

ANDREA LANNA ALMEIDA

**NECTÁRIOS EM INFLORESCÊNCIAS DE *Mabea fistulifera* MART.
(EUPHORBIACEAE): ANATOMIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO NÉCTAR**

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
2015

ANDREA LANNA ALMEIDA

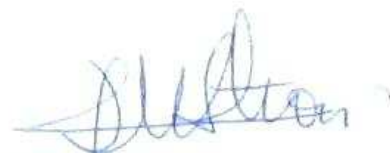
NECTÁRIOS EM INFLORESCÊNCIAS DE *Mabea fistulifera* MART.
(EUPHORBIACEAE): ANATOMIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO NÉCTAR

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: 20 de fevereiro de 2015




Aristéa Alves Azevedo



Renata Maria Strozi Alves Meira



Valdneá Casagrande Dalvi



Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

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

T

A447n
2015
Almeida, Andrea Lanna, 1986-
Nectários em inflorescências de *Mabea fistulifera* Mart.
(Euphorbiaceae) : anatomia e composição química do néctar /
Andrea Lanna Almeida. – Viçosa, MG, 2015.
vii, 30f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marília Contin Ventrella.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.23-30.

1. Biologia vegetal. 2. *Mabea fistulifera*. 3. Nectários -
anatomia. 4. Néctar - Composição. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 581

"O sonho é a pior das drogas, porque é a mais natural de todas. Assim se insinua nos hábitos com a facilidade que uma das outras não tem, se prova sem se querer, como um veneno dado. Não dói, não descora, não abate - mas a alma que dele usa fica incurável, porque não há maneira de se separar do seu veneno, que é ela mesma."

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade de aprender, crescer e me tornar uma profissional capacitada, crítica e humana. Ao Programa de Pós Graduação em Botânica, por oferecer estrutura e apoio em todas as etapas do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de fomento.

Aos membros da banca, Aristéa Alves Azevedo, Renata Maria Strozi Alves Meira e Valdneá Casagrande Dalvi, por aceitarem participar e contribuir com sua experiência e conhecimento neste trabalho.

À professora Marília Contin Ventrella, pela paciência infinita. Pela confiança depositada no meu potencial e em minhas habilidades. Por conhecer meus defeitos. Por ser a primeira mestra, a primeira referência e inspiração acadêmica.

Aos meus coorientadores, profs. Élder Antônio Sousa e Paiva e Milene Faria Vieira, por contribuírem ativamente na construção deste trabalho com sugestões, ideias e críticas sempre pertinentes. Em especial, agradeço à Milene por me receber em seu sítio, onde parte das coletas foi realizada, e ao Klinger Barbosa pelas lareiras acesas e o pó de café moído na hora.

Aos professores Edgard Picolli e Fábio Murilo DaMatta, pela oportunidade de sair da bolha “urucum – mabea” e poder participar de diversos trabalhos durante a graduação e o mestrado. Em especial ao prof. Fábio pelo livre acesso ao Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas, e ao Leandro Elias Morais pela essencial ajuda durante as análises químicas.

À mamys rainha do meu coração Isabela Lanna, por apoiar incondicionalmente minhas escolhas. Por me ouvir sempre, durante horas, inclusive enquanto está fazendo almoço ou esperando ônibus. E sempre ter a palavra certa, seja para afagar ou dar bronca. Pela amizade honesta e sólida que fortalece nossa relação.

Aos meus irmãos Alexandre, Gabriel e Ananda, por me mostrarem desde cedo que o mundo é feito de diversidade e adversidades. E também de música, riso, café, gritaria, briga, gatos, livros, hqs, tatuagens, ironia, mau humor, cuspe na orelha e lambida no umbigo.

Ao Tarcísio, por ser uma fonte inesgotável de amor, paciência, cerveja e batata-frita. Por estar presente em cada passo (certo ou em falso), cada decisão, cada balde chutado, cada fruto colhido. Por caminharmos juntos.

À família Souza Duarte, por ter me recebido de braços abertos.

Aos amigos que a Agronomia me deu: Ítalo (Pelé), as jujubas e as trocas de música estranha que só a gente escuta; Lorena e as conversas sobre feminismo, academia e outras loucura. Às amigas impossíveis, Lidiane e Suzana: de tão explosiva é a nossa amizade (e por isso aparentemente impossível), desconfio que afastar nunca será possível.

Às queridas Carla, Deborah e Laísa, por estarem sempre presentes. Sempre. O suporte e o carinho de vocês foram indispensáveis, principalmente na reta final da corrida maluca.

Ao cachudo e marrento (Gabriel) Poeys, por todas as vezes que escutamos “Evidências”, e por me dar à mão ao atravessarmos a rua. Ao Celso, pela amizade antiga e as conversas bêbadas de madrugada. Ao Arthur, pelos almoços junk food, as prosas sobre quadrinhos e coração. À Keyla, por ser meu grilo falante moderno e praticamente irlandês.

À família maior, os alunos do PPG Botânica, pela paixão compartilhada. À família menor (e mais louca), o laboratório de Anatomia Vegetal, pela convivência barulhenta, caótica e deliciosa. A toda essa gente querida que não tem um pingão de juízo na cabeça (porque a carreira acadêmica e a insanidade andam lado a lado): Guilherme, Anderson, João Paulo (Puff), Eliza, Tiago (Tica), Ítalo, Sara Galvão, Isabel, Valéria, Thamires, Daniel, Ivan, Álvaro, Ivanilson, e quem mais eu tenha esquecido (mas que não deixa de ser importante). À Dya, pelo socorro abençoado na revisão da versão final que salvou o prazo e a bolsa.

À Lays, por ser meu oposto. E mesmo sendo oposto, me entender com tanta clareza. Nossas trocas de ideias foram fundamentais durante a escrita deste trabalho.

Ao Ângelo, por estar sempre disponível e de bom humor. Às técnicas do lab. De Anatomia Vegetal, Aurora e Patrícia, por todas as navalhas cortadas e reagentes perdidos na geladeira. Aos técnicos do Núcleo de Microscopia e Microanálises, Gilmar e Karla, pelos vários anos de aprendizado.

Àqueles não citados, mas que estiveram em minha vida em algum momento e me fizeram rir, dançar, refletir. Aos que atravancaram meu caminho, por servirem de apoio para que eu enxergasse mais longe.

RESUMO

ALMEIDA, Andrea Lanna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Nectários em inflorescências de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): anatomia e composição química do néctar.** Orientadora: Marília Contin Ventrella. Coorientadores: Élder Antônio Sousa e Paiva e Milene Faria Vieira.

Mabea fistulifera é uma espécie arbórea, monoica, autoincompatível e polinizada por mamíferos, aves e abelhas. São encontrados nectários extranupciais nas flores pistiladas e frutos, sendo visitados por formigas, e nectários nupciais inseridos na raque da cima de flores estaminadas produzem o néctar consumido por polinizadores. O objetivo do estudo consiste em caracterizar os nectários presentes nas inflorescências de *M. fistulifera* e a composição do néctar. Nectários em diversos estádios de desenvolvimento foram coletados, fixados e processados para estudo em microscopia de luz e microscopia eletrônica. Amostras de néctar foram coletadas para quantificar sacarose, glicose, frutose, proteínas e aminoácidos. Os nectários nupciais e extranupciais apresentam características anatômicas semelhantes. Ambos são compostos por uma epiderme secretora sem estômatos ou tricomas, parênquima secretor e parênquima de preenchimento vascularizado por xilema e floema. O néctar produzido pelos nectários nupciais é diluído, rico em glicose e frutose, além de conter compostos fenólicos, lipídios, proteínas e aminoácidos. Essas características do néctar estão relacionadas tanto à atração dos polinizadores quanto à exclusão de pilhadores. Os nectários extranupciais começam a secretar a partir da antese das flores pistiladas, e continuam produzindo néctar durante o desenvolvimento dos frutos. A atividade floral e pós-floral dos nectários extranupciais e a presença de formigas visitando flores e frutos são fortes evidências para a função de proteção contra herbivoria.

ABSTRACT

ALMEIDA, Andrea Lanna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Nectaries in inflorescences of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): anatomy and chemical composition of nectar.** Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-advisers: Élder Antônio Sousa e Paiva and Milene Faria Vieira.

Mabea fistulifera is tree species, monoecious, self-incompatible and pollinated by mammals, birds and bees. Extranuptial nectaries are found in pistillate flowers and fruits, commonly visited by ants, and nuptial nectaries inserted in the rachis of staminate flowers that produce nectar consumed by pollinators. As such, the present study aimed to characterize the nectaries present in inflorescences of *M. fistulifera* and the composition of nectar. Nectaries in various stages of development were collected, fixed and processed for study in light and electron microscopy. Nectar samples were collected to quantify sucrose, glucose, fructose, proteins and amino acids. Nuptial and extranuptial nectaries have similar anatomical features. Both are composed of a secretory epidermis without stomata or trichomes, secretory parenchyma and ground parenchyma vascularized by xylem and phloem. The nectar produced by nuptial nectaries is diluted, rich in glucose and fructose, and contain phenolic compounds, lipids, proteins and amino acids. These nectar features are related both to the attraction of pollinators to the exclusion of nectar robbers. The extranuptial nectaries begin to secrete at anthesis of pistillate flowers, and continue to produce nectar during fruit development. The floral and post-floral activity nectaries of extranuptial and the presence of ants visiting flowers and fruits are strong evidence for protection against herbivory function.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 4 |
| <i>Material vegetal e área de coleta</i> | 4 |
| <i>Microscopia de luz</i> | 4 |
| <i>Microscopia eletrônica de varredura</i> | 5 |
| <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i> | 5 |
| <i>Análise química do néctar</i> | 6 |
| RESULTADOS | 7 |
| DISCUSSÃO | 19 |
| CONCLUSÃO | 22 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 23 |

INTRODUÇÃO

Derivado do grego *nektar*, o termo néctar se referiu durante muitos séculos à bebida favorita dos deuses gregos e romanos. A partir do início do século XVII passou a definir o “líquido doce encontrado em flores” (Harper, 2014). Mais do que uma simples solução açucarada, o néctar é responsável por intermediar a relação das plantas com polinizadores e defensores (Heil, 2011). Além de água, sacarose, glicose e frutose, a solução pode conter outros carboidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, alcaloides, lipídios e outras substâncias (Baker & Baker, 1983a). A composição, concentração e volume do néctar variam entre as espécies vegetais. Essas diferenças se devem, principalmente, ao processo de coevolução da planta com polinizadores e defensores (Brandenburg *et al.*, 2009). A solução deve conter compostos que atuem na atração e atendam às diversas demandas nutricionais de cada visitante (Pacini & Nicolson, 2007), pois, assim como os deuses, os animais também têm suas preferências.

O néctar é o principal recurso ofertado pelas plantas como recompensa para a polinização, e é um recurso energético importante para diversos animais (Nicolson, 2007). A presença do néctar e sua relação direta com os polinizadores foi um dos principais passos evolutivos que garantiram o sucesso adaptativo das angiospermas (Brandenburg *et al.*, 2009). O néctar também é responsável pela atração de artrópodes, principalmente formigas, servindo como alimento em troca de proteção contra herbivoria e microrganismos patogênicos (Heil & McKey, 2003; Nogueira *et al.*, 2012). Apesar de estar relacionado à recompensa para polinizadores e defensores, o néctar pode atrair animais que roubam a secreção sem ofertar benefícios à planta (Irwin *et al.*, 2010). A composição do néctar pode atuar na exclusão desses pilhadores, reduzindo ou até mesmo evitando o consumo da secreção (González-Teuber & Heil, 2009).

Nectários são as estruturas responsáveis pela produção de néctar (Fahn, 1988; Pacini *et al.*, 2003), e apresentam variações quanto à disposição no corpo vegetal, morfologia, características estruturais e ultraestruturais, duração do processo secretor, entre outras (Escalante-Pérez & Heil, 2012). Podem ser classificados de acordo com a posição em que se encontram na planta, função ecológica realizada ou características anatômicas (Schmid, 1988; Bernardello, 2007). A classificação proposta por Delpino (1868-1875 apud Schmid, 1988) divide os nectários em dois tipos, nupciais e extranupciais, de acordo com a interação ecológica estabelecida entre o néctar e os

animais que o consomem. Os nectários nupciais estão diretamente associados ao processo de polinização, sendo responsáveis pela síntese do néctar ofertado aos polinizadores (Fahn, 1979a; Bernardello, 2007). Em geral estão localizados nos verticilos florais (De la Barrera & Nobel, 2004; Heil, 2011), mas podem ser encontrados em órgãos vegetativos (Schmid, 1988; Yamasaki *et al.*, 2013). Os nectários extranupciais estão relacionados à atração de patrulhadores e à defesa indireta da planta, sem qualquer papel na polinização (Fahn 1979a; Villamil *et al.*, 2013). Podem ser encontrados tanto em órgãos vegetativos quanto em órgãos reprodutivos (Paiva, 2011; Paiva & Martins, 2014; Marazzi *et al.*, 2013).

Nectários nupciais e extranupciais podem ser encontrados na mesma planta (Pacini & Nicolson, 2007), como observado em *Croton suberosus* (Freitas *et al.*, 2001), *Tabebuia serratifolia* (Thomas & Dave, 1992) e diversas espécies do gênero *Inga* (Koptur, 1994). A presença de tipos diferentes de nectários em uma mesma espécie permite observar e comparar as semelhanças e diferenças quanto à anatomia, organização ultraestrutural e composição química entre eles (Freitas *et al.*, 2001).

Mabea fistulifera Mart. (Euphorbiaceae), planta arbórea distribuída em áreas de Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica (Cordeiro *et al.*, 2010), é um exemplo de planta que apresenta nectários com funções distintas. A espécie é monoica, autoincompatível (Vieira & Carvalho-Okano, 1996) e, assim como os demais representantes do gênero *Mabea*, possui inflorescências pendentes paniculiformes, com flores pistiladas presentes na base e flores estaminadas arrançadas em cimas distribuídas no restante da raque (Esser, 2012). Cada inflorescência é composta por três a doze flores pistiladas e aproximadamente 70 cimas de flores estaminadas (Vieira & Carvalho-Okano, 1996). As flores pistiladas e frutos em desenvolvimento possuem nectários extranupciais alternos e externos às peças do cálice (Vieira & Carvalho-Okano, 1996). Embora não seja possível visualizar gotas de néctar, formigas foram observadas visitando somente os nectários dos frutos (Vieira & Carvalho-Okano, 1996). As cimas de flores estaminadas apresentam nectários nupciais na base da raque, que produzem volumosas gotas de néctar posteriormente consumido pelos polinizadores (Vieira & Carvalho-Okano, 1996).

A biologia floral de *M. fistulifera* é caracterizada por uma fase feminina, com duração de dez dias, seguida de uma fase bissexual de três dias (Vieira & Carvalho-Okano, 1996). Em cada dia da fase bissexual um terço das flores estaminadas (sentido base-ápice) entra em antese, caracterizada pela liberação de pólen e exsudação de néctar

(Vieira & Carvalho-Okano, 1996). Ao final da antese, toda a porção estaminada é caduca (Vieira & Carvalho-Okano, 1996). Os nectários nupciais começam a secretar ao entardecer, e na manhã do dia seguinte o néctar ainda está presente e apto para consumo (Vieira & Carvalho-Okano, 1996). O longo período de exposição do néctar na inflorescência, que pode durar até dezoito horas, permite a atípica atração de polinizadores de hábito diurno e noturno (Vieira & Carvalho-Okano, 1996).

Uma extensa variedade de polinizadores foi identificada, entre eles mamíferos como morcegos microquirópteros (Vieira & Carvalho-Okano, 1996), gambás (Vieira *et al.*, 1991), saguis (Ferrari & Strier, 1992), muriquis (Torres de Assumpção, 1991; Ferrari & Strier, 1992), macacos-prego (Torres de Assumpção, 1991) e micos-leão-preto (Passos & Kim, 1999). Diversas aves passeriformes (Vieira *et al.*, 1992; Vieira & Carvalho-Okano, 1996; Olmos & Boulhosa, 2000) e não-passeriformes (Vieira *et al.*, 1992; Silva, 2008) também foram observadas visitando as inflorescências e promovendo a polinização, bem como abelhas de língua curta (Vieira & Carvalho-Okano, 1996).

Apesar dos estudos detalhados sobre biologia reprodutiva e polinização de *M. fistulifera*, não há informações sobre as características anatômicas e ultraestruturais dos nectários, bem como sobre a composição do néctar. O objetivo do presente trabalho consiste em comparar a composição química do néctar, os aspectos anatômicos e histoquímicos dos nectários nupciais e extranupciais de *M. fistulifera*, e caracterizar os aspectos ultraestruturais dos nectários nupciais. Pretende-se, também, responder às seguintes perguntas: (1) quais características anatômicas dos nectários estão associadas às diferenças quanto ao volume de néctar secretado? (2) Como as células e organelas participam do processo de síntese do néctar nupcial? (3) Qual a relação entre a composição do néctar e os visitantes observados nas inflorescências? (4) O período de secreção do néctar extranupcial apresenta alguma correlação com a atração de defensores?

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e área de coleta

Foram coletados nectários nupciais e extranupciais em pré-antese, antese e pós-antese e amostras de néctar de cinco indivíduos de *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), ocorrentes no Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG, e na RPPN Vida Verde, Coimbra/MG. As coletas foram realizadas entre abril e junho, período que corresponde à floração de *M. fistulifera* em Viçosa/MG. O pico de florescimento (abril-maio) coincide com o início da estação seca (Torres de Assumpção, 1991).

Microscopia de luz

Nectários nupciais foram coletados aproximadamente 48h e 24h antes da antese das flores estaminadas, no momento da antese e 24h após. Nectários extranupciais foram coletados de flores pistiladas em pré-antese, antese, em frutos pequenos (aproximadamente 0,5 cm), médios (aprox. 0,9 cm) e grandes (aprox. 2,0 cm). As amostras foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, volume:volume) por 48 horas e conservadas em etanol 70% (Johansen, 1940), posteriormente desidratadas em série etanólica e incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Alemanha). Secções transversais e longitudinais (5µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,4 (O'Brien *et al.*, 1964) e montadas com resina sintética (Permout, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA).

Para os estudos histoquímicos, foram coletados nectários nupciais e extranupciais assim como para o estudo anatômico. Amostras frescas ou fixadas em FAA, seccionadas em micrótomo de mesa e, também, amostras incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato. As seções foram submetidas aos seguintes reagentes: Sudan IV (Johansen, 1940) e vermelho neutro (Kirk, 1970) para lipídios; reagente NADI (David & Carde, 1964) para óleos essenciais e resinas; Lugol (Johansen, 1940) para amido; ácido periódico-reagente de Schiff (PAS) (O'Brien & McCully, 1981) para polissacarídeos neutros; azul de alciano (Pearse, 1980) para polissacarídeos ácidos e mucopolissacarídeos; vermelho de rutênio (Johansen, 1940) e corifosfina (Weis *et al.*, 1988) para substâncias pécticas; reagente de Fehling (Sass, 1951) para açúcares redutores; xilidine Ponceau (Vidal, 1970) para proteínas; cloreto férrico (Johansen,

1940) para compostos fenólicos totais; vanilina clorídrica (Mace & Howell, 1974) para taninos. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com o método proposto pelos autores.

As imagens das análises estrutural e histoquímica foram obtidas em câmera fotográfica digital (AxioCam HRc, Zeiss, Göttinger, Alemanha) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision acoplados a um microscópio de luz (AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão). A análise com fluorocromos (vermelho neutro e corifosfina) foi realizada no mesmo microscópio, utilizando o sistema de epifluorescência com filtro UV (WU: 340-380nm), espelho dicróico (400nm) e filtro de barreira (420nm).

Microscopia eletrônica de varredura

Nectários nupciais foram coletados 48h antes da antese, na antese e 12h após. Nectários extranupciais foram coletados de flores pistiladas em pré-antese, antese e frutos médios. As amostras foram fixadas em FAA por 48 horas e estocados em etanol 70%, posteriormente desidratadas em série etanólica crescente e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂ (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) (Robards, 1978). Após a fixação das amostras nos suportes com uso de esmalte contendo grafite, foi realizada a deposição metálica com ouro (Sputter Coater FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra). Os estudos em MEV foram realizados no Núcleo de Microscopia e Microanálise – UFV.

Microscopia eletrônica de transmissão

Nectários nupciais foram coletados aproximadamente 72, 24 e 6 horas antes da antese e 12 horas após. Secções longitudinais (1mm) foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) em tampão fosfato 0,2 M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M e incluídas em resina epoxi (Spurr, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA)(Roland, 1978). Secções ultrafinas (60 nm), obtidas em ultramicrotomo (UC6, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), foram contrastadas com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A observação e obtenção das imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de

transmissão Tecnai G2–Spirit (Philips/FEI Company, Eindhoven, Holanda). Os estudos em MET foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG.

Análise química do néctar

Para coleta de néctar nupcial, inflorescências foram ensacadas em campo às 16h e o néctar secretado foi coletado às 23h com seringas plásticas, onde o volume foi mensurado. Para coleta de néctar extranupcial, inflorescências com flores pistiladas em antese e ramos com frutos pequenos foram coletadas e colocadas em baldes com água posteriormente ensacados, criando uma câmara úmida. Após doze horas nessas condições, a secreção foi coletada com seringas plásticas. As amostras foram acondicionadas em microtubos plásticos, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer a -86°C (Série 88700, Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos). Amostras de néctar foram submetidas à extração etanólica a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Ferne *et al.*, 2001) e aminoácidos totais (Gibon *et al.*, 2004). A concentração de proteínas solúveis foi mensurada por meio da ligação entre proteína e corante (Bradford, 1976). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal – UFV.

RESULTADOS

Localização e morfologia dos nectários

Os nectários nupciais de *M. fistulifera* estão amplamente distribuídos no eixo da inflorescência (Fig. 1A-B). É possível observar que as cimas com nectários secretando apresentam flores em antese (Fig. 1B-C). Cada cima possui dois nectários opostos inseridos na raque, situados abaixo da bráctea (Fig. 1C). Os nectários são reniformes e apresentam coloração verde intensa (Fig. 1C).

Os nectários extranupciais foram observados em flores pistiladas (Fig. 1D-E) e frutos em diversos estádios de desenvolvimento (Fig. 1F). São cinco nectários distribuídos no receptáculo, externos e alternos às sépalas (Fig. 1D-E). Assim como os nectários nupciais, apresentam coloração verde e são reniformes, mas são visivelmente menores (Fig. 1E). O início do período secretor ocorre a partir da antese das flores pistiladas; no entanto, a formação de gotas de secreção só pode ser observada nas inflorescências colocadas em câmara úmida (Fig. 1D), devido à evaporação da água contida no néctar em ambiente natural. Os nectários continuam em atividade durante o amadurecimento dos frutos (Fig. 1F).

Estrutura dos nectários

Os nectários nupciais são compostos por epiderme secretora, parênquima secretor e parênquima de preenchimento, além de vários feixes vasculares formados por floema e xilema (Fig. 2A). A epiderme secretora em paliçada é multiestratificada, com duas ou três camadas de células (Fig. 2B-D) revestidas por uma espessa cutícula (Fig. 2D). As células da epiderme são caracterizadas pela presença de núcleo evidente, citoplasma conspícuo, vacúolos diminutos (Fig. 2D) e paredes primárias espessas impregnadas por pectina (Fig. 2D, Tabela 1). O parênquima secretor é formado por várias camadas de células pequenas, predominantemente globosas, com paredes delgadas e celulósicas, vacúolos volumosos (Fig. 2C), inúmeros cloroplastos (Fig. 2E) e pequenos grãos de amido (Fig. 2F). A parede periclinal externa das células parenquimáticas, adjacentes à epiderme, mostra-se mais espessa (Fig. 2D). O parênquima secretor é intensamente irrigado por floema (Fig. 2C). O parênquima de preenchimento é composto por células ligeiramente alongadas, com paredes celulares delgadas, vacúolos volumosos (Fig. 2B-C), cloroplastos e menor acúmulo de grãos de amido (Fig. 2F). O parênquima de preenchimento apresenta feixes vasculares compostos por xilema e floema (Fig. 2C). Ao longo dos estádios de secreção é possível

observar a dinâmica de acúmulo e consumo de amido, principalmente no parênquima secretor (Fig. 2F-G). Não há presença de grãos de amido na epiderme (Fig. 2F-G, Tabela 1). O acúmulo máximo de amido foi observado em nectários coletados 24h antes da antese (Fig. 2F). Um dia após a antese, praticamente todo o amido foi consumido no parênquima secretor (Fig. 2G).

Cinco nectários extranupciais se encontram distribuídos no receptáculo, alternos às sépalas (Fig. 3A-B) e inseridos logo abaixo do ovário (Fig. 3C). Tricomas e poros estomáticos não foram observados (Fig. 3A-B). Os nectários extranupciais apresentam epiderme secretora composta por uma a duas camadas de células colunares (Fig. 3C, E) e cutícula espessa (Fig. 3C, 5A). As células epidérmicas possuem citoplasma denso, núcleo evidente e vacúolos pequenos (Fig. 3E). O parênquima secretor é caracterizado por apresentar várias camadas de células diminutas e isodiamétricas (Fig. 3C, E) que contém cloroplastos (Fig. 3D) e, ocasionalmente, drusas (Fig. 3E). O parênquima de preenchimento se diferencia do parênquima secretor por apresentar células maiores, além de uma maior quantidade de drusas e presença de laticíferos (Fig. 3C, E). Feixes vasculares estão distribuídos pelo parênquima de preenchimento, e apenas cordões de floema irrigam o parênquima secretor (Fig. 3E). A formação de espaço subcuticular foi observada nos nectários das flores em antese, bem como nos frutos (Fig. 3C, F-I). Mudanças anatômicas nos nectários ocorreram somente nos frutos maiores (aprox. 2,0 cm), onde algumas regiões da epiderme apresentam células colapsadas (Fig. 3H).

Os testes histoquímicos realizados com os nectários nupciais revelaram o acúmulo de néctar no espaço subcuticular a partir de 48h antes da antese (Fig. 4A-D). A secreção é composta por uma mistura de açúcares (Fig. 4A), proteínas (Fig. 4B), lipídios (Fig. 4C) e compostos fenólicos (Fig. 4D). Proteínas também foram observadas no citoplasma das células da epiderme secretora e em algumas células parenquimáticas (Fig. 4B). Mucilagens e taninos não foram detectados no nectário nupcial ou na secreção (Tabela 1). Foi constatado, ainda, que nectários nupciais em antese e pós-antese apresentam deposição de lipídios na epiderme secretora (Fig. 4E-F). O acúmulo de lipídios ocorre na região central da epiderme, entre as paredes celulares (Fig. 4E). A reação positiva ao reagente NADI indica que se trata de uma oleoresina (Fig. 4F, Tab. 1).

Os nectários extranupciais de flores estaminadas e frutos pequenos, médios e grandes foram submetidos a diversos testes histoquímicos, e apresentaram poucas diferenças entre as fases amostradas (Fig. 5A-D, Tabela 1). Não foi observado acúmulo

de lipídios nos espaços intercelulares da epiderme secretora (Fig. 5A). A parede periclinal externa das células epidérmicas é mais espessa que as demais, e altamente impregnadas por pectina (Fig. 5B). A secreção acumulada no espaço subcuticular apresenta uma reação tênue ao reagente Xilidine Ponceau, indicando o acúmulo de proteínas em pequena quantidade (Fig. 5C). A presença de proteínas também foi observada no citoplasma das células da epiderme e do parênquima secretor (Fig. 5C). Compostos fenólicos foram observados somente em nectários danificados ou senescentes, depositados tanto na epiderme secretora quanto no parênquima (Fig. 5D). Mucilagens e taninos também não foram detectados no nectário extranupcial ou na secreção (Tabela 1).

Ultraestrutura do nectário nupcial

A epiderme do nectário nupcial, durante a fase pré-secretora (aproximadamente 72 horas antes da antese), é caracterizada pela presença de células com paredes espessas, pequenos vacúolos e citoplasma denso (Fig. 6A). É possível observar a presença de inúmeras mitocôndrias, plastídios com sistema de membranas internas pobremente desenvolvido, retículo endoplasmático rugoso e dictiossomos (Fig. 6B). Nota-se a presença de inúmeras vesículas dispersas no citoplasma, e um pequeno acúmulo de compostos no espaço periplasmático (Fig. 6B). Seis horas antes da antese observa-se nas células da epiderme a formação de um vacúolo único, com acúmulo de material elétron-opaco em seu interior (Fig. 6C). As células do parênquima secretor apresentam vacúolo central com acúmulo de compostos elétron-opacos (Fig. 6D). São observados cloroplastos com pequenos grãos de amido, mitocôndrias, peroxissomos e vesículas (Fig. 6D).

Doze horas após início da liberação de néctar nota-se um volumoso acúmulo de substâncias no espaço periplasmático (Fig. 6E) das células da epiderme, bem como a presença de secreção eletrondensa no espaço intercelular (Fig. 6E-F). Inúmeras e diminutas vesículas se encontram dispersas no citoplasma, muitas delas associadas a dictiossomos. Os plastídios adquirem formato globoso, com membranas internas desorganizadas (Fig. 6F). Em todas as fases do processo secretor nota-se a presença de plasmodios conectando as células da epiderme secretora (Fig. 6A, 6E-F).

A formação de um canal intercelular para passagem de secreção é evidente nos nectários coletados 72h antes da antese (Fig. 6A, 7A). Poros contendo material elétron-opaco são observados atravessando a parede das células da epiderme, permitindo a

conexão com o espaço intercelular (Fig. 7A-B), formando canais. Doze horas após o início da liberação de néctar é possível observar a presença de secreção eletrondensa nos canais (Fig. 7C).

Análise química do néctar

O volume de néctar nupcial coletado por inflorescência variou entre 1.2 mL e 2.5 mL. A concentração total de açúcares no néctar nupcial é equivalente a 21,7% da solução. Glicose (100.17 mg mL⁻¹), frutose (82.03 mg mL⁻¹) e sacarose (35.07 mg mL⁻¹) correspondem a, respectivamente, 46.10%, 37,76% e 16.14% do total de açúcares quantificados. A relação sacarose-hexoses é de 0.19. O néctar nupcial apresenta também 0,0018 mg mL⁻¹ de proteínas totais e 0,0645 mg mL⁻¹ de aminoácidos livres.

O néctar extranupcial foi coletado em flores em antese e frutos pequenos. O volume de néctar coletado por inflorescência variou entre 0.05 mL e 0,1 mL. A concentração total de açúcares no néctar extranupcial é equivalente a 12,9% da solução. Glicose (52.27 mg mL⁻¹), frutose (55.30 mg mL⁻¹) e sacarose (10.3 mg mL⁻¹) correspondem a, respectivamente, 46.61%, 45,01% e 8,38% do total de açúcares quantificados. A relação sacarose-hexoses é de 0.09. O néctar apresenta também 0,0017 mg mL⁻¹ de proteínas totais e 0,127 mg mL⁻¹ de aminoácidos livres.

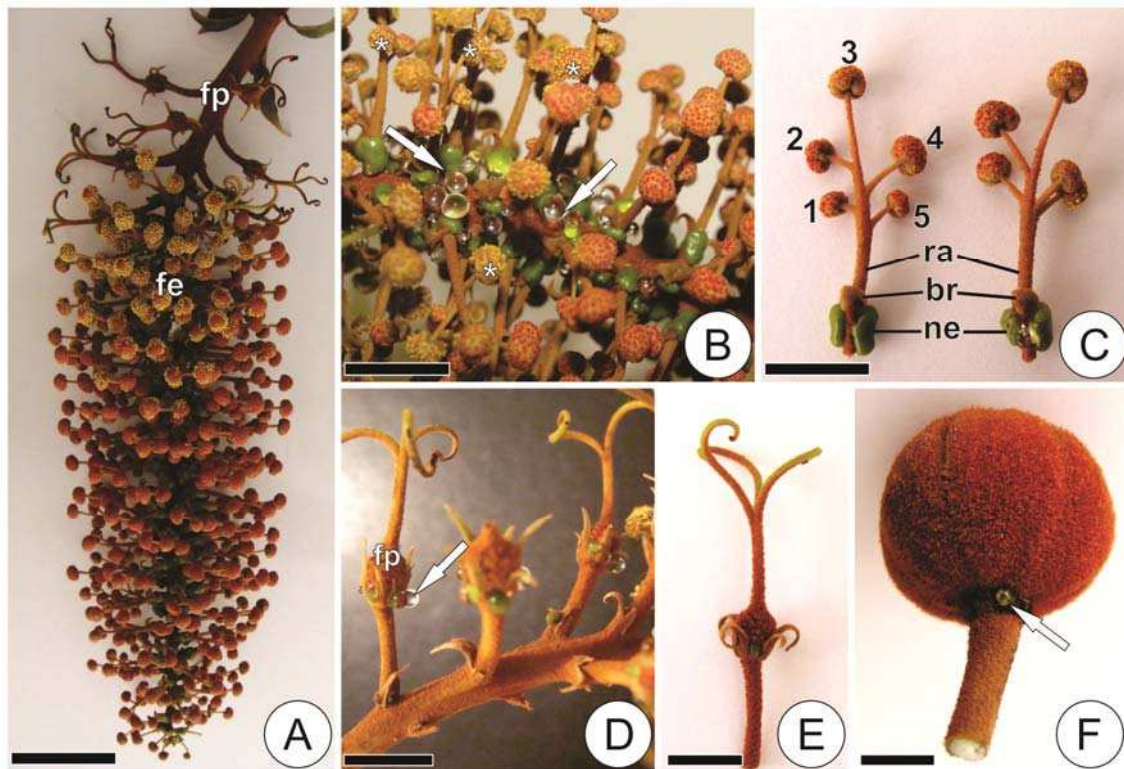


Figura 1: Localização e morfologia do nectário nupcial e extranupcial de *Mabea fistulifera*. (A) Inflorescência com flores pistiladas na base, acima das cimas de flores estaminadas. Note no terço basal as flores estaminadas com grãos de pólen amarelos. (B) Detalhe flores estaminadas na raque da inflorescência. As cimas em antese (*) apresentam nectários nupciais em estágio secretor (setas). (C) Cima de flores estaminadas, composta por cinco flores, uma bráctea e dois nectários nupciais inseridos na raque. (D) Detalhe das flores pistiladas após 12h em câmara úmida. Gotas de néctar se formam na região dos nectários extranupciais (seta). (E) Flor pistilada em antese. (F) Fruto grande com nectários nupciais ativos e secretando néctar (seta). br, bráctea; fe, flor estaminada; fp, flor pistilada; fr, fruto; ne, nectário; ra, raque. Barra = 3 cm (A), 13 mm (B), 10 mm (C), 8 mm (D), 6 mm (E, F).

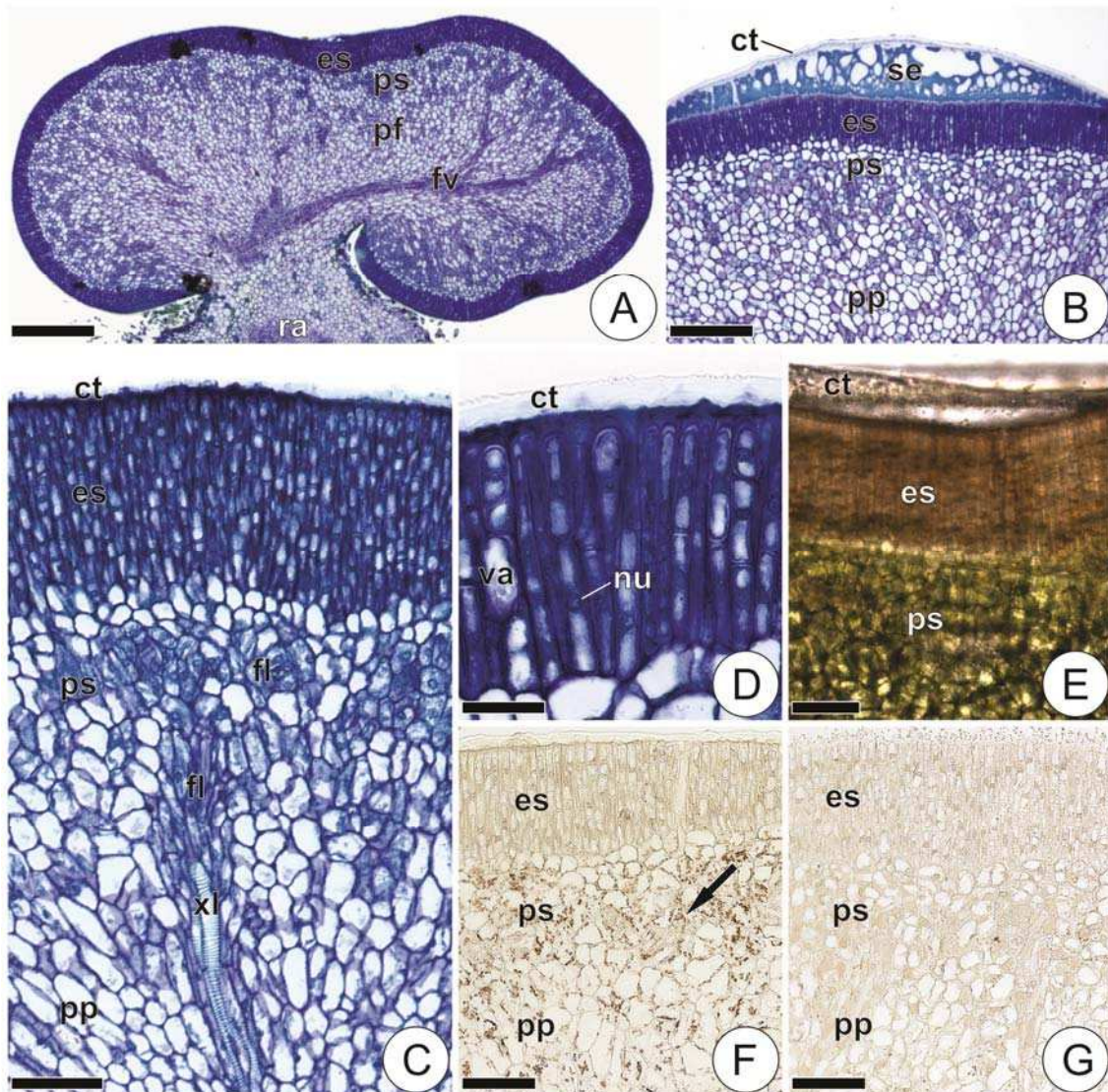


Figura 2: Caracterização anatômica do nectário nupcial de *Mabea fistulifera*. Secções transversais de nectários coletados 24h antes (A-F) e 24h após (G) a antese. (A-C) Caracterização geral do nectário. (A) Observar os feixes vasculares distribuídos em toda a extensão do parênquima; (B) acúmulo de secreção no espaço subcuticular; (C) detalhe do feixe vascular, evidenciando as terminações de floema no parênquima secretor. (D) Detalhe das células da epiderme. (E) Secção de amostra fresca, coloração verde indica presença de cloroplastos no parênquima secretor e de preenchimento. (F-G) Secções coradas com reagente de Lugol, para observação de amido. (F) Nectário 24h antes da antese; nota-se a presença de pequenos grãos de amido (seta), principalmente no parênquima secretor. (G) Nectário 24h após antese; a ausência de amido evidencia o consumo dos mesmos durante a síntese de néctar. ct, cutícula; es, epiderme secretora; fl, floema; fv, feixe vascular; nu, núcleo; pp, parênquima de preenchimento; ps, parênquima secretor; ra, raque; se, secreção; va, vacúolo; xl, xilema. Barra = 300 μm (A), 150 μm (B, F, G), 70 μm (C, E), 30 μm (D).

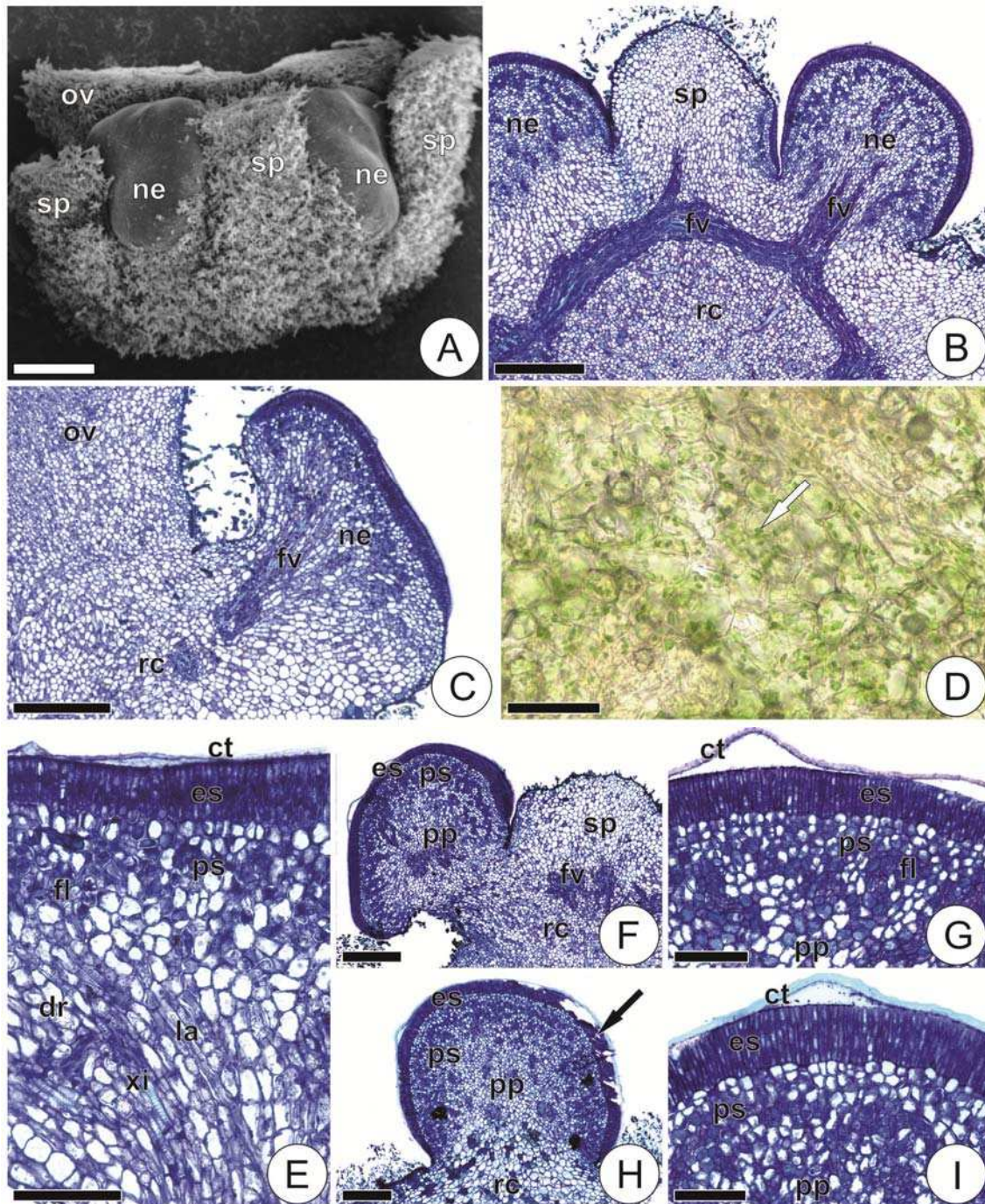


Figura 3: Caracterização anatômica do nectário extranupcial em flores pistiladas (A-E) e frutos (F-I) de *Mabea fistulifera*. (A) Eletromicrografia de varredura do receptáculo e parte do ovário. Observar a alternância entre nectários e sépalas. (B) Corte transversal do receptáculo de flor pistilada em pré-antese. (C) Corte longitudinal do receptáculo da flor pistilada em antese. (D) Nectário de flor em antese sem fixação e seccionado à mão, Detalhe do parênquima secretor, evidenciando a presença de cloroplastos. (E) Detalhe de nectário da flor pistilada em antese. Observar a formação de espaço subcuticular. (F-G) Nectário do fruto pequeno. (H-I) Nectário do fruto grande. Notar a presença de regiões danificadas (seta) e regiões ainda em atividade secretora (I). ct, cutícula; dr, drusa; es, epiderme secretora; fl, floema; fv, feixe vascular; la, laticífero; ne, nectário; ov, ovário; pp, parênquima de preenchimento; ps, parênquima secretor; rc, receptáculo; sp, sépala; xi, xilema. Barra = 500 μm (A), 400 μm (B, C, F, H), 40 μm (D), 100 μm (E, G, I).

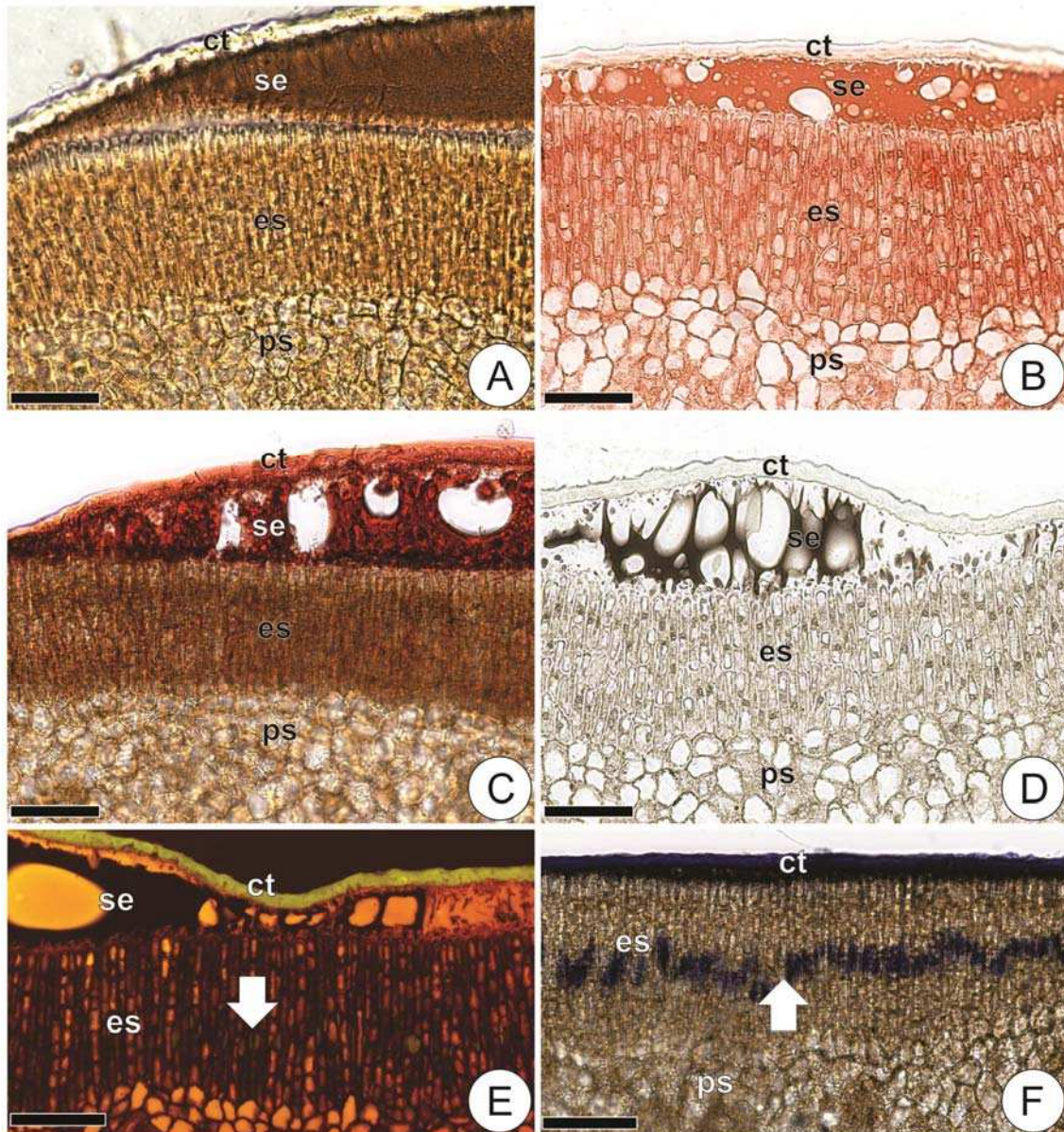


Figura 4: Caracterização histoquímica do nectário nupcial de *Mabea fistulifera*. Secções transversais do nectário submetidas a diversos testes histoquímicos: (A-D) 48h antes da antese, (E-F) antese. (A) reagente de Fehling; os açúcares redutores coram de marrom. (B) xilidine Ponceau; as proteínas coram de vermelhos. (C) sudan IV; os lipídios coram de vermelho intenso. (D) cloreto férrico, os compostos fenólicos coram de marrom. (E) vermelho neutro; os lipídios emitem fluorescência secundária amarela esverdeada sob luz ultravioleta. (F) NADI; as oleoresinas coram de azul ct, cutícula; es, epiderme secretora; ps, parênquima secretor; se, secreção. Barra = 60 μ m (C-F), 80 μ m (E-F).

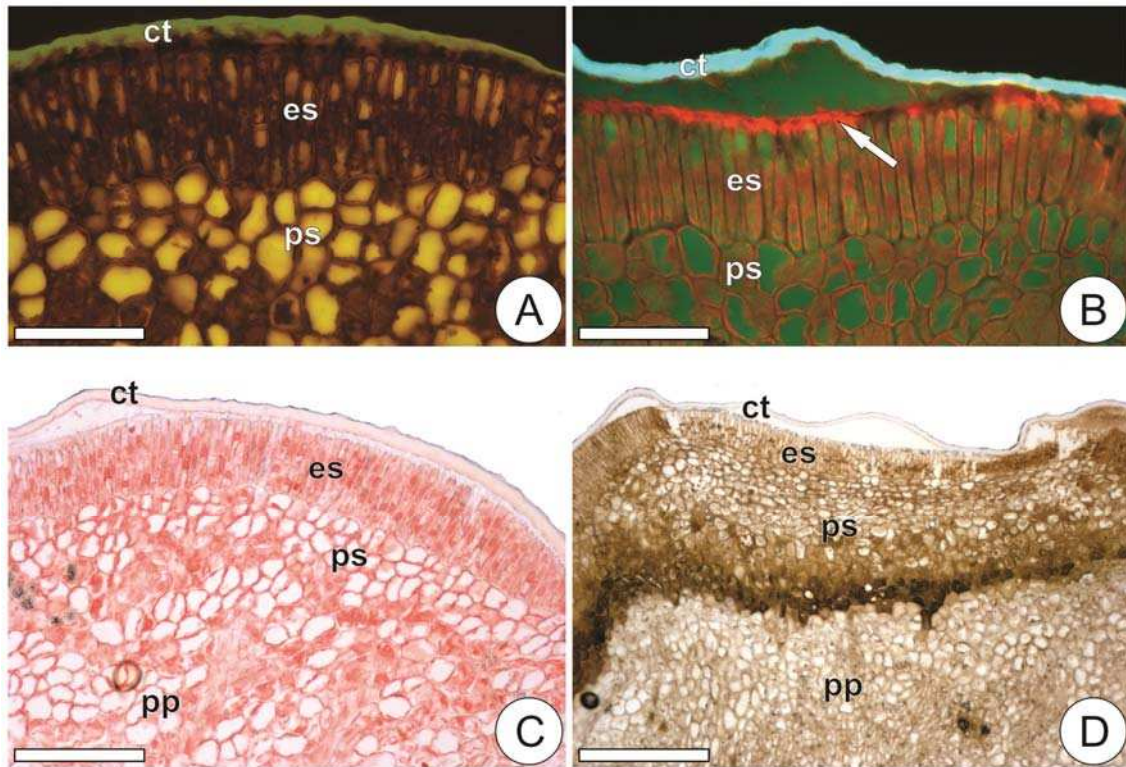


Figura 5: Caracterização histoquímica do nectário extranupcial de *Mabea fistulifera*. Secções transversais de nectários de flores em pré-antese (A), antese (B-C) e de fruto grande (D). (A) Secção corada com vermelho neutro; os lipídios emitem fluorescência secundária amarela sob luz ultravioleta. (B) Secção corada com corifosfina; as pectinas emitem fluorescência secundária alaranjada. Observar impregnação de compostos pécnicos na face externa da epiderme (seta). (C) Secção corada com xilidine Ponceau; as proteínas coram de vermelho. (D) Secção de nectário senescente corada com cloreto férrico; os compostos fenólicos totais coram de marrom. ct, cutícula; es, epiderme secretora; pp, parênquima de preenchimento; ps, parênquima secretor. Barra = 50 m μ (A, B), 100 m μ (C), 200 m μ (D).

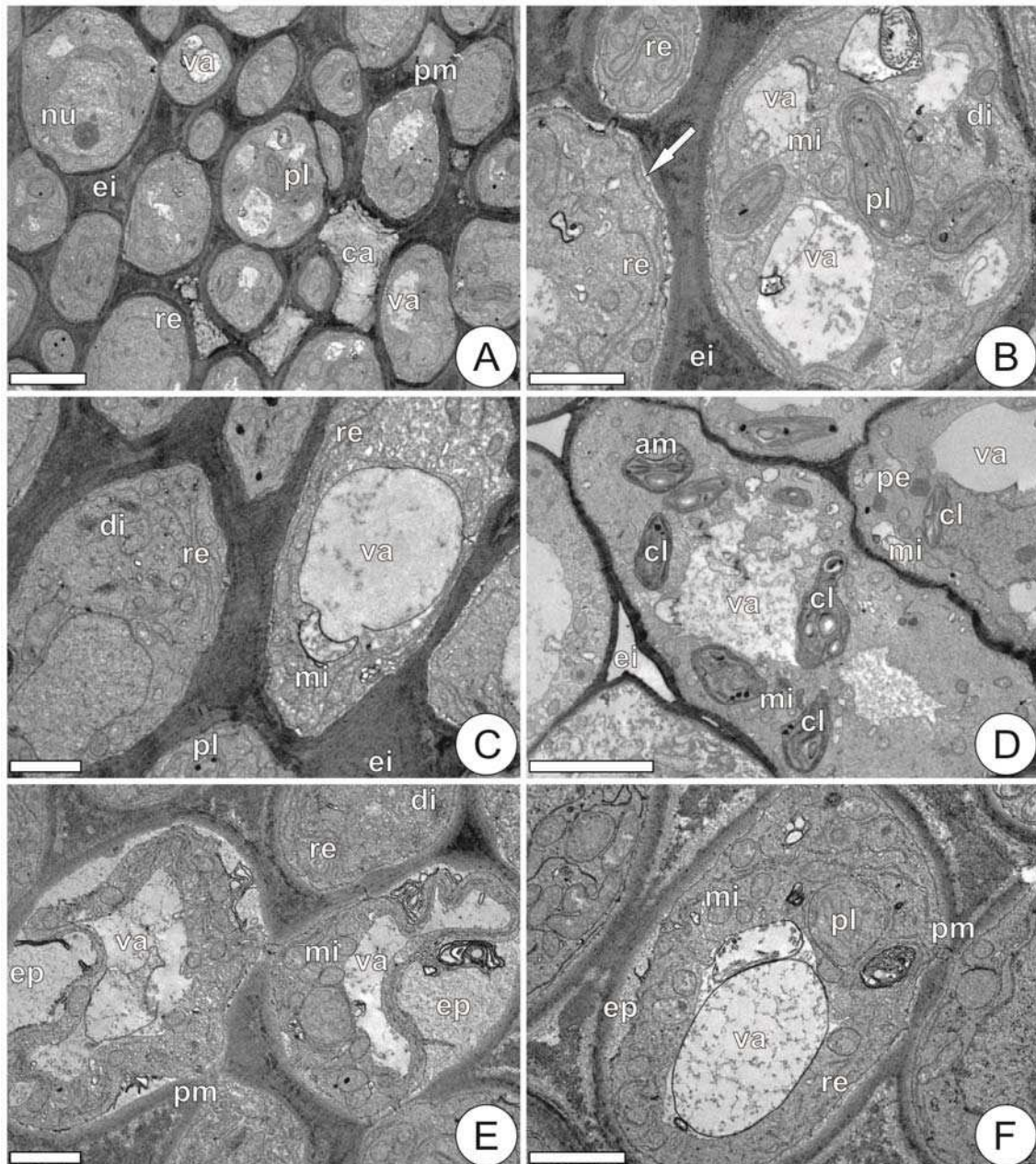


Figura 6: Caracterização ultraestrutural do nectário nupcial de *Mabea fistulifera* amostrado 72h antes (A-B), 6h antes (C-D) e 12h após a antese (E-F). (A) Visão geral da epiderme secretora em estágio pré-secretor. (B) Detalhe da epiderme, onde nota-se a presença de citoplasma denso com muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos, vesículas e plastídios. Há um tênue acúmulo de compostos no espaço periplasmático (seta). (C) Células da epiderme secretora 6h antes da antese. Nesse estágio observa-se a formação de um único vacúolo. (D) Células do parênquima secretor, caracterizadas pela presença de cloroplastos com grãos de amido, mitocôndrias e peroxissomos. (E-F) Células da epiderme secretora 12h após a antese. Nota-se o acúmulo de secreção granular no espaço periplasmático, ocupando quase um terço da célula. am, amido; ca, canal intercelular; cl, cloroplasto; di, dictiossomo; ei, espaço intercelular; ep, espaço periplasmático; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pc, parede celular; pe, peroxissomo; pl, plastídio; pm, plasmodesmo; re, retículo endoplasmático rugoso; va; vacúolo. Barra = 5 μm (A, D), 2 μm (B, C, E, F).

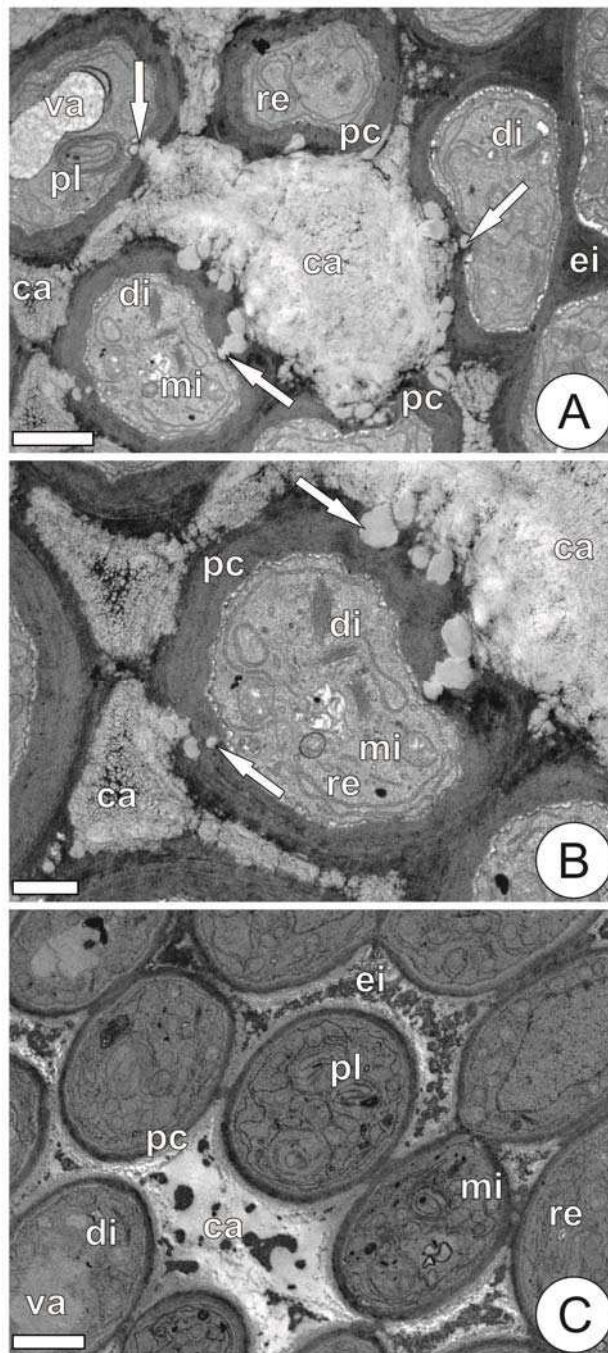


Figura 7: Formação do canal intercelular na epiderme do nectário nupcial de *Mabea fistulifera*. Imagens de MET de amostras coletadas 72h antes (A-B) e 12h após (C) a antese. (A-B) Nota-se a presença de vesículas eletron-opacas atravessando a parede celular e liberando seu conteúdo no espaço intercelular. (C) Secreção eletrondensa pode ser observada no canal e nos espaços intercelulares próximos. ca, canal intercelular; di, dictiossomo; ei, espaço intercelular; mi, mitocôndria; pc, parede celular; pl, plastídio; re, retículo endoplasmático rugoso; va; vacúolo. Barra = 2,0 μm (A), 1,0 μm (B), 2,5 μm (C).

Tabela 1: Caracterização histoquímica dos nectários nupciais e extranupciais de *M. fistulifera*.

| Caracterização histoquímica | | Nectário nupcial | | | Nectário extranupcial | | |
|--|---------------------|-----------------------|--------------------|------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Classe química | Teste | Secreção subcuticular | Epiderme secretora | Parênquima | Secreção subcuticular | Epiderme secretora | Parênquima |
| Lipídios totais | Sudan IV | ++ | ++ | - | - | - | - |
| | Vermelho neutro | - | ++ | - | - | - | - |
| Óleo-resina | NADI | - | ++ | - | nr | nr | nr |
| Amido | Lugol | - | - | ++ | - | - | - |
| Polissacarídeos neutros | PAS | - | ++ | ++ | - | ++ | ++ |
| Polissacarídeos ácidos e mucopolissacarídeos | Azul de alciano | - | - | - | - | - | - |
| Pectinas | Vermelho de rutênio | - | ++ | + | - | ++ | + |
| | Corifosfina | - | ++ | + | - | ++ | + |
| Açúcares redutores | Reagente de Fehling | ++ | - | - | nr | nr | nr |
| Proteínas | Xilidine Ponceau | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Compostos fenólicos | Cloreto férrico | ++ | - | - | - | ++ ⁽¹⁾ | ++ ⁽¹⁾ |
| Taninos | Vanilina clorídrica | - | - | - | - | - | - |

(++) presença, positivo intenso, (+) presença em menor concentração, positivo com coloração fraca, (-) ausência. ⁽¹⁾ resultado positivo apenas em nectários senescentes de frutos médios ou grandes. nr, teste não realizado

DISCUSSÃO

Os nectários nupciais e extranupciais de *M. fistulifera* apresentam características anatômicas semelhantes aos nectários de diversas espécies (Fahn, 1979a), sendo formados por epiderme secretora sem estômatos ou tricomas, parênquima secretor e parênquima de preenchimento vascularizado. Esta estrutura também foi observada em outra espécie de Euphorbiaceae, como *Ricinus comunis* (Baker *et al.*, 1978), *Euphorbia tithymaloides* (Dave & Patel, 1975), *Croton suberosus* (Freitas *et al.*, 2001) e *Sapium biglandulosum* (Coutinho *et al.*, 2010).

Ambos os nectários são vascularizados, com feixes vasculares distribuídos por todo o parênquima de preenchimento. Essas características são comuns a nectários que secretam soluções com baixas concentrações (Nepi, 2007). A intensa vascularização indica que a principal fonte de açúcar do néctar de *M. fistulifera* é a seiva do floema, como observados em nectários de *Passiflora* (Durkee, 1982) e *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado, 2006). Os cloroplastos presentes no parênquima também podem contribuir com a síntese de sacarose (Pacini *et al.*, 2003). Não foram observados grãos de amido nos nectários extranupciais de *M. fistulifera*, ao passo que pequenos grãos de amido estão presentes nos cloroplastos do parênquima dos nectários nupciais. A diferença quanto ao volume de néctar secretado pelos nectários nupciais e extranupciais possivelmente está associada à ocorrência de amido no parênquima (Nepi, 2007). A quebra do amido acumulado nos nectários nupciais contribui para o acréscimo de açúcares no néctar, mas sua principal função possivelmente é formar um *pool* de hexoses que direciona o aporte de seiva do floema para o nectário, como ocorre nos nectários de *Nicotiana tabacum* (Ren *et al.*, 2007). O acréscimo de hexoses no citoplasma aumenta o potencial osmótico da célula, provocando um fluxo de água no sentido xilema-parênquima nectarífero (Nicolson, 1998; Ren *et al.*, 2007). A grande quantidade de néctar nupcial também pode estar relacionada ao tamanho do nectário, como observado em espécies de *Ipomoea* (Galletto & Bernardello, 2004).

Os nectários nupciais apresentam algumas características anatômicas e histoquímicas distintas dos nectários extranupciais, principalmente em função das diferenças quanto o volume de néctar secretado e a duração do período secretor. O acúmulo de lipídios observado entre as paredes anticlinais da epiderme dos nectários nupciais força a passagem da solução através da via simplástica e impede que néctar secretado retorne para o parênquima. O bloqueio ao transporte apoplástico ocorre de

maneira similar na camada endodermóide observada em *Swietenia macrophylla* (Paiva, 2011). Devido à grande quantidade de néctar liberada em um curto espaço de tempo, canais intercelulares distribuídos ao longo da epiderme auxiliam a passagem do exsudado para o espaço subcuticular. A formação de canais intercelulares também foi observada na epiderme dos coléteres de *Bathysa cuspidata* (Coelho *et al.*, 2013), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Appezato-da-Glória & Estelita, 2000). Já os nectários extranupciais apresentam células da epiderme com parede periclinal externa espessa, que atuam como uma camada de proteção mecânica. O acúmulo de compostos fenólicos em nectários extranupciais danificados ou senescentes provavelmente está relacionado à proteção contra entrada de micro-organismos patogênicos.

Os aspectos ultraestruturais dos nectários nupciais de *M. fistulifera* evidenciam uma divisão de papéis ao longo da atividade secretora. As células parenquimáticas apresentam principalmente cloroplastos e mitocôndrias; essas organelas estão relacionadas ao aporte e síntese do pré-nectar (Fahn, 1979b). Já as células da epiderme são caracterizadas pela abundância de mitocôndrias, dictiossomos, plastídios e retículo endoplasmático rugoso. Essas organelas estão envolvidas na síntese de proteínas, aminoácidos, lipídios e compostos fenólicos (Durkee, 1983; Evert, 2006). A cutícula que reveste o nectário, ao contrário de *S. biglandulosum* (Coutinho *et al.*, 2010) e *C. suberosus* (Freitas *et al.*, 2001), não apresentam canais para a passagem de néctar. É provável que a pressão exercida pelo acúmulo de secreção no espaço subcuticular leve à ruptura da cutícula.

O néctar liberado pelos nectários nupciais de *M. fistulifera* é volumoso, diluído e rico em hexoses. Essas características corroboram o padrão de néctar geralmente consumido por morcegos frugívoros (Baker *et al.*, 1998; Zortéa, 2007; Kromer *et al.*, 2008; Rex *et al.*, 2010), mamíferos não voadores (Baker & Baker, 1983b), aves passeriformes (Nicolson, 2002; Johnson & Nicolson, 2007) e abelhas de língua curta (Baker & Baker, 1990). A quantidade de proteínas e aminoácidos encontrados no néctar de *M. fistulifera* é baixa, menos de 0,03% dos solutos diluídos na solução. Estes compostos geralmente estão associados à atração de polinizadores (Nepi *et al.*, 2012). O baixo teor de aminoácidos livres e proteínas no néctar pode estar relacionado ao acesso a outras fontes proteicas (Baker, 1977), visto que as espécies de morcego e aves apontadas como polinizadores efetivos de *M. fistulifera* apresentam hábito alimentar generalista, consumindo frutas, pequenos insetos, grãos de pólen e, ocasionalmente, néctar (Johnson & Nicolson, 2007; Zortéa, 2007). Os lipídios identificados no néctar de

M. fistulifera possivelmente aumentam o potencial energético da solução, visto que os lipídios são formas de carbono altamente reduzidas (Nicolson & Thornburg, 2007).

Características quantitativas e qualitativas do néctar nupcial de *M. fistulifera* podem auxiliar a repelir pilhadores, como beija-flores e morcegos nectarívoros (Vieira & Carvalho-Okano, 1996) e formigas. As plantas podem apresentar mecanismo de defesa para evitar ou resistir às visitas dos ladrões de néctar (Irwin *et al.*, 2004; González-Teuber & Heil, 2009; Irwin *et al.*, 2010). A secreção diluída e com relação sacarose/hexoses abaixo de 0,5 pode desestimular a pilhagem, visto que beija-flores e abelhas de língua longa têm preferência por néctar concentrado e rico em sacarose (Baker & Baker, 1983b; Irwin *et al.*, 2004; Johnson & Nicolson, 2007). A presença de compostos fenólicos no néctar nupcial também está relacionada à defesa. Compostos fenólicos podem tornar a solução pouco palatável aos visitantes indesejados (Baker, 1977), principalmente para aves de hábito alimentar nectarívoro (Johnson *et al.*, 2006).

O néctar extranupcial de *M. fistulifera* é menos concentrado, o volume secretado é reduzido e, assim como o néctar nupcial, é rico em hexoses. A presença de néctar composto majoritariamente por glicose e frutose também foi relatada nos nectários extranupciais de *S. biglandulosum* (Coutinho *et al.*, 2010) e *C. sarcopetalum* (Freitas *et al.*, 2001). O néctar extranupcial possui maior concentração de aminoácidos livres do que o néctar nupcial. Em condições experimentais, formigas apresentaram preferência por soluções de sacarose acrescidas com aminoácidos em comparação à solução de sacarose pura (Blüthgen & Fiedler, 2004). A quantidade e diversidade de aminoácidos são mais determinantes na atração das formigas do que a concentração do néctar ou a proporção de glicose, sacarose e frutose (Blüthgen *et al.*, 2004).

Os nectários extranupciais de *M. fistulifera* começam a secretar a partir da antese floral, e continuam produzindo néctar após a polinização. A atividade secretora pós-antese em nectários é definida como secreção ou ação pós-floral (Schmid, 1988; Nepi, 2007). Nectários com atividade pós-floral foram observados em poucas famílias e estão relacionados à proteção dos frutos contra herbivoria através da atração de defensores e inimigos naturais (Keeler, 1981; Morellato & Oliveira, 1994; Bernardello, 2007). A presença de formigas patrulhando botões florais, flores e frutos em desenvolvimento pode reduzir a atividade de insetos fitófagos e aumentar o *fitness* reprodutivo da planta (Bentley, 1977). A atividade floral e pós-floral dos nectários extranupciais de *M. fistulifera*, associada à observação de formigas visitando os nectários, são fortes

evidências da função de proteção das flores e os frutos. No entanto, são necessários dados experimentais que comprovem essa função.

CONCLUSÃO

Não foram observadas diferenças anatômicas entre os nectários nupciais e extranupciais de *M. fistulifera*. A diferença no volume de néctar secretado se dá principalmente devido ao tamanho dos nectários e à presença de amido no parênquima secretor do nectário nupcial. A atividade secretora dos nectários nupciais é dividida entre parênquima e epiderme, sendo o parênquima responsável pelo aporte de açúcares e a epiderme pela síntese de metabólitos primários e secundários presentes no néctar. A composição química do néctar nupcial e extranupcial são distintas, evidenciando uma forte correlação entre os componentes da secreção e os visitantes observados nas inflorescências. O néctar produzido pelos nectários nupciais é diluído e rico em glicose e frutose, características relacionadas à atração dos polinizadores descritos para *M. fistulifera*. A presença de compostos fenólicos no néctar nupcial e baixa concentração de sacarose auxiliam na defesa do néctar contra a ação de pilhadores. O néctar extranupcial é menos concentrado e apresenta maior quantidade de aminoácidos, composto relacionado à atração de formigas. A atividade floral e pós-floral dos nectários extranupciais, associada à presença de formigas visitando flores e frutos, possivelmente está ligada à defesa desses órgãos contra herbivoria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appezato-da-Glória B, Estelita MEM. 2000.** Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **23**: 113–120.
- Baker DA, Hall JL, Thorpe JR. 1978.** A study of the extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. *New Phytologist* **81**: 129–137.
- Baker HG. 1977.** Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie* **8**: 349–356.
- Baker HG, Baker I. 1983a.** A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley B, Elias T. eds. *The biology of nectaries*. New York: Columbia University Press, 126–152.
- Baker HG, Baker I. 1983b.** Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE, Little RJ. eds. *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Van Nostrand Reinhold, 117–141.
- Baker HG, Baker I. 1990.** The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany* **39**: 157–166.
- Baker HG, Baker I, Hodges SA. 1998.** Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* **30**: 559–586.
- Bentley BL. 1977.** The protective function of ants visiting the extrafloral nectaries of *Bixa orellana* (Bixaceae). *The Journal of Ecology* **65**: 27–38.
- Bernardello G. 2007.** A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. eds. *Nectaries and nectar*. Dordrecht: Springer, 19–128.
- Blüthgen N, Fiedler K. 2004.** Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology* **73**: 155–166.
- Blüthgen N, Gottsberger G, Fiedler K. 2004.** Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. *Austral Ecology* **29**: 418–429.

- Bradford MM. 1976.** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brandenburg A, Dell’Olivo A, Bshary R, Kuhlemeier C. 2009.** The sweetest thing: advances in nectar research. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 486–490.
- Coelho VPM, Leite JPV, Fietto LC, Ventrella MC. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of the secretion. *Flora* **208**: 579–590
- Cordeiro I, Secco R, Melo AL, Sales MF, Silva MJ, Oliveira LSD, Souza SMA. 2010.** *Mabea* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22717>. Acesso em: 20 Dez. 2014.
- 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.
- Dave YS, Patel ND. 1975.** A development study of extrafloral nectaries in slipper spurge (*Pedilanthus tithymaloides*, Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* **62**: 808–812
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l’ Academie dès Sciences Paris* **D258**: 1338–1340.
- De la Barrera E, Nobel PS. 2004.** Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science* **9**: 65–69.
- Durkee LT. 1982.** The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral nectary. *American Journal of Botany* **69**: 1420–1428.
- Durkee LT. 1983.** Ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. In: Bentley B, Elias TS. eds. *The Biology of Nectaries*. New York: Columbia University Press, 1–29.
- Escalante-Pérez M, Heil M. 2012.** Nectar secretion: its ecological context and physiological regulation. In: Vivanco JM, Baluska F. Eds. *Secretions and Exudates in Biological Systems*. Dordrecht: Springer, 187–220.

- Esser HJ. 2012.** The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil. *Rodriguésia* **63**: 209–225.
- Evert RF. 2006.** *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development.* New Jersey: Wiley Interscience.
- Fahn A. 1979a.** *Secretory tissues in plants.* London, Academic Press.
- Fahn A. 1979b.** Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany* **66**: 977–985.
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229–257.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ. 2001.** Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250–263.
- Ferrari SF, Strier KB. 1992.** Exploitation of *Mabea fistulifera* nectar by marmosets (*Callithrix flaviceps*) and muriquis (*Brachyteles arachnoides*) in south-east Brazil. *Journal of Tropical Ecology* **8**: 225–239.
- 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.
- Galetto L, Bernardello G. 2004.** Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany* **94**: 269–280.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hoehne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M. 2004.** A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304–3325.
- González-Teuber M, Heil M. 2009.** Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling & Behavior* **4**:809–813.

- Harper D. 2014.** *Nectar* in Online Etymology Dictionary. Disponível em: http://www.etymonline.com/index.php?term=nectar&allowed_in_frame=0. Acesso em: 15 Jan. 2015.
- Heil M. 2011.** Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* **16**: 191–200.
- 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**: 425–453.
- Irwin RE, Adler LS, Brody A. 2004.** The dual role of floral traits: pollinator attraction and plant defense. *Ecology* **85**: 1503–1511.
- Irwin RE, Bronstein JL, Manson JS, Richardson L. 2010.** Nectar robbing: ecological and evolutionary perspectives. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **41**: 271–92.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York, NY: McGraw Book Co.
- Johnson SD, Hargreaves AL, Brown M. 2006.** Dark, bitter-tasting nectar functions as a filter of flower visitors in a bird-pollinated plant. *Ecology* **87**: 2709–2716.
- Johnson SD, Nicolson SW. 2007.** Evolutionary associations between nectar properties and specificity in bird pollination systems. *Biology Letters* **4**: 49–52.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- Keeler KH. 1981.** Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) postfloral nectaries in seed defense. *American Journal of Botany* **68**: 295–299.
- Kirk PWJr. 1970.** Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**: 1–4.
- Koptur S. 1994.** Floral and extrafloral nectars of Costa Rican *Inga* trees: a comparison of their constituents and composition. *Biotropica* **26**: 276–284.
- Krömer T, Kessler M, Lohaus G, Schmidt-Lebuhn AN. 2008.** Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology* **10**: 502–511.
- Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**: 2423–2426.

- Marazzi B, Conti E, Sanderson MJ, McMahon MM, Bronstein JL. 2013.** Diversity and evolution of a trait mediating ant–plant interactions: insights from extrafloral nectaries in *Senna* (Leguminosae). *Annals of Botany* **111**: 1263–1275.
- Morellato LPC, Oliveira PS. 1994.** Extrafloral nectaries in the tropical tree *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Canadian Journal of Botany* **72**: 157–160.
- Nepi M. 2007.** Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. eds. *Nectaries and nectar*. Dordrecht: Springer, 129–166.
- Nepi M, Soligo C, Nocentini D, Abate M, Guarnieri M, Cai G, Bini L, Puglia M, Bianchi L, Pacini E. 2012.** Amino acids and protein profile in floral nectar: much more than a simple reward. *Flora* **207**: 475–481.
- Nicolson SW. 1998.** The importance of osmosis in nectar secretion and its consumption by insects. *American Zoologist* **38**: 418–425.
- Nicolson SW. 2002.** Pollination by passerine birds: why are the nectars so dilute? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **131**: 645–652
- Nicolson SW. 2007.** Nectar consumers. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. eds. *Nectaries and Nectar*. Dordrecht: Springer, 289–342.
- Nicolson SW, Thornburg RW. 2007.** Nectar chemistry. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. eds. *Nectaries and Nectar*. Dordrecht: Springer, 215–264.
- Nogueira A, Rey PJ, Lohmann LG. 2012.** Evolution of extrafloral nectaries: adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 2325–2340.
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- O’Brien TP, McCully ME. 1981.** The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne: Termarcaphi PTY.
- Olmos F, Boulhosa LP. 2000.** A meeting of opportunists: birds and other visitor to *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) inflorescences. *Ararajuba* **8**: 93–98.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003.** Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematic Evolution* **238**: 7–21.

- Pacini E, Nepi M. 2007.** Nectar production and presentation. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. eds. *Nectaries and nectar*. Dordrecht: Springer, 167–214.
- Pacini E, Nicolson SW. 2007.** Introduction. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. eds. *Nectaries and nectar*. Dordrecht: Springer, 1–11.
- Paiva EAS. 2011.** Petaline nectaries in *Swietenia macrophylla* (Meliaceae): distribution and structural aspects. *Flora* **206**: 484–490.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006.** The floral nectary of *Hymenaea stagnocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Annals of Botany* **101**: 125–133.
- Paiva EAS, Martins LC. 2014.** Structure of the receptacular nectary and circadian metabolism of starch in the ant-guarded plant *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). *Plant Biology* **16**: 244–251.
- Passos FC, Kim AC. 1999.** Nectar feeding on *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) by black lion tamarins, *Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823 (Callitrichidae), during the dry season in southeastern Brazil. *Mammalia* **63**: 519–521.
- Pearse AGE. 1968.** *Histochemistry: theoretical and applied*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Ren G, Healy RA, Klyne AM, Horner HT, James MG, Thornburg RW. 2007.** Transient starch metabolism in ornamental tobacco floral nectarines regulates nectar composition and release. *Plant Science* **173**: 277–290.
- Rex K, Czaczkes BI, Michener R, Kunz TH, Voigt CC. 2010.** Specialization and omnivory in diverse mammalian assemblages. *Ecoscience* **17**: 37–46.
- Reynolds ES. 1963.** The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208–212.
- Robards AW. 1978.** An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Hall JL. ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 343–403.
- Roland JC. 1978.** General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL. ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 1–62.
- Sass JE. 1951.** *Botanical microtechnique*, 2^a ed. Ames, IA: Iowa State College Press.

- Schmid R. 1988.** Reproductive versus extra-reproductive nectaries – historical perspective and terminological recommendations. *The Botanical Review* **54**: 179–232.
- Silva PA. 2008.** Periquitos (*Aratinga aurea* e *Brotogeris chiriri*, Psittacidae) como potenciais polinizadores de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Ornitologia*, **16**: 23–28.
- Thomas V, Dave Y. 1992.** Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **109**: 395–400.
- Torres de Assumpção C. 1981.** *Cebus apella* and *Brachyteles arachnoides* (Cebidae) as potential pollinators of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae). *Journal of Mammalogy* **62**: 386–388.
- Vidal BC. 1970.** Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Annales d'Histochimie* **15**: 289–296.
- Vieira MF, Carvalho-Okano RM, Sazima M. 1991.** The common opossum, *Didelphis marsupialis*, as a pollinator of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae). *Ciência e Cultura* **43**: 390–393.
- Vieira MF, Mattos GT, Carvalho-Okano RM. 1992.** *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) na alimentação de aves na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Iheringia, Série Zoológica*, **73**: 65–68.
- Vieira MF, Carvalho-Okano RM. 1996.** Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in southeastern Brazil. *Biotropica* **28**: 61–68.
- Villamil N, Judith Márquez-Guzmán J, Boege K. 2013.** Understanding ontogenetic trajectories of indirect defence: ecological and anatomical constraints in the production of extrafloral nectaries. *Annals of Botany* **112**: 701–709.
- Watson ML. 1958.** Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemistry Cytology* **4**: 475–478.
- Weis KG, Polito VS, Labavitch JM. 1988.** Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb) fruits. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **36**: 1037–1041.

- Yamasaki E, Kawakita A, Sakai S. 2013.** Modified leaves with disk-shaped nectaries of *Macaranga sinensis* (Euphorbiaceae) provide reward for pollinators. *American Journal of Botany* **100**: 628–632.
- Zortéa, M. 2007.** Subfamília Stenodermatinae. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. eds. *Morcegos do Brasil*. Londrina: Nelio R. dos Reis, 107–128.