectário da flor estaminada possui 1,7 mm de largura e 3 mm de altura (Fig. 2D).

A superfície secretora do nectário da flor pistilada apresenta uma fenda em sentido longitudinal (Fig. 2B). Na superfície secretora as células epidérmicas são papilosas e estriadas (Fig. 2C). Estômatos estão restritos a epiderme da região do pedúnculo (Fig. 2B). Nos nectários da flor estaminada, a região secretora apresenta uma leve depressão (Fig. 2E), onde são

visualizadas estrias nas paredes das células epidérmicas periféricas a essa depressão e paredes lisas nas células que recobrem a depressão (Fig. 2E, F). Não foram notados poros, tampouco cicatrizes na epiderme da depressão (Fig. 2F).

Anatomicamente os nectários das brácteas das flores pistiladas e estaminadas são semelhantes (Fig. 3). Abaixo da epiderme apresentam o parênquima nectarífero que é formado por células pequenas com paredes finas, núcleo bem evidente com citoplasma denso (Fig. 3A, B, E). O parênquima nectarífero é vascularizado por xilema e floema que confluem da vascularização regular da bráctea (Fig. 3A, C). No entanto, a epiderme que recobre a fenda na superfície secretora das flores pistiladas somente é visível em corte, sendo composta por células mais volumosas em relação as circunvizinhas, possuem citoplasma denso e núcleo bem evidente (Fig. 3E e F). Nas flores estaminadas a epiderme que recobre a depressão é composta por células menos volumosas comparadas as células da superfície secretora do nectário das flores pistiladas, e formam uma superfície irregular, devido ao arranjo frouxo (Fig. 3A e B). A cutícula que recobre a epiderme nesta porção é fina e as células são papilosas, possuem núcleo evidente e citoplasma denso (Fig. 3D), exceto na superfície da depressão da glândula da flor pistilada, cujas células não são papilosas e exibem arranjo compacto (Fig. 3E e F).

Os resultados dos testes histoquímicos foram semelhantes nos nectários das flores pistiladas e estaminadas (Tab. 1). Cristais de açúcar redutor foram detectados nas células da epiderme (Fig. 4A), proteínas (Fig. 4B) e polissacarídeos foram evidenciados no citoplasma das células epidérmicas secretoras e das células do parênquima nectarífero subepidérmico (Fig. 4C). Grãos de amido estão presentes ao longo das células subepidérmicas e ausentes nas células da epiderme (Fig. 4E). Compostos fenólicos foram evidenciados no citoplasma das células da epiderme secretora e das células epidérmicas comuns (Fig. 4F). A presença de lipídeos foi comprovada apenas na cutícula das células da epiderme (Fig. 4D), não sendo evidenciado

qualquer conteúdo lipídico no citoplasma das células secretoras do nectário tanto da flor pistilada quanto da flor estaminada (Tab. 1).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que as glândulas nas brácteas das flores estaminadas correspondem a nectários, bem como a presença de nectários também nas brácteas das flores pistiladas, um registro inédito para a espécie *Microstachys serrulata*. Além da estrutura anatômica, a detecção de açúcares redutores e compostos hidrofílicos nas suas células secretoras e a ausência de compostos lipofílicos asseguram a classificação das glândulas florais de *Microstachys serrulata* como nectários.

Os nectários das brácteas de *M. serrulata* possuem uma epiderme secretora em paliçada, parênquima nectarífero subepidérmico e presença de vascularização com células do xilema e floema ao longo da estrutura secretora. Essa característica é comum ao nectário das folhas desta espécie (Pereira, 2019) e também de outras espécies de Euphorbiaceae (Freitas *et al.* 2001; De-Paula *et al.*, 2011; Vitarelli *et al.*, 2015; Feio *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2022; Freitas-Silva *et al.*, 2023) e outros gêneros da tribo Hippomaneae como *Sapium biglandulosum* Müell. Arg. (Coutinho *et al.*, 2010).

Geralmente, as formigas são associadas a nectários extraflorais (presentes em folhas) e florais (presentes em brácteas e sépalas), as quais desempenham papel de defesa, pois atacam herbívoros, protegendo a planta produtora de recursos alimentares, uma interação mutualista (Dutton e Frederickson, 2012; González-Teuber *et al.*, 2012; Del-Claro *et al.*, 2016). Portanto, não é comum formigas que atuam diretamente como polinizadores ativos, que influenciam significativamente nas taxas de frutificação da planta (Luo *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2022; Samuel e Rostagi, 2022; Das e Das, 2023), como reportado em *Microstachys serrulata* (Faria *et al.*, 2022) e *Euphorbia hirta* (Samuel e Rostagi, 2022). Para as Euphorbiaceae esta síndrome

foi reportada em *Euphorbia cyparissias* L., *E. hirta*, *E. seguieriana* Neck., da subfamília Euphorbioideae, e *Jatropha curcas* L., de Crotonoideae (APG IV, 2016; Samuel e Rostagi, 2022; Das e Das, 2023). Este número é relativamente reduzido se considerarmos a diversidade de aproximadamente seis mil espécies de Euphorbiaceae (Judd *et al.*, 2009).

Nectário na inflorescência de *Euphorbia hirta* produz néctar que atua na atração de formigas, incluindo as do gênero *Camponotus* e *Crematogaster*, desempenhando papel crucial na polinização da espécie (Samuel e Rostagi, 2022). Formigas desses mesmos gêneros foram reconhecidas como as polinizadoras de *Microstachys serrulata* (Faria *et al.*, 2022), entretanto, os autores não mencionaram a visitação aos nectários, o que foi verificado no presente estudo. Por outro lado, em *Euphorbia cyparissias* e *E. seguieriana*, que são relatadas como polinizadas por formigas (Das e Das, 2023), foram descritos nectários nas brácteas por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura (Papp, 2004), os quais são semelhantes ao nectário das brácteas de *M. serrulata*, pois também foi notada a presença de estrias na cutícula da epiderme secretora. É interessante notar que observação semelhante foi registrada para o nectário crateriforme das folhas de *M. serrulata* (Paiva, 2017; Pereira, 2019). *Jatropha curcas* listada como polinizada por formigas (Das e Das, 2023), foi observado exsudação de néctar nos nectários presentes parte interna das pétalas nas flores pistiladas e na base dos estames das estaminadas (Bhattacharya *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012; Adriano-Anaya *et al.*, 2016). Os autores se basearam apenas na presença de açúcares no exsudado para caracterizar as glândulas de *J. curcas*, portanto, comparações anatômicas não foram possíveis.

Nectários são estruturas secretoras de néctar, substância composta principalmente por glicose, frutose e sacarose, embora também possa conter outros compostos como polissacarídeos e proteínas (Fahn, 1979; Nicolson *et al.*, 2007). Existem outras estruturas secretoras que apresentam características morfoanatômicas semelhantes aos nectários como coléteres e tricomas secretores (Fahn, 1979).

Embora não tenha sido analisado quimicamente o exsudado dos nectários florais de *M. serrulata*, foi comprovada a presença de açúcares redutores no teste histoquímico. Com base na ausência de compostos lipídicos e na atividade tardia as glândulas nas brácteas de *M. serrulata*, foi descartada a classificação desta estrutura como glândulas de resina ou coléteres, comuns em outros representantes de Euphorbiaceae (Machado *et al.*, 2015; Vitarelli *et al.*, 2015; Feio *et al.*, 2016; Gagliardi *et al.*, 2016; Meira *et al.*, 2020).

Os nectários florais de *M. serrulata* apresentam compostos proteicos em suas células secretoras, assim como discutido nos nectários foliares crateriformes da espécie (Pereira, 2019), o que corrobora a atividade de forrageamento das formigas, tanto nas inflorescências quanto nas folhas. A presença de proteínas nas células secretoras de nectários florais e extraflorais torna o néctar mais rico em nutrientes, o que está relacionado ao suprimento das necessidades energéticas dos visitantes florais, inclusive as formigas, já que muitos insetos apresentam dificuldades em produzir seus próprios recursos proteicos (Baker, 1977; Nicolson e Thornburg, 2007).

O resultado positivo para polissacarídeos nos nectários de *M. serrulata* pode estar relacionado a produção de um néctar mais viscoso, visto que, a concentração de solutos como polissacarídeos está relacionada a viscosidade (Nicolson e Thornburg, 2007). As glândulas de tamanho diminuto de *M. serrulata* e a viscosidade do exsudado seriam importantes para evitar a evaporação rápida do exsudado, o que permitiria que esse recurso permaneça disponível por maior tempo para a alimentação aos visitantes florais, como sugerido por Nicolson e Thornburg (2007). Adicionalmente, a maior viscosidade pode estar relacionada ao sucesso de sucção de formigas formicidas (Paul e Roces, 2003), como é o de *Camponotus*, que foi observado forrageando as florais de *M. serrulata*.

Sabe-se que as estruturas secretoras podem estar associadas a estratégias de proteção das plantas contra ataques de herbívoros e/ou atração a polinizadores (Fahn, 1979). Em *Microstachys serrulata*, a descrição das glândulas nas brácteas das flores pistiladas e estaminadas como nectários é um dado relevante do ponto de vista ecológico, pois indica que essas estruturas estejam envolvidas na atração as formigas, que foram apontadas como polinizadores da espécie (Faria *et al.*, 2022).

A presença de compostos fenólicos totais nas células secretoras do nectário pode estar relacionada a pigmentação avermelhada observada em campo. Compostos fenólicos correspondem a uma classe ampla de compostos tanto do ponto de vista químico quanto funcional (Soares, 2002; Gurgel *et al.*, 2005; Salatino *et al.*, 2007). Alguns compostos fenólicos podem conferir cor e filtrar a luz ultravioleta, como as antocianinas, proteção contra herbivoria, como os taninos, ou atuar como suporte estrutural, como as ligninas (Peleg *et al.*, 1998; Soares, 2002).

Nas 19 espécies descritas de *Microstachys*, glândulas nas flores pistiladas e estaminadas foram observadas apenas em *M. crotonoides*, *M. glandulosa*, *M. nana* e *M. nummularifolia* (Pscheidt, 2015). Como demonstrado no presente trabalho, a presença de glândulas nas brácteas das flores pistiladas passou despercebida, quando a descrição da espécie foi redigida. Acreditamos que esse fato se deva ao diminuto tamanho das brácteas e suas glândulas, especialmente na análise de material desidratado das exsiccatas. Somente uma análise anatômica detalhada poderá confirmar se as glândulas estão presentes nas brácteas das flores pistiladas e estaminadas de todas as espécies de *Microstachys*. Este pode ser um atributo anatômico relevante para as abordagens taxonômicas na tribo Hippomaneae.

CONCLUSÕES

Em *Microstachys serrulata*, as glândulas presentes nas brácteas das flores estaminadas são nectários. Nas brácteas das flores pistiladas descritas como aglandulares também ocorrem nectários diminutos, semelhantes aos presentes nas brácteas das flores estaminadas. O néctar produzido pelos nectários das brácteas atua como atrativo às formigas polinizadoras. Os resultados obtidos no presente trabalho ampliam o conhecimento sobre a ocorrência de nectários nas brácteas de espécies do gênero *Microstachys* e na tribo Hippomaneae, contribuindo com dados relevantes para a taxonomia e ecologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriano-Anaya LM, Pérez-Castillo E, Salvador-Figueroa M, Ruiz-González S, Vázquez-Ovando A, Grajales-Conesa J, Ovando-Medina I. 2016. Sex expression and floral diversity in *Jatropha curcas*: a population study in its center of origin. *PeerJ*. 4:2071. DOI: 10.7717/peerj.2071

Almeida AL, Paiva EAS, Vieira MF, Ventrella MC. 2022. How can structure and nectar composition explain the secretory process in super productive nuptial nectaries of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)? *Protoplasma* 260: 935–947. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01824-4>

APG - Angiosperm Phylogeny Group IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.

Baker HG. 1977. Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie* 8: 349–356.

Bawa KS, Bullock SH, Perry DR, Coville RE, Grayum MH. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *American Journal of Botany* 72: 346-356.

Beattie AJ, Turnbull C, Knox RB, Williams EG. 1984. Ant inhibition of pollen function: a possible reason why ant pollination is rare. *American Journal of Botany* 71: 421–426

Bhattacharya A, Datta K, Datta SK. 2005. Floral biology, floral resource constraints and pollination limitation in *Jatropha curcas* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8: 456-460.

Coutinho IAC, Valente VMM, Meira RMSA. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). *Australian Journal of Botany* 58: 224-232 DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/BT09200>

Das S, Das A. 2023. Ants are more than just curious bystanders to some flowers - they act as significant pollinators. *Frontiers in Insect Science* 3:1145761. DOI: 10.3389/finsc.2023.1145761

Davidson DW, McKey D. 1993. The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research* 2: 13-83.

Del-Claro K, Rico-Gray V, Torezan-Silingardi HM, Alves-Silva E, Fagundes R, Lange D, Dáttilo W, Vilela AA, Aguirre A, Rodriguez-Morales D. 2016. Loss and gains in ant-plant

interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats and lies. *Insectes Sociaux* 63: 207-221 DOI 10.1007/s00040-016-0466-2

De-Paula OC, Sajo MG, Prenner G, Cordeiro I, Rudall PJ. 2011. Morphology, development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae – Malpighiales). *Plant Systematics and Evolution* 292: 1-14. DOI 10.1007/s00606-010-0388-9

Dutton EM, Frederickson ME. 2012. Why ant pollination is rare: new evidence and implications of the antibiotic hypothesis. *Arthropod Plant Interactions* 6: 561-569. DOI: 10.1007/s11829-012-9201-8

Esser HJ. 1998. New combinations in *Microstachys* (Euphorbiaceae). *Kew Bulletin* 53: 955-960.

Esser HJ. 2001. Tribes Hippomaneae, Pachystromateae e Hureae; pp. 352–370. In: Radcliffe-Smith, A. (Ed.) *Genera Euphorbiacearum*, Royal Botanic Gardens, Kew, England.

Esser HJ. 2012. The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil. *Rodriguésia* 63: 209-225.

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

Faria IA, Anjos DV, Del-Claro K, Torezan-Silingardi HM. 2022. Ant pollination, phenology and breeding system of *Microstachys serrulata* (Mart. & Zucc.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) in the Brazilian savanna. *Plant Ecology* 223: 1247-1260. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11258-022-01271-4>

Feio AC, Riina R, Meira RMSA. 2016. Secretory structures in leaves and flowers of two dragon's blood *croton* (Euphorbiaceae): new evidence and interpretations. *International Journal of Plant Sciences* 177: 511-522. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/685705>

Fernandes GW, Aguirre-Jaimes A, Contreras-Varela X, Cocolletzi E, Sousa WO, Araujo L, Nunes B, Angeles G, Quesada M. 2021. Morphological and histological characterization of extrafloral nectaries induced by *Coelocephalapion* galls on *Croton antisiphiliticus* in the Brazilian Cerrado. *Flora* 274: 151758 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151758>

Freitas L, Bernardello G, Galetto L, Paoli AAS. 2001. Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 136: 267-277 DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/bojl.2000.0437>

Freitas L, Bernardello G, Galetto L, Paoli AAS. 2001. Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 267–277. DOI: 10.1006/bojl.2000.0437

Freitas-Silva L, Araújo HH, Meira RMSA, Tanaka FAO, Silva LC. 2023. Morphoanatomy, histochemical and secretions process of extrafloral nectaries in *Joannesia*

princeps Vell. (Euphorbiaceae). Flora 306: 152354 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152354>

Gagliardi KB, Cordeiro I, Demarco D. 2016. Protection and attraction: bracts and secretory structures in reducedin floescences of Malpighiales. Flora 220: 52-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2016.02.003>

González-Teuber M, Silva Bueno JC, Heil M, Boland W. 2012. Increased host investment in extrafloral nectar (EFN) improves the efficiency of a mutualistic defensive service. Plos One 7(10): e46598. DOI: 10.1371/journal.pone.0046598

Gurgel LA, Sidrim JJC, Martins DT, Cechinel Filho V, Rao VS. 2005. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. Journal of Ethnopharmacol 97: 409–412 DOI: doi:10.1016/j.jep.2004.11.033

Heil M, McKey D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 34: 425–5 DOI:10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410

Hernandez-Cumplido J, Forter B, Moreira X, Heil M, Benrey B. 2016. Induced floral and extrafloral nectar production affect ant-pollinator interactions and plant fitness. Biotropica 48: 342–8 DOI:10.1111/btp.12283

Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético. Porto Alegre: Artmed Editora.

Kirk PW. 1970. Neutral Red as a lipid fluorochrome. Stain Technology 45: 1–4. DOI: <https://doi.org/10.3109/10520297009063373>

Luo CW, Li K, Chen XM, Huang ZY. 2012. Ants contribute significantly to the pollination of a biodiesel plant, *Jatropha curcas*. Environmental Entomology 41: 1163-1168 DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EN12042>

Machado SR, Paleari LM, Paiva EAS, Rodrigues TM. 2015. Colleters on the inflorescence axis of *Croton glandulosus* (Euphorbiaceae): structural and functional characterization. International Journal of Plant Sciences 176: 86-93 DOI: 10.1086/678469

Meira RMSA, Miranda JDB, Coutinho IAC. 2020. Anatomical reevaluation and novelties on the leaf marginal tooth glands in *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (Euphorbiaceae): the importance of distinguishing colleters from nectaries. Plant Science Research and Practices 3: 63-82

Nicolson SW, Thornburg RW. 2007. Nectar chemistry. In: Nicolson, S.W., Nepi M, Pacini E. (Eds.), Nectaries and Nectar. Dordrecht: Springer.

O'Brien TP, McCully ME. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcaphi Pty. Ltda.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polyehromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.

Paiva EAS. 2017. How does the nectar of stomata-free nectaries cross the cuticle? *Acta Botanica Brasilica* 31: 525-530 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062016abb0444>

Papp N. 2004. Nectar and Nectary studies on seven *Euphorbia* species. *Acta Botanica Hungarica* 46: 225–234.

Paul J, Roces F. 2003. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *Journal of Insect Physiology* 49: 347-357 DOI:doi:10.1016/S0022-1910(03)00019-2

Peleg H, Bodine KK, Noble AC. 1998. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. *Chemical Senses* 23: 371-378.

Pereira LJ. 2019. Morfoanatomia Foliar de *Microstachys* A. Juss. e *Sebastiania* Spreng. (Hippomaneae-Euphorbiaceae): Caracterização das Estruturas Secretoras e Contribuições para a Distinção dos Gêneros. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Minas Gerais.

Pscheidt AC. 2015. O gênero *Microstachys* A. Juss. e a tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.

Purvis MJ, Collier DC, Walls D. 1964. Laboratory techniques in botany. London: Butterworths.

Ribeiro, VC., Leitão, CAE. 2020. Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma* 257: 993–1008 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01473-0>

Salatino A, Salatino MLF, Negri G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18: 11–33.

Samuel JN, Rastogi N. 2022. Ants as pollination vectors of ant-adapted *Euphorbia hirta* L. plants. *Arthropod-Plant Interactions* 16: 361–372 DOI: <https://doi.org/10.1007/s11829-022-09903-2>

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to Imagej: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.

Soares SE. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 15: 71-81.

Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuentes-Aguilar J, Meira RMS. 2015. Foliar secretory structures in crotonae (Euphorbiaceae): diversity, anatomy and evolutionary significance. American Journal of Botany 102: 1-15 DOI: 10.3732/ajb.1500017

Wu J, Liu Y, Tang L, Zhang F, Chen F. 2010. A study on structural features in early flower development of *Jatropha curcas* L. and the classification of its inflorescences. African Journal of Agricultural Research 6: 275-284.

FIGURAS E TABELAS



Figura 1: *Microstachys serrulata* e suas flores pistiladas e inflorescência com flores estaminadas sendo forrageada por formigas *Crematogaster* sp. A, C, D Flor pistilada com

nectário floral na bráctea. **B, E, F** Inflorescência estaminada. Cabeça de seta branca = nectário floral. Abreviações: Br = Bráctea (Fotos: Jacovine, GF).

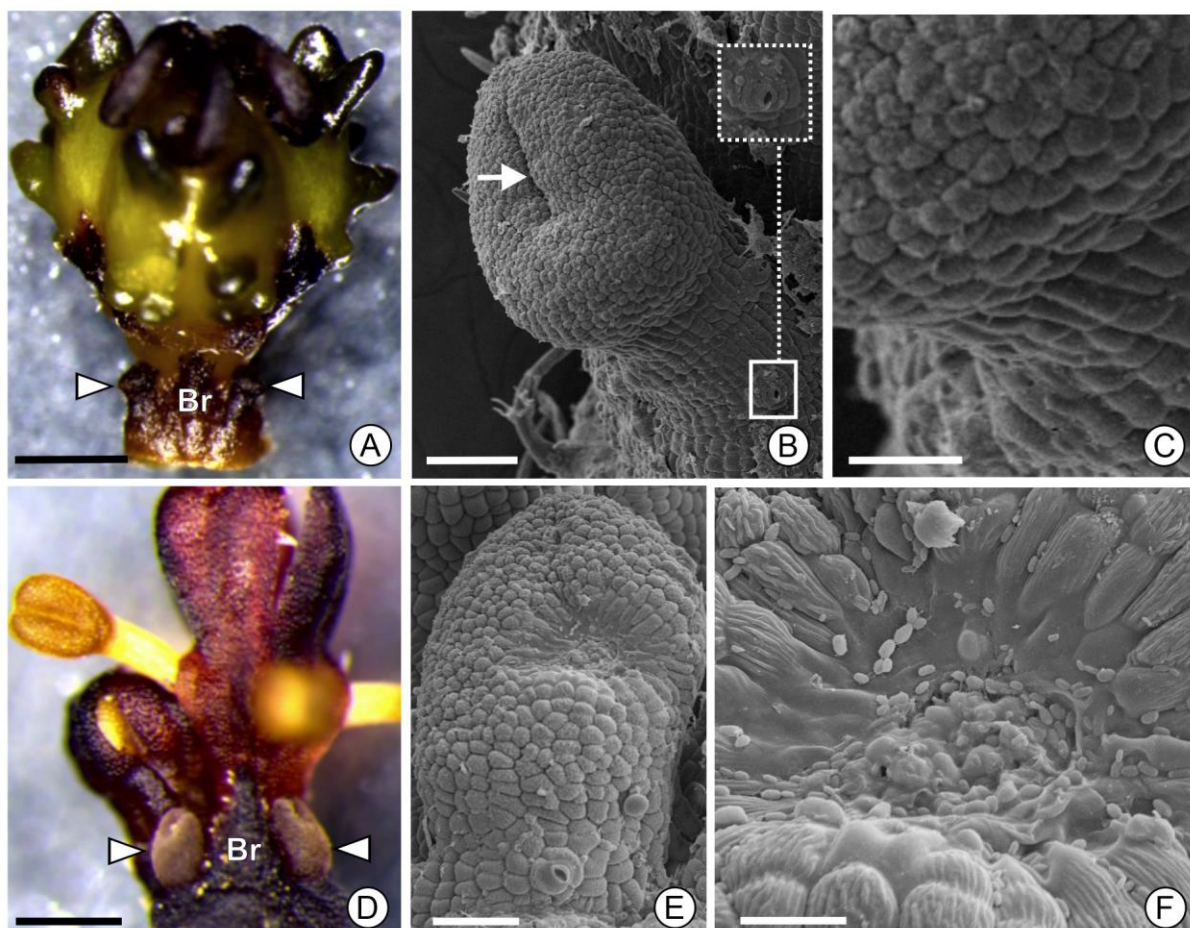


Figura 2: Morfologia externa da flor pistilada e estaminada de *M. serrulata*. **A e D** Imagens em estereomicroscópio. **B, C E e F.** Imagens em microscopia eletrônica de varredura. **A.** Flor pistilada com nectários na bráctea. **D.** Flor estaminada com nectários na bráctea. **B.** Nectário da flor pistilada com estômatos presentes no pedúnculo, cabeça secretora com uma fenda na

superfície secretora. Estômato destacado na imagem. **C.** Superfície papilhosa na cabeça secretora. **E.** Nectário da flor estaminada. **F.** Superfície secretora. Seta branca = fenda secretora. Cabeça de seta branca = Nectário. Abreviações: Br = Bráctea. Barras: A = 10 mm; B = 100 μm ; C = 125 μm ; D = 4 mm; E = 60 μm ; F = 20 μm .

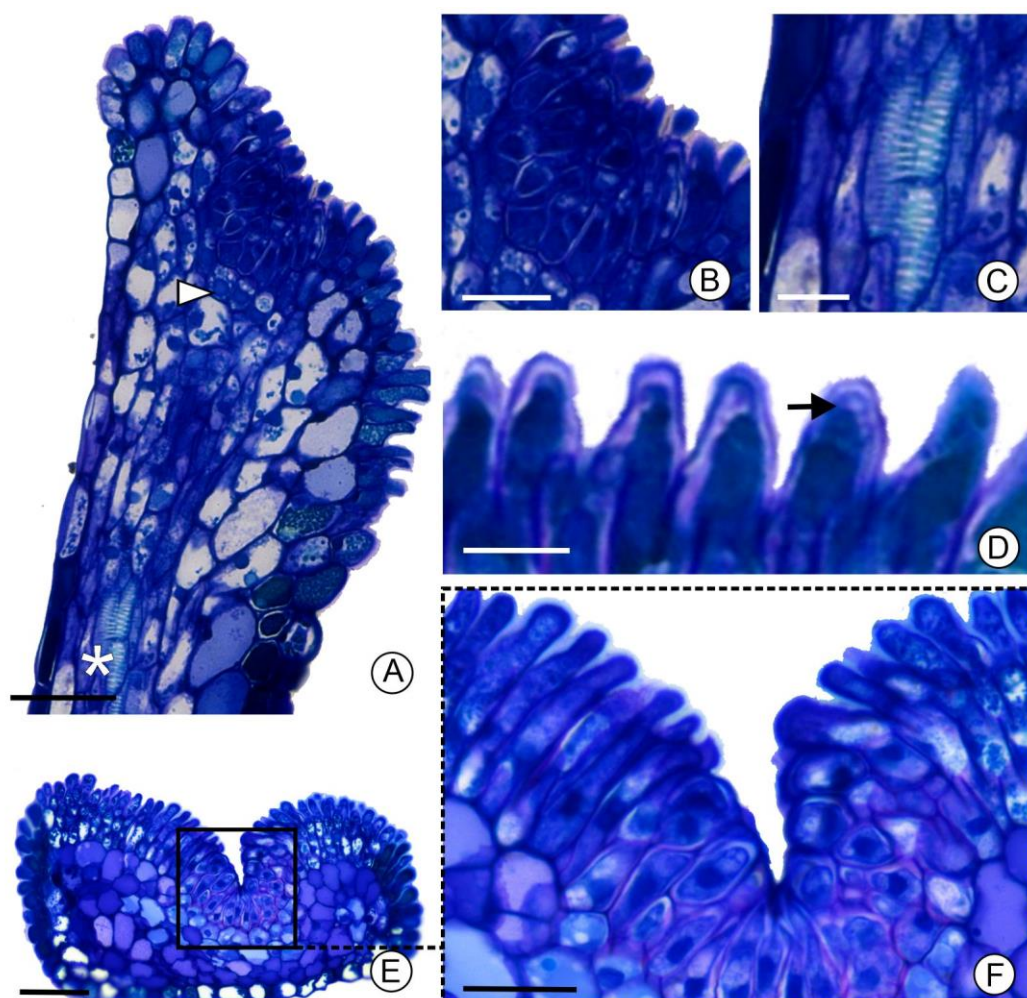


Figura 3: Anatomia dos nectários florais de *M. serrulata* em secção longitudinal radial e transversal. **A.** Nectário da flor estaminada. Presença de vascularização e parênquima nectarífero. **B.** Região secretora do nectário da flor estaminada. **C.** Células do xilema. **D.** Epiderme com formato em paliçada e células papilosas com cutícula fina. **E.** Secção longitudinal radial do nectário da flor pistilada com ênfase na sua região secretora. **F.** Ampliação da imagem **E**. Asterisco = sistema vascular. Cabeça de seta branca = parênquima nectarífero. Seta preta = cutícula. Barras: A = 100 μm ; B, E = 25 μm ; C, D = 30 μm ; F = 40 μm .

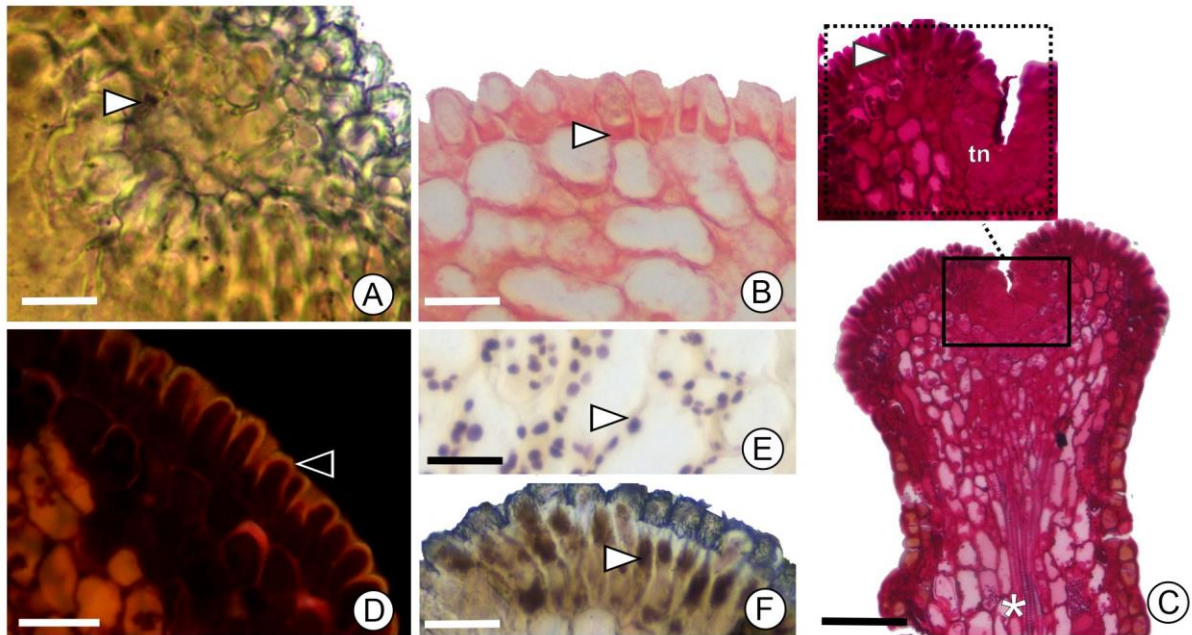


Figura 4: Histoquímica dos nectários florais de *M. serrulata*. **A.** Fehling. Presença de grânulos de açúcar redutor na epiderme secretora. **B.** Xylidine Ponceau. Proteínas presentes no citoplasma das células epidérmicas. **C.** PAS. Nectário da flor pistilada com presença de sistema vascular com ênfase no tecido nectarífero e polissacarídeos no citoplasma das células epidérmicas. **D.** Vermelho Neutro. Lipídeos presentes apenas na cutícula. **E.** Lugol. Grânulos de amido apenas nas células parenquimáticas. **F.** Cloreto Férrico. Composto fenólico no citoplasma das células epidérmicas. Asterisco = sistema vascular. Cabeça de seta branca = resultados. Abreviações: tn = tecido nectarífero. Barras: A, E = 15 μm ; B = 20 μm ; C = 100 μm ; D = 30 μm ; F = 25 μm .

Tabela 1: Resultados obtidos na região da epiderme secretora a partir dos testes histoquímicos aplicados nos nectários florais presentes nas brácteas das flores pistiladas e estaminadas de *Microstachys serrulata*. (+ resultado positivo) (- resultado negativo)

	Grupo de Metabólito	Teste aplicado	Nectário Flor Pistilada	Nectário Flor Estaminada
Lipídeos	Lipídeos totais	Vermelho neutro	-	-
Compostos fenólicos	Estrutural e não estrutural	Cloreto Férrico	+	+
		Azul de toluidina	+	+
Proteínas	Proteínas	Xylidine Ponceau	+	+
Polissacarídeos	Totais	PAS	+	+
	Amido	Lugol	-	-
	Açúcar redutor	Fehling	+	+