

3º ARTIGO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS
FOLIARES DE *Prockia crucis* P. BROWNE EX. L.**

Marcela Thadeo^{1,3,*}; Mariana Franco Cassino^{2,3}; Narah Costa Vitarelli^{2,3}; Renata M. Strozi
Alves Meira³; Aristéa A. Azevedo³; João M. Araújo⁴; Vânia M. M. Valente³

¹Parte da Tese de Doutorado da Primeira Autora. ²Bolsistas de Iniciação Científica.

³Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, fone: +55 31 3899-2520, fax: +55 31 3899-2580, Viçosa, MG, Brasil. ⁴Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. * Autor para correspondência:

tmarcela@gmail.com

Título abreviado: Thadeo *et al.* – Caracterização anatômica e histoquímica das glândulas de *Prockia crucis*.

RESUMO – O estudo da composição química do material secretado pelas estruturas secretoras, juntamente com a anatomia dessas estruturas, pode contribuir para a compreensão do exato papel e da função do produto secretado para a planta, além de poder ser um componente importante para as avaliações taxonômicas. Assim, os objetivos do trabalho foram avaliar anatomicamente a origem e o desenvolvimento das estruturas secretoras de *Prockia crucis*, bem como analisar histoquimicamente e quimicamente o exsudado produzido pelas glândulas. Folhas em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletadas em um fragmento de Floresta Estacional Semi-Decidual Montana (Viçosa –MG) e submetidas às técnicas usuais em anatomia vegetal e a testes histoquímicos. Foram detectadas frutose, glicose e sacarose na secreção e a concentração de açúcares equivale a 49,6% do total do secretado. As glândulas foram identificadas como nectários extraflorais (NEFs), sendo esse o primeiro relato da sua presença para o gênero. O néctar produzido possui alto valor energético. Os NEFs ocorrem nas regiões basais e marginais da folha, são sésseis, circulares e com uma concavidade central. A epiderme que recobre a concavidade é secretora, uniestratificada, formando uma paliçada de células que reagiram fortemente ao PAS e ao Xilidine Ponceau, evidenciando polissacarídeos neutros e proteínas totais, respectivamente. O parênquima nectarífero possui algumas células com citoplasma granuloso que reagiram ao teste para compostos fenólicos. Esse parênquima é interrompido pelas extensões vasculares que se ramificam até a epiderme secretora. O desenvolvimento dos nectários se inicia muito precocemente, já nos primórdios foliares do meristema apical, estando totalmente diferenciado em folhas ainda em expansão. Devido à sua similaridade com os dentes salicídeos presentes em *Populus* e *Salix*, sugere-se que tais clados sejam próximos filogeneticamente.

Palavras-chave: Flacourtiaceae, Salicaceae, nectários extraflorais, ontogenia, química da secreção.

ABSTRACT – Anatomic and histochemistry characterization from foliar glands of *Prockia crucis* P. Browne Ex. L. The study of the chemical composition of the material secreted by secretory structures and anatomy of these structures may contribute to a better understanding of its precise role and functions, being an important component for taxonomic evaluations as well. Thus, the objectives of this work were to anatomically evaluate the origin and development of the secretory structures of *Prockia crucis* and histochemically and chemically analyze the exudates produced by the glands. Leaves at different stages of development were collected in a fragment of a Montane Semi-Deciduous Seasonal Forest (Viçosa –MG) and submitted to the standard plant anatomy techniques and to histochemical tests. Fructose, glucose and sucrose were detected in the secretion with sugar concentration amounting to 49.6% of the total secreted. The glands were identified as extrafloral nectaries (EFNs), this being the first report of their presence for the genus. The nectar produced is of high energy value. The EFNs are sessile, globular glands occurring on the basal and marginal regions of the leaf, with a central concavity. The epidermis surrounding the concavity is secretory, unistratified, forming a palisade that reacted strongly to PAS and Xylidine Ponceau, evidencing total carbohydrates and proteins, respectively. The nectariferous parenchyma contains some cells with granulous cytoplasm that reacted to the phenolic compound test. This parenchyma is interrupted by vascular extensions ramifying up to the secretory epidermis. Nectary development initiated very early, at the leaves primordium of the shoot apical meristem, being totally differentiated on expanding leaves. Due to its similarity with the salicoid teeth present in *Populus* and *Salix*, such taxa are suggested to be phylogenetically close.

Keywords: Flacourtiaceae, Salicaceae, extrafloral nectaries, ontogeny, chemistry of secretion.

INTRODUÇÃO

A família Flacourtiaceae, de acordo com Cronquist (1968), apresenta os caracteres mais primitivos dentro da ordem Violales. No sistema filogenético de classificação (APG, 1998; Chase *et al.*, 2002) Flacourtiaceae foi desmembrada em duas famílias, Salicaceae e Achariaceae, com a maior parte de seus representantes em Salicaceae, no clado das Eurosideas I, ordem Malpighiales. As características unificadoras dos representantes de Salicaceae *lato sensu* são os dentes foliares únicos, denominados salicóides, e compostos fenólicos do tipo salicina (Chase *et al.*, 2002).

De acordo com Sleumer (1980), a família Flacourtiaceae é constituída por 7 tribos, 86 gêneros e cerca de 900 espécies, distribuídas nas Américas, África, Ásia, Malásia, Austrália e nas ilhas do Pacífico. Na América ocorrem 32 gêneros, com cerca de 300 espécies neotropicais (Klein e Sleumer, 1984) e no Brasil, são citados 19 gêneros e, aproximadamente, 90 espécies (Barroso *et al.*, 2002).

Prockia compreende duas espécies: *Prockia flava* Karsten, restrita à Venezuela, e *Prockia crucis* P. Browne ex. L., distribuída por toda a América Central e do Sul, nas regiões tropical e subtropical. São arbustos ou arvoretas cujas folhas têm bordas glandular-serreadas e na base normalmente apresentam duas glândulas localizadas em alturas diferentes (Klein e Sleumer, 1984).

As estruturas secretoras apresentam uma grande variação na morfologia, anatomia, função, posição que ocupam e tipo de substância que secretam. O estudo da composição química do material secretado, juntamente com a anatomia dessas estruturas, pode contribuir para a compreensão do exato papel e da função do produto secretado para a planta (Fahn, 1979), além de poder ser um componente importante para as avaliações taxonômicas (Solereder, 1908; Metcalfe e Chalk, 1979). A diversidade de estruturas secretoras registradas em Flacourtiaceae é elevada e, em muitos casos, a denominação de

glândula é adotada num contexto de reconhecer que a estrutura é secretora sem, contudo, caracterizá-la. Nas descrições taxonômicas é comum a utilização de termos como dentes salicóides e margens glandulares (Sleumer, 1980; Klein e Sleumer, 1984; Chase *et al.*, 2002). A caracterização de tais estruturas é de fundamental importância, pois nem sempre existe uma correspondência da observação morfológica com a estrutural (Lersten e Curtis, 1996).

As glândulas presentes nas folhas de *P. crucis* apresentam-se topográfica e morfológicamente semelhantes a nectários extraflorais e aos dentes salicóides. Nectários são estruturas secretoras de néctar, uma solução composta, basicamente, por glicose, frutose e sacarose, nas mais variadas concentrações. O néctar pode conter ainda maltose, rafinose, melobiose, mucilagem, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, íons, fosfatos, vitaminas, compostos fenólicos, oxidases e tirosinases (Fahn, 1979; Baker e Baker, 1983). Além disso, a composição do néctar pode variar substancialmente, dependendo da posição e do tipo de nectário (Roshchina e Roshchina, 1993).

As primeiras propostas sobre o valor adaptativo dos nectários extraflorais (NEFs) sugerem que tais estruturas sejam responsáveis pela secreção do excesso de fotoassimilados (Mound, 1962), não trazendo necessariamente nenhuma vantagem adaptativa para a espécie vegetal. Entretanto, não há consenso quanto a essa hipótese, uma vez que um número crescente de trabalhos e evidências sugere uma função protecionista para os NEFs. O néctar produzido seria um recurso disponibilizado para visitantes, especialmente formigas de comportamento agressivo, que garantiriam proteção à planta. Os visitantes atuariam como um efetivo agente contra a herbivoria, permitindo um maior sucesso adaptativo à planta (Roshchina e Roshchina, 1993; Morellato e Oliveira, 1994).

Os objetivos do presente trabalho foram caracterizar a estrutura e o desenvolvimento das glândulas da folha de *P. crucis*, bem como analisar quimicamente o

exsudado produzido. Esta caracterização é crucial para abordagens filogenéticas, especialmente quanto à proximidade entre os clados Flacourtiaceae e Salicaceae *stricto sensu*.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de *Prockia crucis* foram coletadas em três plantas nativas de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Montana (Veloso *et al.*, 1991), localizado no Sítio Bom Sucesso (Viçosa-MG). Essa mata está em uma propriedade particular que dista aproximadamente 5 km do Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). De toda a propriedade, apenas um trecho de um vale de aproximadamente 35 ha foi mantido como remanescente florestal. A altitude é de 750 m e o fragmento está situado nas proximidades da Mata do Paraíso, maior fragmento florestal da região de Viçosa e de propriedade da UFV. Material testemunha encontra-se depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, sob o número VIC 17.167.

Para o estudo de ontogenia das glândulas de *P. crucis*, amostras foram coletadas segundo o estágio de desenvolvimento da folha: Estádio I (primórdios foliares no ápice caulinar), Estádio II (folhas do 1º nó), Estádio III (folhas do 2º nó), Estádio IV (folhas do 3º nó), Estádio V (folhas do 4º nó) e Estádio VI (folhas do 5º nó), fixadas em FAA₅₀ por 24 horas ou em solução de sulfato ferroso em formalina para detecção de compostos fenólicos por 48 horas, e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). As amostras fixadas em FAA₅₀ foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Os cortes (transversais e longitudinais de 6 – 8 µm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com utilização de navalhas de aço descartáveis e corados com Azul de Toluidina pH 4,0 por 8 minutos (O'Brien e McCully, 1981) para

caracterização estrutural, com Xilidine Ponceau (XP) (O'Brien e McCully, 1981) e Comassie Brilliant Blue (Fisher, 1968) para proteínas totais, Vermelho de Rutênio para substâncias pécnicas (Johansen, 1940) e PAS para polissacarídeos neutros (Maia, 1979).

Os demais testes foram aplicados somente em amostras frescas das glândulas adultas (estádios V e VI) seccionadas transversalmente, utilizando-se micrótopo de congelamento (modelo CM1850, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) ou micrótopo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil). As classes de metabólitos investigadas e os testes empregados nas amostras frescas encontram-se descritos na Tabela 1. Secções controle foram realizadas simultaneamente, segundo recomendações da literatura (Tabela 1).

Tabela 1 – Metodologias utilizadas para detectar as principais classes de metabólitos em amostras frescas.

Compostos	Em Luz Visível	Referências
Lipídios Totais	Sudan IV	(Pearse, 1980)
Óleos essenciais e Óleos-resina	Reagente de NADI	(David e Carde, 1964)
Lignina	Floroglucinol	(Johansen, 1940)
Alcalóides	Reagente de Dragendorff	(Svendsen e Verpoorte, 1983)
Amido	Lugol	(Jensen, 1962)

As lâminas foram montadas com resina sintética (Permount) ou gelatina glicerinada. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo.

Fragmentos de folhas adultas (estádios V e VI) foram submetidos à diafanização, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 10% e hipoclorito 20% (Johansen, 1940, modificado), corados com safranina (1% solução alcoólica) e montados com gelatina glicerinada.

Amostras da margem foliar foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (Karnovsky, 1965, modificado), por 48 horas, e pós-fixadas por 18 horas, em tetróxido de ósmio a 1% preparado no mesmo tampão; foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas e estocadas em etanol 70%. Após desidratação em série etílica, as amostras foram secas ao ponto crítico, utilizando-se equipamento apropriado (modelo CPD020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), montadas nos suportes e recobertas com ouro (Bozzola e Russel, 1992) em metalizador (modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A investigação e a documentação foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (modelo JSMT200, Jeol Co., Tokyo, Japão) pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para a detecção de açúcares, amostras do exsudado foram obtidas diretamente das glândulas, por meio de um tubo capilar. Ramos coletados foram levados ao laboratório e mantidos em recipientes contendo água de torneira, visando intensificar a quantidade de exsudado produzido. Após a coleta, a secreção foi acondicionada em freezer dentro de tubos eppendorf e, posteriormente, analisada no laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFV. O secretado foi dissolvido em água purificada, e submetido à HPLC (modelo LC – 6AD, Shimadzu, Osaka, Japão) com detector RID, coluna Techspherene NH₂ (250 mm x 4,6 mm di; 5 µm) e pré coluna Techspherene NH₂ (20 mm x 4,6 mm di; 5 µm). A fase móvel utilizada foi acetonitrila: água purificada (70:30v/v), sendo o seu fluxo de 1 ml / min. Com o objetivo de construir a curva de calibração, foram injetadas alíquotas de 10, 20 e 30 µl de uma solução contendo padrões de frutose, glicose e sacarose a 1,2 mg / ml. Finalmente, foram injetados 2 µl da solução obtida através da diluição da secreção em 2 µl de água (branco) (Meyer, 1994). A secreção

foi classificada quanto ao teor de açúcar conforme classificação proposta por Baker e Baker (1983).

RESULTADOS

A concentração de açúcares na secreção de *Prockia crucis* equivale a 49,6% do total do secretado, sendo 12,4% de frutose; 16,2% de glicose e 21% de sacarose. Desta forma, a secreção corresponde a néctar e a estrutura deve ser classificada como nectário. O valor da relação dissacarídeo/monossacarídeo é de 0,73 ($[\text{sacarose}]/[\text{frutose}] + [\text{glicose}]$), sendo o néctar reconhecido como bastante energético e classificado como “sacarose-rico”.

Os NEFs ocorrem em diferentes posições da folha; na inserção do pecíolo com a lâmina foliar se observa uma projeção voltada para a superfície abaxial (NEF basal – Figs. 1A e B) e em toda a margem foliar, no ápice dos dentes (Figs. 1C, 1D, 1E e 1F). Tais estruturas secretoras são sésseis, globosas, apresentam uma concavidade central e secretam um líquido viscoso e translúcido (Fig. 1F). A vista desarmada apresentam coloração verde-escuro brilhante. Os NEFs basais apresentam-se maiores que os marginais, e geralmente encontram-se solitários, por vezes aos pares.

O NEF é intensamente vascularizado por nervuras laterais que confluem para a margem (Fig. 2A), destacando-se nesta região uma grande quantidade de cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa. Os nectários mostram um bordo elevado que circunda uma concavidade de superfície irregular, sendo que nas adjacências do nectário estão presentes tricomas tectores (Figs. 2B e 2C). A cutícula, tanto do bordo quanto da cavidade, é lisa e pode, em alguns locais, apresentar-se rompida (Fig. 2D).

Anatomicamente os NEFs são semelhantes, apesar de os basais serem maiores que os marginais (Figs. 1B e 1F). Possuem epiderme secretora uniestratificada em paliçada, de células altas e colunares, com citoplasma denso (Figs. 3A, 3B e 3C), que reagiram fortemente ao PAS e ao XP e Comassie Brilliant Blue, evidenciando carboidratos totais e

proteínas (Figs. 4A, 4B, 4E e 4F). As paredes anticlinais e a periclinal interna são delgadas e de natureza pecto-celulósica, evidenciadas pelo Vermelho de Rutênio (Fig. 4C). A parede periclinal externa é mais espessa, evidenciada pela diferença de coloração produzida pelo Vermelho de Rutênio (Fig. 4D).

A cutícula é espessa e foi evidenciada através de reação com Sudan IV (Figs. 5C e 5D). Em algumas secções a cutícula mostrou-se descolada da parede, originando pequenos espaços onde se acumula a secreção (Figs. 4A, 4B e 4C).

O parênquima nectarífero subepidérmico é formado por várias camadas de células poligonais e aclorofiladas, com núcleos periféricos, nucléolo evidente e vacúolo proeminente (Figs. 3A, 3B e 3C), não reagindo aos testes aplicados (Figs. 4 e 5). Inclusões cristalíferas do tipo drusa (Figs. 3B, 3C e 5C) são abundantes nesta região. Entremeadas a esse tipo celular descrito acima ocorrem células com citoplasma granuloso densamente corado em verde pelo Azul de Toluidina (Figs. 3A, 3B e 3C), que reagiu para a presença de compostos fenólicos (Figs. 5A e 5B). Essas células granulosas nem sempre são contíguas na superfície abaxial da folha, interrompidas pelas extensões vasculares que se ramificam (Figs. 3B e 3C).

Feixes vasculares chegam até a margem foliar onde se localiza o nectário, com terminações vasculares constituídas de xilema e floema chegando até a epiderme secretora em proporções aproximadamente iguais (Figs. 3B e 3C).

Os resultados dos testes histoquímicos estão sumarizados na Tabela 2. Foram detectadas substâncias hidrofílicas (polissacarídeos neutros, proteínas e compostos fenólicos) e lipofílicas (lipídios). Não foram detectados alcalóides e amido. Pequenas gotas no citoplasma das células da epiderme, da face adaxial, reagiram ao Sudan IV (Figs. 5C e 5D) e ao Reagente de Nadi.

Tabela 2 – Resultado dos testes histoquímicos nos NEFs de *Prockia crucis*.

Grupo de Compostos	Teste	Órgão	Nectário extrafloral		
			Epiderme em paliçada	Parênquima nectarífero	Epiderme adaxial
Lipídios Totais	Sudan IV		-	-	+
Terpenóides (óleo-resina)	Reagente de Nadi		-	-	+
Compostos Fenólicos	Sulfato ferroso*		-	+	-
	Floroglucinol (lignina)		-	-	-
Alcalóides	Reagente de Dragendorff		-	-	-
Polissacarídeos Neutros	PAS		+	-	-
Amido	Lugol		-	-	-
Substâncias Pécnicas	Vermelho de Rutênio		-	-	-
Proteínas Totais	Xilidine Ponceau		+	-	-
	Comassie Brillant Blue		+	-	-

Abreviações: * fixador / + (reação positiva) / - (reação negativa).

O desenvolvimento do nectário basal é sincronizado com o marginal e ao longo da margem também ocorre sincronia, tal fato iniciado muito precocemente já nos primórdios foliares recém formados (Fig. 6A). O primeiro estágio de desenvolvimento (estádio I) foi reconhecido como uma região mais dilatada na margem do primórdio (Fig. 6B), o qual se caracteriza por apresentar: lâmina foliar em formato cilíndrico; um único cordão procambial em sua porção central, envolvido pelo meristema fundamental, e células protodérmicas com formato tabular, citoplasma denso e núcleo volumoso (Fig. 6C). No meristema fundamental se destacam algumas células em início de diferenciação que coraram fortemente de verde pelo Azul de Toluidina. A formação do nectário envolve a atividade de células meristemáticas da protoderme, do meristema fundamental e do procâmbio.

Na margem do primórdio foliar (estádio I), um conjunto de células da protoderme, após sofrer seguidas divisões anticlinais, destaca-se pelo maior volume e por apresentar núcleo mais evidente que as demais, caracterizando o estágio inicial de desenvolvimento da glândula (Figs. 6B e 6C). Nos estádios posteriores (estádios I e II), estas células passam

por um processo de diferenciação e assumem um formato colunar e aspecto secretor (Figs. 6D e 6E). As células protodérmicas adjacentes a estas continuam a se dividir anticlinalmente e as suas derivadas sofrem o mesmo processo de expansão descrito para as anteriores (Figs. 6F e 6G). Este evento é contínuo e assim, as células protodérmicas da margem foliar se diferenciam seqüencialmente do centro para a periferia do nectário em formação.

É interessante notar que as paredes periclinais externas da epiderme secretora do nectário são espessas, sendo tal característica ainda mais marcante nos estádios iniciais (I e II) do desenvolvimento (Figs. 6E e 6G).

No estágio II (Figs. 6F e 6G), a partir do meristema fundamental inicia-se a diferenciação de dois tipos de células parenquimáticas distintas: uma que dará origem à células poligonais e aclorofiladas, com núcleos periféricos, nucléolo evidente, vacúolo proeminente e citoplasma denso; e outro, composto de células com citoplasma granuloso densamente corado em verde pelo Azul de Toluidina.

Nos primórdios foliares, o sistema vascular é constituído por um único cordão procambial, ainda sem ramificações até as porções marginais (Figs. 6B e 6D). Durante o desenvolvimento do nectário não ocorre a diferenciação de um sistema vascular próprio, sendo sua irrigação realizada por ramificações do xilema e floema foliares que, a partir do estágio III, são observadas chegando até o parênquima nectarífero.

Nas fases iniciais do seu desenvolvimento, a folha encontra-se enrolada e o nectário, apesar de totalmente formado ainda não está exposto (Figs. 7A-D). Com a expansão da lâmina foliar ocorre o seu desenrolamento e o nectário assume a posição ventral característica (Fig. 3A).

No estágio IV o nectário encontra-se totalmente formado e identificado por uma epiderme secretora em paliçada característica do nectário adulto (Figs. 7C e 7D).

DISCUSSÃO

A detecção de glicose, frutose e sacarose nas glândulas de *P. crucis* permite caracterizá-las como NEFs. A elevada concentração total de açúcares para os NEFs, como já constatado em outras plantas como algodoeiro (61,7%) e mamona (74%), pode ser resultante dos NEFs serem mais expostos que os nectários florais e sujeitos a uma evaporação adicional. As altas concentrações de açúcares podem também auxiliar numa defesa indireta, uma vez que aumentariam a visitação e o tempo de permanência das formigas. Além disso, o néctar extrafloral concentrado torna-se viscoso e evita a sua utilização por visitantes indesejáveis, como alguns Lepidoptera, cujas peças bucais exigem néctares com baixa concentração de açúcares (Wäckers *et al.*, 2001).

A distribuição dos nectários extraflorais corresponde àquela descrita na literatura para as glândulas marginais de *P. crucis*. Embora Klein e Sleumer (1984) tenham descrito a espécie como possuidora de duas glândulas basais localizadas em alturas diferentes, em muitas das folhas observadas foi constatado apenas um nectário basal.

A análise morfológica e micromorfológica dos nectários da margem e da base foliar mostraram que são estruturas semelhantes, enquadrando-se no tipo séssil e achatado (Flachnektarien), segundo a classificação de Zimmermann (1932).

Os nectários de *P. crucis* são estruturalmente bem organizados. Nectários foliares com organização anatômica similar, com algumas variações estruturais, foram descritos em espécies de Acanthaceae (McDade e Turner, 1997), Euphorbiaceae (Freitas *et al.*, 2001), Rosaceae (Dorscy e Weiss, 1920), Salicaceae (Curtis e Lersten, 1974, 1978, 1980) e Verbenaceae (Padma Rao e Ramayya, 1992).

No sistema de Cronquist (1968), Flacourtiaceae e Salicaceae são duas famílias próximas. O registro de NEFs em *Prockia* é inédito. Existe relato da presença de nectários extraflorais tanto em *Populus* quanto em *Salix*, os únicos gêneros da família Salicaceae.

Em *Populus* (Curtis e Lersten, 1974, 1978) e *Salix* (Curtis e Lersten, 1980), foram também registradas glândulas de resina, sendo que para algumas espécies, há relato de secreção apenas de néctar ou de resina e para outras, tanto de néctar quanto de resina. Em *Populus*, é possível que ocorra facilmente uma transição entre a secreção de resina e de néctar (Curtis e Lersten, 1978). A similaridade anatômica das estruturas de Salicaceae e de *P. crucis* é enorme, constituindo-se em mais uma evidência da proximidade filogenética entre esses clados.

Cristais de oxalato de cálcio em nectários extraflorais, como observado em *P. crucis*, são comuns em diversos grupos taxonômicos (Metcalf e Chalk, 1979; Elias, 1983; Paiva e Machado, 2006). Estes cristais podem estar relacionados com o metabolismo do floema (Elias e Gelband, 1977), que é a principal fonte dos precursores do néctar (Fahn, 2000). A imobilização de cálcio na região floemática é uma estratégia que pode ser explicada pelo fato do transporte de sacarose, principal componente do néctar de *P. crucis*, envolver a atividade de ATPases, as quais podem ser inibidas pela presença de íons Ca^{2+} (Leonard e Hodges, 1980).

A eliminação da secreção, temporariamente acumulada em espaços subcuticulares, pode ocorrer via poros cuticulares, rompimento da cutícula ou em regiões onde exista uma maior permeabilidade da cutícula, como descrito em outros tipos de nectários e tricomas secretores (Fahn, 1979). No caso de *P. crucis* foi possível constatar um acúmulo da secreção entre a cutícula e as paredes das células da epiderme secretora, bem como possíveis fendas na cutícula, sendo provável que o néctar seja liberado por ruptura da cutícula.

Nectários vascularizados, como os de *P. crucis*, são, segundo Elias *et al.* (1975), altamente especializados, permanecendo ativos somente por um curto período de tempo, geralmente algumas semanas, quando as folhas estão em processo final de expansão. O

nectário de *P. crucis* permanece protegido durante todo o seu desenvolvimento, ficando exposto apenas na sua maturidade, quando provavelmente o processo de secreção já estava em curso.

Os testes histoquímicos detectaram substâncias consideradas nutricionalmente importantes a diversas classes de visitantes, como açúcares, proteínas e lipídios (Baker e Baker, 1990). Acredita-se que muitas das proteínas detectadas no néctar são, provavelmente, enzimáticas (Baker e Baker, 1982). Em 1973, Baker e Baker constataram que muitos néctares contêm lipídios (cerca de 30% das amostras por eles analisadas). Sabe-se que os lipídios do tipo óleos essenciais agem contra a perda excessiva de água e aumento da temperatura (Harbone, 1993), além de funcionar atraindo ou repelindo visitantes (Rodriguez *et al.*, 1984).

É comum a ocorrência de taninos nas células parenquimáticas próximas às células secretoras dos nectários (Elias, 1983). Os compostos fenólicos, como detectados nos NEFs de *P. crucis*, podem restringir o ataque por herbívoros e patógenos (Koptur, 1992), e atuar na proteção das células contra o excesso de radiação ultravioleta, bem como na manutenção da integridade do protoplasto em situações de estresse hídrico (Taiz e Zeiger, 2004). Em nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa*, Paiva e Machado (2006) descrevem uma camada de células (endoderme), que estabelece uma linha divisória entre o tecido secretor e a região vascularizada e o mesofilo, na qual é comum o acúmulo de compostos fenólicos, e sugere que esta atuaria impedindo o refluxo de néctar e direcionando sua liberação para o meio externo. Entretanto, em *P. crucis* tal característica não foi observada.

Esse é o primeiro relato da presença de NEFs para o gênero *Prockia*, sendo o néctar produzido com alto valor energético. O desenvolvimento do nectário é precoce, estando a estrutura totalmente formada e ativa em folhas ainda em expansão. Devido à similaridade

dos NEFs presentes em *P. crucis* com os dentes salicóides das espécies de *Populus* e *Salix*, esta característica é mais uma evidência da proximidade filogenética entre os clados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à técnica Cláudia Alencar Vanetti, pela colaboração na captura de imagens digitais ao microscópio eletrônico de varredura, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de iniciação científica e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APG: The Angiosperm Phylogeny Group. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**: 531-553.

Baker HG, Baker I. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator type. *Israel Journal of Botany* **39**: 157-166.

Baker HG, Baker I. 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley BL, Elias TS, eds. *The Biology of Nectaries*. New York: Columbia University Press, 126-152.

Baker HG, Baker I. 1982. Some chemical constituents of floral nectars of *Erythrina* in relation to pollinators and systematics. In: Heywood VH, ed. *Taxonomy and Ecology*. New York: Academic Press, 243-264.

Baker HG, Baker I. 1973. Some anthecological aspects of the evolution of nectar-producing flowers, particularly amino acid production in nectar. *Allertonia* **3**: 25-37.

Barroso GM, Peixoto AL, Ichaso CLF, Guimarães EF, Costa CG. 2002. *Sistemática das angiospermas do Brasil*. Vol. 1. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV.

Bozzola JJ, Russel LD. 1992. *Electron microscopy*. Boston: Jones and Bartlett Publishers.

Chase MW, Zmarzty S, Lledó MD, Wurdack K, Swensen SM, Fay MF. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. *Kew Bulletin* **57**: 141-181.

Cronquist A. 1968. *The evolution and classification of flowering plants*. Boston: Houghton Misslin.

- Curtis JD, Lersten NR. 1974.** Morphology, seasonal variation, and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **61**: 835-845.
- Curtis JD, Lersten NR. 1978.** Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **65**: 1003-1010.
- Curtis JD, Lersten NR. 1980.** Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **67**: 1289-1296.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences de Paris* **258**: 1338-1340.
- Dorscy MJ, Weiss F. 1920.** Petiolar glands in the plum. *Botanical Gazette* **69**: 391-406.
- Elias TS. 1983.** Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: Bentley BL, Elias TS, eds. *The Biology of Nectaries*. New York: Columbia University Press, 174-203.
- Elias TS, Gelband H. 1977.** Morphology, anatomy and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Botanical Gazette* **138**: 206-212.
- Elias TS, Rozich WR, Newcombe L. 1975.** The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. *American Journal of Botany* **62**: 570-576.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fisher DB. 1968.** Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. *Histochemie* **16**: 92-96.
- 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.
- Harbone JB. 1993.** *Ecological Biochemistry*. 4th ed. London: London Academic.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman & Co.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137-138.
- Klein RM, Sleumer HO. 1984.** Flacourtiáceas. In: Reitz R, ed. *Flora ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1-96.

- Koptur S. 1992.** Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays E, ed. *Insect-plant interactions*. Vol. IV. Boca Raton: CRC Press, 82-129.
- Leonard RT, Hodges TK. 1980.** The plasma membrane. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, 163-181.
- Lersten NR, Curtis JD. 1996.** Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **200**: 21-39.
- Maia V. 1979.** *Técnica histológica*. São Paulo: Atheneu.
- McDade LA, Turner MD. 1997.** Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). *American Journal of Botany* **84**: 1-15.
- Metcalf CR, Chalk L. 1979.** *Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of leaf and stem with a brief history of the subject*. Vol.I. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.
- Meyer, VR. 1994.** *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 2nd. John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, England.
- Morellato LPC, Oliveira PS. 1994.** Extrafloral nectaries in the tropical tree *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Canadian Journal of Botany* **72**: 157-160.
- Mound LA. 1962.** Extrafloral nectarines of cotton and their secretions. *The Empire Cotton Growing Review* **39**: 254-261.
- O'Brien TP, McCully ME. 1981.** *The study of plant structure principles and selected methods*. Melbourne: Termarcarphi Pty. Ltda.
- Padma Rao PP, Ramayya N. 1992.** Structure and distribution of extrafloral nectaries (EFN) in *Clerodendrum* L. (Verbenaceae). *Journal of Indian Institute of Science* **72**: 131-137.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006.** Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). *Acta Botânica Brasilica* **20**: 471-482.
- Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry theoretical and applied*, V. II. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingston.
- Rodriguez E, Healey PL, Menta I. 1984.** *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum.
- Roshchina VV, Roshchina VD. 1993.** *The excretory function of higher plants*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sleumer H. 1980.** Flacourtiaceae. Monograph number 22. In: *Flora Neotropica* 22. Nova York: The New York Botanical Garden.
- Solereeder H. 1908.** *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Vol. II. Oxford: Clarendon Press.

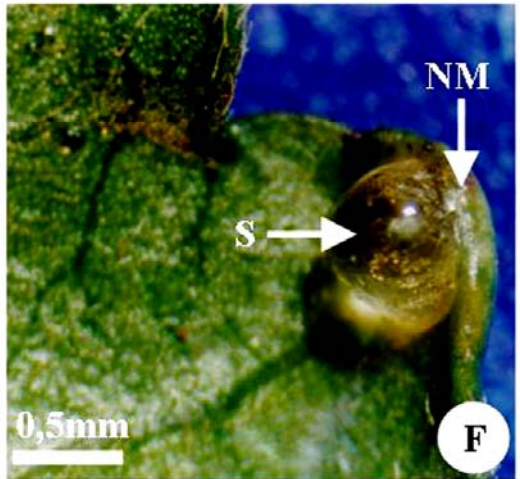
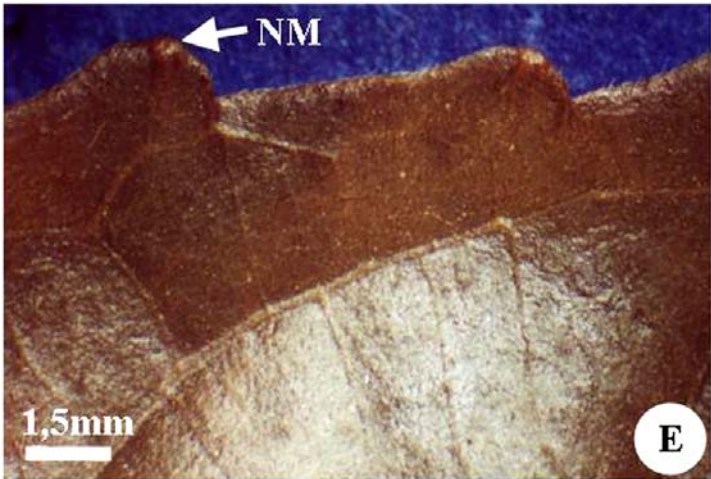
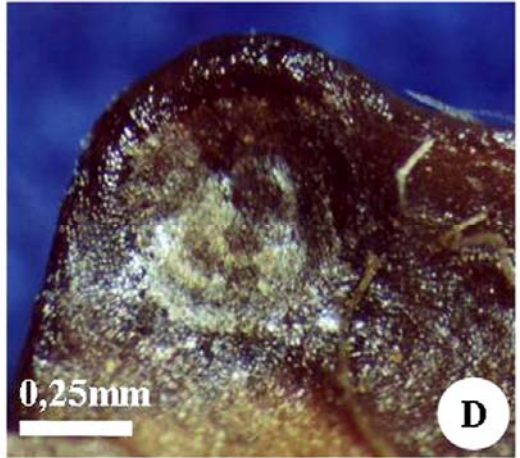
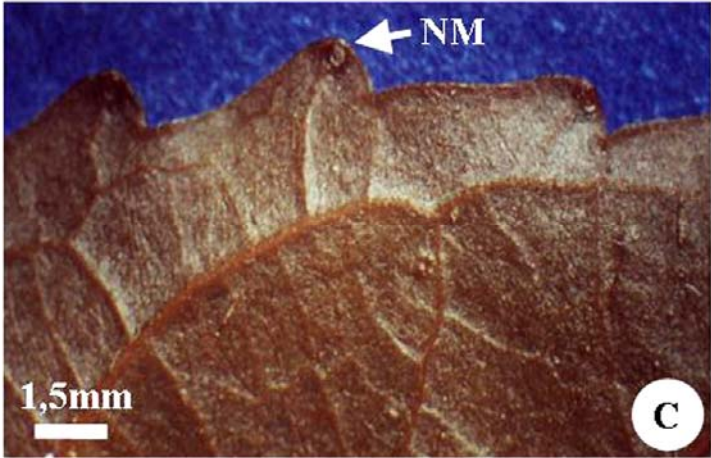
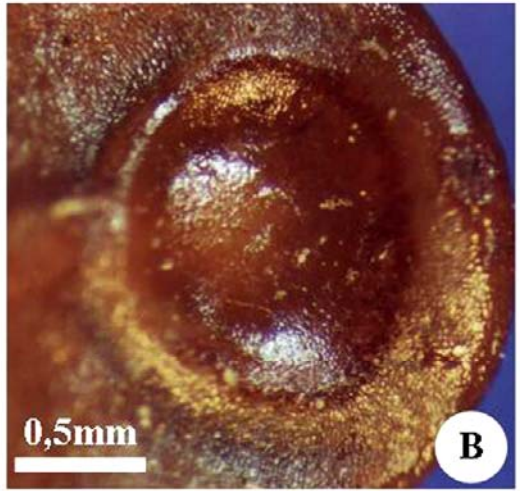
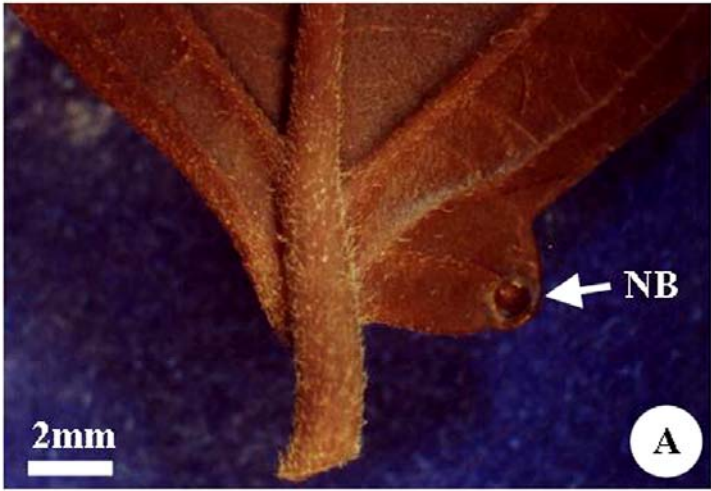
Svendsen AB, Verpoorte R. 1983. *Chromatography of alkaloids*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company.

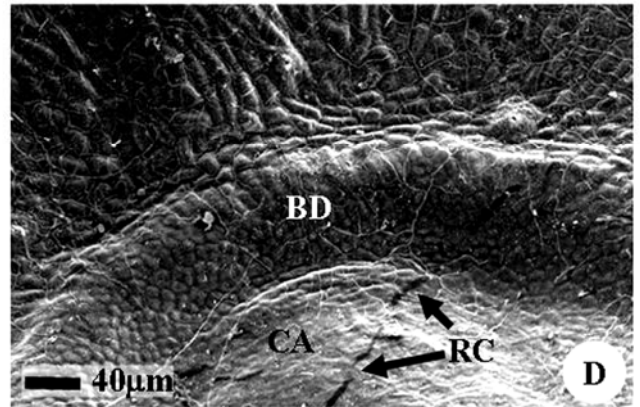
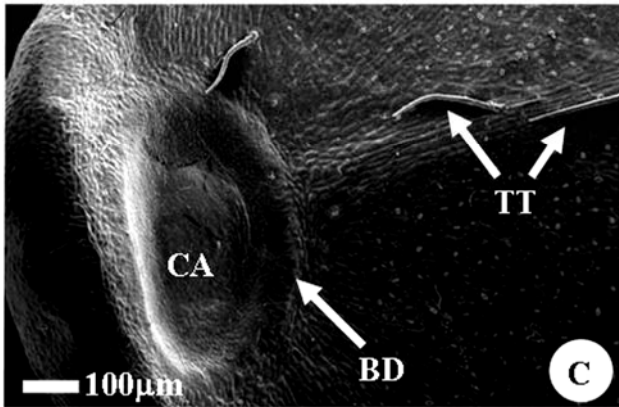
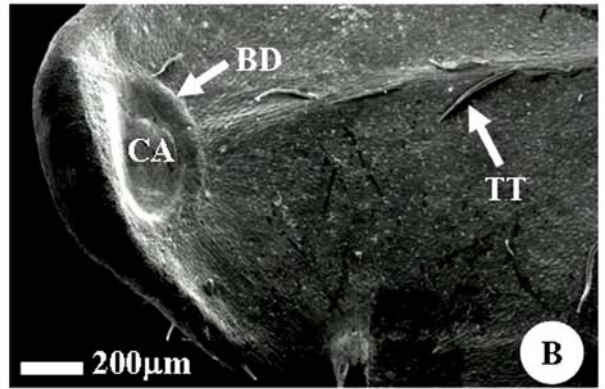
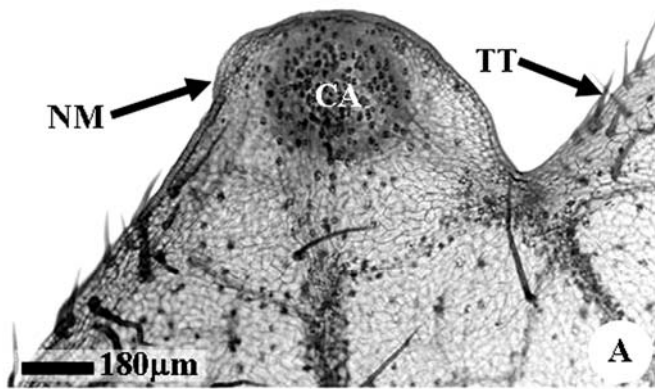
Taiz L, Zeiger E. 2004. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: Taiz L, Zeiger E, eds. Trad. Santarém, E. R. *et al. Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 309-334.

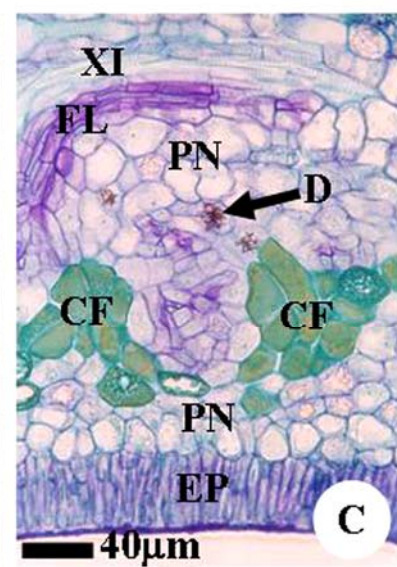
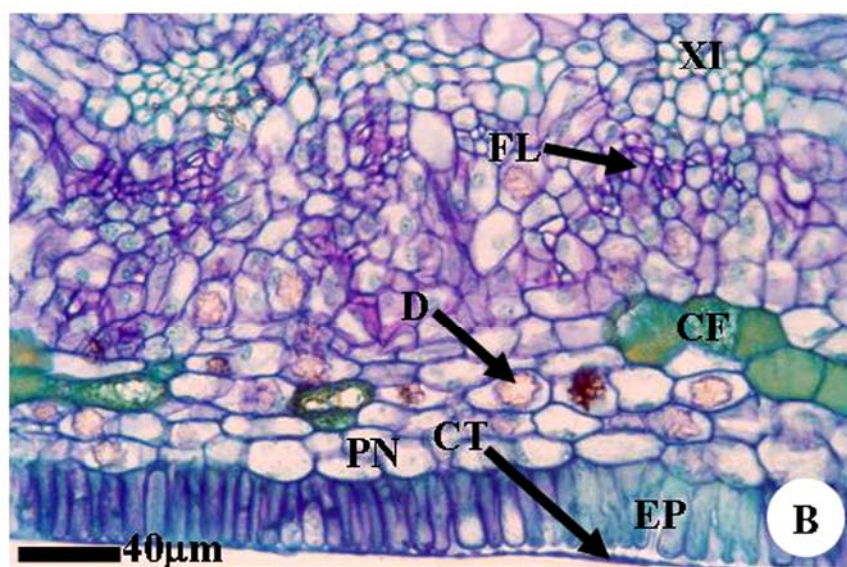
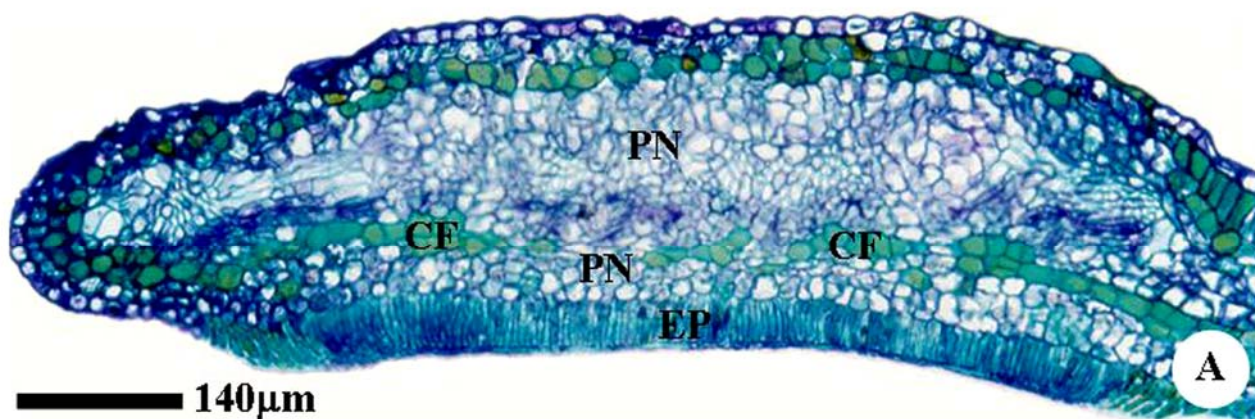
Velozo HP, Rangel Filho AL, Lima JCA. 1991. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

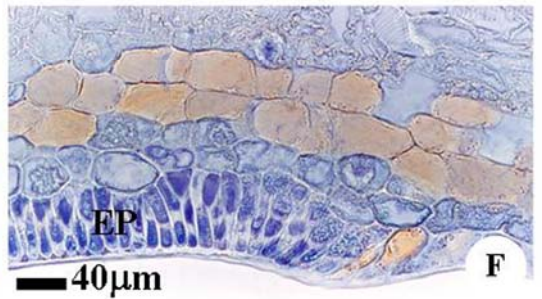
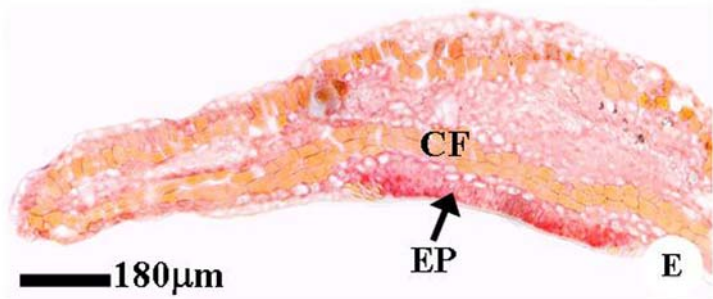
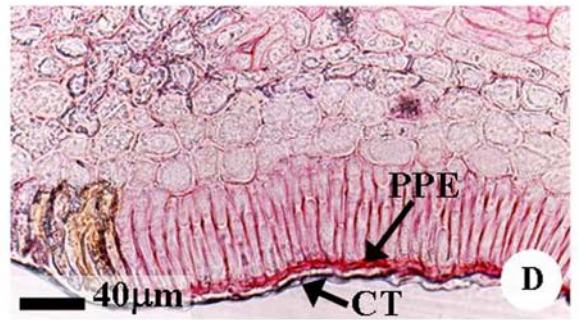
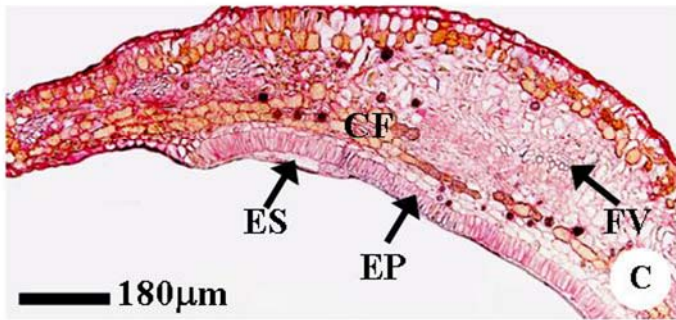
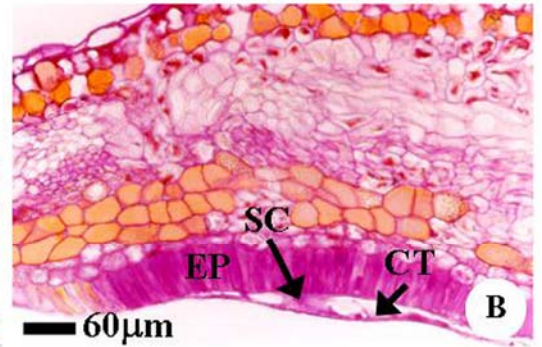
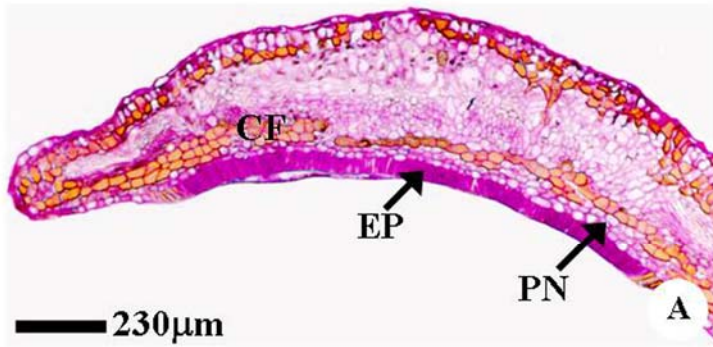
Wäckers FL, Zuber D, Wunderlin R, Keller F. 2001. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Annals of Botany* **87**: 365-370.

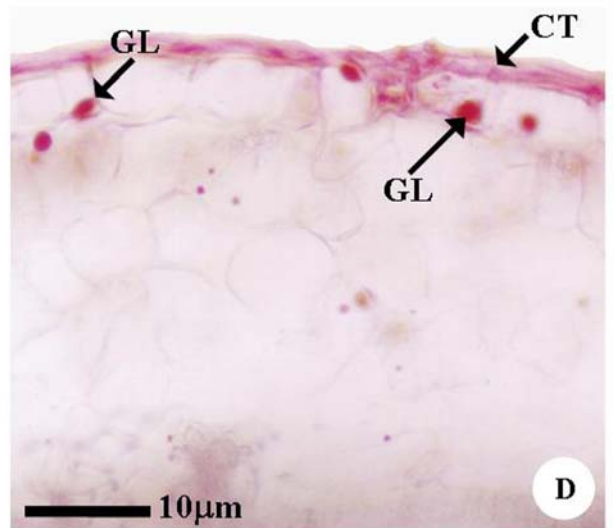
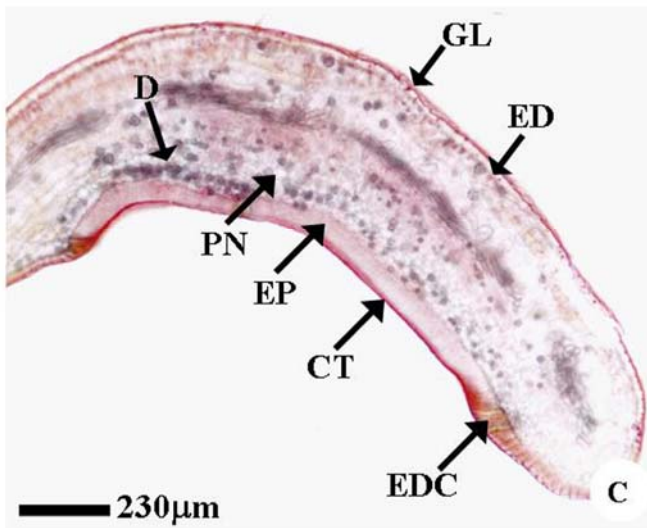
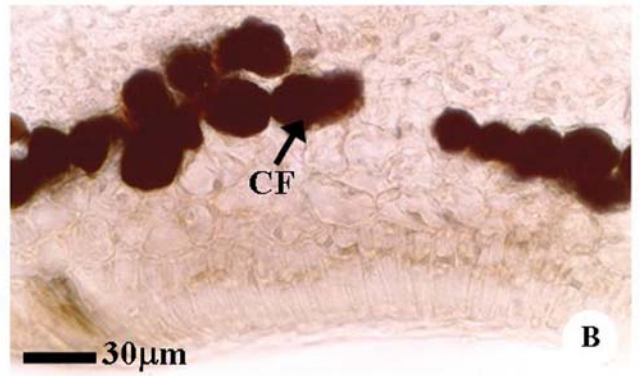
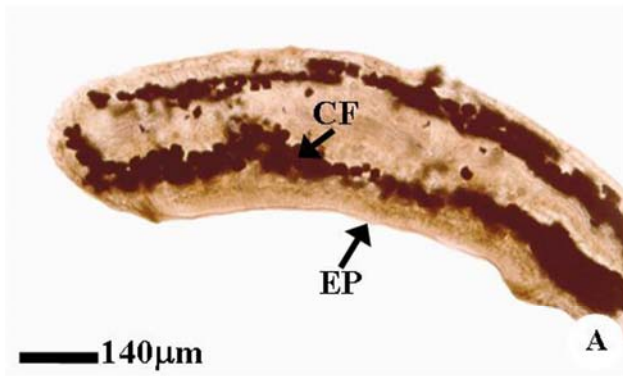
Zimmerman J. 1932. Über die extrafloralen nektarien der Angiospermen. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* **49**: 99-196.

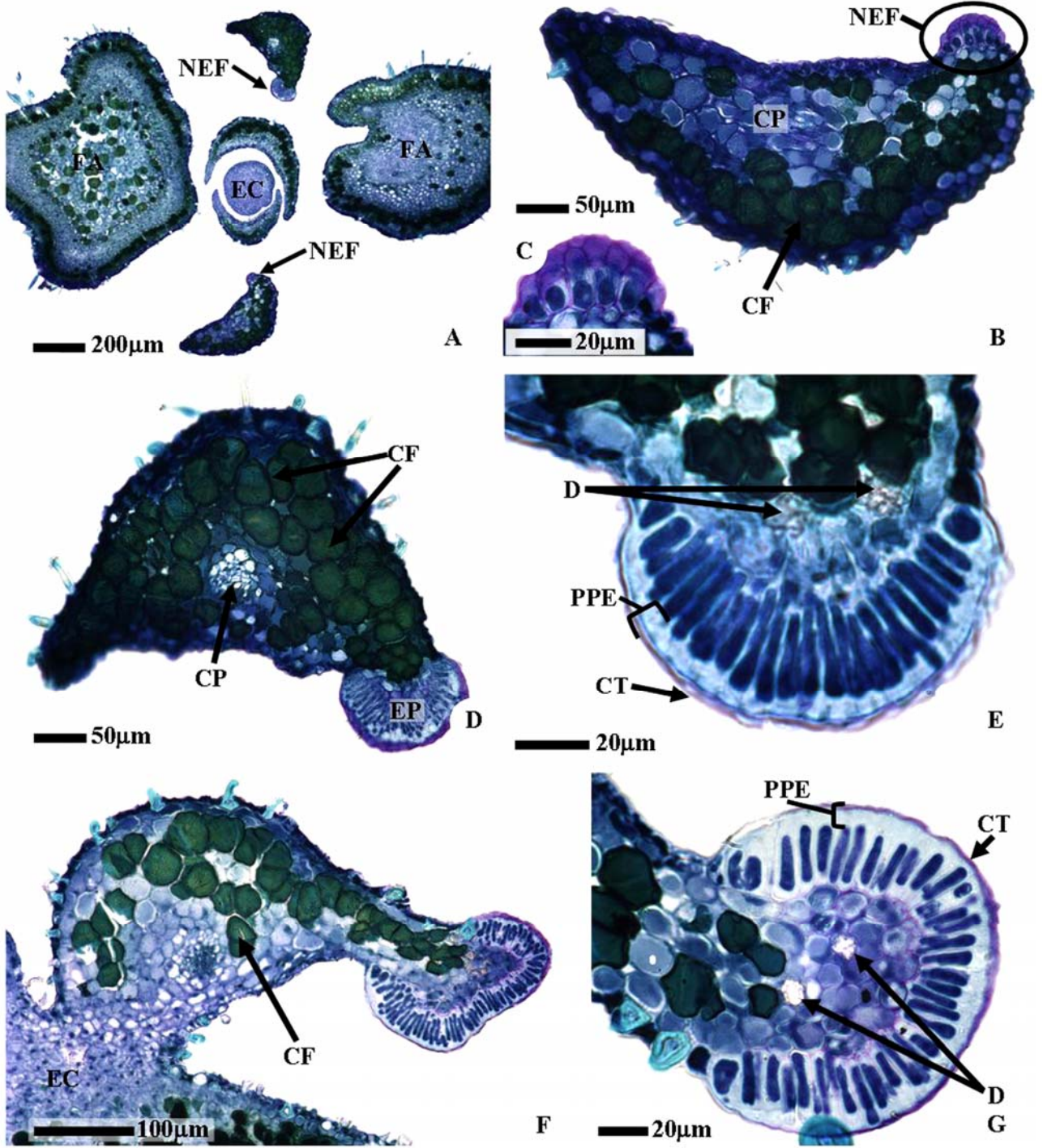


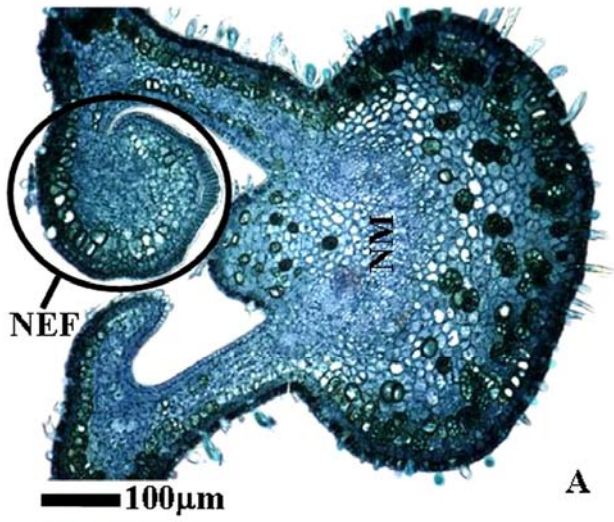




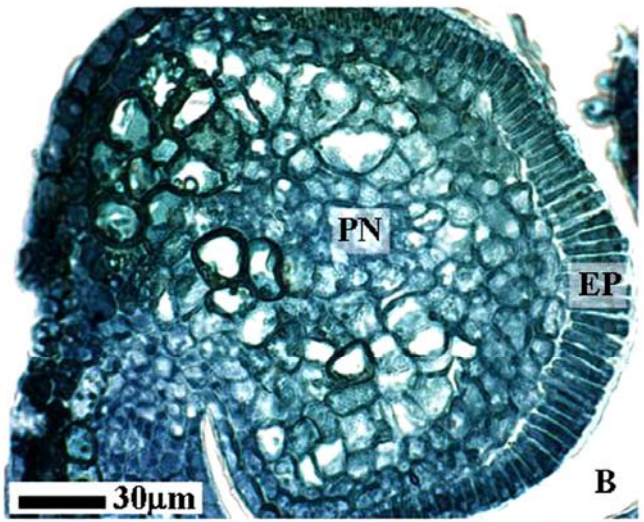




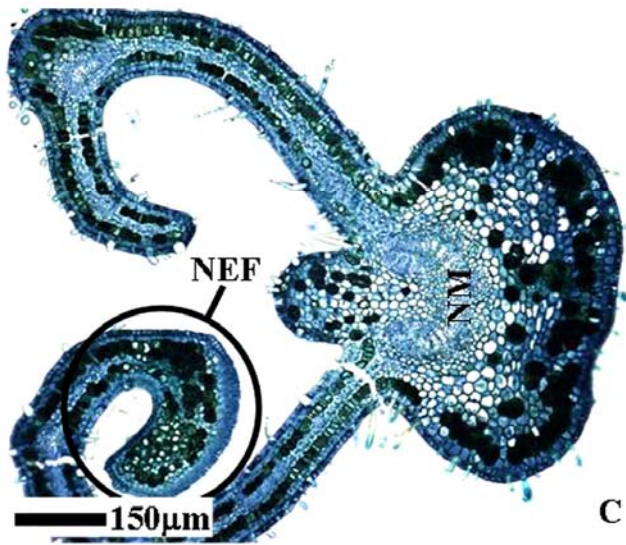




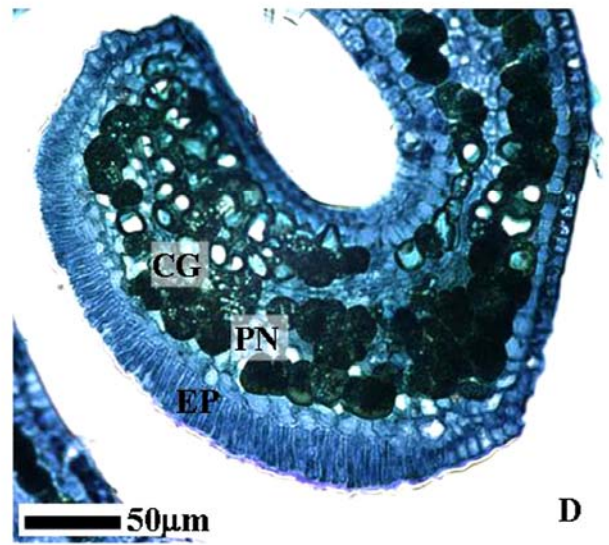
A



B



C



D

5. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi possível constatar alguns caracteres que podem agir de forma unificadora para as famílias Flacourtiaceae e Salicaceae: presença do dente salicóide, tricomas simples unicelulares e não ramificados e pluricelulares ramificados, estômatos braquiparacíticos, crescimento secundário no pecíolo, abundância de cristais, sistema vascular em forma de arco na nervura mediana, mesofilo dorsiventral e esclerênquima acompanhando os feixes.

Os estudos anatômicos feitos nas espécies de Flacourtiaceae demonstraram que a anatomia foliar pode fornecer dados para auxiliar na taxonomia da família, tanto a nível genérico quanto específico. A análise de espécimes provenientes de localidades distintas é de fundamental importância para que se possa levar em consideração a variação que ocorre na estrutura anatômica determinada pelas condições ambientais. A associação de alguns caracteres; como o tipo de venação última marginal, dente marginal, estruturas secretoras, padrões cuticulares, presença de hipoderme e de cristais epidérmicos, tipo de tricomas e padrões de vascularização; se mostrou fundamental para a separação das espécies estudadas.

Este trabalho relatou a presença de ductos e cavidades para o gênero *Casearia*. Os testes histoquímicos confirmam a complexidade do secretado, além de indicar tecidos fundamentais como sítios de síntese e/ou acúmulo de compostos fenólicos.

O desenvolvimento dos nectários de *Prockia crucis* se inicia muito precocemente, já nos primórdios foliares do meristema apical, estando totalmente diferenciado em folhas ainda em expansão. Devido à sua similaridade com os dentes salicóides presentes em *Populus* e *Salix*, sugere-se que tais clados sejam próximos filogeneticamente.