

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),  
o texto completo desta dissertação será disponibilizado  
somente a partir de 28/02/2021.



**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

- 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).