



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



## **Caracterização anatômica, química e ultraestrutural de espinhos secretores em duas espécies de Opuntioideae (Cactaceae)**

**STEFANY CRISTINA DE MELO SILVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU-SP**

**2019**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Caracterização anatômica, química e ultraestrutural de espinhos  
secretores em duas espécies de Opuntioideae (Cactaceae)**

**STEFANY CRISTINA DE MELO SILVA**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> TATIANE MARIA RODRIGUES**

**ORIENTADORA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU-SP**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Stefany Cristina de Melo.

Caracterização anatômica, química e ultraestrutural de espinhos secretores em duas espécies de Opuntioideae (Cactaceae) / Stefany Cristina de Melo Silva. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Capes: 20300000

1. Cactos. 2. Anatomia vegetal. 3. Ultraestrutura (Biologia). 4. Néctar.

Palavras-chave: Anatomia vegetal; Cactaceae; Nectário extra floral; Ultraestrutura (Biologia).

## *DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Cecília e José, ao meu irmão Lucas, à minha avó Catarina e ao meu namorado Henrique por todo o amor, incentivo e apoio na trajetória da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de Mestrado (Proc. 2017/14891-5).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** pelo apoio financeiro (Código de Financiamento 001).

À **Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues** pelos ensinamentos, orientação e comprometimento.

À **Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado** pela colaboração e auxílio nas análises das amostras.

À **Profa. Dra. Elza Guimarães** pelas dicas sobre a coleta de néctar; e à doutoranda **Marília Quinalha** por ter me ensinado a realizar as coletas de néctar.

Ao **Prof. Dr. Nepi Massimo** pela colaboração com as análises químicas de néctar.

Aos membros da banca de Qualificação **Dra. Camila Kissmann, Dr. Sérgio Adachi** e **Dra. Emília Arruda** pelas contribuições.

Aos **docentes do departamento de Botânica** pela boa convivência e ensinamentos.

À todos **funcionários do departamento de Botânica** pela convivência e auxílios. Agradeço em especial, à **Inara**, à **Heloísa**, ao **Kleber** e ao **Sr. Áureo** pelos auxílios nos diversos momentos.

Aos **funcionários da biblioteca/ Ponto de Apoio FAPESP** pela atenção e pelo ótimo atendimento.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação, IBB, UNESP**, pelo pronto atendimento.

À **Yve Canaveze** e ao **Sérgio Adachi** pela amizade, convivência e ensinamentos.

Às queridas amigas **Laisa Cabral** e **Eliandra Nunes** por todo carinho, companheirismo e apoio.

Aos colegas de laboratório: **Ricardo, Fernanda, Diana, Juan, Daiane, Tayeme** e **Wanderléia** pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

Agradeço, em especial, à **Deus** pela graça de realizar este sonho acadêmico e profissional.

Agradeço ao meu companheiro **Henrique Vasque** por todo apoio, paciência, compreensão, conselhos e pela troca de conhecimento. Muito obrigada! Obrigada à minha família que é a minha base, meu apoio!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos!

## Sumário

Resumo.....	1
Abstract .....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	4
Resultados.....	9
Discussão.....	14
Referências bibliográficas.....	19
Tabelas.....	26
Figuras e legendas.....	28

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, os resultados obtidos durante a execução do Projeto de Mestrado foram reunidos em um artigo científico para publicação apresentado de acordo com as normas do periódico *Plant Biology* (A2 – Comitê de Biodiversidade da Capes).

SILVA, S. C. M. **CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA, QUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL DE ESPINHOS SECRETORES EM DUAS ESPÉCIES DE OPUNTIOIDEAE (CACTACEAE)**. 2019. 54p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Resumo.** Nectários extraflorais (NEFs) são comuns e morfologicamente diversos em Cactaceae, podendo se apresentar como espinhos altamente modificados ou não, folhas escamiformes e regiões epidérmicas e corticais especializadas na base ou ao redor das aréolas. Contudo, pouco é conhecido sobre a natureza dos NEFs em cactos e, mesmo, há dúvidas se o exsudato pode ser qualificado como néctar. Nosso objetivo foi analisar a morfologia, anatomia e ultraestrutura dos espinhos secretores em *Brasiliopuntia brasiliensis* e *Nopalea cochenillifera* e a composição química da secreção. Espinhos secretores foram processados para análises aos microscópios de luz (campo claro e confocal) e eletrônicos de varredura e transmissão (convencional e citoquímica). A composição dos açúcares e de aminoácidos foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Observações de campo mostraram que o exsudato acumulado no ápice dos espinhos é removido por formigas. Os aspectos ontogenéticos, estruturais e funcionais dos espinhos secretores se mostraram semelhantes nas duas espécies estudadas. Os espinhos secretores se originam a partir do meristema areolar, tendo início como pequenas protuberâncias formadas por protoderme e meristema fundamental. Espinhos na fase secretora apresentaram a) base dilatada preenchida por células pequenas com paredes pecto-celulósicas delgadas, citoplasma denso e núcleo volumoso; b) região mediana alongada composta por células fibriformes com paredes não-lignificadas; e c) porção apical afilada com células fusiformes com paredes não-lignificadas. Tecidos vasculares estão presentes na região basal dos espinhos. Ultraestruturalmente, as células da região basal apresentaram contorno irregular e parede com plasmodesmos amplos; a lamela média é intumescida nos ângulos entre as células; no citoplasma ocorrem mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, poliribossomos, plastídios e dictiossomos abundantes. Análises citoquímicas permitiram identificar a origem dictiossomal das vesículas encontradas no citoplasma dessas células e o mecanismo de liberação da secreção via exocitose. As análises químicas indicaram que o exsudato liberado pelos espinhos secretores é rico em açúcares; em ambas as espécies o exsudato se mostrou sacarose-dominante e com perfil de aminoácidos similar. Nossos resultados indicam a ocorrência de intensa síntese de substâncias hidrofílicas confirmando que tais espinhos são nectários extraflorais.

**Palavras-chave:** cacto, estrutura, funcionamento, néctar, nectário extrafloral



SILVA, S. C. M. ANATOMICAL, CHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF SECRETORY SPINES IN TWO SPECIES OF OPUNTIOIDEAE (CACTACEAE). 2019. 54p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Abstract.** Extrafloral nectaries (EFNs) are common and morphologically diverse in Cactaceae, and may be highly modified spines or not, scamiform leaves and specialized epidermal and cortical regions located at the base or around the areoles. However, little is known about the nature of EFNs in cacti, and even if the exudate can be qualified as nectar. We aimed to analyze the morphology, anatomy and ultrastructure of the secretory spines in *Brasiliopuntia brasiliensis* and *Nopalea cochenillifera* and the chemical composition of the secretion. Secretory spines were processed for light (bright field and confocal) and scanning and transmission (conventional and cytochemical) electron microscopy. The composition of sugars and amino acids was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Field observations have shown that the exudate accumulated at the apex of the spines is removed by ants. The ontogenetic, structural and functional aspects of the secretory spines were similar in both species. Secretory spines originate from the areolar meristem, beginning as small protuberances formed by protoderm and fundamental meristem. Spines in the secretory phase presented a) dilated base filled by small cells with thin pecto-cellulosic walls, dense cytoplasm and voluminous nucleus; b) elongated median region composed of fibriform cells with non-lignified walls; and c) apical portion tapered with fusiform cells with non-lignified walls. Vascular tissues are present in the basal region of the spines. Ultrastructurally, the cells of the basal region presented irregular shape and walls with wide plasmodesmata; the middle lamella is swollen at the angles between the cells; mitochondria, rough endoplasmic reticulum, polyribosomes, plastids and abundant dictyosomes occurred in the cytoplasm. The cytochemical analyzes allowed us to identify the dictiosomal origin of vesicles found in the cytoplasm of these cells and the mechanism of secretion release via exocytosis. Chemical analyzes indicated that the exudate released by the secretory spines is rich in sugars; in both species the exudate was sucrose-dominant and with a similar amino acid profile. Our results indicated the occurrence of intense synthesis of hydrophilic substances confirming that these spines are extrafloral nectaries.

**Keywords:** cactus, extrafloral nectary, functioning, nectar, structure

## INTRODUÇÃO

Nectários extraflorais (NEFs) são estruturas secretoras de néctar, um fluido aquoso constituído por mono (frutose, glicose) e dissacarídeos (sacarose) (Fahn 1979), podendo conter outras substâncias como, por exemplo, aminoácidos (Baker & Baker 1973; Koptur 2005). A secreção liberada pelos NEFs pode atrair insetos, principalmente formigas, em busca de recursos energéticos ou da água contida no néctar (Ruffner & Clark 1986). Essas glândulas podem ocorrer em porções vegetativas, tais como no caule, pecíolo, estípulas, ou até mesmo em porções reprodutivas das plantas; entretanto, não estão diretamente relacionados com a polinização (Bentley 1977; Koptur 2005). Estruturalmente, em seu formato mais comum, os NEFs são constituídos por parênquima especializado e por epiderme secretora; entretanto, os NEFs apresentam ampla diversidade morfológica dentre as Angiospermas (Fahn 1979; Nepi 2007).

A presença de NEFs tem sido relatada em muitos grupos de plantas, ocorrendo em cerca de 3940 espécies e em 108 famílias, inclusive em Cactaceae (Weber & Keeler 2013). Os representantes de Cactaceae, geralmente, apresentam caules suculentos com numerosos espinhos localizados em aréolas (Rocha & Agra 2002; Sánchez *et al.* 2014). As aréolas representam uma das sinapomorfias de Cactaceae (Nyffeler 2002) e são constituídas por um conjunto de meristemas axilares e ramos encurtados (Soller *et al.* 2014; Mauseth *et al.* 2016) de onde se originam novos ramos vegetativos ou reprodutivos, além dos espinhos, gloquídeos e tricomas (Boke 1951; Nyffeler 2002).

Os espinhos são evolutivamente relacionados com a perda de folhas em Cactaceae e podem representar a única evidência de folhas em diversas espécies da família (Anderson 2001). Espinhos de Cactaceae, em geral, são considerados escamas modificadas da gema axilar, ou folhas modificadas de um caule reduzido (Mauseth 1976; Boke 1980). Assim como as aréolas, os espinhos são considerados uma das sinapomorfias da família (Judd *et al.* 2008) e podem ser classificados em dois tipos: a) espinhos lignificados, presentes na maioria das espécies de Cactaceae; e b) gloquídeos, um tipo de espinho pequeno encontrado apenas em membros da subfamília Opuntioideae (Gibson & Nobel 1986; Mauseth 2006). Nessa subfamília ocorre uma ampla variedade de formas de transição entre folhas e espinhos e entre folhas e gloquídeos na região areolar (Arruda & Melo-de-Pinna 2016).

Na família, a ocorrência NEFs tem chamado a atenção de pesquisadores desde o final do século XIX (Ganong 1894; Lloyd 1908) e tem sido objeto de estudos até os dias atuais (Mauseth *et al.* 2016). A diversidade morfológica e a localização dos NEFs representam caracteres de valor taxonômico em Cactaceae, podendo contribuir com a distinção de gêneros

e espécies (Mauseth *et al.* 2016). Além disso, a importância ecológica dos NEFs na família também tem sido ressaltada em trabalhos que mostram os benefícios das relações mutualísticas com formigas e a sazonalidade da secreção (Pickett & Clark 1979; Ness 2006). Contudo, muitos detalhes sobre a localização, morfologia e anatomia dos NEFs em Cactaceae permanecem desconhecidos, até mesmo no que se refere a espécies com as glândulas mais evidentes e altamente modificadas (Mauseth *et al.* 2016). Assim, estudos sobre a morfogênese e funcionamento dos NEFs em Cactaceae podem apresentar grande valor agregado, fornecendo subsídios para estudos taxonômicos (Mauseth *et al.* 2016) e ecológicos (Díaz-Castelazo *et al.* 2005).

Esse trabalho teve como objetivo analisar a morfologia, anatomia e ultraestrutura dos espinhos secretores em duas espécies de Opuntioideae, *Brasiliopuntia brasiliensis* (Willd.) A. Berger e *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, além de investigar a composição química da secreção produzida por eles. Estas espécies foram escolhidas como modelo para os estudos uma vez que sobre o ápice de alguns espinhos presentes nas aréolas de caules jovens foram observadas pequenas gotas de líquido transparente e viscoso, as quais eram removidas por formigas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Espécies estudadas

*Brasiliopuntia brasiliensis* (Willd.) A. Berger. (sin. *Opuntia brasiliensis*) é uma espécie arbustiva (Fig. 1A) nativa do Brasil, com potencial ornamental (Azevedo *et al.* 2013), conhecida popularmente por xiquexique-do-sertão (Zappi & Taylor, in prep). É encontrada principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil (Scarano *et al.* 2001), havendo relatos de sua presença na Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado e no Pantanal (Zappi & Taylor, in prep). Suas flores apresentam coloração esverdeada a amarela e seus frutos são globosos amarelo-esverdeados (Zappi *et al.* 2007). Apresenta porção caulinar principal com formato cilíndrico, além de segmentos basais e intermediários cilíndricos e segmentos terminais aplanados (cladódios) (Fig. 1A) contendo aréolas responsáveis pela formação de tricomas tectores e diferentes tipos de espinhos (Fig. 1B-E).

*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (sin. *Nopalea coccenellifera* (L.) Salm-Dyck) é uma espécie arbustiva nativa do México conhecida popularmente por palma-miúda ou palma-doce (Zappi & Taylor, in prep). No Brasil, ocupa regiões da Caatinga, Cerrado, Mata

Atlântica e Restinga Zappi & Taylor, in prep), sendo bastante utilizada na ornamentação de jardins e na alimentação de gados (Silva & Sampaio 2015). *N. cochenillifera* pode ser reconhecida pelas flores com coloração rosa-escuro, estigma com lobos verdes, e estames exertos (Zappi *et al.* 2007); seus frutos são globosos de coloração avermelhada (Zappi & Taylor, in prep). Seu caule é formado por uma porção central cilíndrica e segmentos laterais aplanados (cladódios) (Fig. 2A). Em suas aréolas são observados tricomas tectores e diferentes tipos de espinhos (Fig. 2B-E).

### **Áreas de estudo**

Foram amostrados indivíduos adultos de *B. brasiliensis* (n=4) e *N. cochenillifera* (n=5) ocorrentes na área experimental do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu, IBB, UNESP, e de espécimes localizados na área urbana do município de Botucatu (22°53'08" S, 48°26'42" W).

### **Observações em campo**

Para registros do comportamento de insetos visitantes, três indivíduos de ambas espécies contendo, no mínimo, cinco cladódios jovens com o comprimento máximo de 10cm, foram observados durante o período de setembro de 2017 a outubro de 2018. Foram realizadas observação mensais. Cada etapa de observação ocorreu durante quatro dias consecutivos das 8:00 às 18:00h (Aguiar-dias *et al.* 2011); observações no período noturno, foram realizadas das 19:00h às 23:00h, nos mesmos dias das observações diurnas.

Durante os períodos de observação, filmagens e imagens fotográficas foram obtidas com o uso de câmara digital Samsung modelo A7 com auxílio de lente macro acoplada. As formigas observadas na região areolar de ambas espécies vegetais foram coletadas, armazenadas em álcool 70% e identificadas pelo Dr. Roberto da Silva Camargo do Laboratório de Insetos Sociais e Pragas (LISP), da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), UNESP, Botucatu.

### **Coleta de material vegetal**

Para análises estruturais dos espinhos secretores foram coletadas aréolas localizadas em cladódios jovens (cerca de 10 cm de comprimento) presentes na região distal dos segmentos caulinares. Foram amostrados espinhos secretores em diferentes estágios de desenvolvimento.

Cladódios contendo material reprodutivo foram coletados e vouchers foram depositados no Herbário Irina Delanova Gemtchúnicov (BOTU) do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu, IBB, UNESP sob os números 33069 e 33070 para *B. brasiliensis* e 32966, 32967 e 33071 para *N. cochenillifera*. A confirmação da identificação das espécies foi realizada pela Profa. Dra. Lidyanne Yuriko Saleme Aona da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

### **Análise da morfologia externa dos espinhos em estereomicroscópio e morfometria**

Espinhos (n=3) em fase secretora foram analisados ao estereomicroscópio Leica (M205C). As imagens foram registradas com auxílio de câmera Leica (DFC 425) acoplada. Medições do comprimento espinhos secretores foram realizadas com auxílio de paquímetro digital.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Amostras da região areolar contendo espinhos em fase secretora foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Em seguida, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em solução alcoólica, secadas em ponto crítico e metalizadas com ouro (Robards 1978) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do IBB, UNESP. A análise das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura EVO LS15 ZEISS a 10 kV no Laboratório de Pesquisa IV, da Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru.

### **Microscopia de luz**

Para a descrição anatômica e estudo ontogenético dos espinhos secretores, foram amostradas porções areolares dos cladódios contendo espinhos em diferentes estágios de desenvolvimento. As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético e álcool etílico 50%) (Johansen 1940) durante 24 horas, desidratadas em série etílica e emblocadas em resina metacrilato Leica®. Secções transversais e longitudinais (5µm de espessura) foram obtidas de forma seriada em micrótomo rotativo semiautomático Leica® e coradas com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964). Lâminas permanentes foram montadas em resina sintética Permount®.

O laminário foi analisado ao microscópio Leica DMR em campo claro. Algumas amostras foram analisadas sob luz polarizada para melhor visualização de cristais. Os

resultados foram documentados com câmera digital acoplada Leica (DFC425), no Laboratório de Pesquisas em Anatomia Vegetal (LaPAV), IBB, UNESP.

### **Testes histoquímicos**

Para identificação das principais classes de compostos químicos presentes nas células dos espinhos secretores, amostras de material fresco foram seccionadas com auxílio de micrótomo de Ranvier. As secções foram tratadas com reagente de Fehling para identificação de açúcares redutores (Purvis *et al.* 1964); solução de vermelho de rutênio 0,02% para polissacarídeos ácidos e mucilagens (Jensen 1962); ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos (Taboga & Vilamaior 2001); reagente de Lugol para grãos de amido (Johansen 1940); Sudan IV para lipídios totais (Johansen 1940); azul mercúrio de bromofenol para proteínas (Mazia *et al.* 1953); solução de cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (Johansen 1940) e ácido clorídrico 10% para identificação de cristais de oxalato de cálcio (Kraus & Arduin 1997). Testes controle foram realizados conforme as indicações dos descritores de cada técnica. O material foi analisado ao microscópio Leica DMR em campo claro e os resultados documentados com câmera digital acoplada Leica (DFC425) no Laboratório de Pesquisa em Anatomia Vegetal, IBB, UNESP.

Para a detecção de polissacarídeos ácidos, secções de material fresco foram tratadas com Laranja de Acridina (Armstrong 1956) e analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser SP5 – Leica, sob excitação de 460 nm e emissão de 650 nm (Rost 1995; Los Rios *et al.* 2002) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do IBB, UNESP.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - convencional**

Para as análises convencionais em MET, amostras obtidas a partir de espinhos em fase secretora foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante quatro horas. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, desidratadas em série cetônica e embebidas em Araldite (Machado & Rodrigues 2004). Foram obtidas secções semifinas da região basal, mediana e apical dos espinhos secretores. Secções ultrafinas (70 nm) foram contrastadas com solução saturada de acetato de uranila (Watson 1958) e em citrato de chumbo (Reynolds 1963).

O processamento das amostras foi realizado no CME do IBB, UNESP, Botucatu. As análises das amostras foram realizadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM100CX II, no laboratório de Microscopia Eletrônica, no Departamento de Biologia

Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (BIOCEL), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP- USP).

### **Citoquímica ultraestrutural**

Para impregnação do sistema de endomembranas, foi utilizada a técnica ZIO (Reinecke & Walther 1978). Amostras pós-fixadas em tetróxido de ósmio foram submetidas a lavagens em tampão fosfato com sacarose 8,5% e tampão TRIS-aminometano; a seguir, foram incubadas em solução de tetróxido de ósmio/iodeto de zinco (ZIO). Posteriormente, o material foi lavado em tampão TRIS-aminometano e processado conforme protocolo convencional.

Para detecção de carboidratos nas células secretoras, foi empregado o Método de Thiery (1967). Amostras foram processadas como na metodologia convencional para MET até a obtenção de cortes ultrafinos. A seguir, os cortes foram tratados com solução aquosa de ácido periódico 1 %, lavados em água destilada e mantidos em solução de tiosemicarbazida a 1 % durante 72 horas. Posteriormente, os cortes foram submetidos a série decrescente de ácido acético e mantidos em solução aquosa de proteinato de prata 1 % durante 30 minutos na ausência de luz.

As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Fei Tecnai Spirit (80 kV) no Centro de Microscopia Eletrônica do IBB, UNESP.

### **Análise química do exsudato**

Cladódios jovens de ambas as espécies medindo cerca de 10cm de comprimento, foram recobertos com sacos de voal para evitar a remoção da secreção por formigas.

Para detecção da presença de glicose, gotas do exsudato encontradas sobre os espinhos secretores de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* foram coletadas em tiras-testes (Uri-test-11 INLAB).

Para análise química da secreção, amostras do exsudato liberado pelos espinhos foram coletadas durante o período de março a outubro de 2018 em dias claros e consecutivos, no início da manhã (8:00h). A secreção acumulada no ápice dos espinhos foi coletada em filtro de papel Whatman<sup>TM</sup> grade 1 (Sigma-Aldrich) recortado em formato triangular (Amato & Petit 2017) com tesoura esterilizada. A secreção foi coletada a partir de contato direto com o vértice maior do triângulo. Os fragmentos de papel foram pesados antes e após a coleta do exsudato. Após a secagem em temperatura ambiente, os fragmentos de filtro de papel Whatman<sup>TM</sup> foram estocados a -20°C (Nepi *et al.* 2012).

Após o descongelamento das amostras em estufa à 40°C, durante 2 horas, o exsudato foi removido das tiras de papel filtro por eluição estática em água destilada por 4 minutos, seguido de centrifugação por 5 minutos a 11000g. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando uma coluna LC1 (Waters). Alíquotas de 20mL da amostra e da solução padrão foram injetadas. Água ultra pura (MilliQ, pH 7) em fluxo de 0,5ml por 21 minutos foi usada como fase móvel. Os açúcares foram separados em uma coluna (Water-Sugar Pack I) (6,5-300mm), mantidos a 90°C e identificados com detector de índice de refração (Waters 2410) (Stahl *et al.* 2012).

A análise dos aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com coluna de troca iônica Novapak C18 (15mm x 4,6mm) e detector de fluorescência Water 470 (excitação a 295nm; detecção a 350nm) (Nepi *et al.* 2012). Solvente composto de tampão TEA-fosfato pH 5,0 e solução de acetonitrila em água (6:4) foi utilizado como fase móvel em um fluxo de 1,0 ml por minuto. As alíquotas foram derivatizadas com reagente fluorescente AQC e tampão borato 0,02M, pH 8,6. A excitação e emissão de fluorescência nos comprimentos de ondas de 250 e 480 nm, respectivamente, foram usadas para detecção dos aminoácidos.

## RESULTADOS

### Morfologia das aréolas e observações em campo

Nas aréolas de *B. brasiliensis* são observadas folhas reduzidas, tricomas tectores, gloquídeos, espinhos secretores (Fig. 1B e C) e longos espinhos lignificados (Fig. 1D e E). Os gloquídeos são pequenos espinhos não-secretores (com comprimento médio de 1mm) e apresentam coloração amarronzada (Fig. 1B). Espinhos lignificados apresentam coloração esbranquiçada (Fig. 1D e E) e são bastante longos podendo atingir aproximadamente 3,5 cm de comprimento. Um espinho secretor está presente em cada aréola (Fig. 1B); esses são maiores que os gloquídeos, apresentando cerca de 1,42mm de comprimento e coloração amarronzada (Fig. 1B). Gota de secreção hialina pode se acumular na porção apical dos espinhos secretores (Fig. 1B) nas horas mais frescas do início da manhã (8:00h-9:00h), tornando-se viscosa com o aumento da temperatura matutina e diminuição da umidade relativa do ar, apresentando-se totalmente polimerizadas (Fig. 1C) por volta do 12:00h. A exsudação em cada espinho durou de dois a três dias. Formigas do gênero *Camponotus* sp. (Fig. 1D e E), *Crematogaster* sp. e *Cephalotes* sp. foram observadas sobre os cladódios de *B.*



*brasiliensis*. A presença desses insetos foi restrita aos períodos de setembro de 2017; abril, maio e de agosto a outubro de 2018.

Em *N. cochenillifera*, gloquídeos e espinhos secretores que se dispõem na axila de folhas reduzidas (Fig. 2B-D) compõem as aréolas. As folhas reduzidas são suculentas, com formato cônico (Fig. 2B) e decíduas. Os gloquídeos apresentam cerca de 1mm de comprimento, com base alargada, ápice filado e coloração levemente amarronzada (Fig. 2C). Espinhos lignificados com coloração amarronzada medindo aproximadamente 1cm de comprimento (Fig. 2E) ocorrem em porções caulinares mais velhas. Nessa espécie, um a dois espinhos secretores foram observados em cada aréola (Fig. 2C). Os espinhos secretores, em fase ativa de secreção, apresentam aproximadamente 1,41mm de comprimento. Durante a fase secretora, apresentam aspecto translúcido (Fig. 2C) e pequenas gotas de exsudato hialino podem ser observadas em seu ápice (Fig. 2B e C) nas primeiras horas da manhã (8:00h-9:00h). Tais gotas de exsudato tornam-se viscosas (Fig. 2D) em contato com o ambiente conforme o aumento da temperatura matutina, sendo que por volta do 12:00h estão totalmente polimerizadas (Fig. 2D). A exsudação em cada espinho secretor durou por cerca de três dias. Formigas do gênero *Cephalotes* sp. (Fig. 2F), *Pheidole* sp. (Fig. 2G), e *Crematogaster* sp. (Fig. 2H e I) foram observadas movimentando-se pelas aréolas, especialmente na região axilar das folhas reduzidas onde se encontram os espinhos secretores. As formigas mostraram-se mais numerosas (6 a 15 indivíduos por segmento do cladódio) e ativas na coleta de secreção durante o dia; o número de formigas visitando as aréolas reduziu consideravelmente (1 a 4 formigas por cladódio) durante a noite. Visitas por formigas aos indivíduos de *N. cochenillifera* foram registradas ao longo de todo o período de observação.

Em *B. brasiliensis* (Fig. 1E) e *N. cochenillifera* (Fig. 2H-J), as formigas foram capazes de remover a secreção acumulada no ápice dos espinhos utilizando seu aparelho bucal.

### **Ontogenia e caracterização anatômica dos espinhos secretores**

Em ambas as espécies, os espinhos secretores são formados a partir do meristema areolar (Fig. 3A). Seis estágios de desenvolvimento dos espinhos secretores, em ambas as espécies, foram identificados:

Estágio 1 (Fig. 3B): Pequenas protuberâncias formadas por duas a quatro camadas de meristema fundamental e revestidas por protoderme surgem na superfície das aréolas. Essas protuberâncias são constituídas por células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo volumoso.

Estágio 2 (Fig. 3C): Ocorre proliferação das células que compõem as protuberâncias fazendo com que o primórdio de espinho secretor se torne mais volumoso e adquira formato de domo. As células localizadas na porção mais basal do primórdio de espinho tornam-se mais volumosas e mais vacuolizadas que as células localizadas na porção superior.

Estágio 3 (Fig. 3D): Na porção apical as células são pequenas, com citoplasma bastante denso e abundante e núcleo volumoso. Na região basal do primórdio de espinho, as células apresentam-se gradativamente mais volumosas e vacuolizadas que as células da porção apical. Nesse estágio, o primórdio de espinho adquire formato papiliforme, com ápice mais afilado e base mais alargada.

Estágio 4 (Fig. 3E-H): Três regiões tornam-se distintas no corpo do espinho em formação. Na região basal as células epidérmicas e as células que preenchem o corpo dos espinhos secretores são isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo volumoso, e vacuoma moderadamente desenvolvido. Na região mediana do espinho, as células mantêm citoplasma denso e abundante; as células epidérmicas mantêm formato isodiamétrico, enquanto que as células que preenchem essa região vão se tornando fusiformes. Na porção apical dos espinhos secretores, as células são fusiformes; as células que preenchem o espinho secretor apresentam citoplasma menos abundante e vacuoma desenvolvido; na epiderme, a extremidade inferior de cada célula parece se tornar mais sobressalente. Nesse estágio, a morfologia da estrutura em formação já se assemelha à do espinho totalmente diferenciado.

Estágio 5 (Fig. 4A-F; 5A-F): Essa fase do desenvolvimento corresponde ao espinho ativo em secreção. Em ambas as espécies, em microscopia eletrônica de varredura, a superfície dos espinhos secretores mostrou-se revestida por células epidérmicas com formato fusiforme com extremidades afiladas e porção mediana mais larga e superfície lisa (Fig. 4A e B; 5A e B); em nenhuma das espécies foram observados poros ou aberturas no tecido de revestimento para liberação de secreção. Em corte longitudinal, os espinhos secretores, em toda sua extensão, são revestidos por epiderme unisseriada constituída por células volumosas, com paredes pecto-celulósicas, citoplasma abundante e núcleo volumoso (Fig. 4C; 5C); as células epidérmicas apresentaram um arranjo mais frouxo, principalmente na porção apical dos espinhos, sendo que a extremidade inferior de cada célula pode sofrer um breve desprendimento e se tornar saliente (Fig. 4C e F; 5F). As células que preenchem a região basal dos espinhos secretores são pequenas, isodiamétricas, com paredes pecto-celulósicas delgadas, citoplasma denso e núcleo volumoso (Fig. 4C-E; 5C e D), o que as tornam distintas das células parenquimáticas subjacentes ao espinho (Fig. 4D, 5C). Feixes vasculares foram observados na porção basal dos espinhos secretores (Fig. 5C-E) de ambas as espécies.

As células que preenchem a região mediana-basal do espinho secretor de ambas as espécies adquirem formato fusiforme e apresentam citoplasma menos denso e núcleo evidente; essas células vão se alongando gradativamente e se tornando mais vacuolizadas em direção ao ápice (Fig. 4E; 5D). As células que preenchem a porção apical dos espinhos secretores de ambas as espécies são alongadas, com formato fusiforme, paredes pecto-celulósicas e vacuoma desenvolvido; apresentam núcleo volumoso também com formato fusiforme (Fig. 4F; 5F).

Estágio 6 (Fig. 4G-I; 5G e H): Espinhos nesse estágio de desenvolvimento encontram-se em fase pós-secretora. A porção basal dos espinhos de *B. brasiliensis* permanece constituída por células com aspecto meristemático, com pequeno tamanho, paredes pecto-celulósicas delgadas, citoplasma bastante denso, núcleo volumoso e vacuoma reduzido (Fig. 4G); em *N. cochenillifera*, essa região passa a ser constituída por células tipicamente parenquimáticas com paredes pecto-celulósicas delgadas, citoplasma reduzido, vacúolo desenvolvido e núcleo volumoso (Fig. 5G). Cristais de oxalato de cálcio em formato de drusas continuam presentes na região basal dos espinhos e nas células parenquimáticas do cladódio (Fig. 4H), em ambas as espécies. Feixes vasculares continuam presentes na porção basal dos espinhos na fase pós-secretora (Fig. 4G e H) de ambas as espécies. As porções mediana e apical dos espinhos secretores tornam-se preenchidas por células alongadas, com paredes espessas e lignificadas, com pouco ou nenhum conteúdo (Fig. 4G-I; 5G e H).

### **Histoquímica dos espinhos secretores**

Espinhos secretores de ambas as espécies, em fase ativa de secreção, reagiram positivamente para a presença de açúcares redutores (Fig. 6A), polissacarídeos neutros (Fig. 6B) e ácidos (Fig. 6C) e proteínas (Fig. 6D) (Tabela 1). Grãos de amido foram detectados nas células parenquimáticas do segmento caulinar subjacente à região basal dos espinhos, em especial nas proximidades dos tecidos vasculares (Fig. 6E).

### **Caracterização ultraestrutural e citoquímica dos espinhos secretores**

As células epidérmicas das regiões basal e mediana dos espinhos secretores de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* apresentam formato irregular com porções salientes (Fig. 7A) e/ou extremidades afiladas que se projetam em direção às células vizinhas (Fig. 7B). Essas células exibiram paredes delgadas; entretanto, a parede periclinal externa é relativamente mais espessa que as demais paredes e apresenta microfibrilas de celulose num arranjo laxo e revestida por cutícula delgada (Fig. 7C). O núcleo é volumoso e o citoplasma denso rico em organelas (7A-C). Os vacúolos são pouco desenvolvidos (7A-C). No citoplasma foram

observados mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, polirribossomos, dictiossomos e plastídios com tilacóides pouco desenvolvidos contendo plastoglóbulos (Fig. 7A-C).

As células que preenchem a região basal de espinhos secretores de ambas as espécies estudadas apresentam contorno irregular, com porções que se projetam entre as outras células (Fig. 8A; 9A). As paredes são delgadas e sinuosas (Fig. 8A; 9A). A lamela média nessa região é bastante espessada, principalmente no ângulo entre as células (Fig. 8A; 9A). Campos de pontoação primários com plasmodesmos amplos conectam as células entre si (Fig. 9B e C). Nessa região dos espinhos, as células apresentam citoplasma denso e abundante, núcleo volumoso com nucléolo evidente e vacúolos pequenos contendo material floculado (Fig. 9A e B); em *B. brasiliensis* o vacuoma mostrou-se mais desenvolvido (Fig. 8A). No citoplasma são observadas mitocôndrias, polirribossomos, dictiossomos, vesículas e plastídios (Fig. 8B; 9B e D); os plastídios apresentam sistema interno de membranas pouco desenvolvido e inclusões osmiofílicas (Fig. 8B; 9B e D); alguns apresentam grãos de amido (Fig. 9B e D); os dictiossomos são abundantes e constituídos por quatro a seis cisternas dilatadas; vesículas foram observadas associadas às extremidades das cisternas dos dictiossomos ou dispersas no citoplasma periférico (Fig. 8B; 9E); produtos da reação do ZIO impregnaram as membranas dos dictiossomos e suas vesículas adjacentes, além das membranas internas de plastídios (Fig. 9E). Polissacarídeos neutros presentes na parede celular (Fig. 9F e G) e no citoplasma (Fig. 9H) foram marcados pelo método de Thiéry.

Em ambas as espécies, as células que preenchem a região mediana dos espinhos secretores são longitudinalmente alongadas com extremidades afiladas que se projetam entre as outras células (Fig. 8C; 10A e B). Espaços intercelulares são observados (Fig. 8C; 10A e B). Em *N. cochenillifera*, essas células apresentam paredes pecto-celulósicas delgadas com contorno bastante sinuoso (Fig. 10A); em *B. brasiliensis*, as paredes são espessas, não lignificadas, com arranjo frouxo das microfibrilas de celulose (Fig. 8C e D). Plasmodesmos conectam as células entre si (Fig. 8D; 10C e D). Essas células apresentaram citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo evidente e vacúolos com diferentes tamanhos (Fig. 8C; 10A). Os vacúolos podem apresentar material floculado e inclusões membranosas (Fig. 8C; 10B). Em *B. brasiliensis*, o vacuoma é mais desenvolvido (Fig. 8C). No citoplasma foram observadas mitocôndrias (Fig. 8D; 10C), dictiossomos (Fig. 8E), retículo endoplasmático rugoso (Fig. 8D e F; 10C e D), polirribossomos (Fig. 8D-F; 10C e D) e plastídios com tilacóides pouco desenvolvidos (Fig. 8E e F) contendo grãos de amido (Fig. 10D). Cordões de filamentos de actina foram observados no citoplasma (Fig. 8E).

Na região apical dos espinhos secretores, as células epidérmicas mostraram face externa saliente ou papiliforme (Fig. 10E). Exibiram parede periclinal externa espessa com

arranjo laxo das microfibrilas de celulose (Fig. 10E-G), constituindo pequenas fenestradas (Fig. 10G). Ramificações elétron-densas se projetam em direção à cutícula (Fig. 10F e G). O citoplasma é reduzido devido à presença de um grande vacúolo (Fig. 10E); mitocôndrias foram observadas no citoplasma (Fig. 10F). As células que preenchem a região apical dos espinhos apresentam formato irregular, citoplasma reduzido e vacuoma desenvolvido (Fig. 10E); no citoplasma dessas células foram observadas mitocôndrias e plastídios com grãos de amido (Fig. 10H). As células mais centrais dessa região apresentam paredes bastante espessas (Fig. 10I e J); na maioria dessas células, o citoplasma é bastante reduzido ou ausente (Fig. 10I); em algumas delas, observam-se mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e vacúolos (Fig. 10J).

### **Caracterização química da secreção**

O teste realizado com auxílio de tiras-teste para detecção de glicose na secreção liberada pelos espinhos secretores em ambas as espécies indicou a presença de glicose. O pH do exsudato coletado manteve-se na faixa entre 5 e 6.

Os carboidratos presentes na exsudato liberado pelos espinhos secretores foram glicose, frutose e sacarose (Tabela 2). Em ambas espécies, o exsudato foi sacarose-dominante, com proporção de sacarose de 88,37% em *B. brasiliensis* e de 90,1% em *N. cochenillifera*.

Diversos aminoácidos foram identificados no exsudato liberado pelos espinhos secretores de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* (Tabela 3). O aminoácido Histidina foi o mais abundante e o aminoácido Glicina foi o menos abundante no exsudato de ambas as espécies (Tabela 3).

## **DISCUSSÃO**

Os espinhos secretores de *Brasiliopuntia brasiliensis* e *Nopalea cochenillifera* apresentaram aspectos ontogenéticos, morfológicos e funcionais bastante semelhantes. Em ambas as espécies, os dados obtidos por meio das análises químicas da secreção e das observações de campo, aliados aos resultados dos testes histoquímicos e aos aspectos anatômicos e ultraestruturais dos espinhos secretores confirmaram tratar-se de nectários extraflorais (NEFs).

Diversos tipos morfológicos de NEFs têm sido descritos em Cactaceae (Blom & Clark 1980; Mauseth 1982; Díaz-Castelazo *et al.* 2005; Hunt 2006; Almeida *et al.* 2012; Mauseth *et al.* 2016). Uma importante revisão sobre NEFs em cactos (Mauseth *et al.* 2016) descreve quatro morfotipos de nectários que podem ser encontrados nos cladódios: a) espinhos

altamente modificados, curtos e com base alargada; b) nectários semelhantes a espinhos comuns, sem modificações aparentes; c) folhas reduzidas a escamas que ocorrem na base das aréolas; e d) NEFs representados por regiões epidérmicas e corticais que ocorrem na base ou ao redor das aréolas. Em *B. brasiliensis* e de *N. cochenillifera*, os NEFs se assemelham a espinhos comuns.

A nomenclatura utilizada para designação dessas estruturas pode ser conflitante dependendo da base bibliográfica utilizada. Tradicionalmente, dois tipos de espinhos são descritos em Cactaceae: os espinhos lignificados (presentes na maioria das espécies da família) e os gloquídeos (um tipo de espinho bastante pequeno considerado sinapomorfia da subfamília Opuntioideae a qual pertencem *B. brasiliensis* e de *N. cochenillifera*) (Gibson & Nobel 1986; Arruda 2010). Espinhos e gloquídeos são estruturas multicelulares e multisseriadas. Entretanto, espinhos são inteiramente constituídos por células lignificadas, enquanto que gloquídeos mantêm a base constituída por células com paredes não-lignificadas e apresentam células epidérmicas em forma de farpas (Boke 1944; Gibson & Nobel 1986; Arruda 2010). Assim sendo, a presença de células vivas com características secretoras na base dos NEFs e a ocorrência de células epidérmicas com extremidades que se desprendem do tecido (lembrando farpas) em *B. brasiliensis* e de *N. cochenillifera*, categorizariam essas estruturas como gloquídeos. Em 1930, Daumann já sugeriu que os nectários extraflorais de *Opuntia monacantha* seriam gloquídeos modificados. Entretanto, em estudo atual e específico sobre os nectários de cactos, Mauseth *et al.* (2016) utilizam o termo “espinho secretor” para se referir a qualquer tipo de espinho que produza secreção. Considerando que os gloquídeos são classificados como um tipo de espinho, nesse trabalho adotamos manter o termo “espinho secretor” (*lato sensu*) para se referir aos NEFs observados em *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera*.

O processo de formação e desenvolvimento dos espinhos secretores se assemelha em ambas espécies estudadas. Em *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* os espinhos secretores são formados a partir do meristema areolar e apresentam diferenciação basípeta e centrífuga, como observado em espinhos lignificados e gloquídeos de outras espécies de Cactaceae (Boke 1944, 1951; Gibson & Nobel 1986; Arruda 2010). Nessas espécies, os espinhos expandidos em estágio secretor mantêm-se preenchidos por células com paredes não-lignificadas; no entanto, espinhos em fase pós-secretora apresentam região apical e mediana formadas por células lignificadas com protoplasto reduzido ou ausente.

Nossas análises aos microscópios de luz e eletrônico mostraram que os espinhos secretores de *B. brasiliensis* e de *N. cochenillifera* apresentam três regiões morfológicamente distintas: basal, mediana e apical. As características histológicas e celulares dessas regiões nos

permitem sugerir que cada uma delas atuam de maneira distinta no processo secretor. Nesse sentido, a região basal dos espinhos secretores em ambas as espécies parece ser a responsável pela síntese da secreção propriamente dita, enquanto que a região mediana parece estar mais envolvida no transporte da secreção até a região apical, onde ocorre a liberação do exsudato para o meio externo.

A região basal dos espinhos secretores de *B. brasiliensis* e de *N. cochenillifera* é constituída principalmente por células com aspectos comuns a células secretoras, tais como paredes delgadas, núcleo volumoso, e citoplasma denso rico em mitocôndrias, dictiossomos, plastídios e retículo endoplasmático. Nessas células, a utilização de métodos citoquímicos possibilitou identificar a origem dictiossomal das vesículas dispersas no citoplasma e a presença de acúmulos de polissacarídeos nas paredes celulares e no citoplasma; além disso, açúcares redutores e polissacarídeos foram histoquimicamente detectados nessas células. Esses resultados confirmam a atuação desse tecido na produção de polissacarídeos. Assim, essa região corresponde ao “tecido parenquimático especializado” (Fahn 1979) ou “parênquima nectarífero” (Nepi 2007) descrito em literatura para outros tipos de nectários.

A presença de grãos de amido nas células parenquimáticas adjacentes à região basal dos espinhos secretores sugere ser essa a fonte de carboidratos para a produção do néctar. Entretanto, a abundância de amido observada nas espécies estudadas por meio dos testes histoquímicos e em MET é menor quando comparada com o parênquima subnectarífero de algumas espécies (Fahn 1979; Paiva & Machado 2008). Segundo Pacini *et al.* (2003), os carboidratos que participarão da composição do néctar nem sempre são armazenados na forma de amido, podendo ser derivados imediatos da fotossíntese realizada em qualquer parte da planta. De fato, a vascularização da porção basal dos espinhos secretores por xilema e floema em *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* sugere que substâncias utilizadas na síntese da secreção possam ser transportadas pelos tecidos vasculares a partir de outras porções do cladódio.

Dentre as Opuntioideae, existem relatos de espinhos secretores vascularizados (Diaz-Castelazo *et al.* 2005) e não-vascularizados (Sandoval-Molina *et al.* 2018). Tecidos vasculares são particularmente importantes em nectários por facilitarem a chegada de substâncias que serão utilizadas na produção do néctar (Evert 2006). Frey-Wyssling & Aghte (1950 *apud* Nepi 2007) a concentração do néctar produzido está associada à vascularização que o nectário recebe. Nesse sentido, os autores propõem que somente floema ocorre em nectários produtores de néctar mais concentrado, enquanto que em nectários produtores de néctar com baixa concentração de açúcares são irrigados por xilema e floema, assim como observado nas espécies estudadas. Embora a fase secretora seja restrita a uma determinada fase do

desenvolvimento desses espinhos, a vascularização dessas estruturas viabiliza sua manutenção nas aréolas de cladódios jovens, favorecendo sua atuação na proteção desses caules contra herbivoria.

A presença de células com paredes pecto-celulósicas sinuosas, o crescimento intrusivo das células, e a ocorrência de espessamentos de lamela média nos ângulos entre as células da região basal dos espinhos secretores em *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* favorecem o movimento de substâncias hidrofílicas através das paredes celulares (Evert 2006) indicando que o transporte do néctar pode ocorrer via apoplasto. Ainda, a projeção de extremidades celulares em direção às células vizinhas num modelo que lembra crescimento intrusivo (Machado *et al.* 2017) pode facilitar o transporte da secreção entre as células. Entretanto, a abundância de plasmodesmos nas paredes dessas células indica ocorrência de transporte simplástico e é uma característica descrita para NEFs de outras espécies vegetais, inclusive Cactaceae (Sandoval-Molina *et al.* 2018). O transporte de substâncias via simplasto e apoplasto simultaneamente tem sido registrado em nectários de diversas espécies (Davis *et al.* 1988; Stpiczynska 2003; Wist & Davis 2006). Assim, em *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera*, o néctar produzido na porção basal dos espinhos é transportado via simplasto e apoplasto para a porção mediana dos espinhos. De fato, polissacarídeos foram histoquimicamente detectados na região mediana dos espinhos.

Da mesma forma que na região basal, a região mediana dos espinhos secretores de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* apresenta células caracterizadas pelo contorno sinuoso das paredes celulares, crescimento intrusivo, intumescimento da lamela média e paredes espessas com arranjo frouxo das microfibrilas de celulose, o que pode estar relacionado ao favorecimento do transporte apoplástico da secreção nessa região. Plasmodesmos também ocorrem nas paredes dessas células em ambas as espécies, sugerindo que na região mediana dos espinhos, o transporte da secreção também continua via simplasto. Na porção citoplasmática da região mediana dos espinhos secretores de *B. brasiliensis* foram observados filamentos de actina. A marcação positiva com Azul de mercúrio de bromofenol nessa região pode estar associada à presença de tais filamentos proteicos nessas células. Os filamentos de actina podem estar associados com movimentos de vesículas no citoplasma das células (Valderrama *et al.* 2001; Stamnes 2002; Tozin & Rodrigues 2017). De acordo com Tozin & Rodrigues (2017), células secretoras em plantas apresentam distribuição diferencial de microfilamentos de actina e microtúbulos de acordo com a composição da secreção produzida; segundo os autores, filamentos de actina são mais intensamente marcados em células secretoras de substâncias hidrofílicas.



No ápice dos espinhos secretores, as células que preenchem a região central apresentam formato bastante irregular e paredes pecto-celulósicas bastante espessas onde se observa o arranjo frouxo das microfibrilas de celulose. Plasmodesmos não foram observados nessa região; além disso, o citoplasma dessas células torna-se reduzido. Assim, sugerimos que nessa região, o transporte apoplástico da secreção seja priorizado. As células epidérmicas nessa região apresentam parede periclinal externa bastante espessa, com aspecto laxo e ramificações elétron-densas que se projetam em direção à cutícula. Tais ramificações caracterizam teicóides que são microcanais ricos em pectina (Evert 2006). Tais microcanais são responsáveis pelo aumento da porosidade da parede celular à macromoléculas (Taiz & Zeiger 1998) e representam uma rota apoplástica para a passagem da secreção hidrofílica em meio aos materiais hidrofóbicos da cutícula (Rocha & Machado 2009). Considerando a ausência de estômatos modificados e de poros ou aberturas na superfície dos espinhos analisados, essa parece ser a rota de liberação do exsudato para a superfície dos espinhos de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera*, sugerindo a permeabilidade da cutícula à secreção (Stpiczynska *et al.* 2005; Evert 2006; Rocha & Machado 2009). Diferentemente do sugerido por Sandoval-Molina *et al.* (2018) para *Opuntia robusta*, em *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera*, o néctar pode ser liberado através da epiderme intacta, sem necessidade de manipulação da superfície dos espinhos por formigas.

Cristais de oxalato de cálcio (drusas) foram detectados no parênquima adjacente a região basal dos espinhos secretores de ambas espécies, o que parece ser um aspecto comum em nectários extraflorais (Horner *et al.* 2003; Stpiczynska *et al.* 2003; Ávila-Argáez *et al.* 2018). Considerando que o mecanismo de transporte de sacarose em plantas envolve a atuação de ATPases e que o excesso de cálcio é capaz de inibir a atividade dessa enzima, a imobilização de íons de cálcios na forma de cristais é importante para o funcionamento glandular (Nepi 2007). Além disso, a presença de cristais de oxalato de cálcio pode ser eficiente na proteção contra herbivoria (Prychid & Rudall 1999), o que se faz importante principalmente em regiões meristemáticas, como é o caso da região areolar das espécies estudadas.

Durante nossas observações de campo, visitas de formigas aos espinhos secretores e a remoção do exsudato pelos insetos foram registradas em ambas as espécies estudadas. Foram observadas formigas dos gêneros *Campanotus*, *Crematogaster*, *Cephalotes* e *Pheidole*. Há diversos relatos sobre o patrulhamento de formigas e sua interação com NEFs em espécies de Cactaceae (Pickett & Clark 1979; Blom & Clark 1980; Oliveira *et al.* 1999; Díaz-Castelazo *et al.* 2005; Mauseth 2016). O exsudato produzido pelos espinhos secretores de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* mostrou-se como uma solução aquosa rica em açúcares e aminoácidos,

assim como registrado para NEFs de outros representantes de Cactaceae (Pickett & Clark 1979; Ruffner & Clark 1986), o que o torna bastante atrativo para formigas (Lanza 1998; Bluthgen & Fiedler 2004; Byk & Del Claro 2011). No exsudato produzido por ambas as espécies aqui estudadas, dos dezenove aminoácidos identificados, nove são considerados aminoácidos essenciais para a nutrição de insetos (Bentley 1977; Pickett & Clark 1979). A marcação positiva para proteínas ao longo do corpo dos espinhos secretores pode estar relacionada à presença de aminoácidos na secreção.

Diversos estudos indicam que NEFs proporcionam vários benefícios às plantas, uma vez que formigas atraídas pela secreção dos NEFs, além da função de patrulhamento e limpeza das plantas, podem protegê-las de organismos nocivos como fungos e outros insetos (Ness 2006; Chamberlain & Holland 2008; Mauser *et al.* 2016). Além disso, as formigas atraídas pelos NEFs podem melhorar a qualidade nutricional do solo, uma vez que a construção de seus ninhos envolve a estocagem de alimentos.

Nossos dados nos permitiram concluir que os espinhos secretores de *B. brasiliensis* e *N. cochenillifera* apresentam origem, desenvolvimento e funcionamento semelhantes entre si e que podem ser considerados nectários extraflorais.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela bolsa de mestrado à S.C.M. Silva (Proc. 2017/14891-5), ao CNPq pela bolsa de Produtividade à T.M. Rodrigues (Proc. 303981/2018-0), à CAPES pelo apoio financeiro (Código de Financiamento 001), à Dra. L.S. Aona pela identificação das espécies vegetais e ao Dr. R.S. Camargo pela identificação das formigas. Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME), IBB, UNESP pelo auxílio no processamento das amostras; ao Centro de Pesquisa IV, Faculdade de Ciências, UNESP- Bauru e ao laboratório de Microscopia Eletrônica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela contribuição com os registros fotográficos das amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Dias A.C.A., Yamamoto K., Castro M.M. (2011) Stipular extranuptial nectaries new to *Polygala*: morphology and ontogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **166**, 40-50.
- Almeida O.J.G., Paoli A.A.S., Cota-Sánchez J.H. (2012) A macro-and micromorphological survey of floral and extrafloral nectaries in the epiphytic cactus *Rhipsalis teres* (Cactoideae: Rhipsalideae). *Flora*, **207**, 119-125.

- Amato B., Petit S. (2017) A review of the methods for storing floral nectars in the field. *Plant Biology*, **19**, 497-503.
- Anderson E.F. (2001) *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, Oregon: 776 pp.
- Armstrong J.A. (1956) Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. *Experimental Cell Research*, **11**, 640-643.
- Arruda E. (2010) Histogênese de segmentos caulinares de espécies de Opuntioideae (Cactaceae). 141 f. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Arruda E., Melo-De-Pinna G.F.A. (2016). Areolar structure in some Opuntioideae: occurrence of mucilage cells in the leaf-glochid transition forms in *Opuntia microdasys* (Lhem.) Pfeiff. *Adansonia*, **38**, 267-274.
- Ávila-Argáez M., Yáñez-Espinosa L., Badano E., Barragán-Torres F., Flores J. (2018) Extrafloral nectaries of *Cylindropuntia imbricata* (Cactaceae) in the southern Chihuahuan Desert: anatomy and interaction with ants. *Arthropod-Plant Interactions*, 1-9.
- Azevedo C.F., Silva K.R.G., Bruno R.L.A., Quirino Z.G.M. (2013) Morfoanatomia vegetativa de *Opuntia brasiliensis* (Willd) Haw. *Ambiência*, **9**, 73-82.
- Baker H.G., I. Baker (1973) Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature*, **241**, 543-545.
- Bentley B.L. (1977) Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **8**, 407-27.
- Blom P.E., Clark W.H. (1980) Observations of ants (Hymenoptera: Formicidae) visiting extrafloral nectaries of the barrel cactus, *Ferocactus gracilis* Gates (Cactaceae), in Baja California, Mexico, Southwest. *The Southwestern Naturalist*, **25**, 181-196.
- Blüthgen N., Fiedler K. (2004) Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology*, **73**, 155–166.
- Boke N.H. (1944) Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. *American Journal of Botany*, **31**, 299-316.
- Boke N.H. (1951) Histogenesis of the vegetative shoot in *Echinocereus*. *American Journal of Botany*, **38**, 23-38.
- Boke N.H. (1980) Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. *BioScience*, **30**, 9, 605-610.
- Byk J., Del-Claro K. (2011). Ant–plant interaction in the Neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology*, **53**, 327-332.

- Chamberlain S.A., Holland J.N. (2008) Density-mediated, context-dependent consumer–resource interactions between ants and extrafloral nectar plants. *Ecological Society of America*, **89**, 1364-1374.
- Daumann E. (1930) Nektarien und Bienenbesuch bei *Opuntia monacantha* Haw. *Biologia Generalis*, **6**, 353-376.
- Davis A.R., Peterson R.L., Shuel R.W. (1988) Vasculature and ultrastructure of the floral and stipular nectaries of *Vicia faba* (Leguminosae). *Botany*, **66**, 1435-1448.
- Díaz-Castelazo C., Rico-Gray V., Ortega F., Ángeles G. (2005) Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of Veracruz, Mexico. *Annals of Botany*, **96**, 1175- 1189.
- Evert R.F. (2006) *Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their Structure, Function, and Development*. 3 (Ed) John Wiley e Sons, New Jersey: 624 pp.
- Fahn A. (1979) *Secretory Structures in Plants*. Academic Press, New York: 302 pp.
- Frey-Wyssling A., Agthe C. (1950) Nektar ist ausgeschiedener Phloemsaft. *Verhandlung der schweizerischen naturforschenden Gesellschaft*, **130**, 175 - 176.
- Ganong W.F. (1894) Beiträge zur Kenntniss der morphologie und biologie der cacteen. *Flora*, **79**, 49-86.
- Gibson A.C., Nobel, P. (1986) *The cactus primer*. Haward University Press, Cambridge: pp 286.
- Horner H.T., Wanke S., Oelschlägel B., Samain M.S. (2003) Floral nectary fine structure and development in *Glycine max* L. (Fabaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **164**, 675-690.
- Hunt D. (2006) *The New Cactus Lexicon*. DH Books, Milborne Port: 373 pp.
- Jensen W.A. (1962) *Botanical Histochemistry: Principles and practice*. Freeman, San Francisco: 408 pp.
- Johansen D. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co, New York: 523 pp.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. (2008) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. 3 (Ed). Sinauer Associates, Sunderland: 464 pp.
- Koptur S. (2005) Nectar as fuel for plant protectors. In: Wäckers, F.L., Van Rijn P.C.J., Bruin J. *Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, New York: 75-108.
- Kraus J.E., Arduin M. (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Universidade Rural, Rio de Janeiro: 198 pp.

- Lanza L. (1998) Ant preferences for *Passiflora* nectar mimics that contain amino acids. *Biotropica*, **20**, 341-344.
- Lloyd F.E. (1908) Extrafloral nectaries in cacti. *Plant World*, **11**, 138-140.
- Los Rios A., Ascaso C., Grube M. (2002) Infection mechanisms of lichenicolous fungi studied by various microscopic techniques. *Bibliotheca Lichenologica*, **82**, 153-161.
- Machado S.R., Rodrigues T.M. (2004) Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica*, **27**, 135-147.
- Machado S.R., Canaveze Y., Rodrigues T.R. (2017) Structure and functioning of oil cavities in the shoot apex of *Metrodorea nigra* A. St.-Hil. (Rutaceae). *Protoplasma*, **254**, 1661–1674.
- Mauseth J.D. (1976) Cytokinin-and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, **63**, 1295-1301.
- Mauseth J.D. (1982) Development and ultrastructure of extrafloral nectaries in *Ancistrocactus scheeri* (Cactaceae). *Botanical Gazette*, **143**, 273-277.
- Mauseth J.D. (2006) Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, **98**, 901-9261.
- Mauseth J., Rebmann J.P., Machado S.R. (2016) Extrafloral nectaries in cacti. *Cactus and Succulent Journal*, **88**, 156-171.
- Mazia D., Brewer P.A., Alfert M. (1953) The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin*, **104**, 57-67.
- Nepi M. (2007) Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E. (Eds), *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht: 129-166.
- Ness J.H. (2006) A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos*, **113**, 506-514.
- Nyffeler R. (2002) Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL/trnF sequences. *American Journal of Botany*, **89**, 312-326.
- O'Brien T.P., Feder N., Cully M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**, 369-376.
- Oliveira P.S., Rico-Gray V., Díaz-Castelazo C., Castillo-Guevara C. (1999) Interaction between ants, extrafloral nectaries, and insect herbivores in neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Functional Ecology*, **13**, 623-631.

- Paiva E.A.S., Machado S.R. (2008) The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): Structural aspects during floral development. *Annals of Botany*, **101**, 125-133.
- Pacini E., Nepi, M., Vesprini J.L. (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 7-21.
- Pickett C. H., Clark W.D. (1979) The function of extrafloral nectaries in *Opuntia acanthocarpa* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, **66**, 618-625.
- Prychid C.J., Rudall P.J. (1999) Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany*, **84**, 725-739.
- Purvis M.J., Collier D.C., Walls D. (1964) *Laboratory techniques in botany*. Butterwoths, London: 371 pp.
- Reinecke M., Walter C. (1978) Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular shgroups. *Journal Cell Biology*, **78**, 839-855.
- Reynolds E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**, 208-212.
- Robards A.W. (1978) An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Hall J.L. (Ed.), *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Elsevier, New York: 343-403.
- Rocha E.A., Agra M.F. (2002) Flora do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. *Acta Botânica Brasílica*, **16**, 15-21.
- Rocha J.F., Machado S.R. (2009) Anatomy, ultrastructure and secretion of *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae) extrafloral nectary. *Revista Brasileira de Botânica*, **32**, 489-498.
- Rost F.W.D. (1995) *Fluorescence microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge and New York: 457 pp.
- Ruffner G.A., Clark D.W. (1986) Extrafloral nectar of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae): Composition and Its Importance to Ants. *American Journal of Botany*, **73**, 185-189.
- Sánchez D., Grego-Valencia D., Terrazas T., Arias S. (2015) How and why does the areole meristem move in *Echinocereus* (Cactaceae)? *Annals of Botany*, **115**, 19-26.
- Sandoval-Molina M.A., Zavaleta-Mancera H.A., León-Solano H.J., Solache-Ramos L.T., Jenner B., Morales-Rodríguez S., Patrón-Soberano A., Janczur M.K. (2018) First description of extrafloral nectaries in *Opuntia robusta* (Cactaceae): Anatomy and ultrastructure. *Plos One*, **13**, e0200422.

- Silva R.R., Sampaio V.S.B (2015) Palmas forrageiras *Opuntia ficus-indica* e *Nopalea cochenillifera*: sistemas de produção e usos. *Revista GEAMA*, **1**, 151-161.
- Scarano F.R., Duarte H.M., Ribeiro K.T., Rodrigues P.J.F.P., Barcellos E.M.B., Franco A.C., Brulfert J., Deléens E., Lüttge U. (2001) Four sites with contrasting environmental stress in southeastern Brazil: relations of species, life form diversity, and geographic distribution to ecophysiological parameters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **136**, 345-364.
- Soller A., Soffiatti P., Calvente A., Goldenberg R. (2014) Cactaceae no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, **65**, 201-219.
- Stahl J.M., Nepi M., Galetto L., Guimarães E., Machado S.R. (2012) Functional aspects of floral nectar secretion of *Ananas ananassoides*, an ornithophilous bromeliad from the Brazilian savanna. *Annals of Botany*, **109**, 1243-1252.
- Stamnes M. (2002) Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 428-433.
- Stpiczynska M. (2003) Nectar resorption in the spur of *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.) Orchidaceae – structural and microautoradiographic study. *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 119–126.
- Stpiczynska M., Davies K.L., Gregg A. (2005) Comparative Account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, **95**, 749-756.
- Taboga S.R., Vilamaior P.S.L. (2001) Citoquímica. In: Carvalho H.F., Recco-Pimentel S.M. (Eds), *A célula*. Manole, Barueri: 42-50.
- Taiz L., Zeiger E. (1998) *Plant Physiology*. 2 (Ed.) Sinauer Associates Publishers, Massachusetts: 792 pp.
- Thierry J.P (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal de Microscopie*, **6**, 987-1018.
- Tozin L.R.S., Rodrigues T.M. (2017) Morphology and histochemistry of glandular trichomes in *Hyptis villosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae) and differential labeling of cytoskeletal elements. *Acta Botanica Brasilica*, **31**, 330-343.
- Valderrama F., Duran J.M., Babia T., Barth H., Renau-Piqueras J., Egea G. (2001) Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Traffic*, **2**, 717-726.
- Watson M.L. (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology*, **4**, 475.
- Weber M.G., Keeler K.H. (2013) The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants. *Annals of Botany*, **111**, 1251-1261.

- Wist T.J., Davis A.R. (2006) Floral Nectar Production and Nectary Anatomy and Ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany*, **97**, 177-1931.
- Zappi D., Aona, L.Y.S., Taylor N. (2007) Cactaceae. In: Melhem T.S., Wanderley M.G.L., Martins S.E., Jung-Mendaçolli S.L., Shepherd G.J., Kirizawa M. (Eds.), *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo: 163-194.
- Zappi D., Taylor N. Cactaceae. In: *Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1609> (Acesso em 16 abr. 2018).



**Tabela 1.** Testes histoquímicos dos espinhos secretores em *Brasiliopuntia brasiliensis* e *Nopalea cochenillifera* (Opuntioideae, Cactaceae)

Reagente	Substância detectada	<i>B. brasiliensis</i>			<i>N. cochenillifera</i>		
		Região basal	Região mediana	Região apical	Região basal	Região mediana	Região apical
Reagente de Fehling	Açúcares redutores	+	-	-	+	-	-
Vermelho de Rutênio	Polissacarídeos neutros	+	+	+	+	+	+
PAS	Polissacarídeos ácidos	+	+	+	+	+	+
Laranja de Acridina	Polissacarídeos ácidos	+	+	+	+	+	+
Azul Mercúrio de Bromofenol	Proteínas	+	+	+	+	+	+
Sudan III	Lipídeos totais	-	-	-	-	-	-
Cloreto Férrico	Compostos fenólicos	-	-	-	-	-	-
Reagente de Lugol	Amido	-	-	-	-	-	-

Nota: += presença; -= ausência.

**Tabela 2.** Concentração de açúcares no exsudato liberado pelos espinhos secretores em *Brasiliopuntia brasiliensis* e *Nopalea cochenillifera* (Opuntioideae, Cactaceae)

Açúcares	<i>B. brasiliensis</i> (mg g <sup>-1</sup> )	%	<i>N. cochenillifera</i> (mg g <sup>-1</sup> )	%
Sacarose	190	88,37	603,15	90,10
Glicose	15,5	7,20	29,95	4,47
Frutose	9,5	4,42	36,25	5,41
Total	215		669,35	

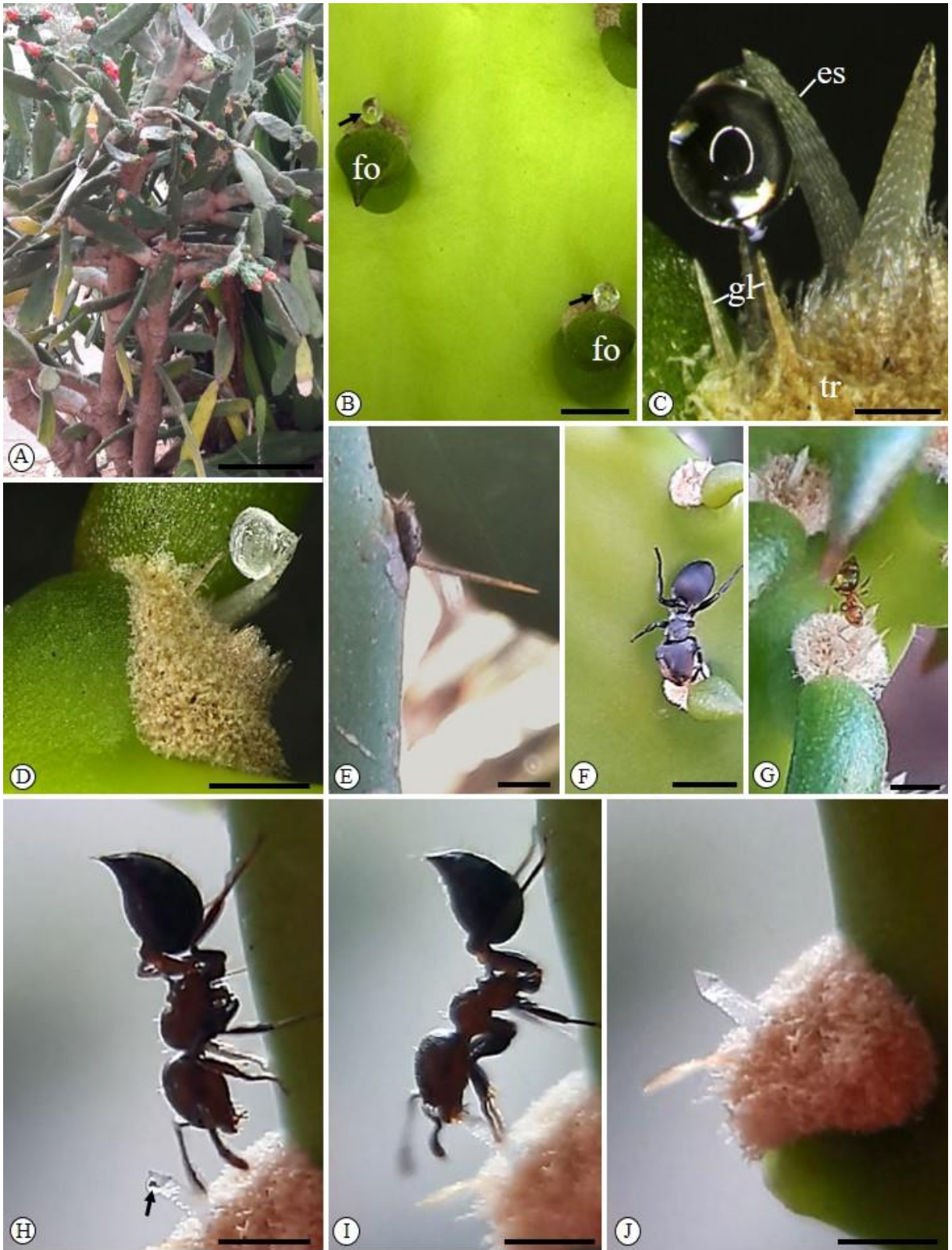
**Tabela 3.** Concentração de aminoácidos no exsudato liberado pelos espinhos secretores em *Brasiliopuntia brasiliensis* e *Nopalea cochenillifera* (Opuntioideae, Cactaceae)

Aminoácidos	Concentração (pmol/mg)	
	<i>B. brasiliensis</i>	<i>N. cochenillifera</i>
Ac. Aspártico <sup>b</sup>	36,7	4,4
Serina <sup>b</sup>	457,5	43,6
Ac. Glutâmico <sup>b</sup>	46,4	3,2
Glicina <sup>b</sup>	25,7	1,34
Histidina <sup>a</sup>	7442,7	271,3
Arginina <sup>a</sup>	42,6	2,7
Treonina <sup>a</sup>	294,1	29,1
Alanina <sup>b</sup>	312,5	11,1
Prolina <sup>b</sup>	1106,4	101,8
Tirosina <sup>b</sup>	55,5	11
Valina <sup>a</sup>	305,9	50,5
Metionina <sup>a</sup>	68,6	7,2
Lisina <sup>a</sup>	25,8	
Isoleucina <sup>a</sup>	250,2	12,7
Leucina <sup>a</sup>		16,6
Fenilalanina <sup>a</sup>	45,3	10
Taurina <sup>c</sup>	69,5	8,1
β alanina <sup>c</sup>	62	3,3
Ácido γ aminobutírico <sup>c</sup>	378,5	34,8
Concentração total	11026	622,74
Concentração de aminoácidos proteicos (%)	95,37	92,58
Concentração de aminoácidos essenciais (%)	76,87	64,24
Concentração de aminoácidos não essenciais (%)	18,50	28,33
Concentração de aminoácidos não proteicos (%)	4,62	7,41

Nota: a= aminoácido essencial; b= aminoácidos não essenciais; c= aminoácidos não proteicos.

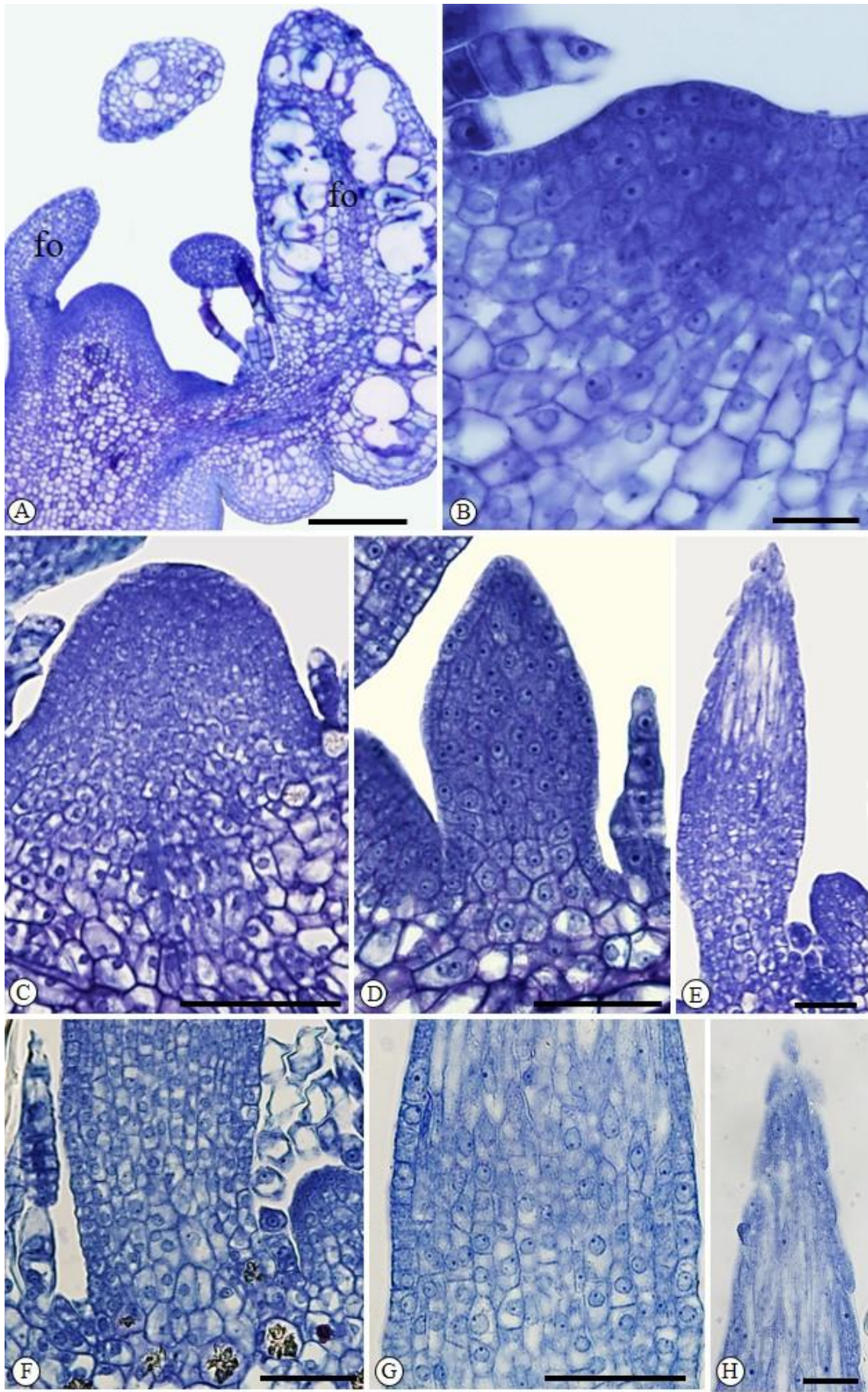


**Fig. 1.** Aspectos da morfologia externa e visita de formigas à região areolar de *Brasiliopuntia brasiliensis*. A. Indivíduo adulto. B. Detalhe de aréola mostrando tricomas, gloquídeos e espinho secretor com acúmulo de exsudato (seta) no ápice. C. Detalhe mostrando secreção polimerizada no ápice de espinho secretor. D-E. Formigas do gênero *Camponotus* removendo exsudato do ápice do espinho secretor. es: espinho secretor; fo: folha reduzida; gl: gloquídeo; tr: tricomas; el: espinho lignificado. Barras: A= 20 cm; B= 200  $\mu$ m; C= 500  $\mu$ m; D= 10 mm; E= 5 mm.



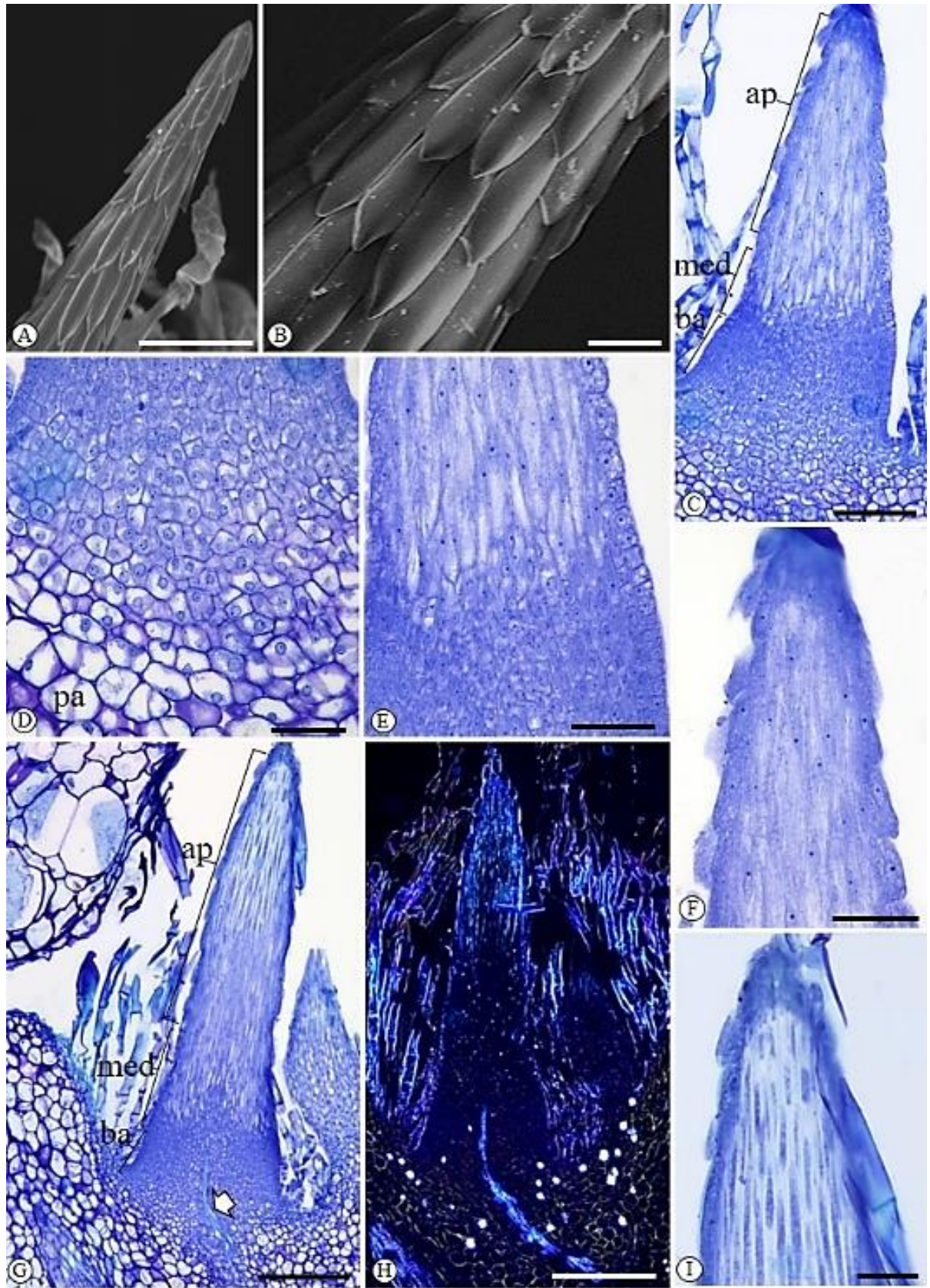
**Fig. 2.** Aspectos da morfologia externa e visita de formigas à região areolar de *Nopalea cochenillifera*. A. Indivíduo adulto. B. Aréolas sobre o cladódio contendo espinhos com secreção no ápice (seta). C. Detalhe de aréola mostrando tricomas, gloquídeos e espinho secretor com secreção no ápice. D. Secreção polimerizada no ápice de espinho secretor. E. Aréola contendo espinho lignificado. F. Formiga do gênero *Cephalotes* e; G do gênero *Pheidole* visitando a região dos espinhos secretores. H-I. Formigas do gênero *Crematogaster* visitando a região areolar e consumindo o exsudato (seta) acumulado no ápice do espinho. J. Espinho secretor após remoção da secreção por formiga. es: espinho secretor; fo: folha reduzida; tr: tricomas; gl: gloquídeos; el: espinho lignificado. Barras: A= 30 cm; B= 2.5 mm; C= 500 µm; D= 200 µm; E= 10 mm; F-G= 5 mm; H-J= 2mm.





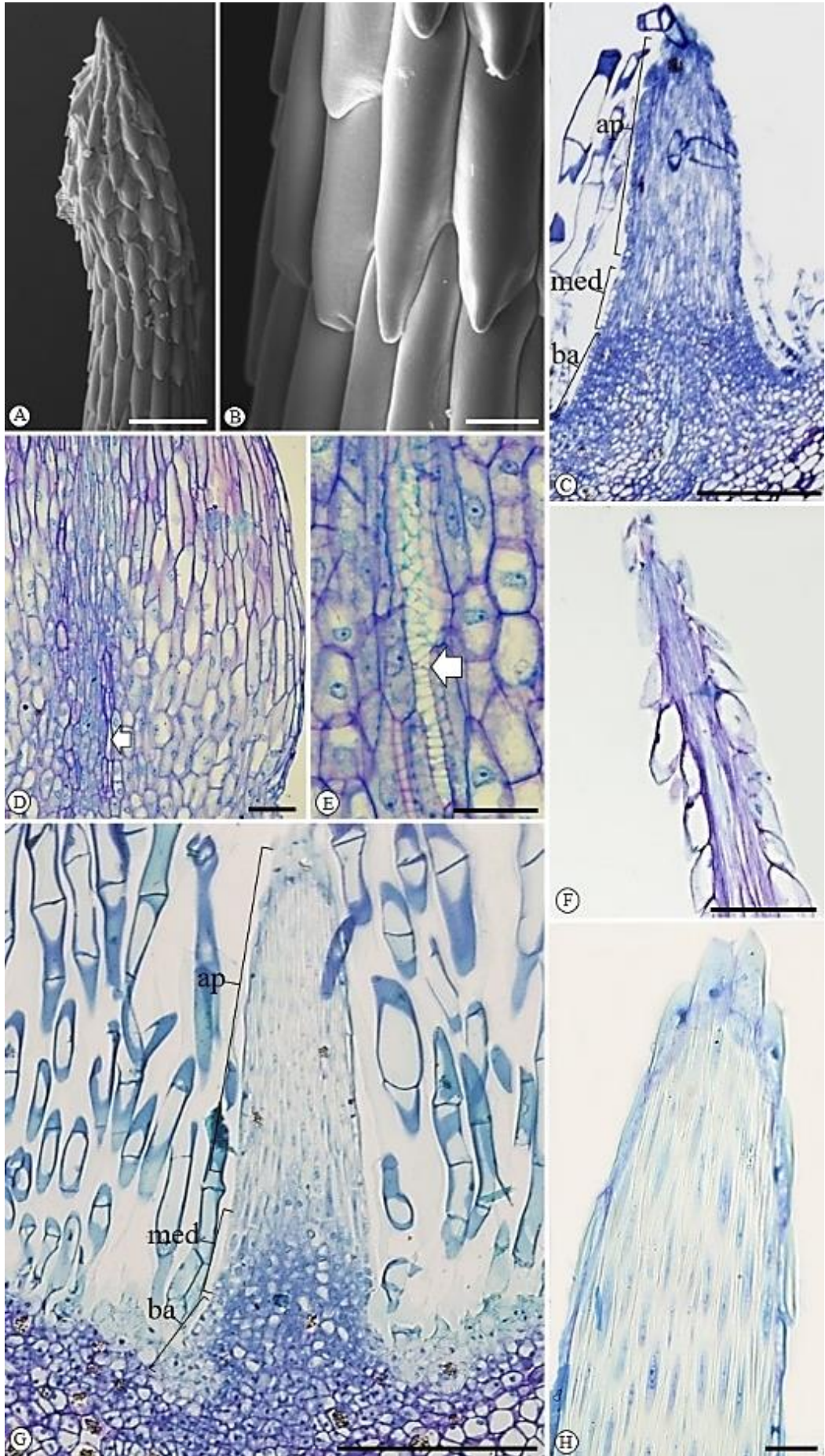
**Fig. 3.** Secções longitudinais da região areolar de *Brasiliopuntia brasiliensis*. A. Aspecto geral da região meristemática areolar início da formação de espinho secretor. B. Detalhe mostrando primórdio de espinho secretor formado por protoderme e meristema fundamental (estágio 1). C. Protuberância em forma de domo representando estágio 2 de formação de espinho secretor. D. Primórdio de espinho com formato papiliforme, com ápice mais afilado e base mais alargada (estágio 3). E-H. Estágio 4 de desenvolvimento do espinho secretor. E. Aspecto geral mostrando regiões basal, mediana e apical. F. Detalhe da porção basal mostrando células isodiamétricas com citoplasma denso, núcleo volumoso, e vacuoma moderadamente desenvolvido. G. Região mediana preenchida por células fusiformes com citoplasma abundante e núcleo volumoso. H. Porção apical constituída por células fusiformes com vacuoma desenvolvido. Barras: A= 200 µm; B, E-G= 50 µm; C, D= 100 µm; H= 50 µm.



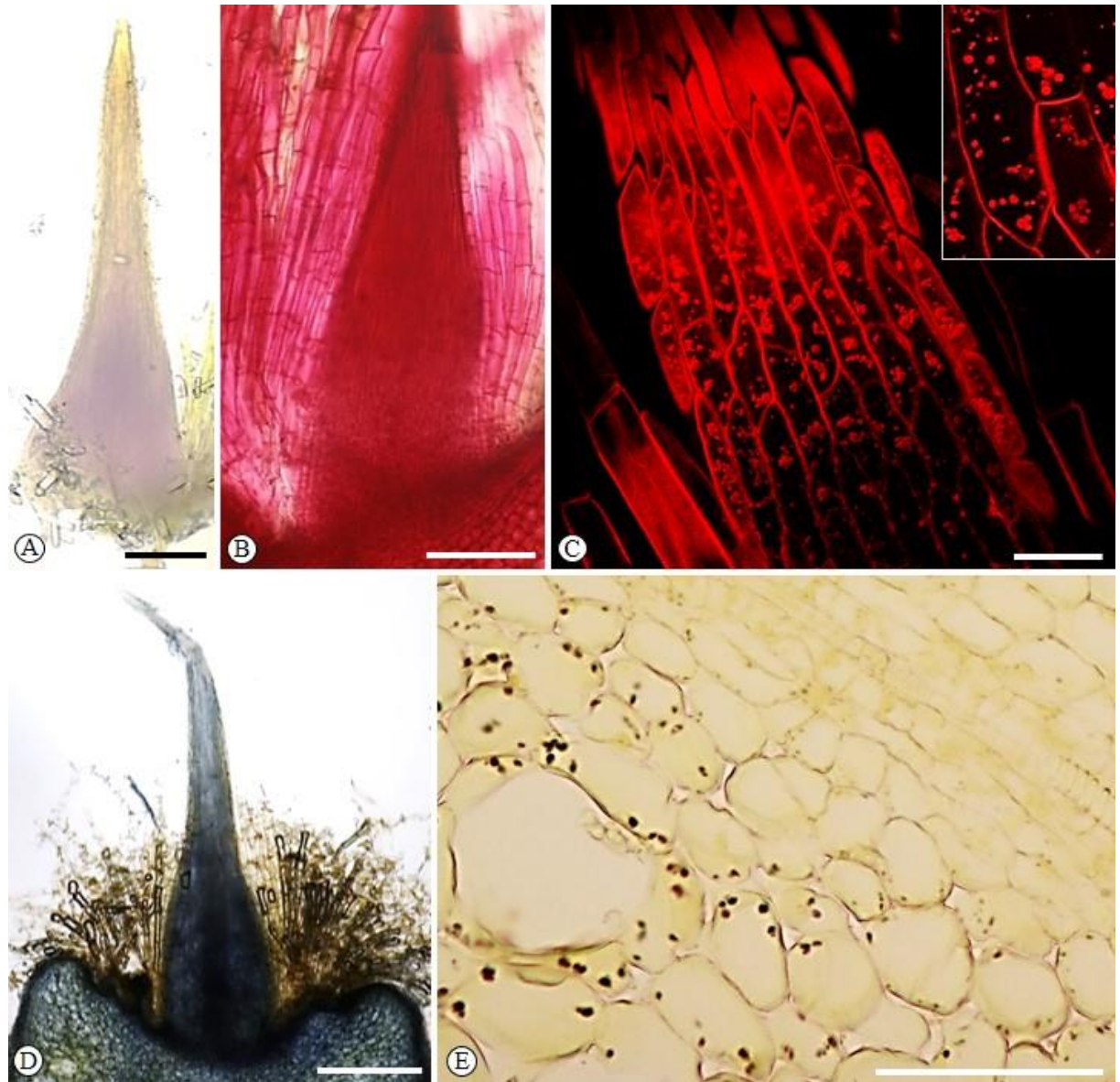


**Fig. 4.** Espinhos secretores de *Brasiliopuntia brasiliensis*. A-B. Eletronmicrografias (MEV). C-I. Fotomicrografias de secções longitudinais. A-F. Estágio 5. G-I. (Estágio 6). A-B. Visão superficial de espinho secretor mostrando células epidérmicas com extremidades afiladas e porção mediana larga. C. Aspecto geral do espinho mostrando regiões basal, mediana e apical. D. Detalhe da região basal mostrando células com citoplasma denso e núcleo volumoso. E. Detalhe mostrando região mediana com células fusiformes. F. Detalhe da região apical preenchida por células com formato fusiforme. Observar células epidérmicas com extremidades salientes. G. Aspecto geral mostrando região basal do espinho preenchida por células com paredes não-lignificadas. A seta indica elementos vasculares. H. Espinho sob luz polarizada evidenciando vascularização da porção basal e presença de cristais na região basal e no parênquima adjacente. I. Detalhe da região apical preenchida por células alongadas com paredes lignificadas. ba: região basal; med: região mediana; ap: região apical; pa: região parenquimática subjacente ao espinho secretor. Barras: A-B= 30  $\mu\text{m}$ ; C, I= 100  $\mu\text{m}$ ; D-F= 50  $\mu\text{m}$ ; G-H= 500  $\mu\text{m}$ .



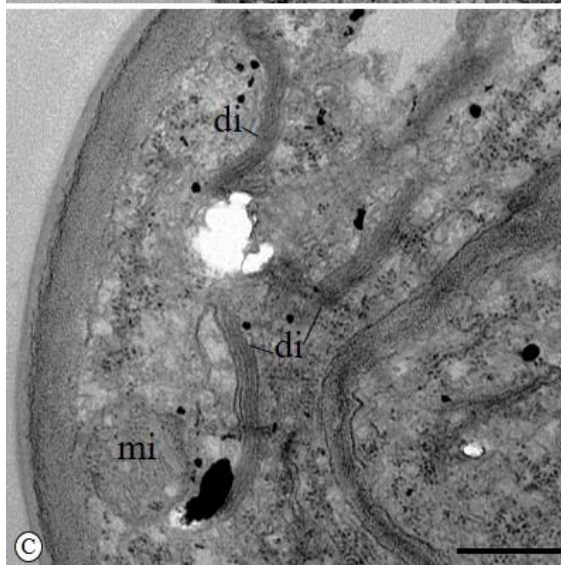
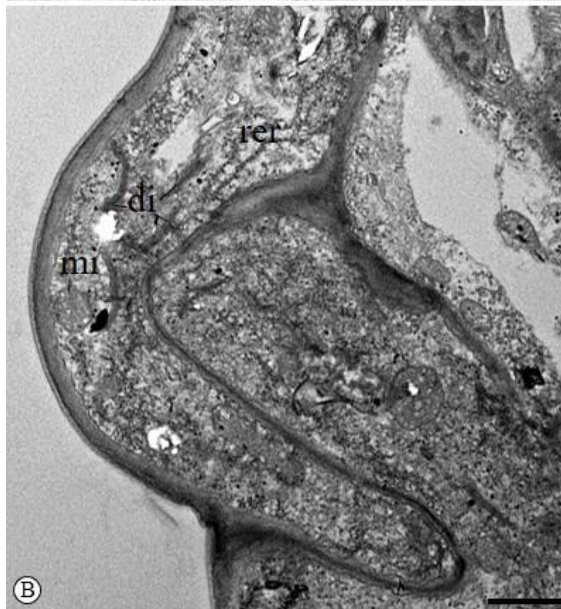
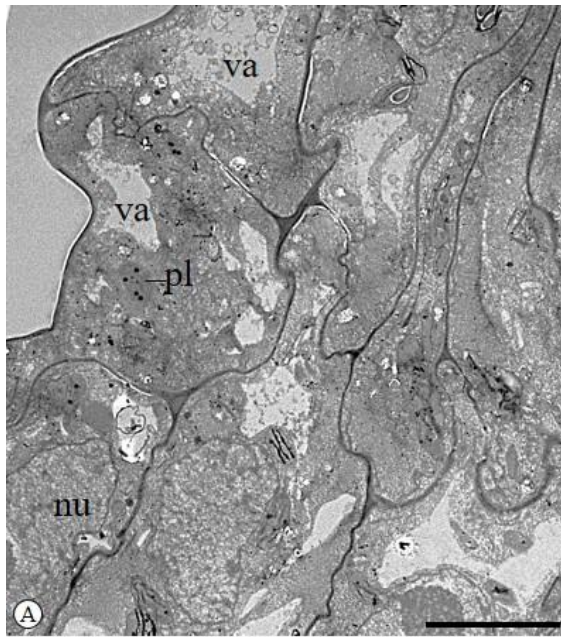


**Fig. 5.** Espinhos secretores de *Nopalea cochenillifera*. A-B. Eletronmicrografias (MEV). C-H. Fotomicrografias de secções longitudinais. A-F. Estágio 5. G-H. Estágio 6. A-B. Visão superficial de espinho secretor mostrando células epidérmicas com extremidades afiladas e porção mediana larga. C. Aspecto geral do espinho mostrando regiões basal, mediana e apical. D. Detalhe mostrando células com citoplasma denso e núcleo volumoso na região basal e células fusiformes na região mediana. A seta indica tecidos vasculares. E. Tecidos vasculares (seta) irrigando regiões basal do espinho secretor. F. Região apical de espinho secretor preenchida por células fibriformes com paredes pecto-celulósicas e revestida por células epidérmicas com extremidades salientes. G. Aspecto geral do espinho mostrando regiões basal preenchida por células com paredes não-lignificadas, porção mediana com células alongadas em processo de lignificação e porção apical constituída por células com paredes lignificadas. H. Detalhe da porção apical de espinho preenchida com células com paredes lignificadas. ba: região basal; med: região mediana; ap: região apical. Barras: A, D, F= 100  $\mu\text{m}$ ; B= 10  $\mu\text{m}$ ; C, G= 200  $\mu\text{m}$ ; E, H= 50  $\mu\text{m}$ .



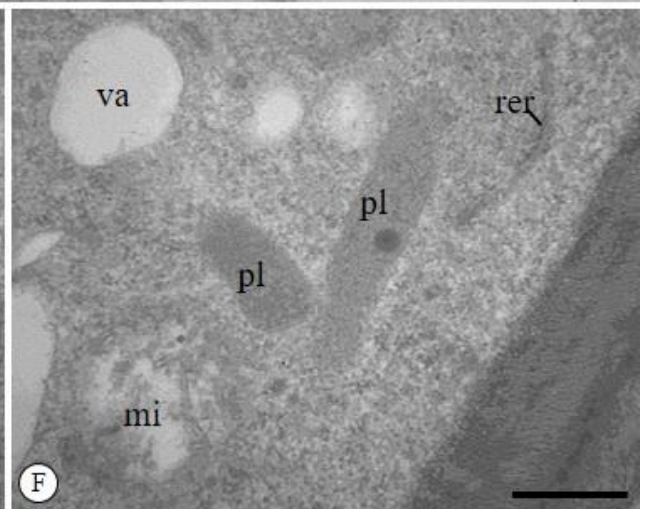
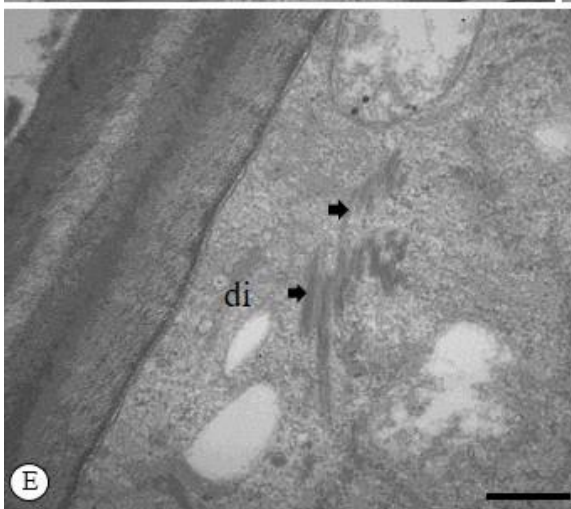
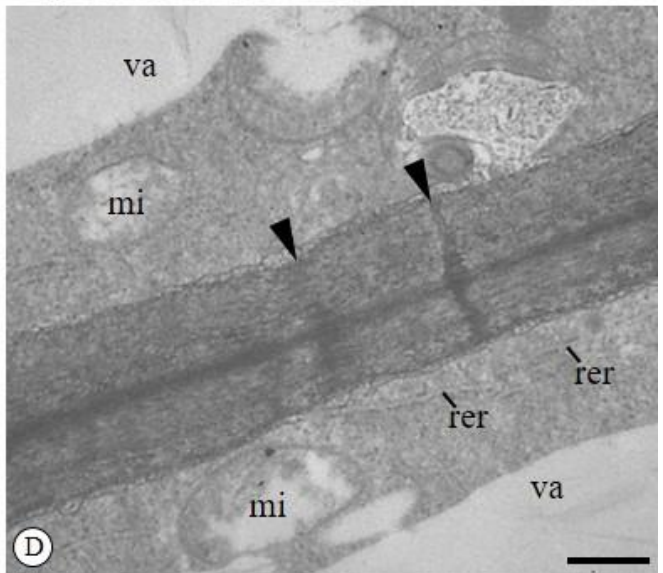
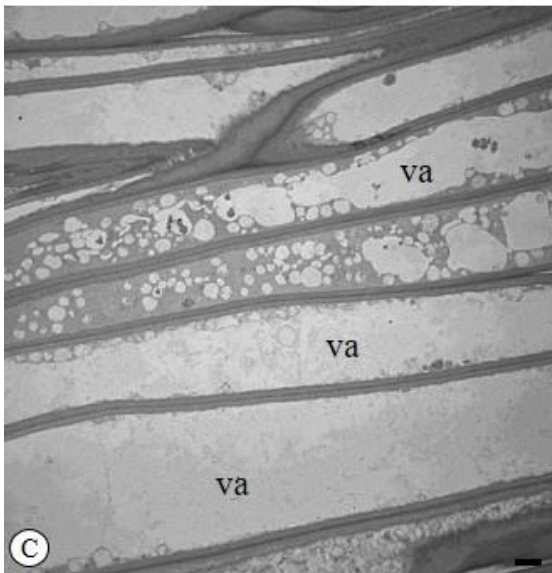
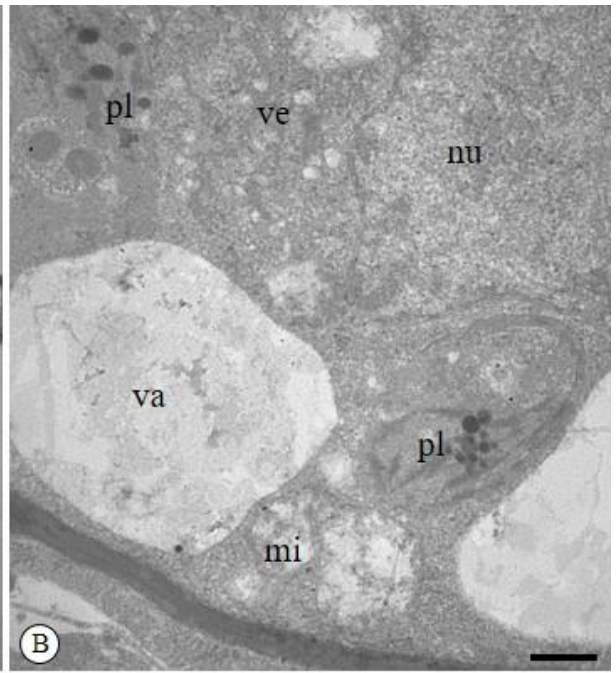
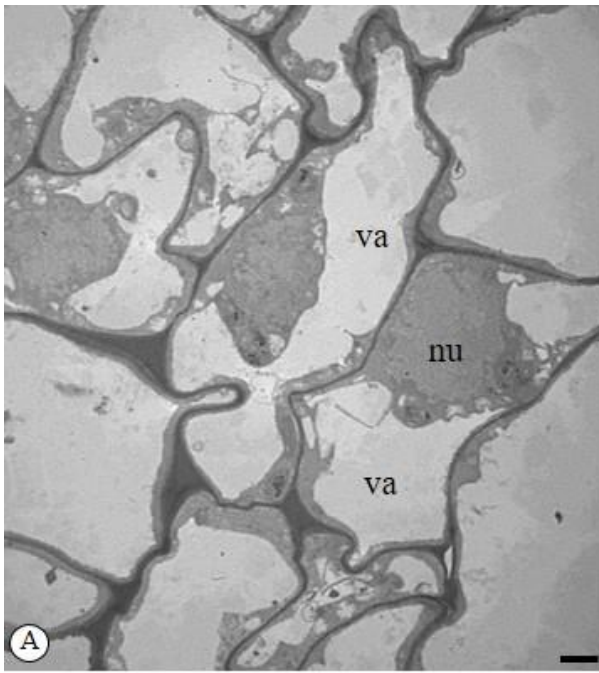
**Fig. 6.** Testes histoquímicos dos espinhos secretores em *Nopalea cochenillifera* no estágio 5. A. Reagente de Fehling. B. Vermelho de rutênio. C. Laranja de acridina. D. Azul mercúrio de bromofenol. E. Células parenquimáticas do segmento caulinar adjacente à região basal dos espinhos marcadas pelo reagente de lugol. Barras: A-B, D= 100 µm; C, E= 50 µm.



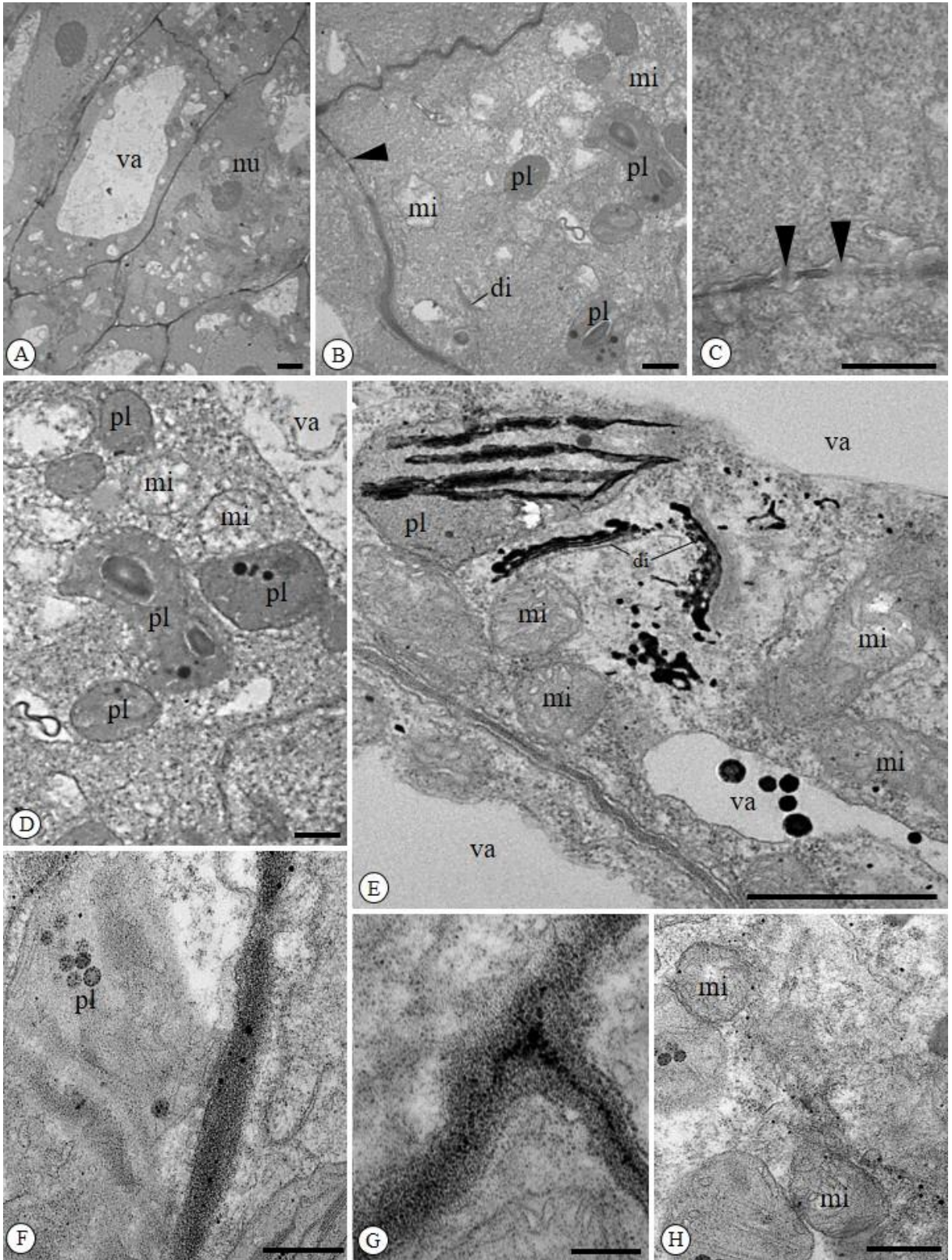


**Fig. 7.** Eletronmicrografias (MET) das células epidérmicas dos espinhos secretores *Nopalea cochenillifera* no estágio 5. A-B. Células epidérmicas com formato irregular com protuberâncias e extremidades afiladas que se projetam em direção às células vizinhas, paredes delgadas, núcleo volumoso e vacúolos pouco desenvolvidos. Observa no citoplasma mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, polirribossomos, dictiossomos e plastídios com tilacóides pouco desenvolvidos contendo plastoglóbulos. C. Detalhe mostrando parede periclinal externa relativamente espessa. mi: mitocôndria; di: dictiossomo; pl: plastídios; rer: retículo endoplasmático rugoso. Barras: A= 5 µm; B= 1 µm; C= 500 µm.



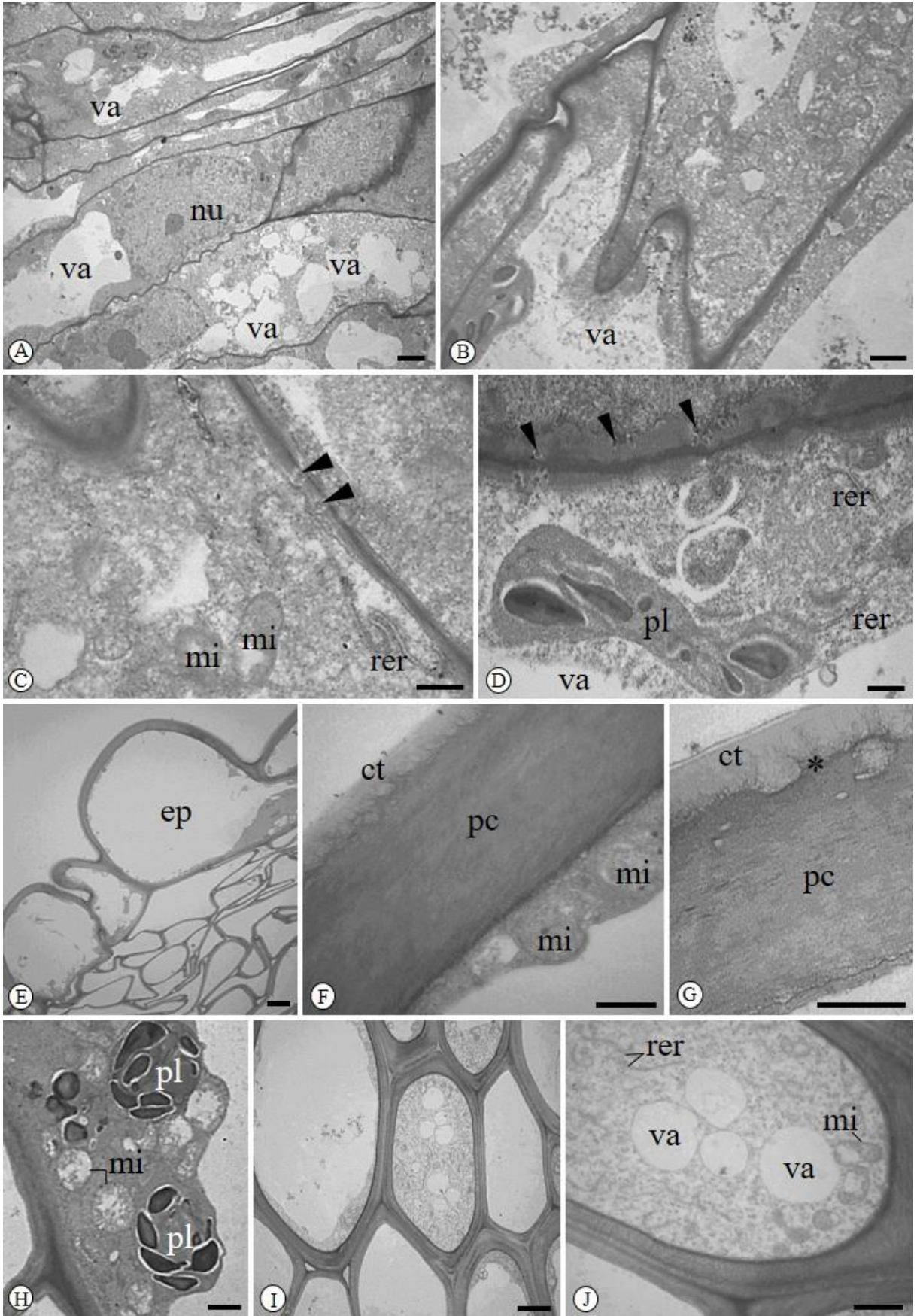


**Fig. 8.** Eletronmicrografias (MET) das células que preenchem os espinhos secretores de *Brasiliopuntia brasiliensis* no estágio 5. A-B. Região basal. C-F. Região mediana. A. Células com contorno irregular, lamela média intumescida, vacúolos moderadamente desenvolvidos e núcleo evidente. B. Porção celular com núcleo volumoso, mitocôndrias, plastídios com inclusões osmiofílicas e vesículas. C. Células alongadas com paredes espessas e vacúolos volumosos. D. Porções celulares mostrando paredes espessas com plasmodesmos (pontas de seta) e citoplasma com mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. E. Observar aspecto laxo da parede celular e cordões de filamentos de actina (setas largas) no citoplasma. F. Porção citoplasmática com retículo endoplasmático rugoso, plastídios, mitocôndrias e polirribossomos. nu: núcleo; mi: mitocôndria; pl: plastídio; va: vacúolo; ve: vesículas, rer: retículo endoplasmático rugoso. Barras: A, C= 4 µm; B, D-F= 1 µm.





**Fig. 9.** Eletronmicrografias (MET) das células que preenchem a região basal dos espinhos secretores de *Nopalea cochenillifera* no estágio 5. A-D. MET convencional. E. técnica do ZIO. F-H. Método de Thiéry. A. Células com contorno irregular, paredes delgadas, citoplasma denso e abundante, núcleo volumoso e vacúolos de diferentes tamanhos. B. Detalhe mostrando células com paredes delgadas e sinuosas com plasmodesmos (pontas de setas) e citoplasma abundante com dictiossomos, mitocôndrias, plastídios. C. Detalhe mostrando plasmodesmos (pontas de setas). D. Porção celular com mitocôndrias, polirribossomos e plastídios com inclusões osmiofílicas e grãos de amido. E. Porção celular mostrando as membranas de dictiossomos, vesículas adjacentes e membranas internas de plastídios impregnadas pelo ZIO. F-G. Marcação de polissacarídeos na parede celular. H. Marcação de polissacarídeos no citoplasma. di: dictiossomos; mi: mitocôndrias; pl: plastídios; nu: núcleo. Barras: A= 4  $\mu$ m; B= 3  $\mu$ m; C-E= 1  $\mu$ m; F, H= 500 nm; G= 200 nm.



**Fig. 10.** Eletronmicrografias (MET) dos espinhos secretores de *Nopalea cochenillifera* no estágio 5. A-D. Região mediana. E-J. Região apical. A. Porção preenchida por células alongadas com paredes sinuosas delgadas, citoplasma denso, núcleo volumoso e vacúolos de diferentes tamanhos. B. Detalhe mostrando células com crescimento intrusivo. C-D. Porções celulares mostrando paredes com plasmodesmos (pontas de seta) e citoplasma com mitocôndrias, plastídios com grãos de amido, retículo endoplasmático rugoso e polirribosomos. E. Células epidérmicas proeminentes com parede periclinal externa espessa. Observar células com contorno bastante irregular em posição subepidérmica. F-G. Detalhes de célula epidérmica mostrando da parede periclinal externa com aspecto laxo das microfibrilas de celulose revestida por cutícula com projeções eletrondensas, denominadas teicóides (\*). H. Porção de células subepidérmica com citoplasma reduzido contendo plastídios com grãos de amido, mitocôndrias e polirribossomos. I. Porção central da região apical do espinho mostrando células com paredes espessas, citoplasma reduzido e vacuoma desenvolvido. J. Detalhe da figura anterior mostrando paredes espessas com aspecto laxo e citoplasma com mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, ribossomos e vacúolos. ep: epiderme; ct: cutícula; pc: parede celular; nu: núcleo; va: vacúolo; rer: reticulo endoplasmático rugoso; mi- mitocôndria. Barras: A, I= 4 µm, B= 3 µm; C-D, F-G= 1 µm; E= 6 µm; H= 2 µm.