

**CARLOS ANDRÉ ESPOLADOR LEITÃO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS  
NECTÁRIOS DE *TRIUMFETTA SEMITRILOBA*  
JACQ. (TILIACEAE).**

Tese 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

2001

**CARLOS ANDRÉ ESPOLADOR LEITÃO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS NECTÁRIOS  
DE *TRIUMFETTA SEMITRILOBA* JACQ. (TILIACEAE).**

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

**APROVADA: 30 de março de 2001.**

---

**Dr.<sup>a</sup>. Aristéa Alves Azevedo**  
(Conselheira)

---

**Dr. João Marcos de Araújo**  
(Conselheiro)

---

**Dr. Eldo Antônio Monteiro da Silva**

---

**Dr. Hildeberto Caldas de Sousa**

---

**Dr.<sup>a</sup>. Renata Maria Strozi Alves Meira**  
(Orientadora)

“Uma das principais funções de um amigo é suportar (sob forma atenuada e simbólica) os castigos que nós gostaríamos, mas não temos possibilidade, de infligir aos nossos inimigos.”

Aldous Huxley

“Se um Estado for governado pelos princípios da razão, a pobreza e a miséria serão objeto de vergonha; se um Estado não for governado pelos princípios da razão, a riqueza e as honrarias serão objeto de vergonha.”

Confúcio

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, à professora Renata, que tanto me ajudou e me motivou nos mais amargos momentos do meu mestrado. Sou grato à ela não só pelos ensinamentos acadêmicos e pela confiança em mim depositada, mas também pelo seu exemplo de conduta;

Aos meus pais, Rosa Helena Winter Espolador e Carlos Eduardo Pini Leitão, pela minha formação pessoal e apoio;

À Luciana, minha musa inspiradora, amiga e camarada;

À Ana Letícia Espolador Leitão, minha irmã, pela torcida;

Às minhas tias Vera Regina Pini Leitão e Maria Elizabeth Pini Leitão e meu avô, Cláudio de Castro Leitão, pelo apoio e patrocínio;

À professora Aristéia, pelos ensinamentos, pelos conselhos amigáveis e pelas críticas de extrema importância em minha formação; e ao Gilmar Valente, pela ajuda e pelo agradável convívio;

Ao professor Fernando, pelos conselhos de vida em nossas prazerosas e inesquecíveis conversas;

Ao professor João Marcos, pela sua assistência e atenção, e pelo convívio tão agradável;

Ao professor Hildeberto, pelas críticas e elogios feitos a este trabalho;

À professora Tânia, pela sua pronta ajuda e receptividade num momento de grande dificuldade na realização deste trabalho; e à Cida, técnica do Laboratório de Bioquímica, pela boa convivência e simpatia;

Ao professor Eldo, pela confiança em mim depositada; e por ministrar, em minha graduação, a disciplina em que eu me encontrei e que me levou a procurar o Laboratório de Anatomia Vegetal, onde desenvolvi o meu primeiro projeto científico;

À professora Rosane, pela sua simpatia e energia positiva, pelos conselhos e pela ajuda;

Aos demais professores do DBV, pelos ensinamentos;

À minha veterana, agora professora da UFV, Letícia, por me ajudar em certos momentos turbulentos de meu mestrado;

À Zilda e Rosane, técnicas do Laboratório de Anatomia Vegetal, pelos ensinamentos, pelo divertido convívio e pela torcida;

Às secretárias do DBV, Glória, Ângela e Beth, pela força e pela simpatia;

Ao Bráulio, porteiro do prédio, pelas agradáveis e divertidas conversas nos intervalos de minhas jornadas de trabalho noturno;

Aos técnicos da UCP, João Bosco, Rogério e Mercês, por toda a ajuda;

Ao meu velho e grande amigo do peito, camarada Adriano Henrique Ferrarez, o “Che”; pelo seu exemplo, boa fé e pelos nossos momentos que marcaram a minha vida universitária;

Ao Bruno, estagiário do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela simpatia e companheirismo;

À Neudes, por me ajudar a nutrir as plantas cultivadas em casa de vegetação;

Aos meus novos e grandes amigos, camaradas Álvaro & Luzimar (e Guilherme), Darci, Jonas; pelos bons momentos e pelas conversas de alto nível;

Aos meus colegas de mestrado, Sandra, Alexander, Natália, Carlos Alexandre, Livia, Rogério e Rosana, pela amizade e cooperação;

Aos meus novos amigos, carinhosamente, meus calouros: Tathiana, Silvana, Érica, Karla, Renata, Caiafa e meu grande amigo e companheiro David; pelo convívio inesquecível;

Aos meus inimigos, por darem um tempero especial às minhas vitórias da vida;

E a todos que me ajudaram, de uma forma ou de outra, durante a realização deste trabalho; de coração, muito obrigado.

**Valeu, galera!!!!!!**

## **Biografia**

Carlos André Espolador Leitão, filho de Carlos Eduardo Pini Leitão e Rosa Helena Winter Espolador, nasceu na capital do Rio de Janeiro, em 02 de julho de 1975.

Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, em março de 1995 e graduou-se em março de 1999. Foi monitor I de Citologia em 1997 e de Anatomia das Espermatófitas em 1998; estagiou no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia Vegetal, no último ano de graduação.

Em março de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Botânica na mesma Universidade e defendeu tese em março de 2001.

# Índice

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Introdução.....	1
Objetivos.....	7
Materiais e métodos.....	8
Resultados.....	20
Discussão e conclusões.....	46
Referências bibliográficas.....	59

## Resumo

LEITÃO, Carlos André Espolador, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Caracterização estrutural dos nectários de *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae).** Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Renata Maria Strozi Alves Meira. Conselheiros: Dr.<sup>a</sup> Aristéa Alves Azevedo e Dr. João Marcos de Araújo.

*Triumfetta semitriloba* é uma planta invasora, que apresenta nectários florais e nectários extraflorais localizados na folha e na bráctea. Este trabalho teve como objetivos descrever, de forma comparativa, os nectários de *T. semitriloba*, estudar a ontogenia dos nectários florais e a senescência dos nectários extraflorais; e realizar uma análise de detecção de aminoácidos no néctar dos respectivos nectários. Foram utilizados cortes seriados em parafina e historesina, os quais foram corados ou submetidos à diferentes testes histoquímicos. Parte das amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura. Os cinco nectários florais de *T. semitriloba* ocorrem em torno de um curto androginóforo, são constituídos por uma epiderme secretora recoberta por tricomas nectaríferos clavados e um parênquima nectarífero vascularizado. O desenvolvimento dos nectários florais inicia-se em botões com cerca de 1,7mm de comprimento, a partir de divisões anticlinais das células protodérmicas, e divisões em sentidos diversos de células do meristema fundamental e procambiais. Posteriormente, as células protodérmicas se dividem periclinalmente, originando uma estrutura unisseriada constituída por cinco células, onde

as três células mais apicais sofrem divisões no sentido anticlinal e oblíquo. A secreção do néctar ocorre em botões em pré-antese, com cerca de 9mm de comprimento. Os nectários extraflorais se localizam nos primeiros pares de dentes basais da lâmina foliar e bracteal. São, estruturalmente, muito semelhantes, constituídos por uma epiderme secretora recoberta por tricomas secretores, delimitada por uma borda epidérmica. Subjacente, encontra-se um parênquima nectarífero e vascularização constituída por floema e xilema. Na análise química de aminoácidos livres proteicos, foram detectados aspartato ou/e triptofano no néctar produzido pelo nectário da bráctea, não sendo detectados aminoácidos nos demais néctares, embora os três néctares de *T. semtriloba* apresentaram reação positiva à ninhidrina.

## Abstract

LEITÃO, Carlos André Espolador, M. S., Federal University of Viçosa, March, 2001. **Structural characterization of *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tilicaceae) nectaries.** Advisor: Dr. Renata Maria Strozi Alves Meira. Committee Members: Dr. Aristéa Alves Azevedo and Dr. João Marcos de Araújo.

*Triumfetta semitriloba* is a weedy shrub that has floral and extrafloral nectaries on its leaves and bracts. The objectives of this work were to describe comparatively the nectaries of *T. semitriloba*, to study the ontogeny of the floral nectaries and the senescency of the extrafloral nectaries, and to determine the aminoacids which are present in the nectars of the respective nectaries. Serial sections in parafin and histoiresin were prepared and stained or submitted to histochemistry tests with several purposes. Some samples were observed using a scanning electron microscope. The five nectaries of *T. semitriloba* are located on the lateral surface of the short androginophore being constituted by a secretory epidermis recovered by clavate nectariferous trichomes and vascularized nectariferous parenchyma. The floral nectary development begin, initially, within the buds wich are 1,7mm long. The development consists of the protodermal cells dividing into anticlinal direction while the ground meristem and procambial cells dividing into several directions. Afterwards, the protodermic cells divide periclinally, giving rise to an unisseriated structure with five cells. The three most apical cells divide into anticlinal and oblique directions. The nectar secretion

occurs in pre-anthesis buds which are 9mm long. The extrafloral nectaries are located in the first basal teeth pairs of the foliar and bracteal blades. They are structurally similar, constituted by a secretory epidermis which is recovered by secretory trichomes, also they are delimited by an epidermal margins. Immediately below there are a nectariferous parenchyma and vascular system formed by phloem and xylem. In the free proteic aminoacid chemical analysis, aspartate and/or tryptophan were detected in the nectar yielded by the bracteal nectaries. However, it was not detected any aminoacid on the other nectars, although the three nectars of *T. semtriloba* had shown ninhidrin positive reactions.

## Introdução

Nectários são estruturas secretoras de néctar, que ocorrem na superfície de vários órgãos vegetais. Desempenham diferentes funções ecológicas dependendo de sua posição e estrutura, e composição química do néctar secretado, dentre outros fatores. Fisiologicamente, são considerados como estruturas responsáveis pela secreção de excesso de fotoassimilados (Roshchina & Roshchina, 1993). São constituídos por uma epiderme com ou sem tricomas, e um parênquima subepidérmico modificado, podendo também apresentar um tecido vascular especializado (Fahn, 1979a; 1979b). A secreção do néctar pode ocorrer sob duas formas não mutuamente exclusivas: écrina, quando o néctar é eliminado da célula por meio de transportadores localizados na membrana plasmática; e granulócrina, quando o néctar é eliminado por meio de vesículas oriundas do retículo endoplasmático e/ou dictiossomas, por exocitose (Fahn, 1979a; Mauseth, 1988).

O néctar é uma solução composta, basicamente, por glicose, frutose e sacarose, nas mais variadas concentrações. Pode conter ainda maltose, rafinose, melobiose, mucilagem, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, íons minerais, fosfatos, vitaminas, compostos fenólicos, oxidases e tirosinases (Fahn, 1979a; Baker & Baker, 1983; Durkee, 1983). A composição do néctar secretado pode variar substancialmente, dependendo da posição e do tipo de nectário (Roshchina & Roshchina, 1993). Existem evidências de que a concentração de aminoácidos no néctar está correlacionada com o tipo de visitante do nectário, além de ser um parâmetro em estudos taxonômicos e filogenéticos (Baker & Baker, 1977).

São diversas as propostas de classificação para os nectários: Caspary (1848 *apud* Schmid, 1988), com base na posição, classifica os nectários como florais e extraflorais conforme sua ocorrência, respectivamente, em flores e em órgãos não florais (ex: caule, folhas e cotilédones). Delpino (1848-1874 *apud* Schmid, 1988) alternativamente, classifica os nectários como nupciais e extranupciais, conforme o envolvimento, ou não, na polinização.

Schmid (1988) propõe classificar os nectários em “nectários reprodutivos” e “nectários extrarreprodutivos”, quanto a sua localização na flor ou em órgãos vegetativos. Outro aspecto a ser considerado é que existem nectários extraflorais que são nupciais (Knox *et al.*, 1985; Thorp & Sugden, 1990) e nectários florais que são extranupciais (Elias & Gelband, 1976; Inouye, 1983; Subramanian & Inamdar, 1989; Thomas & Dave, 1992)

Embora o sistema proposto por Caspary seja amplamente adotado por vários autores, sua definição se mostra confusa, pois o termo “nectário extrafloral” abrange os nectários presentes na face abaxial de pétalas e sépalas (Elias & Gelband, 1975, 1976; Baker *et al.*, 1978; Beattie, 1985).

Dessa forma, no presente trabalho, optou-se por designar “nectários florais” os situados em qualquer parte da flor, e “nectários extraflorais” aqueles localizados em outra parte qualquer do vegetal.

Alguns nectários são estruturalmente muito semelhantes a hidatódios. Em *Impatiens scabrida* e *I. balfourii* (Balsaminaceae), ocorrem nectários e hidatódios nas folhas, e em *I. balfourii* ocorrem estruturas intermediárias (Elias & Gelband, 1977). Em *Lafoensia vandelliana*, as glândulas foliares, antes tidas como hidatódios, foram consideradas nectários por Meira (2000) ao detectar açúcares na secreção

e verificar que estes nectários são visitados por formigas. Em alguns taxa da família Curcubitaceae ocorrem nectários homólogos à hidatódios tricomas (Vogel, 1997). A semelhança entre nectários e outras estruturas secretoras torna necessária a realização da análise química da secreção para uma correta classificação da estrutura estudada.

Os nectários florais ocorrem nas mais variadas partes da flor. Fahn (1953), baseando-se na posição de nectários florais em representantes de várias famílias, propôs um sistema de classificação e sugeriu a existência de uma tendência acro-centrípetas de migração, onde os nectários, originalmente localizados nas partes externas da flor, passariam a se situar em partes internas da flor, por exemplo, no ovário. Esta proposta foi criticada por Smets (1986), sob a alegação de que a classificação topográfica adotada por Fahn (1953) era detalhada demais e não concordava suficientemente com os táxons naturais.

Os nectários florais estão freqüentemente envolvidos com a polinização, mas também podem ser visitados por animais sem nenhuma atuação na polinização (Inouye, 1983). O volume e a composição química do néctar produzido pode estar relacionado com o requerimento energético do agente polinizador, sendo elevado em flores polinizadas por morcegos e pássaros, e baixo em flores polinizadas por insetos como abelhas e borboletas (Cruden *et al.*, 1983). Nectários localizados na face abaxial de sépalas e pétalas podem servir de atrativo para formigas que conferem proteção à planta (Elias & Gelband, 1975; Beattie, 1985; Subramanian & Inamdar, 1989; Thomas & Dave, 1992).

Os nectários florais apresentam estrutura variada, assim como os nectários extraflorais, e podem sintetizar algumas substâncias hormonais necessárias aos processos de fertilização e desenvolvimento do ovário e do fruto (Roshchina & Roshchina, 1993). Um tipo muito comum é o

nectário em anel, localizado em torno do ovário, constituído por uma epiderme com estômatos modificados e um parênquima secretor subjacente (Fahn, 1979a).

Pelo menos 68 famílias de angiospermas possuem representantes portadores de nectários extraflorais, sendo estes mais freqüentes nas dicotiledôneas. A presença de nectários extraflorais em 35 ordens de angiospermas (Elias, 1983), exibindo grande diversidade em seu desenvolvimento ontogenético, indica que tais estruturas se desenvolveram independentemente e em épocas diferentes em várias famílias (Elias, 1983; Vogel, 1997).

Quanto ao valor adaptativo dos nectários extraflorais, existem duas correntes que se contrapõem: a protecionista e a exploracionista. Segundo a corrente protecionista, os nectários extraflorais estariam envolvidos em interações ecológicas. Em vários experimentos e observações, foram registradas redução de danos foliares e o aumento de disseminação de sementes em plantas visitadas por insetos de comportamento agressivo que forrageiam a planta em busca de néctar (Bentley, 1976; Stephenson, 1982; Beattie, 1985; Freitas & Oliveira, 1996).

A corrente exploracionista atribui aos nectários extraflorais uma função puramente fisiológica, considerando que a visita de formigas e demais insetos seria apenas uma forma de herbivoria benigna, sem nenhuma atuação defensora ao vegetal considerado (Beattie, 1985; Schmid, 1988). Atualmente, a corrente protecionista vem sendo cada vez mais reforçada por um número crescente de evidências (Bentley, 1976; Beckmann Jr. & Stucky, 1981; Beattie, 1985; Smiley, 1986; Pemberton & Lee, 1996; Oliveira, 1997; Koptur *et al.*, 1998).

Os nectários extraflorais também podem estar envolvidos na polinização. Em *Acacia terminalis* os nectários foliares são visitados por pássaros que atuam como agentes polinizadores, uma vez que estes esbarram o seu corpo nas flores enquanto visitam os nectários (Knox *et al.*, 1985). Em *A. longifolia* os nectários foliares também são atrativos para polinizadores. Neste caso, os polinizadores que visitam os nectários são insetos (Thorp & Sugden, 1990).

*Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae) é uma planta, invasora de pastagens, pomares, terrenos baldios e beira de estradas. É conhecida, popularmente, por carrapicho-de-boi, carrapichão, carrapicho-miúdo, juta-nacional, carrapicho-de-linho, guanxuma, carrapicho (PE, SP) e carrapicho-da-calçada. No Brasil ocorre na região Sudeste, parte do Centro-oeste, Santa Catarina e Bahia. Caracteriza-se por ser perene, de porte subarbustivo, ereta e muito ramificada, com folhas alternas, pecioladas, denso-pubescentes e polimórficas. Apresenta, como inflorescências, cimeiras axilares e terminais, com muitas flores pentâmeras de coloração amarela, que possuem cinco nectários florais em volta do ovário (Lorenzi, 1982).

Collevatti *et al.* (1997, 1998), estudando o comportamento de forrageamento de visitantes florais em *T. semitriloba*, verificaram que os principais agentes polinizadores são abelhas, e que o pólen é o principal recurso procurado, embora algumas espécies visitem as flores principalmente a procura de néctar. No entanto, no levantamento bibliográfico realizado no presente trabalho, não foi encontrada nenhuma referência à caracterização anatômica dos nectários florais de *T. semitriloba*, tampouco sobre a composição do néctar. Para um melhor entendimento da biologia da polinização de *T. semitriloba*, é importante um estudo da anatomia dos nectários florais e a análise química do

néctar secretado. Essas informações são também valiosas na área de sistemática, podendo servir de base na delimitação de táxons naturais (Smets, 1986).

Os nectários foliares de *T. semitriloba* foram previamente estudados por (Ferreira, 1997), que identificou sacarose, glicose e frutose no néctar. Os nectários são constituídos por uma concavidade na epiderme adaxial, recoberta por numerosos tricomas multicelulares em forma de clava. Internamente à epiderme se encontra um parênquima especializado, caracterizado por células de citoplasma denso, núcleo relativamente grande e paredes finas. Entre estes tipos celulares encontram-se terminações vasculares de xilema e floema, as quais podem alcançar a epiderme secretora. (Ferreira, 1997).

Os nectários extraflorais de *T. semitriloba* se encontram mais ativos em folhas em fase final de expansão, o que pode estar relacionado com a atração de formigas em direção às folhas novas, oferecendo assim uma maior proteção contra herbívoros à esta região vulnerável do corpo da planta (Leitão, 1999). Embora tenha sido elucidado o desenvolvimento ontogenético dos nectários extraflorais da folha de *T. semitriloba* nesse trabalho, a fase de senescência dos nectários extraflorais ainda não foi devidamente esclarecida (Leitão, 1999).

## Objetivos

Pela importância fisiológica, ecológica e sistemática das estruturas secretoras, o presente trabalho teve como objetivos:

- Caracterizar a anatomia dos nectários florais de *Triumfetta semitriloba*;
- Analisar comparativamente a anatomia dos nectários florais e extraflorais de *T. semitriloba*;
- Caracterizar as diferentes etapas do desenvolvimento ontogenético dos nectários florais de *T. semitriloba*;
- Descrever a fase de senescência dos nectários extraflorais de *T. semitriloba*;
- Identificar algumas classes de substâncias nos tecidos nectaríferos em diferentes fases do desenvolvimento ontogenético dos nectários florais de *T. semitriloba*, e durante as fases de secreção e senescência dos nectários extraflorais.

## **Materiais e métodos**

### **1- Procedência e cultivo das plantas**

Parte das plantas de *Triumfetta semitriloba* utilizadas neste trabalho foram coletadas às margens da trilha principal da Mata do Paraíso, um fragmento de mata secundária do Bioma Mata Atlântica em Viçosa - MG; e parte foi cultivada em casa de vegetação. Os materiais testemunha foram depositados no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (VIC), sob os números: 24.807, 24.808, 24.809 (plantas provenientes da mata), 25.254 e 25.255 (plantas cultivadas).

Os exemplares cultivados foram obtidos por meio de estaquia de plantas coletadas às margens de rodovias próximas ao município de Viçosa – MG. Depois de enraizadas em água, as estacas foram plantadas em vasos com capacidade para 14 litros, contendo uma mistura de solo peneirado em malha de 7mm, e esterco bovino curtido, na proporção de 5:1.

Os vasos foram regados regularmente e, a cada cinco dias, era adicionada solução nutritiva - força total - (Hoagland & Arnon, 1950), sendo mantidos em casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa – MG.

## 2 – Microscopia de luz

### Nectários florais de *T. semitriloba*

Inflorescências de plantas da mata apresentando flores em diversos estádios de desenvolvimento foram fixadas em FAA<sub>50</sub>, por 24 horas e estocadas em álcool etílico 70% (Johansen, 1940). Das inflorescências, foram selecionados botões florais medindo 1,7mm; 2,0mm; 2,5mm; 3,0mm; 3,5mm; 4mm; 5mm; 6mm; 8mm de comprimento, flores em pré-antese e flores senescentes (fig. 1), em 3 repetições, para os estudos ontogenéticos.

Flores em pré-antese, coletadas na mata, com aproximadamente 9mm de comprimento e que continham néctar, foram fixadas em solução aquosa de sulfato ferroso 2% em formalina 4%, durante 48h, para verificação de compostos fenólicos. Este teste histoquímico dispensa tratamentos posteriores (Johansen, 1940). Para evidenciação de compostos lipídicos, as amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada (solução aquosa de fosfato de sódio monobásico 0,4%, fosfato de sódio dibásico 6,5% e formalina 4%) durante 48h, submetidas ao “post-chrome” em solução aquosa de bicromato de potássio 3% por 72h e lavadas em água destilada (Lillie, 1948 *apud* Clark, 1981). Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas e estocadas em álcool etílico 70%. Como controle, alguns destes materiais foram previamente submetidos ao metanol (Johansen, 1940) e à piridina (Baker, 1947), para a extração de compostos fenólicos e lipídicos, respectivamente. Para ambos os testes foram feitas 3 repetições.

Flores em pré-antese que continham néctar, foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação e fixadas em solução contendo

0,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 3% de sacarose e 5mM de cloreto de cálcio, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, por 4 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas na mesma solução tampão, sendo posteriormente mantidas em solução tampão acrescida de 0,15M de glicina por 12 horas. As amostras foram novamente lavadas, desidratadas e estocadas em álcool etílico 70% (Karnovsky, 1965, modificado).

Parte das amostras dos nectários florais em diferentes estádios de desenvolvimento foi desidratada em série etílica/butílica e incluídas em parafina em estufa à vácuo, e parte foi desidratada em série etílica e incluída em historesina do tipo glicol-metacrilato (Historesin, Leica), preparada conforme as instruções recomendadas pelo fabricante.

Os blocos de parafina e resina foram cortados com navalha de aço e de vidro, em um micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 da Leica), com espessura de 8 $\mu$ m e 2 a 4 $\mu$ m, respectivamente, e os cortes (seriados) obtidos foram acondicionados sobre lâminas. Os cortes dos materiais incluídos em parafina foram posteriormente desparafinizados em série xilol/etílica e hidratados em série etílica (Berlyn & Miksche, 1976).

Os cortes foram submetidos à diferentes métodos de coloração e histoquímica, a saber:

- Azul de Toluidina;
- Fucsina e Azul de Astra;
- Hematoxilina de Sass;
- Reação de P.A.S.;
- Sudan Black B;
- Xylidine Ponceau.

#### **Azul de Toluidina pH 4,0 (Vidal, 1977).**

Para detecção de radicais aniônicos e metacromasia, cortes em resina de nectários florais em diferentes estádios de desenvolvimento

foram submetidos à coloração pelo azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0 durante 15 minutos à temperatura ambiente.

**Fucsina e Azul de Astra (Roeser, 1972, modificado).**

Para caracterização anatômica, cortes obtidos de nectários florais incluídos em parafina, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram corados em solução alcoólica 50% de fucsina básica 0,1% por 15min, lavados em água destilada e posteriormente corados com solução aquosa de azul de astra 0,5% por 5min.

**Hematoxilina (Sass's Hemalum) (Berlyn & Miksche, 1976).**

Para caracterização anatômica e evidenciação de células em mitose, cortes obtidos de nectários florais incluídos em parafina, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram corados em solução aquosa de hematoxilina 0,1%, contendo 0,02% de iodato de potássio e 2% de alúmen de potássio (mordente), por 1:30h.

**Reação de P.A.S. (Maia, 1979, midificado).**

Para identificar polissacarídeos neutros e glicoproteínas, procedeu-se à reação de P.A.S. Cortes obtidos de nectários florais incluídos parafina, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram inicialmente oxidados em solução aquosa de ácido periódico 0,5% durante 9min, à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e submetidas ao Reativo de Schiff (Mello & Vidal, 1978) durante 30 min, na ausência de luz e temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes durante 3min em água sulfurosa (água, solução aquosa de ácido clorídrico 1N e solução de

metabissulfito de sódio 10%, na proporção de 18:1:1 (v/v/v)) (Maia, 1979).

Já os cortes em resina de nectários florais foram oxidados em solução aquosa de ácido periódico 0,4% por 30min à temperatura de 57°C, lavados em água sulfurosa (água, solução aquosa de ácido clorídrico 1N e solução de metabissulfito de sódio 10%, na proporção de 18:1:1 (v/v/v)) e posteriormente, em água destilada. Em seguida, os cortes foram submetidos ao Reativo de Schiff (Mello & Vidal, 1978) durante 15min, na ausência de luz e temperatura ambiente (Maia, 1979, modificado).

#### **Sudan Black B (Pearse, 1962, modificado; Benes, 1964, modificado).**

Para evidenciação de compostos lipídicos, cortes em resina de nectários de flores em pré-antese, fixados em formalina neutra tamponada (Lillie, 1948 *apud* Clark, 1981) foram corados por 45min em solução alcoólica 70% de Sudan Black B 1%.

#### **Xylidine Ponceau (Vidal, 1970).**

Para detecção de radicais catiônicos proteicos, cortes em resina de nectários florais, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram submetidos à coloração com Xylidine Ponceau 0,1%, pH 2,5, em solução de ácido acético 3% (v/v) durante 15min.

Após a coloração, os cortes foram lavados em água destilada. As lâminas de material incluído em parafina foram desidratadas em série etílica/xilol, e montadas com bálsamo-do-canadá (Berlyn & Miksche, 1976). As lâminas com material incluído em resina foram lavadas em água destilada e secas ao ar. Posteriormente, foram mergulhadas em xilol

e montadas com bálsamo-do-canadá, exceto aquelas que continham os materiais submetidos aos testes para detecção de compostos fenólicos e lipídicos, as quais não foram montadas para evitar perda de contraste, uma vez que nestes testes não se utiliza contra-coloração. Para todas as técnicas empregadas, foram feitas 3 repetições.

As principais etapas do processamento das amostras encontram-se resumidas no quadro 1.

Quadro 1. Técnicas empregadas durante o processamento de nectários florais a serem analisados ao microscópio de luz.

<b>Fixador</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Tratamento posterior</b>	<b>Inclusão</b>	<b>Referências</b>
FAA <sub>50</sub>	coloração simples	Hematoxilina	parafina	Berlyn & Miksche, 1976
	coloração dupla	Fucsina e Azul e Astra	parafina	Roeser, 1973
	avaliação de metacromasia	Azul de Toluidina	Historesin	Vidal, 1977
	detecção de carboidratos totais	Reação de PAS	parafina	Maia, 1979
Historesin			Maia, 1979, modificado	
Formalina neutra tamponada	detecção de lipídios	Sudan Black B	Historesin	Pearse, 1962; Benes, 1964
Sulfato ferroso em formalina	detecção de compostos fenólicos	_____	Historesin	Johansen, 1940
Glutaraldeído e paraformaldeído	avaliação de metacromasia	Azul de Toluidina	Historesin	Vidal, 1977
	detecção de proteínas totais	Xylidine Ponceau	Historesin	Vidal, 1970
	detecção de carboidratos totais	Reação de PAS	Historesin	Maia, 1979, modificado

### **Nectários extraflorais de *T. semitriloba***

Os 3 primeiros pares de dentes basais (portadores de nectário) da lâmina foliar e os dois primeiros pares de dentes basais (portadores de nectário) da lâmina bracteal foram isolados com o auxílio de uma lâmina de barbear, fixados em solução contendo glutaraldeído e paraformaldeído (Karnovsky, 1965, modificado) e estocados em álcool etílico 70%. Estas amostras foram coletadas entre 8:00h e 9:00h da manhã a partir de plantas em floração cultivadas em casa de vegetação.

Os nectários que apresentavam uma gota de secreção foram obtidos de folhas com aproximadamente 10cm de comprimento de lâmina foliar e 2,5cm de comprimento de pecíolo, localizadas entre o 6° e o 8° nó do ramo vegetativo (fig. 2). Dentes contendo nectários senescentes foram coletados de folhas com cerca de 10cm de comprimento de lâmina foliar e 5,5cm de comprimento de pecíolo, localizadas entre o 13° e o 19° nó do ramo vegetativo a partir do ápice.

Foram coletados nectários que apresentavam uma gota de secreção, a partir de brácteas com cerca de 6,5cm de comprimento de lâmina e 1cm de pecíolo, localizadas entre o 7° e o 8° nó do ramo fértil a partir do ápice (fig. 3). As amostras de nectários extraflorais da bráctea e da folha foram incluídas em resina do tipo glicol-metacrilato (Historesin, Leica), preparada conforme as instruções recomendadas pelo fabricante.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo de avanço automático RM 2155 da Leica, onde se obteve cortes com 2µm de espessura, que foram submetidos às seguintes técnicas de coloração:

- Azul de Toluidina (seguindo o mesmo protocolo descrito para os nectários florais);
- Reação de P.A.S. (seguindo o mesmo protocolo descrito para os nectários florais incluídos em historesina);
- Xylidine Ponceau (seguindo o mesmo protocolo descrito para os nectários florais).

Após a coloração, as lâminas com material incluído em resina foram lavadas em água destilada e secas ao ar. Posteriormente, foram mergulhadas em xilol e montadas com bálsamo-do-canadá. Para todas as técnicas empregadas, foram feitas 3 repetições.

As principais etapas do processamento das amostras encontram-se resumidas no quadro 2.

Quadro 2. Técnicas empregadas durante o processamento de nectários extraflorais a serem analisados ao microscópio de luz.

<b>Fixador</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Tratamento posterior</b>	<b>Inclusão</b>	<b>Referências</b>
Glutaraldeído e paraformaldeído	avaliação de metacromasia	Azul de Toluidina	Historesin	Vidal, 1977
	detecção de proteínas totais	Xylidine Ponceau	Historesin	Vidal, 1970
	detecção de carboidratos totais	Reação de PAS	Historesin	Maia, 1979, modificado

### **3 - Microscopia eletrônica de varredura**

Os nectários da flor em pré-antese, da bráctea e da folha que continham secreção, e nectários senescentes da folha foram observados ao microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram fixadas em

solução de glutaraldeído e paraformaldeído seguindo o mesmo protocolo utilizado para as amostras destinadas à análise em microscopia de luz (Karnovsky, 1965, modificado). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica e levadas à secagem em ponto crítico do dióxido de carbono (Bozzola & Russel, 1992), utilizando-se equipamento CPD020 da Balzers. Após a montagem dos nectários nos “stubs”, procedeu-se a deposição metálica com ouro (Bozzola & Russel, 1992) utilizando-se equipamento Sputter Coater FDU 010 da Balzers.

#### **4 – Análise química do néctar**

Amostras de néctar foram obtidas diretamente dos nectários da flor aberta, da folha e da bráctea por meio de um tubo capilar. Após a coleta, os tubos capilares contendo néctar foram selados com parafilme e armazenados em “freezer” ( $-8^{\circ}\text{C}$ ). As coletas de néctar produzido por nectários extraflorais foram realizadas entre 8:00h e 9:00h. As amostras de néctar da flor foram coletadas entre 15:30h e 16:30h. As coletas de néctar foram realizadas durante o mês de junho de 2000

As amostras de néctar foram extraídas dos capilares com solução solvente MCA (metanol/clorofórmio/água, na proporção de 12:5:3) (Morita & Assumpção, 1972) com o auxílio de uma seringa de vidro. Para a remoção parcial do solvente da solução final, foi utilizado um vapor rotativo da marca Fisatom.

Para detecção de aminoácidos totais no néctar foram adicionadas, com o auxílio de uma pipeta micrométrica, amostras de néctar floral, foliar e bracteal em um pedaço de papel de filtro Whatman nº1, que foram posteriormente reveladas com ninhidrina 1% em acetona (Morita & Assumpção, 1972).

Para a análise qualitativa de aminoácidos livres das três amostras de néctar foi realizada eletroforese em papel (Block *et al.*, 1958), utilizando-se tampão ácido cítrico (0,1M) e fosfato de sódio dibásico (0,2M) em pH 2,2 (Morita & Assumpção, 1972) sob 300V por um período de 80min. Como suporte, foram utilizadas tiras de papel de filtro Whatman nº1 medindo 45cm de comprimento e 2cm de largura. No centro de cada tira foi traçada uma linha em sentido transversal (origem). As tiras foram embebidas no tampão e, posteriormente, foi adicionada uma amostra de néctar ou padrão na região central de cada tira de papel, utilizando-se uma pipeta micrométrica.

Foram utilizadas soluções padrões, na concentração de 0,1M, dos seguintes aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina.

Após a eletroforese, as tiras de papel foram reveladas com ninhidrina 1% em acetona (Morita & Assumpção, 1972), e medidas as distâncias do centro das manchas de aminoácidos em relação ao ponto de origem. Os valores obtidos para as mostras de néctar foram comparados com os obtidos para as amostras dos padrões.

## **5 - Análise e documentação fotográfica**

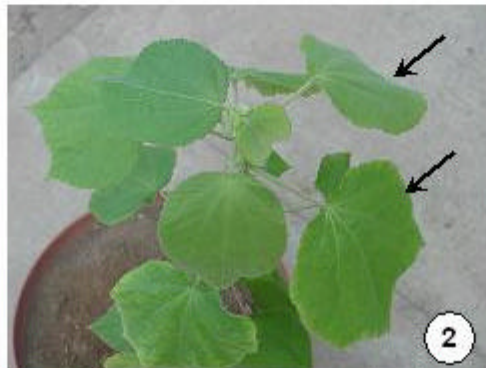
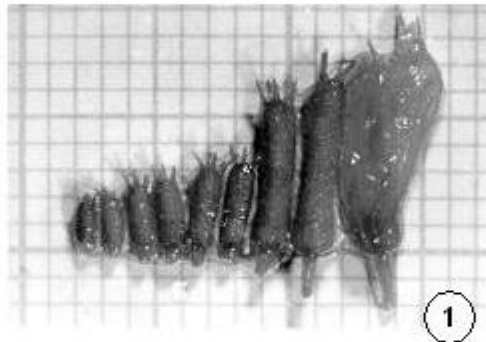
Para caracterização dos tricomas foi utilizada a classificação proposta por Theobald *et al.* (1979).

Os botões florais nos diferentes estádios de desenvolvimento e os nectários florais, em fase de secreção, foram analisados e as fotografias obtidas utilizando-se um estereoscópio Olympus SZH.

Para análise e documentação fotográfica em microscopia de luz foi utilizado um fotomicroscópio Olympus AX70 equipado com sistema

fotográfico U-Photo e recurso de contraste de fase e polarização, pertencentes ao Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

As observações e documentação em microscópio eletrônico de varredura foram efetuadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol T200 pertencente ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.



Figuras 1-3. *T. semitriloba*. Fig. 1. Botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento, e uma flor aberta (à direita). Fig. 2. Folhas em diferentes estádios de desenvolvimento. Setas: folha com nectário em atividade de secreção. Fig. 3. Ramo fértil com brácteas em diferentes estádios de desenvolvimento Setas: brácteas com nectário em atividade de secreção. Escala (Fig. 1) em milímetros.

# Resultados

## 1- Fenologia

As flores de *Triumfetta semitriloba* entram em antese no período de 13:00h a 15:00h, permanecem abertas até o anoitecer e perdem o perianto no dia seguinte (flores senescentes). As plantas de *T. semitriloba* que cresciam à beira da estrada, das quais foram obtidas as estacas para cultivo em estufa, encontravam-se em final de floração em janeiro de 2000. Já as plantas que cresciam em mata floresceram de março a abril de 2000. Nas plantas cultivadas em estufa foram observados dois períodos de floração, de abril a junho de 2000 e em setembro de 2000.

## 2- Nectários florais

As flores de *Triumfetta semitriloba* (figs. 4 a 6) apresentam 5 sépalas e 5 pétalas de mesmo comprimento, em disposição alterna. Os verticilos férteis encontram-se elevados por um curto androginóforo (fig. 6), que apresenta 5 nectários ao redor de suas paredes laterais, em posição oposta às pétalas (fig. 4). Os nectários possuem aspecto de pequenos discos elípticos, convexos (figs. 4, 5) e salientes (fig. 6). Na extremidade distal do androginóforo encontra-se uma estrutura laminar denteada que forma uma coroa (figs. 4, 6), estando seu bordo apical em contato com tricomas presentes nas pétalas, delimitando, assim, uma câmara (figs. 5, 6) onde o néctar se acumula (fig. 4).

O androceu é formado por 10 a 20 estames dispostos em torno do ovário bicarpelar e bilocular a tricarpelar e trilocular, com dois óvulos por lóculo. Por toda a superfície da flor ocorrem tricomas secretores clavados e pluricelulares, formados por uma célula basal colunar, mais alongada que as células epidérmicas adjacentes, uma célula do pescoço também alongada, e por uma cabeça pluricelular, predominantemente unisseriada, podendo apresentar-se bisseriada (figs. 7, 8).

A epiderme do androginóforo é destituída de estômatos e formada por células que acumulam compostos fenólicos nas regiões entre os nectários (fig. 9). Já, nas cinco regiões correspondentes aos nectários, a epiderme é formada por tricomas secretores (figs. 10, 11). O tecido parenquimático, interno à epiderme na região entre nectários, é constituído por células vacuolizadas (fig. 9) com poucos amiloplastos em seu citoplasma. Ductos, idioblastos e cavidades mucilaginosos (figs. 12, 13) são amplamente distribuídos pela planta, como visualizados na região do receptáculo (fig. 6) e muitas vezes, encontram-se em contato com as células da bainha dos feixes vasculares (fig. 13).

O feixe vascular que irriga o nectário é proveniente daquele que se ramifica para a pétala (fig. 14).

Drusas são encontradas distribuídas por toda a flor, sendo mais numerosas no ovário, visualizadas como pontos birrefringentes sob luz polarizada (fig. 15).

O nectário floral de *T. semitriloba* é constituído por uma epiderme secretora formada por tricomas glandulares, um parênquima nectarífero e tecido vascular (fig. 16).

Os tricomas secretores são multicelulares e multisseriados (fig. 17), constituídos por uma ou duas células basais, uma célula do pescoço com as paredes anticlinais espessadas (fig. 17), que se coram pelo “sudan

black B". As células da cabeça são distribuídas irregularmente em 3 camadas (fig. 17) e cerca de 8 séries mal delimitadas (fig. 18), conferindo um formato clavado ao tricoma.

O parênquima nectarífero é constituído por células pequenas, de parede fina e núcleo relativamente grande, dispostas em 5 a 8 camadas, compactamente arranjadas subjacentes à epiderme (fig. 16). Terminações vasculares, oriundas de feixes de maior porte, confluem para o parênquima nectarífero, onde se ramificam profusamente (fig. 16), podendo alcançar a camada subepidérmica. Os feixes são constituídos por xilema e floema, em quantidade semelhante (fig. 16), sendo, em parte, delimitados por uma bainha de células relativamente grandes, que podem conter compostos fenólicos.

## **2.1- Ontogenia**

O desenvolvimento dos nectários florais de *T. semitriloba* inicia-se em botões com menos de 2mm de comprimento, na forma de cinco regiões em torno do androginóforo, que se encontra pouco expandido (fig. 19). Neste estágio, as células do nectário são de difícil distinção, dentre as demais células do androginóforo, destacando-se apenas pela afinidade um pouco maior ao azul de toluidina e à hematoxilina. As células protodérmicas são cúbicas e sofrem divisões anticlinais, ao passo que as células procambiais e do meristema fundamental são poliédricas e se dividem em vários planos (fig. 20).

As células procambiais do nectário formam um cordão pouco diferenciado, interligando o nectário ao cordão procambial das sépalas e das pétalas, que se encontram em estágio mais avançado de desenvolvimento (fig. 19). No meristema fundamental adjacente ao

nectário ocorrem numerosos grânulos positivos à reação de P.A.S., estando estes ausentes nos tecidos do nectário (fig. 21).

Nos botões de 3mm a 5mm de comprimento, parte das células protodérmicas cessam as divisões anticlinais e se avolumam, alongando-se no sentido radial, assumindo um formato colunar (fig. 22). Posteriormente, as células protodérmicas sofrem uma divisão periclinal (fig. 23), originando uma célula apical e uma basal (fig. 24). A apical se divide periclinamente (fig. 24) originando duas células (fig. 24), das quais uma sofre uma divisão periclinal. Uma destas três células filhas sofre mais uma divisão periclinal (fig. 25) originando uma estrutura unisseriada com 5 células (fig. 25). A célula basal pode ou não sofrer uma divisão anticlinal (fig. 26). As 3 células apicais sofrem divisões consecutivas nos sentidos anticlinal e oblíquo (fig. 27), constituindo a cabeça multisseriada.

O desenvolvimento dos tricomas é assincrônico, visto que aqueles mais distais encontram-se em estágio de desenvolvimento um pouco mais avançado em relação aos proximais, em um mesmo nectário (fig. 28).

O meristema fundamental subjacente permanece em constante divisão celular (fig. 26). Estas células, distribuídas em cerca de 4 camadas, são distintas das células parenquimáticas do androginóforo, pelo seu pequeno volume relativo, citoplasma denso, e vacúolos inconspícuos (figs. 26, 28). As células procambiais do nectário encontram-se em formato alongado, sendo facilmente distinguidas das células do meristema fundamental (fig. 28).

Foram observados grânulos positivos à reação de P.A.S. nas células da cabeça dos tricomas. Estes grânulos permanecem presentes

nas células do meristema fundamental do nectário e do parênquima circundante. (fig. 29).

Quando o botão floral encontra-se com 6mm de comprimento, os tricomas nectaríferos passam a assumir um formato clavado, em função das divisões consecutivas das células apicais em diversos planos. A cabeça do tricoma torna-se pluricelular e multisseriada (fig. 30), onde as células são arranjadas em camadas e séries mal delimitadas, a célula do pescoço é relativamente mais vacuolizada, e ocorrem uma ou duas células basais (fig. 30). As células do parênquima nectarífero permanecem se dividindo em sentidos variados (figs. 30, 31), estando distribuídas em quatro a seis camadas. Alguns elementos traqueais apresentam-se com reforços espiralados na parede (fig. 31), e células de floema e xilema são vistas em contato com a camada de células parenquimáticas subjacentes a epiderme secretora. Algumas células da bainha do feixe destacam-se pelo acúmulo de compostos fenólicos e pelo seu grande volume relativo (fig. 31). A base da pétala começa a se afastar do androginóforo, formando um espaço, onde o néctar secretado irá se acumular nos estádios posteriores.

Quando o botão floral atinge cerca de 8mm de comprimento, a epiderme do nectário é constituída por tricomas cujas células da cabeça apresentam citoplasma denso, fortemente corado (fig. 32). O núcleo de todas as células do tricoma é esférico e relativamente grande. A célula do pescoço cora-se fracamente, com o núcleo deslocado e vacúolo volumoso. A(s) célula(s) basal(ais) apresentam um formato achatado no sentido tangencial ao órgão, com o citoplasma bem corado (fig. 32). Não foram mais visualizadas divisões nas células dos tricomas.

As células do parênquima nectarífero, neste estádio, raramente se dividem e encontram-se compactamente arranjadas em cinco a oito

camadas pouco definidas; são mais expandidas, caracterizadas por citoplasma denso e núcleo relativamente grande (fig. 32).

O feixe que vasculariza o nectário encontra-se, totalmente desenvolvido (fig. 32), e as células da bainha deste feixe apresentam maior acúmulo de compostos fenólicos, se comparado com os estádios anteriores de desenvolvimento.

Durante a pré-antese (fig. 33), quando os botões atingem cerca de 9mm de comprimento, o espaço formado entre as pétalas e o androginóforo fica preenchido por secreção (fig. 4), constituindo uma câmara nectarífera (fig. 6).

O teste empregado para a verificação de proteínas totais evidenciou a presença deste componente químico no citoplasma e núcleo de todos os tipos celulares indistintamente (fig. 34) e a reação foi negativa apenas para parede celular e conteúdo vacuolar (fig. 34).

Os tricomas glandulares não mostraram diferenças morfológicas significativas em relação ao observado nas flores de 8mm. O parênquima nectarífero foi o tecido que mais apresentou mudanças em relação ao estágio anterior, pois se nota que as células são menos coradas e alguns vacúolos são evidentes pelo conteúdo incolor (fig. 33).

Não foram notadas mudanças na superfície da cabeça do tricoma. Nas células basais e do pescoço foram evidenciados pequenos grânulos que reagiram positivamente aos testes para detecção de compostos fenólicos e lipídicos (figs. 35, 36), resultados confirmados pelos controles aplicados (figs. 37, 38). As células da cabeça apresentam grânulos corados pelo P.A.S., no entanto, não foram encontrados estes grânulos no parênquima nectarífero (fig. 39).

Nas flores coletadas um dia após a antese (flores senescentes), os tricomas nectaríferos apresentam a célula do pescoço e a(s) célula(s)

basal(ais) mais vacuolizadas. As células do parênquima secretor apresentam vacúolo grande, citoplasma denso e retraído (fig. 40). Todo o nectário corou-se predominantemente de verde com o azul de toluidina, em contraste com a coloração predominantemente arroxeadada, nos estádios anteriores. Já, os grânulos que apareciam corados pelo P.A.S. nos estádios anteriores, não são mais evidentes.

As modificações estruturais durante o desenvolvimento ontogenético do nectário floral de *T. semitriloba* encontram-se resumidas no quadro 3.

Quadro 3. Resumo das modificações estruturais ocorridas durante o desenvolvimento dos nectários florais de *Triumfetta semitriloba*.

<b>Comprimento do botão</b>	<b>Tecido de revestimento</b>	<b>Tecidos internos</b>
1,7 – 2,5mm	Células cúbicas em divisões anticlinais.	Células isodiamétricas dividindo-se em diversos planos.
3,0 – 5,0mm	Cessam as divisões anticlinais. As células aumentam de volume assumindo aspecto colunar, e sofrem 4 divisões periclinais, originando uma estrutura unisseriada com 5 células. A célula basal pode sofrer 1 divisão anticlinal. Iniciam-se as divisões anticlinais e oblíquas nas 3 células apicais.	Células em constante divisão, em sentidos diversos. Aumento de volume das células do meristema fundamental. As células procambiais assumem um formato alongado. Ocorrência de grânulos positivos ao P.A.S. no meristema fundamental do nectário.
6,0mm	Permanecem as divisões mitóticas em diversos planos nas células da cabeça, acarretando o formato clavado do tricoma. Formação da câmara onde o néctar irá se acumular.	Inicia-se a deposição de parede secundária nos elementos traqueais na região do nectário. Ocorrência de divisões nas células do meristema fundamental.
8,0mm	Cessam as divisões nas células da cabeça. Célula do pescoço com menos afinidade pelo corante, com grande vacuolização.	Rara ocorrência de divisões nas células do parênquima nectarífero. Tecidos vasculares aparentemente formados.
Pré-antese (9,0mm)	Não foram vistas mudanças na superfície das células da cabeça dos tricomas. Permanece a ocorrência de grânulos positivos ao P.A.S.. Secreção do néctar é evidente.	Não foram encontradas células em divisão. Grande aumento da vacuolização das células do parênquima nectarífero e do parênquima vascular. Não foram encontrados grânulos positivos ao P.A.S.
1 dia após a antese	Aumento da vacuolização das células basal e do pescoço. Não foram mais encontrados grânulos positivos ao P.A.S.	Células do parênquima secretor e vascular com grande vacúolo. Células do parênquima nectarífero com citoplasma retraído.

### **3- Nectários extraflorais:**

Os nectários extraflorais estão presentes na base da lâmina das folhas – nectário foliar - (fig. 41) e das brácteas – nectário bracteal - (fig. 42). São constituídos por uma epiderme formada por tricomas secretores clavados (fig. 43). A epiderme secretora encontra-se numa depressão e o nectário é delimitado por epiderme não secretora com pêlos tectores. Esta organização confere ao nectário o formato côncavo, com a abertura voltada para a face adaxial da folha (fig. 44) e da bráctea (fig. 45), e a borda com altura variada (figs. 43, 46). O néctar é acumulado nesta depressão formando uma gota viscosa (figs. 41, 42).

#### **3.1- Nectários foliares**

No nectário em atividade de secreção, os tricomas secretores são constituídos por uma a três células basais, uma ou duas células do pescoço (neste último caso, o pescoço geralmente é bisseriado) e pelas células da cabeça distribuídas em 3 a 4 camadas mal definidas (figs. 47, 48). As células da cabeça apresentam citoplasma denso, núcleo esférico grande e central parcialmente envolvido, em sua face voltada para a periferia do tricoma, por uma massa (fig. 48) que se cora de verde pelo azul de toluidina. A célula do pescoço tem o citoplasma relativamente menos corado, núcleo esférico e central e também envolvido parcialmente por uma massa corada (fig. 48) de verde pelo azul de toluidina. As paredes anticlinais da célula do pescoço são mais espessas e apresentam menor afinidade ao corante em relação às demais paredes das células do tricoma (fig. 48). A célula basal tem citoplasma denso,

núcleo grande e central e pequenos vacúolos periféricos (figs. 47, 48). Ocorrem, no citoplasma, grânulos esféricos relativamente grandes, ou uma grande massa, ambos corados de verde pelo azul de toluidina (figs. 47, 48). O teste para detecção de proteína demonstrou a presença deste componente no citoplasma e núcleo de todas as células do tricoma indistintamente, sendo negativo para conteúdo vacuolar e parede celular (fig. 49). Pequenos grânulos, positivos ao teste P.A.S., ocorrem nas células basais (fig. 50).

O parênquima nectarífero é constituído por 2 a 4 camadas de células justapostas, isodiamétricas, com citoplasma densamente corado, núcleo grande e central, com vacúolos conspícuos de conteúdo incolor (fig. 47, 48) que não reagiram aos testes histoquímicos aplicados (figs. 49, 50). Os conteúdos celulares e nucleares destas células foram corados pelo teste para detecção de proteínas (fig. 49). Quanto ao P.A.S., observam-se pequenos grânulos corados no parênquima nectarífero, enquanto que no parênquima clorofiliano circundante, estes grânulos são maiores e mais numerosos (fig. 50).

Feixes vasculares, oriundos de nervuras de pequeno porte, chegam até a margem foliar onde se localiza o nectário, e se ramificam e anastomosam profusamente (figs. 50, 51). A bainha que delimita parcialmente esses feixes é caracterizada por células de núcleo grande, com grânulos citoplasmáticos deslocados para a periferia pela presença de vacúolos centrais, cujo conteúdo é incolor (figs. 48, 50).

Terminações vasculares constituídas por floema e xilema (fig. 48) em aproximadamente igual proporção (fig. 51) partem da face adaxial dos feixes vasculares em direção à epiderme secretora (fig. 48), podendo alcançar a camada superior de células do parênquima nectarífero (figs.

47, 48). Ocorrem idioblastos mucilaginosos na epiderme adaxial e abaxial próximas ao nectário (fig. 51).

Quando o nectário se encontra em senescência, os tricomas secretores apresentam morfologia alterada (fig. 52). Suas células se caracterizam pela desorganização do citoplasma (fig. 53), que anteriormente se corava de lilás pelo azul de toluidina, passando a apresentar coloração esverdeada. Nas células basais, são evidenciados grânulos na periferia, os quais se coram de verde pelo azul de toluidina, tratando-se, possivelmente, de compostos fenólicos (fig. 53). A parede periclinal externa da célula basal é espessada por material de aspecto lamelado (fig. 53) e aquelas das células da cabeça e do pescoço do tricoma se retraem (fig. 54). Foi observada degeneração do núcleo das células basais e do pescoço (figs. 53, 54, 55). A epiderme secretora torna-se totalmente recoberta por hifas (figs. 56, 57), que podem penetrar nos tricomas secretores (fig. 53).

As células do parênquima nectarífero também assumem coloração esverdeada pelo azul de toluidina, apresentam um vacúolo maior e paredes enrugadas. No citoplasma são evidenciados grânulos positivos ao P.A.S., que aparentemente são mais claros e maiores (fig. 55) que aqueles do estágio secretor (fig. 50).

As células da bainha de feixe que continham a massa central de compostos fenólicos passam a apresentá-la na periferia do grande vacúolo central de conteúdo incolor (fig. 54). As células do parênquima clorofiliano que anteriormente apresentam cloroplastos corados intensamente pelo P.A.S. (fig. 50) passam a apresentá-los com pequenos grânulos fracamente corados pelo P.A.S. (fig. 55).

### 3.2- Nectários bracteais

Os nectários da bráctea (fig. 58) são semelhantes aos nectários da folha. Os tricomas secretores são mais longos, com 4 ou 5 camadas mal definidas de células na cabeça (fig. 59) em um número bem maior de séries (fig. 59, 60) e uma ou duas células do pescoço, com paredes anticlinais espessadas (fig. 61). As células basais, uma a três, apresentam pequenos grânulos corados fracamente pelo P.A.S. (fig. 62).

O parênquima nectarífero também é formado por 2 a 4 camadas de células isodiamétricas que contém pequenos grânulos corados pelo P.A.S. (fig. 62).

Os feixes vasculares, que ocupam a maior parte dos tecidos internos do nectário, são maiores que os encontrados nos nectários foliares (fig. 58) e são representados, aparentemente, por mais floema que xilema (fig. 62). Os feixes são parcialmente revestidos, principalmente em sua face abaxial, por bainha de células grandes contendo uma massa escura que se cora de verde pelo azul de toluidina, entremeada por porções hialinas, tratando-se, aparentemente, de compostos fenólicos (fig. 62). Da face adaxial do feixe, partem terminações vasculares de xilema e floema que podem alcançar a camada de células do parênquima nectarífero em íntimo contato com a epiderme secretora (fig. 59, 62). Ocorrem idioblastos mucilaginosos na epiderme próxima ao nectário. (figs. 58, 62).

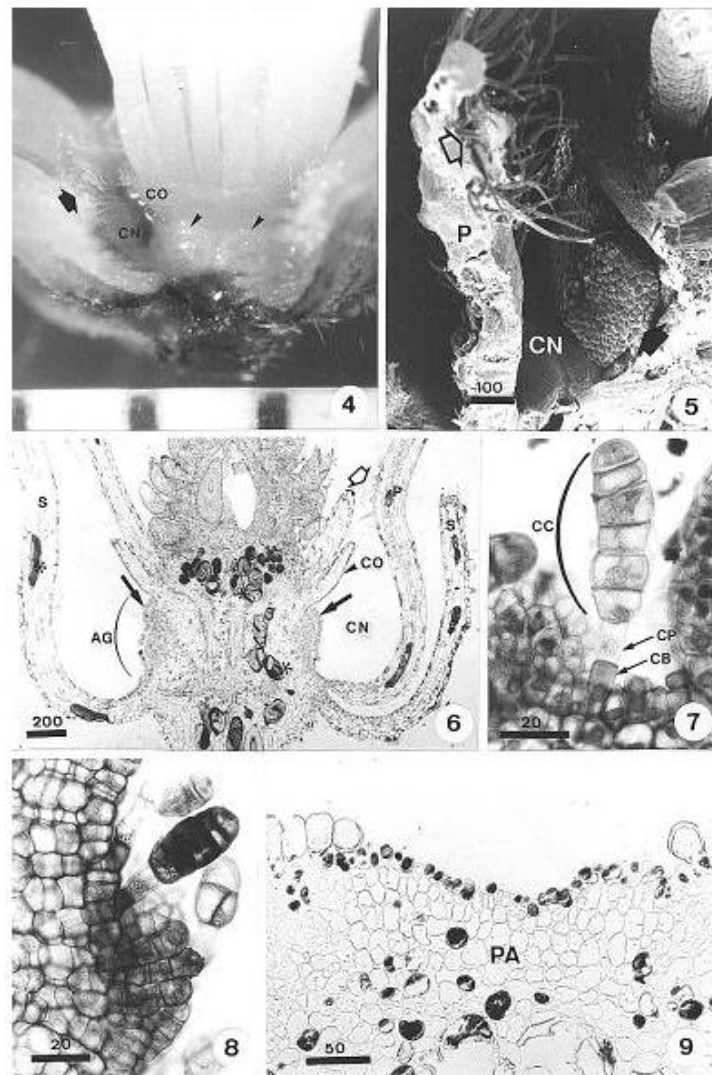
Todos os tipos celulares reagiram fortemente ao teste de detecção de proteínas totais, já as paredes e o conteúdo do vacúolo das células apresentaram resultado negativo (fig. 63).

#### **4- Análise de aminoácidos livres no néctar**

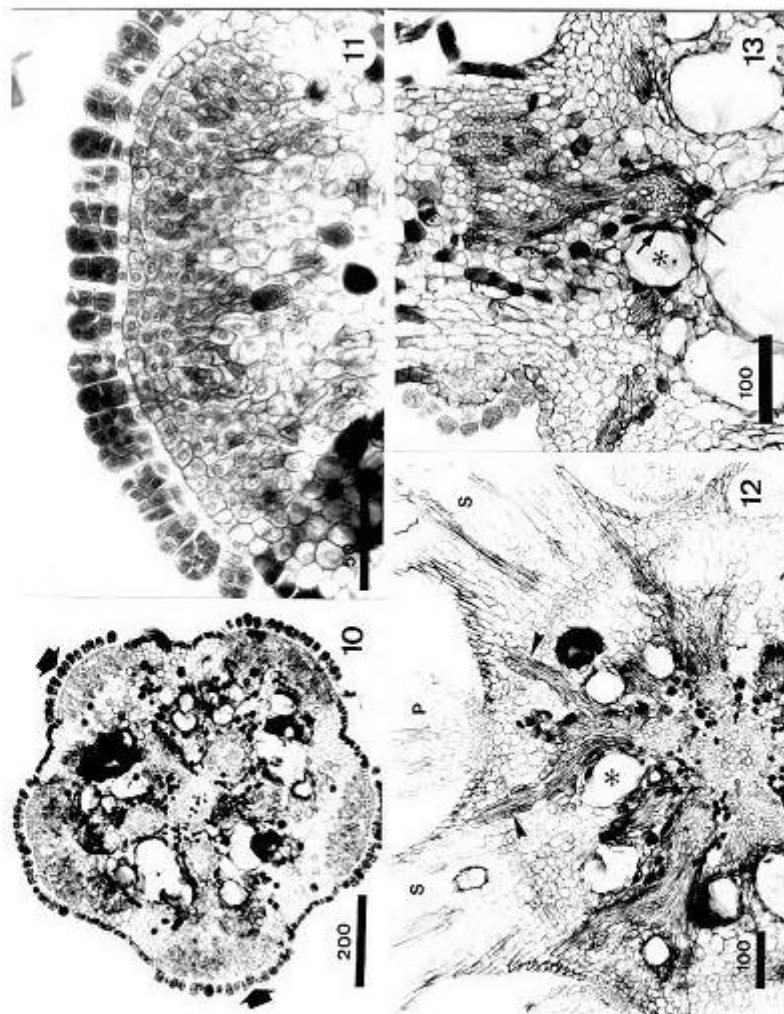
Não foi encontrada secreção sobre os nectários extraflorais de *T. semitriloba* que cresciam na mata. No período da manhã podia-se encontrar grandes gotas de néctar sobre os nectários extraflorais de plantas que cresciam em casa de vegetação.

As amostras de néctar floral, foliar e bracteal reagiram positivamente à ninhidrina, onde a reação foi mais intensa no néctar bracteal, indicando a presença de aminoácidos nos três néctares.

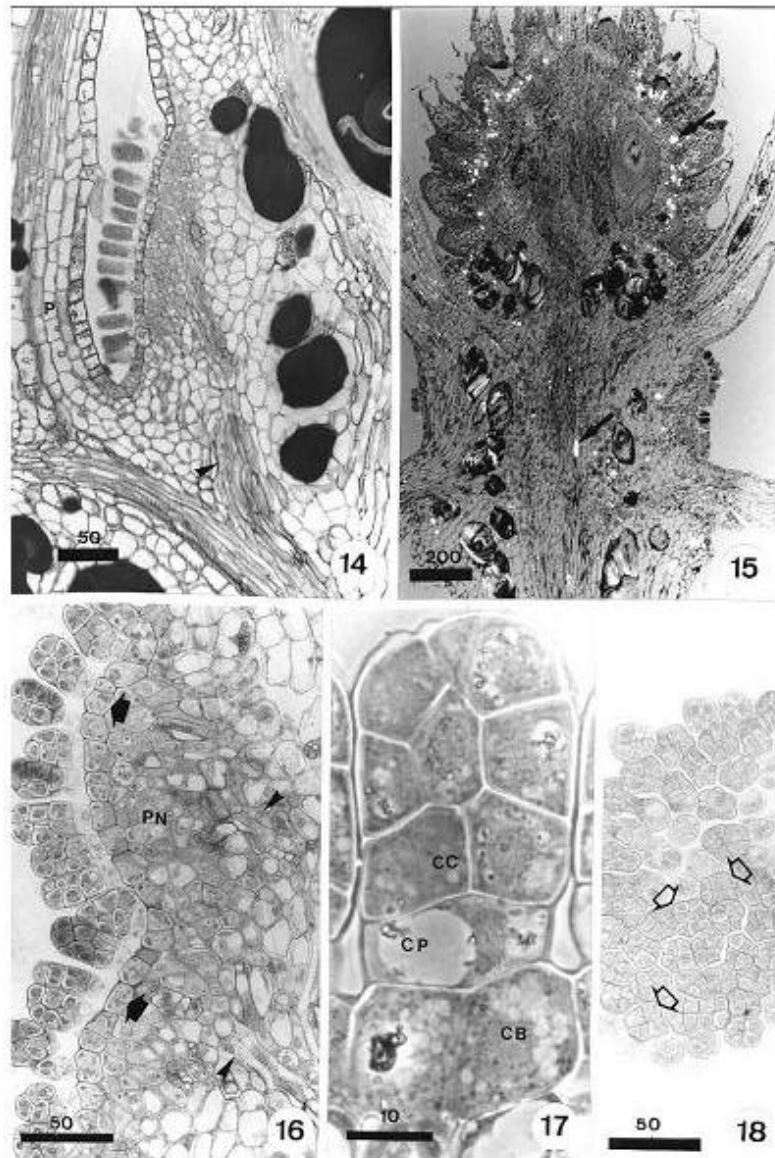
Na eletroforese em papel, realizada para análise qualitativa de aminoácidos livres nas três amostras de néctar, obteve-se o resultado exposto figura 64. Foram detectados aminoácidos apenas na amostra de néctar bracteal. Esta percorreu 2cm em direção ao pólo negativo, enquanto as amostras padrões dos aminoácidos aspartato e triptofano percorreram, respectivamente, 2cm e 1,9cm em direção ao pólo negativo, sendo estes valores os mais próximos ao do néctar bracteal.



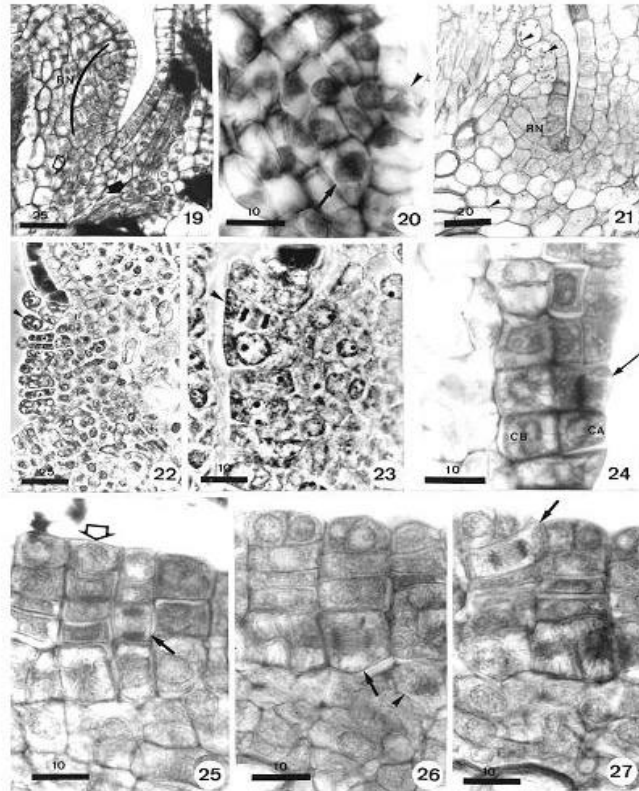
Figuras 4-9. Flor de *T. semitriloba*. Fig. 4. Flor com uma sépala e uma pétala removidas. Cabeças de seta: nectários florais; seta longa: tufo de tricomas tectores; CO: coroa; CN: câmara de néctar com secreção. Fig. 5. Detalhe de parte do androginóforo, ao M.E.V.. Seta preenchida: nectário; seta vazia: tufo de tricomas tectores; CN: câmara de néctar; P: Pétala. Fig. 6. Corte longitudinal da flor em pré-antese. Setas preenchidas: nectários; seta vazia: tufo de tricomas tectores; AG: androginóforo; CN: câmara de néctar; CO: coroa; P: pétala; S: sépala. Fig. 7. Detalhe de tricoma secretor presente na superfície do ovário. CB: célula basal; CC: células da cabeça; CP: célula do pescoço. Fig. 8. Tricomas secretores presentes na superfície do ovário. Fig. 9. Corte transversal do androginóforo, na região entre 2 nectários, submetido ao teste para detecção de compostos fenólicos. As células coradas indicam resultado positivo. PA: parênquima. Escalas em milímetros (Fig. 4) e micrômetros.



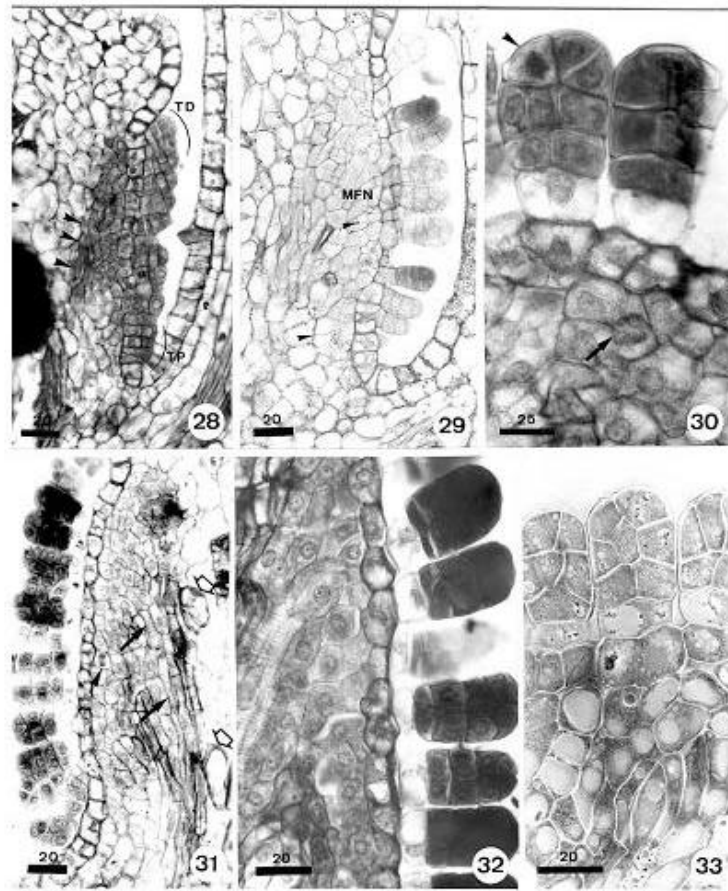
Figuras 10-13. Flor de *T. semitriloba*. Fig. 10. Corte transversal do androgínóforo. Setas: nectários. Fig. 11. Detalhe de 1 nectário com tricomas secretores. Fig. 12. Corte transversal do receptáculo, na altura da inserção do perianto. Asterisco: cavidade mucilaginosa; cabeça de setas: a origem dos feixes que irrigarão parte de 2 sépalas; P: pétala; S: sépala. Fig. 13. Corte longitudinal tangencial do receptáculo. Asterisco: cavidade mucilaginosa; setas: células da bainha do feixe; VN: vascularização de um nectário. Escalas em micrômetros.



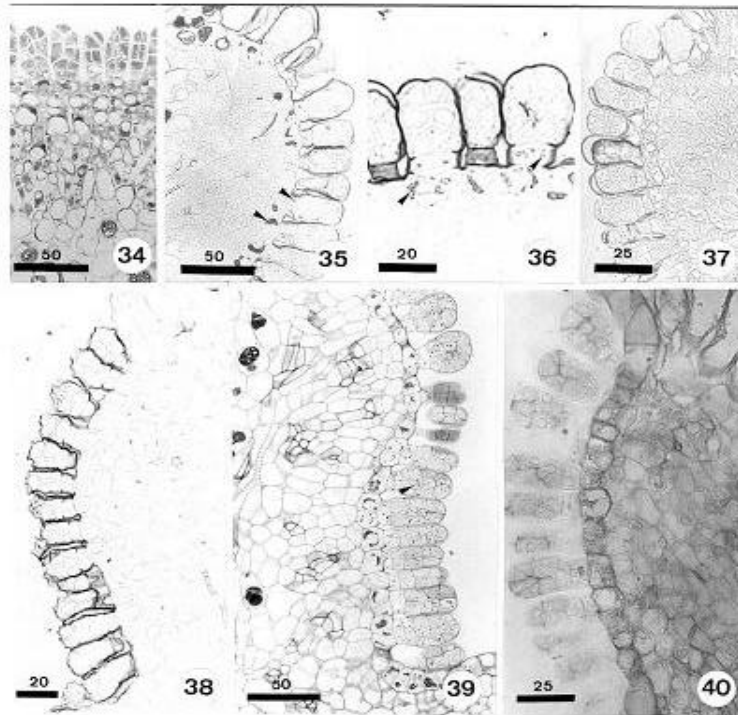
Figuras 14-18. Flor de *T. semitriloba*. Fig. 14. Nectário em botão com 5mm de comprimento cortado longitudinalmente. Cabeça de seta: origem da vascularização do nectário; P: pétala. Fig. 15. Corte longitudinal da flor em pré-antese, sob luz polarizada. Setas: drusas. Fig. 16. Detalhe de um nectário. Cabeça de seta: vascularização; setas largas: epiderme secretora; PN: parênquima nectarífero. Fig. 17. Detalhe de um tricoma nectarífero sob contraste de fase. CB: células basais; CC: células da cabeça; CP: célula do pescoço. Fig. 18. Corte transversal de tricomas de um nectário floral. Setas: tricomas cortados na altura da cabeça. Escalas em micrômetros.



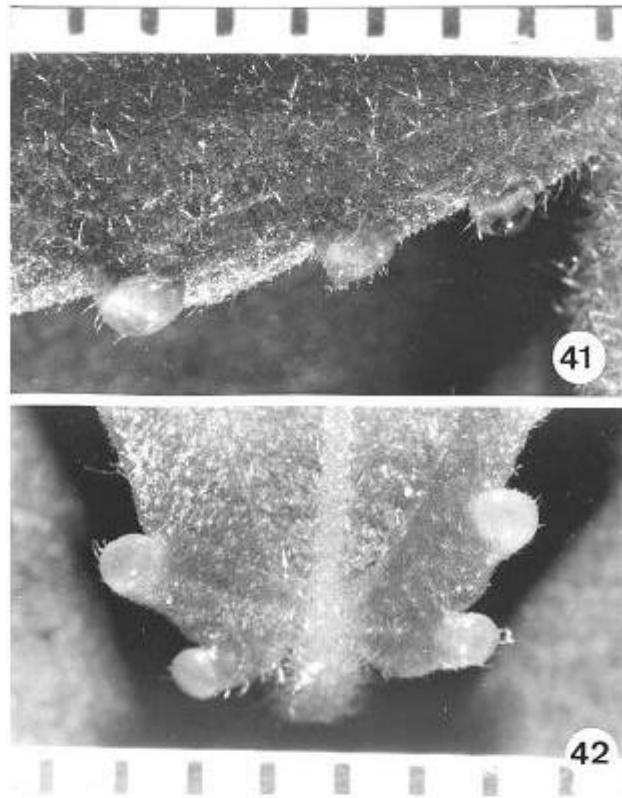
Figuras 19-27. Nectários florais de *T. semitriloba* em botões em diferentes estádios de desenvolvimento, cortados longitudinalmente. Fig. 19. Botão floral com cerca de 1,7mm de comprimento. Seta vazia: cordão de células procambiais do nectário; Seta preenchida: cordão procambial da pétala; RN: região de um nectário. Fig. 20. Detalhe das células iniciais de um nectário em botão com 1,7mm de comprimento. Cabeça de seta: célula procambial em divisão anticlinal; seta: célula do meristema fundamental em divisão. Fig. 21. Detalhe de iniciais de um nectário em botão com 2,5mm de comprimento, submetido ao P.A.S.. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste; RN: região de um nectário. Fig. 22. Nectário em botão com 2,5mm de comprimento, em contraste de fase. Cabeça de seta: célula procambial alongada. Fig. 23. Nectário em botão com 3,5mm de comprimento. Cabeça de seta: célula protodérmica em divisão periclinal. Fig. 24. Nectário em botão com 4mm de comprimento. Seta: célula apical em divisão periclinal; CA: célula apical; CB: célula basal. Fig. 25. Detalhe de nectário em botão com 4mm de comprimento. Seta vazia: tricoma com 5 células; Seta preenchida: célula em divisão periclinal. Fig. 26. Detalhe de um nectário em botão com 4mm de comprimento. Seta: célula basal em divisão anticlinal; cabeça de seta: célula do meristema fundamental em divisão oblíqua. Fig. 27. Detalhe de um nectário em botão com 4mm de comprimento. Seta: célula da cabeça de um tricoma em divisão oblíqua. Escalas em micrômetros.



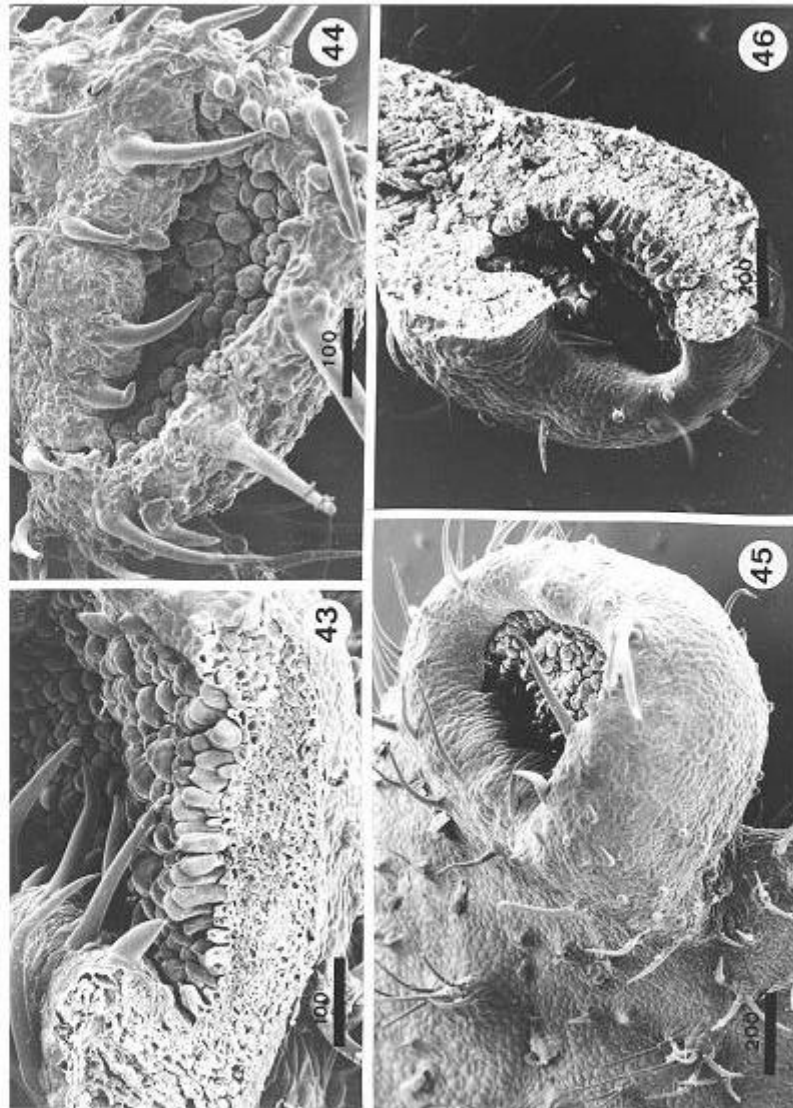
Figuras 28-33. Nectários florais de *T. semitriloba* em botões em diferentes estádios de desenvolvimento, cortados longitudinalmente. Fig. 28. Nectário em botão com 4mm de comprimento. Cabeça de seta: células procambiais; TD: tricomas distais; TP: tricomas proximais. Fig. 29. Nectário em botão com 5mm de comprimento, submetido ao P.A.S. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste; MFN: meristema fundamental do nectário. Fig. 30. Detalhe de nectário em botão com 6mm de comprimento. Cabeça de seta: célula da cabeça do tricoma em divisão oblíqua; seta: célula do parênquima nectarífero em divisão. Fig. 31. Nectário em botão com 6mm de comprimento. Cabeça de seta: célula do parênquima nectarífero em divisão; seta preenchida: elementos traqueais com reforços de parede espiralados; seta vazia: células da bainha do feixe com acúmulo de compostos fenólicos. Fig. 32. Nectário em botão com 8mm de comprimento. Fig. 33. Nectário em flor em pré-antese, sob contraste de fase. Escalas em micrômetros.



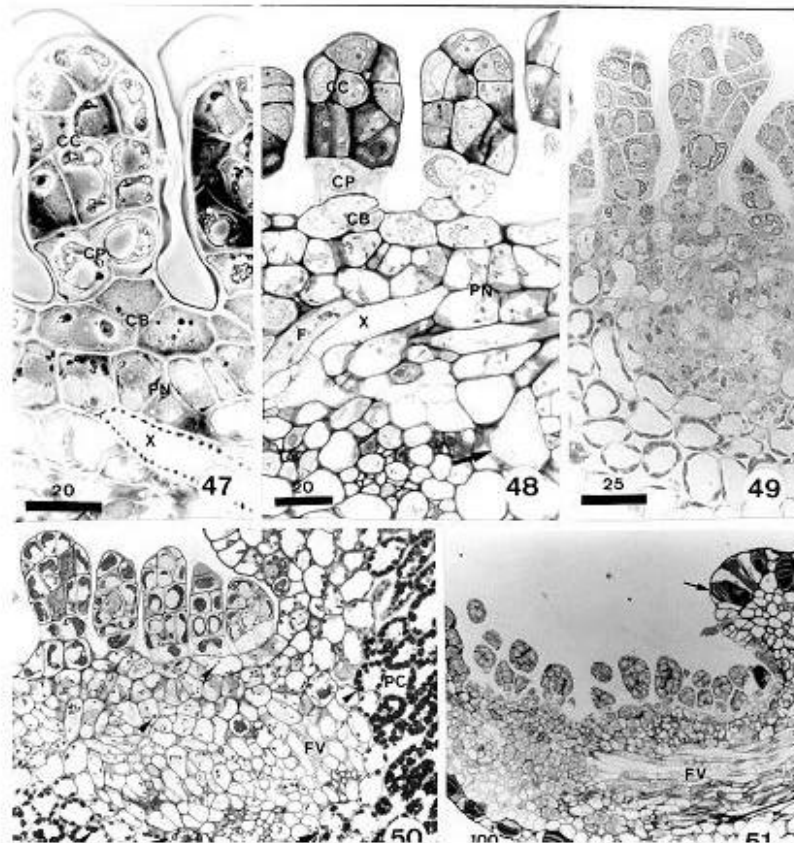
Figuras 34-40. Cortes histológicos do nectário floral de *T. semitriloba*, submetidos à diferentes testes histoquímicos. Fig. 34. Nectário em flor em pré-antese submetido ao teste de detecção de proteínas totais. Fig. 35. Nectário em flor em pré-antese submetido ao teste para detecção de compostos fenólicos. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste. Fig. 36. Nectário em flor em pré-antese submetido ao teste para detecção de compostos lipídicos. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste. Fig. 37. Nectário em flor em pré-antese, controle do teste para detecção de compostos fenólicos. Fig. 38. Nectário em flor em pré-antese, controle do teste para detecção de compostos lipídicos. Fig. 39. Nectário em flor em pré-antese, submetido ao teste de P.A.S. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste. Fig. 40. Nectário floral senescente. Escalas em micrômetros.



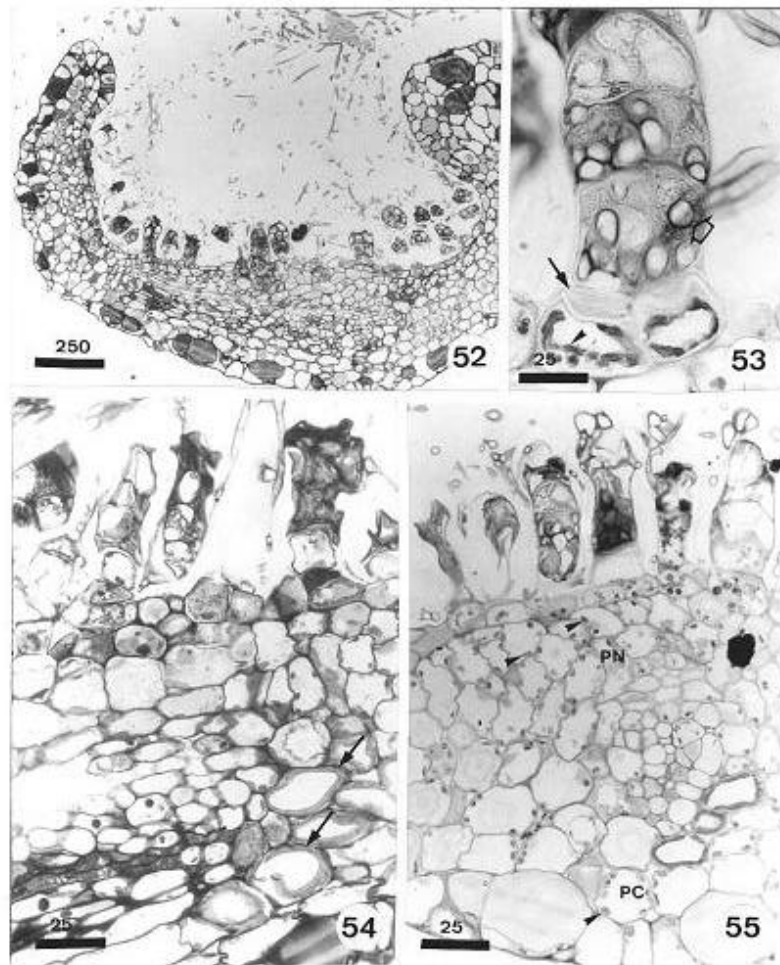
Figuras 41-42. Nectários extraflorais de *T. semitriloba* ao estereoscópio. Fig. 41. Parte da base da lâmina foliar com três nectários com secreção. Fig. 42. Base da lâmina bracteal com quatro nectários com secreção. Escalas em milímetros.



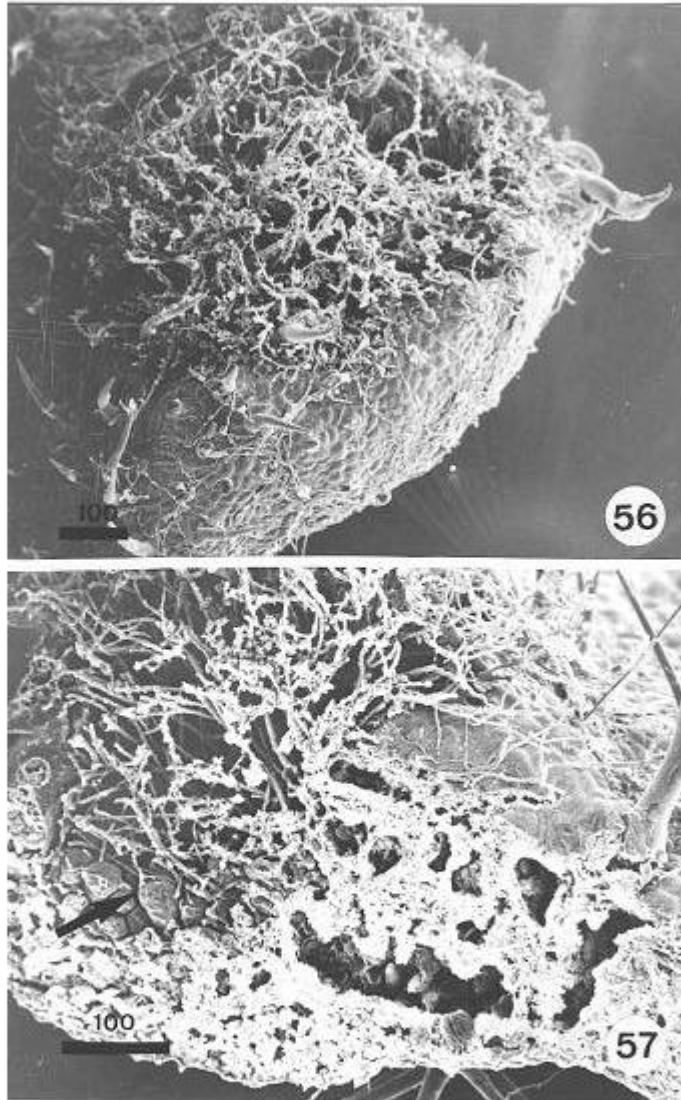
Figuras 43-46. Nectários extraflorais de *T. semitriloba* ao M.E.V.. Fig. 43. Corte de nectário foliar em atividade de secreção. Fig. 44. Nectário foliar em atividade de secreção. Fig. 45. Nectário bracteal em atividade de secreção. Fig. 46. Corte de nectário bracteal em atividade de secreção. Escalas em micrômetros.



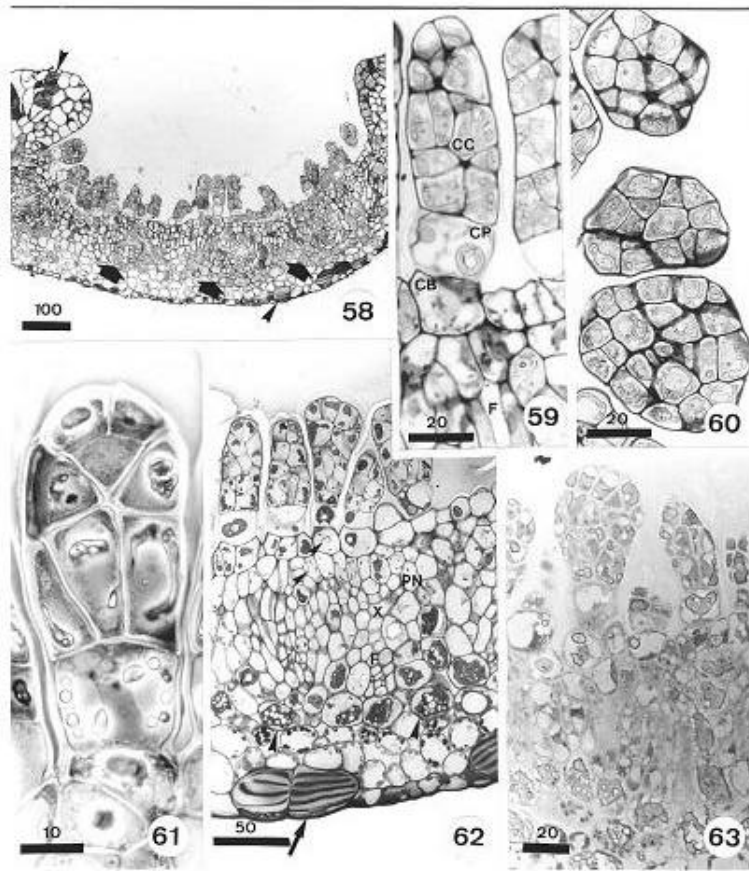
Figuras 47-51. Cortes histológicos do nectário foliar de *T. semitriloba*, em atividade de secreção. Fig. 47. Detalhe de nectário sob contraste de fase. CB: células basais; CC: células da cabeça; CP: células do pescoço; PN: parênquima nectarífero; X: terminação vascular de xilema. Fig. 48. Detalhe de nectário. CB: células basais; CC: células da cabeça; CP: célula do pescoço; F: terminação vascular de floema. PN: parênquima nectarífero; X: terminação vascular de xilema. Fig. 49. Nectário submetido ao teste para detecção de proteínas totais. Fig. 50. Nectário submetido ao P.A.S.. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste; seta: células da bainha do feixe com conteúdo amorfo; FV: feixe vascular; PC: parênquima clorofiliano. Fig. 51. Aspecto geral do nectário. Setas: idioblastos epidérmicos mucilaginosos; FV: feixe vascular. Escalas em micrômetros.



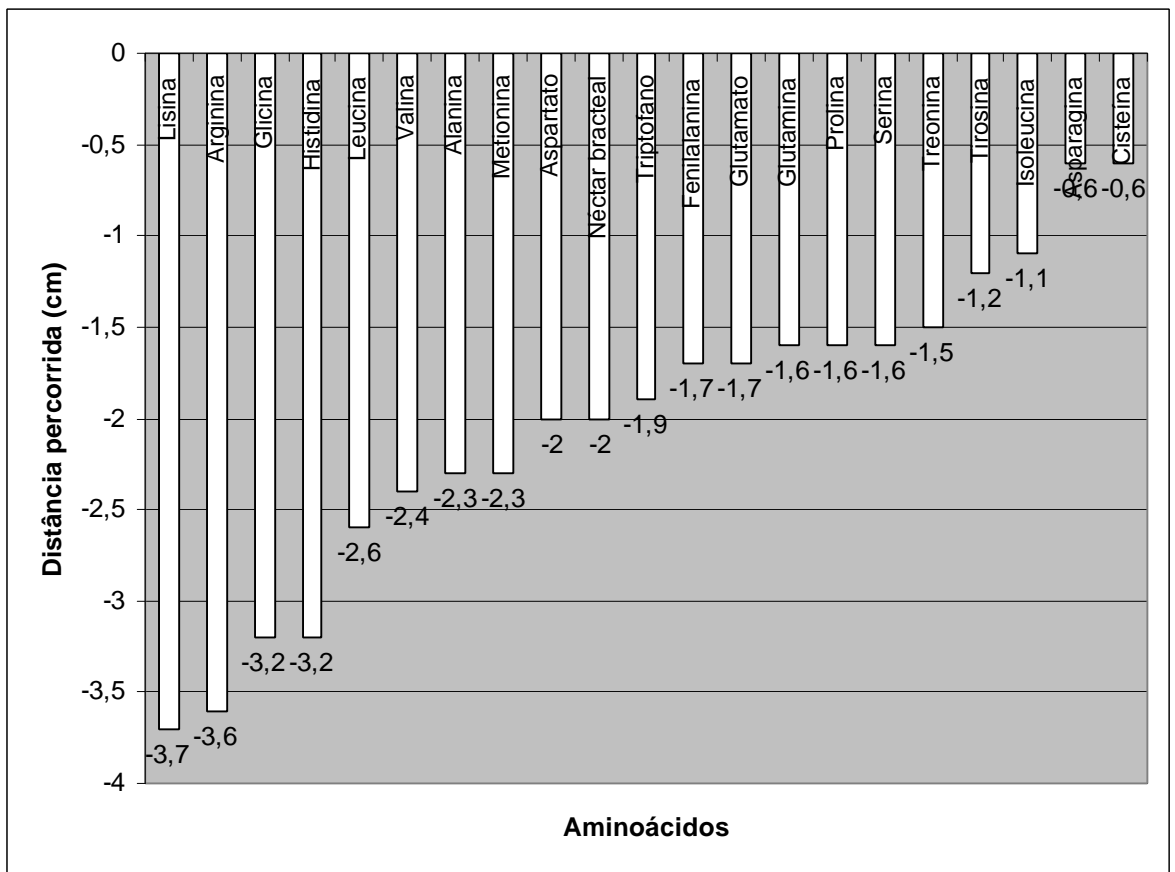
Figuras 52-55. Cortes histológicos do nectário foliar de *T. semitriloba*, em senescência. Fig. 52. Aspecto geral do nectário. Fig. 53. Detalhe de tricoma nectarífero senescente. Cabeça de seta: grânulos de compostos fenólicos; seta preenchida: espessamento na parede periclinal externa de uma célula basal. seta vazia: hifas penetrando no tricoma. Fig. 54. Detalhe do nectário. Setas: células da bainha do feixe com acúmulo de compostos fenólicos. Fig. 55. Nectário submetido ao teste P.A.S. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste; PC: parênquima clorofiliano; PN: parênquima nectarífero. Escalas em micrômetros.



Figuras 56-57. Nectário foliar de *T. semitriloba* senescente, ao M.E.V.. Fig. 56. Aspecto geral do nectário. Fig. 57. Corte do nectário. Escalas em micrômetros.



Figuras 58-63. Cortes histológicos do nectário bracteal de *T. semitriloba*. Fig. 58. Aspecto geral do nectário. Cabeça de seta: idioblastos mucilaginosos; seta: feixes vasculares. Fig. 59. Detalhe do nectário. CB: célula basal; CC: células da cabeça; CP: célula do pescoço; F: terminação vascular de floema. Fig. 60. Corte transversal de cabeças de tricomas do nectário. Fig. 61. Detalhe de um tricoma do nectário. Fig. 62. Nectário bracteal submetido ao teste P.A.S.. Cabeça de seta: grânulos positivos ao teste; seta: idioblasto mucilaginoso epidérmico; F: floema; PN: parênquima nectarífero; X: xilema. Fig. 63. Nectário submetido ao teste de detecção de proteínas totais. Escalas em micrômetros.



## Discussão e conclusões

Nectários, como os de *Triumfetta semitriloba*, formados por uma epiderme secretora constituída por tricomas, com um parênquima subjacente modificado, vascularizado ou não, são comuns na ordem Malvales (Cronquist, 1981, 1988), ocorrendo nos gêneros *Ayenia* (Cristobal & Arbo, 1971), *Byttneria* (Arbo, 1972), *Gossypium* (Wergin *et al.*, 1975), *Abutilon* (Fahn, 1979a) e *Hibiscus* (Sawidis *et al.*, 1987; Sawidis, 1991). Na ordem Malvales também podem ocorrer nectários formados por um parênquima onde o néctar é secretado em espaços intercelulares, sendo a secreção eliminada por estômatos, como no caso dos nectários florais relatados nos gêneros *Herrantia* e *Theobroma* (Young *et al.*, 1984).

No presente trabalho optou-se denominar, quanto a posição, como “florais” os nectários presentes em qualquer parte da flor, e “extraflorais” os nectários em qualquer parte não floral, independentemente de sua participação na polinização. Os extraflorais foram subdivididos em dois subgrupos: “foliares”, nectários localizados na folha, e “bracteais” aqueles localizados na bráctea. Acreditamos que a classificação aqui adotada seja literalmente mais precisa, pois se refere à localização por termos claros de posição (floral, foliar e bracteal). Como os nectários florais de *T. semitriloba* são diretamente envolvidos em estratégias de polinização (Collevatti *et al.*, 1997; 1998), pode-se classificá-los quanto à função, como nupciais, segundo a proposta de classificação de Delpino (1848-1874 *apud* Schmid, 1988).

Em *Byttneria* (Sterculiaceae), os nectários extraflorais mais avançados são formados por uma epiderme secretora constituída por

tricomas secretores, delimitada por uma borda epidérmica especializada. Os tricomas secretores destes nectários são especializados, diferindo-se estruturalmente dos tricomas secretores capitados presentes na superfície da planta. Já os nectários mais primitivos de *Byttneria* são multiaperturados, onde os tricomas secretores se encontram em pequenas lojas delimitadas por epiderme pluriestratificada (nectários multiaperturados). Estes tricomas são menos especializados, se assemelhando aos tricomas capitados distribuídos por toda a planta (Arbo, 1972). Em *Mucuna pruriens* (Papilionideae) ocorrem, nas estipelas, nectários menos especializados que os observados em *Erythrina* (Papilionideae), por apresentar os pêlos secretores espalhados pela superfície da estípula. Em contrapartida, no gênero *Erythrina*, os nectários que ocorrem nas estipelas são mais especializados, onde os tricomas secretores encontram-se alojados em criptas mais profundas (Lersten & Brubaker, 1987).

Em toda superfície aérea de *T. semitriloba*, ocorrem tricomas secretores (Leitão *et al.*, 1998b, 2000) diferentes dos tricomas da epiderme secretora dos nectários florais e extraflorais de *T. semitriloba*. Então, os tricomas nectaríferos de *T. semitriloba* são especializados. Nos nectários florais, estes tricomas encontram-se adensados formando constituindo, juntamente com o parênquima nectarífero, uma estrutura em forma de disco elíptico e convexo que se salienta no androginóforo. Já nos nectários extraflorais, os tricomas nectaríferos encontram-se reunidos em uma concavidade comum, delimitada por uma borda especializada epidérmica. Em ambos os casos, ocorre um parênquima modificado subjacente. Estas características sugerem que os nectários de *T. semitriloba* sejam avançados dentre a ordem Malvales.

O parênquima nectarífero dos nectários extraflorais de *Byttneria* é avascularizado (Arbo, 1972), diferindo-se da condição vascularizada dos nectários de *T. semitriloba*. Segundo Elias (1983), em várias ordens, incluindo Malvales, os nectários extraflorais grandes e vascularizados seriam o tipo mais derivado, entretanto a presença ou ausência de tecido vascular no nectário não é necessariamente uma indicação de avanço.

O néctar secretado pelos nectários florais de *T. semitriloba* se acumula em uma pequena câmara de néctar. Teuber *et al.* (1980) concluíram que o volume de néctar secretado pelo nectário floral de *Medicago sativa* tem relação com o tamanho da câmara de néctar. No caso dos nectários florais de *T. semitriloba* é possível fazer esta correlação, uma vez que estes nectários acumulam pouco néctar, enquanto que os nectários extraflorais, cuja concavidade onde o néctar se acumula não restringe espacialmente o tamanho da gota de néctar, secretam quantidade relativamente maior de néctar. No entanto são necessários estudos mais específicos para comprovar esta suposição.

No ápice do androginóforo, em torno do androceu, ocorre uma estrutura avascularizada e laminar em forma de coroa. Esta estrutura, assim como a base dos filetes, fica em contato com os tricomas tectores presentes em tufo na face adaxial das pétalas, estando possivelmente envolvida na retenção do néctar. Em *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) ocorre uma estrutura relativamente semelhante em torno da base dos filetes, denominada paraperigônio ou coroa, estando envolvida no aprisionamento do néctar (Dutilh, 1996).

As brácteas florais de *T. semitriloba* apresentam 4 nectários, e nas folhas eles variam de 6 a 10, situados em ambos os casos, na base da lâmina. Esta característica pode ser considerada mais avançada, pela atuação dos nectários em conjunto, oferecendo uma área maior de

fORAGEAMENTO, e pela proteção contra danos, uma vez que um único nectário grande pode ser inutilizado quando injuriado, comprometendo a produção de néctar na estrutura onde se encontra (Elias & Gelband, 1976; Elias & Prance, 1978; Subramanian & Inamdar, 1986; Morellato & Oliveira, 1994; McDade & Turner, 1997).

Os nectários extraflorais de *T. semitriloba* são muito semelhantes entre si, diferindo-se basicamente quanto à altura do bordo da concavidade, que é um pouco maior nos nectários bracteais, e quanto ao comprimento dos tricomas secretores, que são mais longos nos nectários bracteais. Os feixes vasculares que chegam aos nectários bracteais são mais espessos e aparentemente mais representados por floema, se comparado com os nectários foliares. A maior participação de floema na vascularização do nectário bracteal, em relação ao nectário da folha de *T. semitriloba*, pode indicar que o néctar bracteal seja mais concentrado que o néctar foliar, uma vez que a proporção de floema pode estar relacionada com a concentração do néctar (Elias, 1983).

Em *T. semitriloba* foram encontrados espessamentos nas paredes anticliniais da célula do pescoço dos tricomas constituintes dos três tipos de nectário analisados. Este tipo espessamento é amplamente relatado em vários tipos de tricomas secretores (Unzelman & Healey, 1974; Fahn, 1979a, 1988; Ascensão *et al.*, 1997; Serrato-Valenti *et al.*, 1997; Ascensão & Pais 1988; Bisio *et al.*, 1999). Espessamentos de parede, impregnados com substâncias graxas, ocorrem também em muitos nectários, tais como os relatados nas paredes anticliniais de célula(s) do pescoço de tricomas nectaríferos (Findlay & Mercer, 1971a, 1971b; Arbo, 1972; Eleftheriou & Hall, 1983; Sawidis, 1991) e de nectários em forma de escama, que ocorrem dentre as Bignoniaceae (Subramanian & Inamdar, 1986, 1989) e Acanthaceae (McDade & Turner, 1997).

Segundo Fahn (1988), o transporte de pré-néctar entre as células do parênquima nectarífero ocorre via apoplasto e, principalmente, por via simplasto. Ao penetrar na célula do pescoço, a fração de pré-néctar que se encontrava na via apoplasto, assume a via simplasto em decorrência da impregnação de compostos graxos nas paredes anticlinais da célula do pescoço (Fahn, 1979a). Em contrapartida, Zelling *et al.* (1991), por meio de experimentos de infiltração, concluíram que o depósito de compostos graxos não impede por completo a via apoplasto do pré-néctar através das paredes anticlinais da célula do pescoço em *Abutilon*. Estes autores supõem que os resultados dos trabalhos anteriores realizados em *Abutilon* foram negativos para permeabilidade, possivelmente pelo fato dos nectários analisados não terem sido submetidos a um tempo suficientemente longo de infiltração.

Segundo Baker *et al.* (1978), os nectários extraflorais de *Ricinus communis* não encontram, aparentemente, uma barreira apoplástica no transporte de pré-néctar, nem uma distribuição pronunciada de plasmodesmos entre as células do nectário que sugira uma nítida via simplasto no transporte de açúcares. No entanto, Nichol & Hall (1988) relataram espessamentos impregnados por substâncias graxas na base das células da epiderme secretora destes nectários e inúmeros plasmodesmos atravessando a parede periclinal interna destas células. Estes autores sugeriram a possibilidade de duas vias de transporte dos carboidratos do néctar: os monossacarídeos seriam oriundos da hidrólise da sacarose, sendo transportados, ativamente, via simplasto; enquanto que a sacarose seria transportada, sem gastos de energia, por via apoplasto (Nichol & Hall, 1988). Em *T. semitriloba* não foi avaliada a permeabilidade das paredes anticlinais da célula do pescoço dos tricomas nectaríferos, assim como a sua ultraestrutura. Seria interessante um

estudo destas características para se esclarecer o processo de secreção pelos nectários de *T. semitriloba*.

Foi verificada a ocorrência de idioblastos, cavidades e ductos mucilaginosos no tecido interno ao nectário floral de *T. semitriloba*, inclusive em contato com as células da bainha do feixe. Também foram encontrados idioblastos mucilaginosos nas adjacências dos nectários extraflorais de *T. semitriloba*. Sawidis (1991) observou a presença de células mucilaginosas sob o parênquima nectarífero dos nectários florais de *Hibiscus rosa-sinensis*, e mencionou a possibilidade de sua atuação no acúmulo de água, uma vez que estruturas mucilaginosas são encontradas em famílias xerofíticas como Cactaceae e Malvaceae. Segundo Gregory & Baas (1989), muitos autores propõem que a mucilagem desempenha uma função de estoque de água. No caso de *T. semitriloba*, a presença de cavidades e ductos mucilaginosos em contato com feixes vasculares, tais como os que vascularizam o nectário, pode estar associada à um possível suprimento de água para secreção. Para elucidar esta questão, são necessários estudos ultraestruturais com marcadores moleculares.

Estruturas secretoras de mucilagem são largamente encontradas dentre as famílias incluídas em Malvales (Solereder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950; Fahn, 1979a, 1982; Cronquist, 1981, 1988), e somente em Bombacaceae, Malvaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae ocorrem idioblastos e ductos ou cavidades mucilaginosos, o que pode ser considerado um caráter sinapomórfico (Gregory & Baas, 1989).

Em *T. semitriloba*, assim como em toda ordem Malvales (Solereder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950), ocorrem drusas distribuídas em todos os tecidos internos, sendo comum a sua presença nas adjacências dos feixes vasculares de *T. semitriloba* (Leitão *et al.*, 1998b,

2000). Existem algumas evidências de que os cristais de oxalato de cálcio podem ser estruturas de acúmulo de cálcio ou oxalato (Franceschi & Horner, 1980), sendo verificado o desaparecimento destes cristais em algumas espécies, inclusive do gênero *Sterculia* (Metcalf, 1985). Elias & Gelband (1977), com base na observação de uma maior abundância destes cristais no floema e nos nectários de *Impatiens*, em relação às demais partes da folha, sugeriram que a sua ocorrência pode estar correlacionada com o metabolismo do floema. Também, a presença de cristais em tecidos vegetais pode estar relacionada à ecologia da planta, conferindo impalatabilidade a insetos fitófagos (Mauseth, 1988).

O desenvolvimento dos tricomas nectaríferos dos nectários florais de *T. semitriloba* ocorre de forma idêntica ao dos nectários da folha (Leitão *et al.*, 1998a; Leitão 1999), o que nos permite inferir que os tricomas dos nectários da bráctea também seguem o mesmo padrão de desenvolvimento. No entanto, como nas brácteas esses tricomas são mais longos e com mais camadas de células, provavelmente a estrutura unisseriada formada por divisões periclinais nos primeiros estádios de desenvolvimento, apresenta mais camadas de células. O desenvolvimento ontogenético dos tricomas dos nectários localizados na folha de *Byttneria* (Sterculiaceae) (Arbo, 1972) ocorre de forma semelhante ao observado em *T. semitriloba*.

A maturação dos tricomas secretores dos nectários florais de *T. semitriloba* é assincrônica, sendo mais precoce nos tricomas distais em comparação com os tricomas na região proximal do nectário. Dentre os tricomas localizados à mesma distância da base do androgínóforo, os encontrados na região central do nectário apresentam-se em estágio de desenvolvimento mais avançado que os da periferia. Possivelmente, o desenvolvimento retardado observado nos tricomas basais, se deve ao

restrito espaço para o alongamento destes tricomas na região próxima à inserção da pétala, antes do desenvolvimento da câmara de acúmulo de néctar. Os nectários localizados nas folhas de *T. semitriloba* também apresentam desenvolvimento assincrônico, onde são observados tricomas em diferentes estádios de desenvolvimento, porém em distribuição aleatória pela epiderme secretora do nectário imaturo (Leitão *et al.*, 1998a; Leitão, 1999). Segundo Sawidis *et al.* (1987), o desenvolvimento assincrônico de tricomas secretores em nectários é raro entre as Malvales e ocorre nos nectários florais de *Hibiscus rosa-sinensis* – Malvaceae, em sentido inverso ao observado nos nectários florais de *T. semitriloba* no presente trabalho.

A principal diferença observada entre os nectários florais antes e durante a atividade de secreção, foi o aumento da vacuolização nas células do parênquima nectarífero e do parênquima dos tecidos vasculares. Fahn (1988) relatou que, com o desenvolvimento do nectário em direção ao estágio secretor, pode haver um aumento no volume do vacúolo das células nectaríferas. No parênquima nectarífero de *Ricinus communis*, a condição de um grande vacúolo nas células jovens muda para a ocorrência de vários e pequenos vacúolos (Baker *et al.*, 1978). Já em *Abutilon*, ocorre aumento e coalescência dos vacúolos das células dos tricomas nectaríferos durante a secreção (Findlay & Mercer, 1971b), sendo esta mudança aparentemente não diretamente relacionada com o estágio de secreção do nectário.

Também observou-se a crescente ocorrência de pequenos grânulos positivos ao P.A.S. na protoderme e meristema fundamental durante o desenvolvimento ontogenético dos nectários florais de *T. semitriloba*. Estes grânulos só ocorrem nas células da cabeça durante a atividade de secreção do néctar, tornando-se ausentes em todos os tecidos do nectário

senescente. A constituição polissacarídica e o formato elíptico, sugerem que estes grânulos sejam amido contidos em plastídeos, embora não apresentem birrefringência sob luz polarizada. Grãos de amido são frequentemente relatados em células nectaríferas, sendo degradados durante a secreção (Rachmilevitz & Fahn, 1973; Durkee *et al.*, 1981; Subramanian & Inamdar, 1986). Já em *Gossypium hirsutum* (Malvaceae), não foram vistas mudanças aparentes nos plastídeos no decorrer do desenvolvimento dos tricomas nectaríferos, o que sugere a não participação desta organela na secreção do néctar (Eleftheriou & Hall, 1983). Os dados obtidos nos testes histoquímicos aqui empregados deverão ser complementados com a análise da ultraestrutura dos nectários de *T. semitriloba* em diversos estádios de desenvolvimento, para o entendimento das organelas envolvidas na secreção do néctar.

No presente trabalho, não foram encontradas modificações na cutícula da cabeça dos tricomas, entre os estádios pré e pós secretores. Leitão *et al.* (1998a) e Leitão (1999) também não encontraram modificações na cutícula da cabeça dos tricomas do nectário foliar de *T. semitriloba*, ao microscópio de luz, antes e durante a secreção. O acúmulo de néctar entre a cutícula e as paredes das células da epiderme secretora, e sua posterior liberação por rompimento da cutícula é amplamente relatado na literatura (Durkee, 1982, 1983; Mohan & Inamdar, 1986; Davis *et al.*, 1988; Subramanian & Inamdar, 1989). Quando não ocorre rompimento de cutícula, podem existir poros (Findlay & Mercer, 1971a; Fahn, 1979a; Sawidis *et al.*, 1989; Machado, 1999) ou regiões de maior permeabilidade na cutícula (Knox *et al.* 1986, *apud* Roshchina & Roshchina, 1993). No caso de *T. semitriloba*, seria necessário um estudo ultraestrutural dos nectários para elucidar o mecanismo de liberação da secreção.

Após a secreção, os nectários florais e foliares de *T. semitriloba* se coram diferencialmente pelo azul de toluidina em tampão pH 4,2, possivelmente por uma mudança de disponibilidade de radicais aniônicos nas células, em função da liberação do conteúdo vacuolar durante o processo de degeneração celular. Muitas células se encontram mais vacuolizadas, e as paredes podem estar retraídas. Em *Ancistrocactus scheeri* (Cactaceae) ocorre abscisão de todos os tecidos do nectário (Mauseth, 1982). Em *T. semitriloba* não foi verificada abscisão do nectário foliar, mas verificou-se forte retração nas paredes das células da cabeça e do pescoço dos tricomas dos nectários foliares, e espessamento na parede periclinal externa das células basais, o que pode ocasionar a queda da cabeça do tricoma.

No presente trabalho não foram encontradas características avançadas de senescência nos tricomas dos nectários florais devido a utilização de amostras coletadas com apenas um dia após a antese. Também não foi feito o estudo da senescência dos nectários bracteais de *T. semitriloba*. Como estes nectários são estruturalmente muito semelhantes aos foliares, inferimos que podemos extrapolar para os nectários bracteais os resultados obtidos com a análise da senescência dos nectários foliares.

Foi verificado acúmulo de compostos fenólicos, aparentemente contidos em vacúolos, de formato irregular, nas células dos tricomas dos nectários extraflorais de *T. semitriloba*, estando estes compostos muitas vezes envolvendo parcialmente o núcleo destas células. Estruturas semelhantes ocorrem nos tricomas do nectário extrafloral de *Gossypium hirsutum* (Eleftheriou & Hall, 1983) e no nectário floral de *Hibiscus rosa-sinensis* (Sawidis, 1991). A persistência destes compostos durante o desenvolvimento dos tricomas e após a secreção indica que estas

substâncias não participam diretamente da secreção do néctar (Eleftheriou & Hall, 1983). A localização dos compostos fenólicos, basicamente entre o núcleo e a superfície do tricoma, pode sugerir um papel na secreção do néctar, ou na defesa do tricoma contra ataque de herbívoros. Esta última suposição poderia ser reforçada com a menor ocorrência destes vacúolos nos tricomas do nectário floral de *T. semitriloba*, que estão protegidos pelos verticilos estéreis.

Os nectários extraflorais podem ser visitados por formigas (Bentley, 1976; Lawton & Heads, 1984; Beattie, 1985; Rodrigues, 1997; Koptur *et al.*, 1998), mariposas (Beckmann & Stucky, 1981) parasitoides de insetos herbívoros (Pemberton & Lee, 1996) e moscas (Hespenheide, 1985), e esses insetos podem agir de forma defensiva ao vegetal (Roshchina & Roshchina, 1993) reduzindo os danos causados por insetos fitófagos. Os nectários de *T. semitriloba* foram estudados quanto à sua interação com formigas, sendo observados redução de danos foliares e aumento, embora não significativo, na disseminação de sementes germináveis em *T. semitriloba* (Rodrigues, 1997). No entanto, não foi encontrado nenhum trabalho sobre a interação de nectários extraflorais de *T. semitriloba* com parasitoides de herbívoros. São raros os trabalhos que enfocam a interação de nectários extraflorais e parasitoides, e estes, muitas vezes, protegem a planta de forma significativa (Hespenheide, 1985; Pemberton & Lee, 1996).

Em *T. semitriloba*, foram vistos dois gêneros de formigas, com comportamento agressivo contra herbívoros, forrageando os nectários extraflorais: *Camponotus* e *Crematogaster* (Rodrigues, 1997). O comportamento agressivo de formigas do gênero *Crematogaster* conferindo proteção às plantas, é amplamente relatado (Beckman & Stucky, 1981; Hespenheide, 1985; Smiley, 1986). Em *Caryocar*

*brasiliense*, as formigas *Camponotus* são responsáveis por 52% dos ataques contra fitófagos, dentre o total de ataque de todas as espécies de formigas que forrageam os nectários (Oliveira, 1997). Em *C. mirianthum*, formigas *Camponotus* provavelmente participam na remoção de hifas sobre os nectários extraflorais ativos, sendo encontradas hifas apenas sobre os nectários senescentes (Machado, 1999). Provavelmente, as formigas que forrageam os nectários extraflorais ativos de *T. semitriloba* removem as hifas que crescem sobre sua superfície. Conforme observado no presente trabalho, os nectários extraflorais senescentes encontravam-se completamente recobertos por hifas, sendo estas pouco frequentes sobre os nectários em atividade.

Não foi encontrada secreção sobre os nectários extraflorais de *T. semitriloba* que cresciam na mata. Nestas plantas havia um pequeno número de formigas não vistas forrageando o nectário. Os danos aos órgãos aéreos eram maiores e as inflorescências menores ao observado nas plantas cultivadas em estufa. A distribuição de plantas portadoras de nectários extraflorais é em parte, uma resposta das atividades de formigas (Bentley, 1976), e a distribuição de formigas é crucial no ataque de herbívoros contra a planta (Smiley, 1986); o que tornaria interessante um estudo correlacionando a distribuição de *T. semitriloba* em ambientes com e sem formigas capazes de manter uma relação mutualística de defesa à planta.

No néctar bracteal de *T. semitriloba* foi(ram) detectado(s), como aminoácido(s) livre(s), aspartato e/ou triptofano. Não foram encontrados aminoácidos livres no néctar floral e foliar, possivelmente pela baixa sensibilidade da técnica de análise empregada, uma vez que ocorreu reação positiva com ninhidrina em amostras dos três tipos de néctar. Provavelmente o néctar floral apresenta considerável concentração de

prolina, por ter sido contaminado com pólen durante a coleta (Gilliam *et al.*, 1980; Gottsberger *et al.*, 1990). Os resultados obtidos na análise do néctar bracteal devem ser considerados com cautela, uma vez que podem ocorrer vários outros aminoácidos em concentração não detectável pelo teste. Este néctar reagiu mais intensamente com a ninhidrina que os demais, o que sugere uma maior diversidade e/ou uma maior concentração de aminoácidos livres no néctar bracteal. Também podem ocorrer aminoácidos não proteicos nos néctares produzidos pelos nectários extraflorais de *T. semitriloba*, uma vez que a produção destes aminoácidos, por nectários extraflorais é muito frequente (Baker *et al.*, 1978).

Embora seja incerta a função de aminoácidos produzido por nectários extraflorais (Keeler, 1977), a sua presença pode contribuir com o sabor do néctar (Baker & Baker, 1983). A produção de um néctar mais enriquecido em aminoácidos pelas brácteas, localizadas nas proximidades das flores, poderia funcionar como um atrativo maior para formigas agressivas, conferindo certa proteção às dispendiosas estruturas férteis da planta. Tendo em vista a baixa sensibilidade da metodologia empregada na análise química do néctar no presente trabalho, e da grande diversidade de substâncias químicas que podem ser encontradas no néctar, os dados obtidos no presente trabalho devem ser complementados com uma análise mais precisa e abrangente dos diferentes tipos de néctares de *T. semitriloba*.

## Referências bibliográficas

- Arbo, M. M. 1972. Estructura y ontogenia de los nectarios foliares del género *Byttneria* (Sterculiaceae). **Darwiniana** **17**: 104-158.
- Ascensão, L. & Pais, M. S. 1988. Ultrastructure and histochemistry of secretory ducts in *Artemisia campestris* ssp. *maritima* (Compositae). **Nord. J. Bot.** **8**: 283-292.
- Ascensão, L.; Marques, N. & Pais, M. S. 1997. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. **Int. J. Plant. Sci.** **158**: 249-258.
- Baker, D. A.; Hall, J. L. & Thorpe, J. R. 1978. A study of the extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. **New Phytol.** **81**: 129-137.
- Baker, H. G. & Baker, I. 1977. Intraspecific constancy of floral nectar amino acid complements. **Bot. Gaz.** **138**: 183-191.
- Baker, H. G. & Baker, I. 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. Pp. 126-152. In: Bentley, B. & Elias, T. (Eds.). **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Baker, H. G.; Opler, P. A. & Baker, I. 1978. A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectars. **Bot. Gaz.** **139**: 322-332.
- Baker, J. R. 1947. Further remarks on the histochemical recognition of lipinice. **Quart. J. Microscop. Sci.** **88**: 463-465.
- Beattie, A. J. 1985. **The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms**. Cambridge University Press, New York.

- Beckmann Jr., R. L. & Stucky, J. M. 1981. Extrafloral nectaries and plant guarding in *Ipomoea pandurata* (L.) G. F. W. MEY. (Convolvulaceae). **Amer. J. Bot.** **68**: 72-79.
- Benes, K. 1964. Detection of lipids in plant meristematic cell with aid of sudan black staining. **Biol. Plant.** **6**: 142-151.
- Bentley, B. L. 1976. Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant communit: interhabit differences in the reduction of herbivore damage. **Ecology** **57**: 815-820.
- Berlyn, G. P. & Miksche, J. P. 1976. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University Press, Iowa.
- Bisio, A.; Corallo, A.; Gastaldo, P.; Romussi, G.; Ciarallo, G.; Fontana, N.; Tommasi, N. & Profumo, P. 1999. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. **Ann. Bot.** **83**: 441-452;
- Block, R. J.; Durrum, E. L. & Zweig, J. 1958. **Paper chromatography and paper electrophoresis**. Academic Press, New York.
- Bozzola, J. J. & Russell, L. D. 1992. **Electron microscopy**. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Clark, G. 1981. **Satining procedures**. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Collevatti, R. G.; Campos, L. A. O. & Schoereder, J. H. 1997. Foraging behaviour of bee pollinators on the tropical weed *Triumfetta semitriloba*: departure rules from flower patches. **Insectes Soc.** **44**: 345-352.
- Collevatti, R. G.; Campos, L. A. O. & Silva, A. F. 1998. Pollination ecology of the tropical weed *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae), in the south-eastern Brazil. **Rev. Brasil. Biol.** **58**: 383-392.

- Cristobal, C. L. & Arbo, M. M. 1971. Sobre las especies de *Ayenia* (Sterculiaceae) con nectarios foliares. **Darwiniana** **16**: 603-612.
- Cronquist, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York.
- Cronquist, A. 1988. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden, New York.
- Cruden, R.W.; Herman, S. M. & Peterson, S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. Pp. 80-125. In: Bentley, B. & Elias, T. S. (Eds.) **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Davis, A. R.; Peterson, R. L. & Shuel, R. W. 1988. Vasculature and ultrastructure of the floral and stipular nectaries of *Vicia faba* (Leguminosae). **Can. J. Bot.** **66**: 1435-1448.
- Durkee, L. T. 1982. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. II. The extra-floral nectary. **Amer. J. Bot.** **69**: 1420-1428.
- Durkee, L. T. 1983. The ultrastructure of floral nectaries. Pp. 1-29. In: Bentley, B. & Elias, T. S. (Eds.) **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Durkee, L. T.; Gaal, D. J. & Reisner, W. H. (1981). The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. I. The floral nectary. **Amer. J. Bot.** **68(4)**: 453-462;
- Dutilh, J. H. A. 1996. **Biosistemática de quatro espécies de *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Eleftheriou, E. P. & Hall, J. L. 1983. The extrafloral nectaries of cotton. I. Fine structure of the secretory papillae. **J. Exp. Bot.** **34**: 103-119.

- Elias, I. 1983 Extrafloral nectaries: their structure and distribution. Pp. 174-203. In: Bentley, B. & Elias, T.S. (Eds.) **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Elias, T. S. & Gelband, H. 1975. Nectar, its production and functions in trumpet creeper. **Science** **189**: 289-291.
- Elias, T. S. & Gelband, H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). **Amer. J. Bot.** **63**: 1349-1353.
- Elias, T. S. & Gelband, H. 1977. Morphology, anatomy, and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). **Bot. Gaz.** **138**: 206-212.
- Elias, T. S. & Prance, G. T. 1978. Nectaries on the fruit of *Crescentia* and other Bignoniaceae. **Brittonia** **30**: 175-181.
- Fahn, A. 1953. The topography of nectary in the flower and its phylogenetical trend. **Phytomorphology** **3**: 424-426.
- Fahn, A. 1979a. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, New York.
- Fahn, A. 1979b. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. **Amer. J. Bot.** **66**: 977-985.
- Fahn, A. 1982, **Anatomia vegetal**. Pergamon Press/Ediciones Pirámide S.A., Madrid.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytol.** **108**: 229-257.
- Ferreira, K. L. D. 1997. **Nectários extraflorais de *Triumfetta semitriloba* Jacq: anatomia e histoquímica**. Monografia de Graduação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- Findlay, N. & Mercer, F. V. 1971a. Nectar production in *Abutilon* I. Movement of nectar through the cuticle. **Aust. J. bio. Sci.** **24**: 647-656.
- Findlay, N. & Mercer, F. V. 1971b. Nectar production in *Abutilon* II. Submicroscopic structure of the nectary. **Aust. J. bio. Sci.** **24**: 657-664.
- Franceschi, V. R. & Horner Jr., H. T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. **Bot. Rev.** **46**: 361-427.
- Freitas, A. V. L. & Oliveira, P. S. 1996. Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behavior of a non-myrmecophilous butterfly. **J. Anim. Ecol.** **65**: 205-210.
- Gilliam, M.; McCaughey, W. F. & Wintermute, B. 1980. Amino acids in pollens and nectars of *Citrus* cultivars and in stored pollen and honey from honeybee colonies in *Citrus* groves. **J. Apic. Res.** **19**: 64-72.
- Gottsberger, G.; Arnold, T. & Linskens, H. F. 1990. Variation in floral nectar aminoacids with aging of flowers, pollen contamination, and flower damage. **Israel J. Bot.** **39**: 167-176.
- Gregory, M. & Baas, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel J. Bot.** **38**: 125-174.
- Hespenheide, H. A. 1985. Insect visitors to extrafloral nectaries of *Byttneria aculeata* (Sterculiaceae): relative importance and roles. **Ecol. Entomol.** **10**: 191- 204.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil.** California Agricultural Experiment Station. Circular 347. University of California, Berkeley.

- Inouye, D. W. 1983. The ecology of nectar robbing. Pp. 153-173. In: Bentley, B. & Elias, T. S. (Eds.) **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** **27**: 137-138.
- Keeler, K. H. 1977. The extrafloral nectaries of *Ipomea carnea* (Convolvulaceae). **Amer. J. Bot.** **64**: 1182-1188.
- Knox, R. B.; Kenrick, J.; Bernhardt, P.; Margiinson, R.; Beresford, G.; Baker, I. & Baker, H. G. 1985. Extrafloral nectaries as adaptations for bird pollination in *Acacia terminalis*. **Amer. J. Bot.** **72**: 1185-1196.
- Koptur, S.; Rico-Gray, V. & Palacios-Rios, M. 1998. Ant protection of the nectaried fern *Polypodium plebeium* in central Mexico. **Amer. J. Bot.** **85**: 736-739.
- Lawton, J. H. & Heads, P. A. 1984. Bracken, ants and extrafloral nectaries. I. The components of the system. **J. Anim. Ecol.** **53**: 995-1014.
- Leitão, C. A. E. 1999. **Ontogenia dos nectários extraflorais de *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae)**. Monografia de Graduação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Leitão, C. A. E.; Meira, R. M. S. A. & Azevedo, A. A. 1998a. Histoquímica e desenvolvimento ontogenético dos nectários extraflorais de *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae). In: **Anais do XLIX Congresso Nacional de Botânica**.

- Leitão, C. A. E.; Meira, R. M. S. A. & Azevedo, A. A. 1998b. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae). In: **Anais do XX Encontro Regional de Botânicos**.
- Leitão, C. A. E.; Meira, R. M. S. A. & Azevedo, A. A. 2000. Estruturas secretoras foliares em espécies da ordem Malvales. In: **Anais do LI Congresso Nacional de Botânica**.
- Lersten, N. R. & Brubaker, C. L. 1987. Extrafloral nectaries in Leguminosae: Review and original observations in *Erythrina* and *Mucuna* (Papilionoideae; Phaseoleae). **Bull. Torrey Bot. Club** **114**: 437-447.
- Lorenzi, H. 1982. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Copyright, Nova Odessa.
- Machado, S. R. 1999. **Estrutura e desenvolvimento de nectários extra-florais de *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae)**. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Maia, V. 1979. **Técnica histológica**. Atheneu, São Paulo.
- Mauseth, J. D. 1982. Development and ultrastructure of extrafloral nectaries in *Ancistrocactus scheeri* (Cactaceae). **Bot. Gaz.** **143**: 273-277.
- Mauseth, J. D. 1988. **Plant anatomy**. University of Texas, Austin.
- McDade, L. A. & Turner, M. D. 1997. Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). **Amer. J. Bot.** **84**: 1-15.
- Meira, R. M. S. A. 2000. **Anatomia foliar e estudos morfológicos em espécies de *Lafoensia* Vand. (Lythraceae) nativas do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Mello, M. L. S. & Vidal, B. C. 1978. Reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.** **30**: 665-676.
- Metcalf, C. R. 1985. Secreted mineral substances. Pp. 82-97. In: Metcalf, C. R. & Chalk, L. (Eds.) **Anatomy of dicotyledons II**. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C. R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of dicotyledons I**. Oxford University Press, Amen House, London.
- Mohan, J. S. S. & Inamdar, J. A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. **Ann. Bot.** **57**: 389-401.
- Morellato, L. P. C. & Oliveira, P. S. 1994. Extrafloral nectaries in the tropical tree *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Can. J. Bot.** **72**: 157-160.
- Morita, T. & Assumpção, R. M. V. 1972. **Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização, preparação e purificação**. Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo.
- Nichol, P. & Hall, J. L. (1988). Characteristics of nectar secretion by extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. **J. Exp. Bot.** **39**: 573-586.
- Oliveira, P. S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). **Func. Ecol.** **11**: 323-330.
- Pearse, A. G. E. 1962. **Histochemistry: Theoretical and Applied I**. Chuchill Livingstone, London.
- Pemberton, R. W. & Lee, J. 1996. The influence of extrafloral nectaries on parasitism of an insect herbivore. **Amer. J. Bot.** **83**: 1187-1194.
- Rachmilevitz, T. & Fahn, A. 1973. Ultrastructure of nectaries of *Vinca rosea* L., *Vinca major* L. and *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Valencia*

- and its relation to the mechanism of nectar secretion. **Ann. Bot.** **37**: 1-9.
- Rodrigues, L. L. 1997. **Efeito da presença de formigas associadas às glândulas de *Triumfetta semitriloba* Jacq. (Tiliaceae) sobre o sucesso reprodutivo da planta.** Monografia de Graduação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Roeser, K. R. 1973. Die nadel der schwarzkiefer. Massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos** **61**: 33-36.
- Roshchina, V. V. & Roshchina, V. D. 1993. **The excretory function of higher plants.** Springer-Verlag, Berlin.
- Sawidis, T. 1991. A histochemical study of nectaries of *Hibiscus rosa-sinensis*. **J. Exp. Bot.** **42**: 1477-1487.
- Sawidis, T.; Eleftheriou, E. P. & Tsekos, I. 1987. The floral nectaries of *Hibiscus rosa-sinensis* I. Development of the secretory hairs. **Ann. Bot.** **59**: 643-652.
- Sawidis, T.; Eleftheriou, E. P. & Tsekos, I. 1989. The floral nectaries of *Hibiscus rosa-sinensis* III. A morphometric and ultrastructural approach. **Nord. J. Bot.** **9**: 63-71.
- Schmid, R. 1988. Reproductive versus extra-reproductives nectaries - historical perspective and terminological recommendations. **Bot. Rev.** **54**: 179-232.
- Serrato-Valenti, G.; Bisio, A.; Cornara, L. & Ciarallo, G. 1997. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. **Ann. Bot.** **79**: 329-336.
- Smets, E. 1986. Localization and systematic importance of the floral nectaries in the Magnoliatae (Dicotyledons). **Bull. Lard. Bot. Nat. Belg.** **56**: 51-76.

- Smiley, J. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on cartepillar survival. **Ecology** **67**: 516-521.
- Solereeder, H. 1908. **Systematic anatomy of the dicotyledons II**. Clarendon Press, Oxford.
- Stephenson, A. G. 1982. The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. **Ecology** **63**: 663-669.
- Subramanian, R. B. & Inamdar, J. A. 1986. Nectaries in *Bignonia illicium* L. – Ontogeny, structure and functions. **Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)** **96**: 135-140.
- Subramanian, R. B. & Inamdar, J. A. 1989. The structure, secretion and biology of nectaries in *Tecomaria capensis* Thunb (Bignoniaceae). **Phytomorphology** **39**: 69-74.
- Teuber, L. R.; Albertsen, M. C.; Barnes, D. K. & Heichel, G. H. 1980. Structure of floral nectaries of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in relation to nectar production. **Amer. J. Bot.** **67**: 433-439.
- Theobald, W. L.; Krahulik, J. L. & Rollins, R. C. 1979. Trichome description and classification. Pp. 40-53. In: Metcalfe, C. R. & Chalk, L. (Eds.) **Anatomy of dicotyledons I**. Clarendon Press, Oxford.
- Thomas, V. & Dave, Y, 1992. Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). **Bot. J. Linnenan Soc.** **109**: 395-400.
- Thorp, R. W. & Sugden, E. A. 1990. Extrafloral nectaries producing rewards for pollinator attraction in *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. **Israel J. Bot.** **39**: 177-186.

- Unzelman, J. M. & Healey, P. L. 1974. Development, structure, and occurrence of secretory trichomes of *Pharbitis*. **Protoplasma** **80**: 285-303.
- Vidal, B. C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Ann. Histochem.** **15**: 289-296.
- Vidal, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.** **22**: 45-64.
- Vogel, S. 1997. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives I. Substitutive nectaries. **Flora** **192**: 305-333.
- Wergin, W. P.; Elmore, C. D.; Hanny, B. W. & Ingber, B. F. 1975. Ultrastructure of the subglandular cells from the foliar nectaries of cotton in relation to the distribution of plasmodesmata and the symplastic transport of nectar. **Amer. J. Bot.** **62**: 842-849.
- Young, A. M.; Schaller, M. & Strand, M. 1984. Floral nectaries and trichomes in relation to pollination in some species of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). **Amer. J. Bot.** **71**: 466-480.
- Zellnig, G.; Kronstedt-Robards, E. C. & Robards, A. W. 1991. Intercellular permeability in *Abutilon* nectary trichomes. **Protoplasma** **161**: 150-159.