

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS GLÂNDULAS FLORAIS E DOS NECTÁRIOS
FOLIARES EM *DIPLOPTERYS PUBIPETALA* (A. JUSS.) W.R. ANDERSON & C.
CAV. DAVIS (MALPIGHIACEAE)**

CLÍVIA CAROLINA FIORILO POSSOBOM

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Botânica), AC:
Morfologia e Diversidade Vegetal**

BOTUCATU - SP

- 2008 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS GLÂNDULAS FLORAIS E DOS NECTÁRIOS
FOLIARES EM *DIPLOPTERYS PUBIPETALA* (A. JUSS.) W.R. ANDERSON & C.
CAV. DAVIS (MALPIGHIACEAE)**

CLÍVIA CAROLINA FIORILO POSSOBOM

PROF^a DR^a SILVIA RODRIGUES MACHADO
ORIENTADORA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Botânica), AC:
Morfologia e Diversidade Vegetal**

BOTUCATU - SP
- 2008 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Possobom, Clívia Carolina Fiorilo.

Estrutura e função das glândulas florais e dos nectários foliares em
Diplopterys Pubipetala (A. JUSS.) W. R. Anderson & C. Cav. Davis
(Malpighiaceae) / Clívia Carolina Fiorilo Possobom. – Botucatu: [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: Silvia Rodrigues Machado

Assunto CAPES: 20302002

1. Morfologia vegetal 2. Flores 3. Folhas

CDD 581.4

Palavras-chave: Glândulas florais; Malpighiaceae; Nectários foliares;
Secreção; Ultra-estrutura

Dedicatória

Às pessoas que são minhas fontes de amor e paz neste mundo:

Meus queridos pais, Terezinha e Arlindo, pelo amor incondicional, incentivo e compreensão em todos os momentos da vida.

Meu irmão, Ricardo e sua esposa Melissa, pelo apoio e carinho.

Meus dois adorados sobrinhos, Bruno e FrancESCO, por trazerem alegria ao coração de qualquer pessoa.

Meu grande tesouro, o Danilo, pelo amor, amizade, companheirismo, paciência e pela grande ajuda nos diferentes momentos deste trabalho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Sílvia Rodrigues Machado, por quem tenho grande admiração pela simplicidade, sabedoria, coragem e pelo imenso prazer em trabalhar que acaba motivando todos ao seu redor. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, confiança e pelo respeito às minhas limitações.

À Elza Guimarães, pessoa admirável por sua dedicação e inteligência, agradeço pela amizade e colaboração indispensável em diversas etapas deste trabalho. Obrigada pelo apoio em diversos momentos difíceis da minha vida, pelos conselhos, ensinamentos, maravilhosas idéias e pela imensa ajuda nos trabalhos de campo.

Ao Danilo Naliato, meu grande companheiro, que além de tudo o que representa na minha vida, ainda me ajudou muito na execução deste trabalho. Obrigada por me acompanhar nos trabalhos de campo, pela imensa ajuda na captura das abelhas e por me ajudar com as referências bibliográficas. Não teria conseguido sem seu apoio!

À Profa. Dra. Rita de Cássia S. Maimoni Rodella pela maravilhosa convivência, pela disponibilidade, pelas sugestões, pelo incentivo, pela ajuda no processo de identificação das abelhas e pelo empréstimo do material usado nos trabalhos de campo.

À Letícia Silva Souto, pelo auxílio na etapa inicial de elaboração do projeto deste trabalho, contribuindo com a escolha da espécie e com sugestões ao longo do desenvolvimento do mesmo.

Ao Prof. Dr. João M. F. Camargo pela identificação das abelhas.

À Tatiane Maria Rodrigues e Shelly Favorito pela colaboração com algumas técnicas laboratoriais, principalmente com relação aos testes histoquímicos.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica, do IB, especialmente Maria Helena e Claudete pelo enorme auxílio no processamento do material.

A todos os alunos, funcionários e professores do departamento de Botânica, pela agradável convivência e pela ajuda nos diversos momentos. Agradeço em especial à Adriana e ao Kleber pela disposição em ajudar sempre que necessário.

Aos amigos e familiares que atuaram nos bastidores deste trabalho, me dando carinho, apoio, incentivo e maravilhosos momentos de distração. Agradeço à minha família e à família do Danilo e aos queridos amigos que conquistei ao longo da minha vida, em especial às amigas Lúcia, Letícia G., Luciana, Máira, Paula e Raquel (e à Meg também, é claro!).

À Fapesp pela bolsa de Mestrado (06/ 54268-0).

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	30
CAPÍTULO I - “Glândulas florais e a polinização de <i>Diplopterys pubipetala</i> (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis”.....	31
1. Resumo.....	32
2. Introdução.....	32
3. Material e Métodos	34
4. Resultados	37
5. Discussão	41
6. Referências Bibliográficas	47
7. Figuras e Tabelas	52
CAPÍTULO II - “Estrutura, ultra-estrutura e mecanismo de secreção das glândulas florais em <i>Diplopterys pubipetala</i> (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis.....	64
1. Resumo.....	65
2. Introdução.....	65
3. Material e Métodos	67
4. Resultados	68
5. Discussão	74
6. Referências Bibliográficas	80
7. Figuras e Tabelas	85
CAPÍTULO III – “Estrutura, mecanismo de secreção e papel dos nectários foliares em <i>Diplopterys pubipetala</i> (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis”.....	109
1. Resumo.....	110
2. Introdução.....	110
3. Material e Métodos	112
4. Resultados	113
5. Discussão	118

6. Referências Bibliográficas	125
7. Figuras e Tabelas	131
CONSIDERAÇÕES FINAIS	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154

Resumo e Abstract

POSSOBOM, C.C.F. **ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS GLÂNDULAS FLORAIS E DOS NECTÁRIOS FOLIARES EM *DIPLOPTERYS PUBIPETALA* (A. JUSS.) W.R. ANDERSON & C. CAV. DAVIS (MALPIGHIACEAE).** 2008. 128P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO – *Diplopterys pubipetala* é uma malpigiácea amplamente distribuída pelo Brasil e apresenta glândulas no cálice, corola, estames e folhas, cuja estrutura, funcionamento e significado ecológico são desconhecidos. Com o objetivo de entender a dinâmica de secreção e o papel destas glândulas, foram estudados aspectos anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais, além de registros fenológicos e do comportamento dos visitantes em uma população ocorrente em área de cerrado. As glândulas calicinais estão dispostas aos pares na face abaxial das sépalas, são conspicuas e constituídas por epiderme secretora em paliçada e parênquima especializado vascularizado por xilema e floema. As glândulas da corola ocorrem nas margens fimbriadas de todas as cinco pétalas. São diminutas e constituídas por epiderme secretora unisseriada envolvendo um pequeno grupo de células parênquimáticas vascularizadas ou não. As glândulas presentes na pétala posterior são vascularizadas e estruturalmente mais desenvolvidas do que as glândulas presentes nas pétalas laterais, não vascularizadas. Nos estames o conectivo apresenta superfície secretora constituída por células epidérmicas globulares. Constatou-se que todas as glândulas florais desempenham funções como atrativos primários ou secundários; além disto, o conectivo glandular está relacionado também com o aumento da eficiência na transferência de pólen, sendo fundamentais na manutenção da interação com os vetores de pólen e na reprodução da população de *D. pubipetala* estudada. Os nectários são diminutos e distribuídos na margem do limbo, sendo mais desenvolvidos os localizados na base e no ápice do limbo. Estes nectários são anatomicamente semelhantes às glândulas do cálice, entretanto são vascularizados predominantemente por floema. São ativos unicamente em folhas jovens e sua secreção representa um importante recurso alimentar para formigas com comportamento agressivo, sugerindo a existência de associação benéfica entre nectários e formigas. Os testes histoquímicos revelaram que nas glândulas florais a secreção é predominantemente lipofílica e que nos nectários foliares é predominantemente hidrofílica. As características ultra-estruturais das células secretoras nos diferentes tipos glandulares são indicativas de síntese de secreção hidrofílica e lipofílica. Contudo, nas glândulas florais os plastídeos foram as organelas mais abundantes e apresentaram peculiaridades em cada um dos três tipos

glandulares, as quais estão relacionadas com a secreção lipofílica. Nos nectários os dictiossomas e o retículo endoplasmático são abundantes e desenvolvidos. As características ultra-estruturais das células do parênquima das glândulas do cálice, das pétalas e das folhas indicam sua participação nos processos de síntese da secreção. A semelhança estrutural observada entre as glândulas calicinais e os nectários foliares nesta espécie corrobora a hipótese sobre a existência de algum tipo de relação evolutiva entre estas estruturas em Malpighiaceae.

Palavras-chave: glândulas florais, Malpighiaceae, nectários foliares, secreção, ultra-estrutura.

POSSOBOM, C.C.F. **STRUCTURE AND FUNCTION OF FLORAL GLANDS AND LEAF NECTARIES OF *DIPLOPTERYS PUBIPETALA* (A. JUSS.) W.R. ANDERSON & C.CAV. DAVIS (MALPIGHIACEAE).** 2008. 128P. M.SC. THESIS - BIOSCIENCES INSTITUTE, UNESP – SÃO PAULO STATE UNIVERSITY, BOTUCATU.

ABSTRACT - *Diplopterys pubipetala* is a Malpighiaceae species widely distributed in Brazil and presents glands in calyx, corolla, stamens and leaves whose structural, functional and ecological aspects are unknown. In order to understand the secretion dynamic and the role of these glands, anatomical, histochemical and ultrastructural aspects were studied, besides phenological and visitors behavior records in a cerrado population. The calyx glands occur in pairs in the sepal abaxial surface and are constituted by secretory epidermis and specialized parenchyma with vascular supply of xylem and phloem. The corolla glands occur in the fimbriate margins of all the five petals. They are very small and constituted by uniseriate secretory epidermis that involves a small group of parenchyma cells vascularized or not. The posterior petal glands are vascularized and structurally more developed than lateral petal glands which are not vascularized. In the stamen, the connective shows secretory surface constituted by globular epidermal cells. All these floral glands play important roles as primary and secondary attractive; furthermore, the glandular connective is also related to the increase of pollen transfer efficiency, being essential for maintenance of the interactions with pollen vectors and in the reproduction of *D. pubipetala* studied population. The nectaries are very small and occur in all the margin of the leaf blade, being more developed these located in the apex and in the base. These nectaries are anatomically similar to the calyx glands, although are vascularized predominantly by phloem. They are only active in young leaves whose secretion represents a food resource for aggressive ants, suggesting the existence of beneficial interactions between nectaries and ants. The histochemical tests revealed that the secretion is predominantly lipophilic in floral glands and predominantly hidrophilic in the leaf nectaries. The epidermal cells ultrastructural characteristics of all the glandular structures indicate the synthesis of both, hidrophilic and lipophilic secretions. However, in the floral glands the plastids were the more abundant organelle and presented peculiarities in each of glandular type that are related with the lipophilic secretion. In the leaf nectaries the dictyosomes and the endoplasmic reticulum are abundant and developed. The parenchyma cells ultrastructural characteristics of calyx, posterior petal and leaf glands indicate its participation in the secretion synthesis process. The structural similarity between calyx glands and leaf nectaries

confirms the hypothesis about the existence of some evolutive relation between these structures in Malpighiaceae.

Key-words: floral glands, leaf nectaries, Malpighiaceae, secretion, ultra-structure

Introdução

Malpighiaceae compreende cerca de 65 gêneros e 1250 espécies predominantemente tropicais (Cameron *et al.* 2001), das quais 85% ocorrem no Novo Mundo (Anderson, 1990). No Brasil, são encontrados mais de 38 gêneros e cerca de 300 espécies amplamente distribuídas nas diferentes formações vegetais (Barroso 1984, Souza & Lorenzi 2005).

Esta família exibe estruturas glandulares diversas as quais podem ser encontradas em brácteas, folhas, estípulas e cálice, apresentando valor taxonômico (Barroso 1984, Anderson 1990). Enquanto apresenta características bastante variáveis com relação ao hábito e os tipos de frutos, esta família caracteriza-se pela grande uniformidade na arquitetura geral das flores (Anderson 1979). As espécies de Malpighiaceae, de maneira geral, apresentam flores com cinco sépalas portadoras de até cinco pares de glândulas, cinco pétalas livres unguiculadas, sendo a pétala posterior normalmente diferenciada das demais pela espessura da unha, além da orientação do androceu e do gineceu que é bastante conservada. Estas características florais relacionam-se principalmente com atração, orientação e recompensa de polinizadores e, segundo Anderson (1979), esta uniformidade é provavelmente resultante da pressão de seleção exercida pelos polinizadores específicos que são na maioria das vezes, himenópteros pertencentes à família Anthophoridae.

As glândulas do cálice estão presentes em cerca de 90% das espécies do Novo Mundo e em apenas 52% das espécies do Velho Mundo (Vogel 1990) e são conhecidas pela secreção de substâncias lipídicas como recompensa aos visitantes/polinizadores (Taylor & Crepet 1987, Vogel 1990). Nas espécies neotropicais estas glândulas funcionam na secreção de óleos, sendo denominadas elaióforos, enquanto em algumas espécies paleotropicais, como *Hiptage benghalensis*, as glândulas do cálice podem produzir néctar, funcionando portanto, como nectários não relacionados à atração de polinizadores (Vogel 1974 *apud* Anderson 1990, Vogel 1990).

Os óleos secretados pelos elaióforos são coletados por abelhas fêmeas principalmente da tribo Centridini (família Anthophoridae) as quais utilizam este recurso como fonte de alimentação de suas larvas e como impermeabilizante dos ninhos (Neff & Simpson 1981, Buchmann 1987, Vogel 1990, Vinson *et al.* 1997, Sigrist & Sazima 2004).

Além das glândulas do cálice, ocorrem glândulas localizadas nas pétalas ou no conectivo das anteras em alguns táxons (Vogel 1990) e glândulas localizadas em órgãos foliares, as quais são amplamente distribuídas na família, ocorrendo em um grande número de espécies (Elias 1983).

Apesar dos valores taxonômico e ecológico das glândulas em Malpighiaceae amplamente relatados por diferentes autores (Anderson 1977, 1979, 1990, Neff & Simpson 1981, Buchmann 1987, Lobreau-Callen 1989, Sazima & Sazima, 1989, Vogel 1990, Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Carvalho *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006), informações sobre sua estrutura e modo de secreção são escassas. Com relação às glândulas do cálice e das folhas merecem destaque os trabalhos de Subramanian *et al.* (1990), Cocucci *et al.* (1996), Vinson *et al.* (1997), Castro *et al.* (2001), Attala (2004, dados não publicados), Vieira (2005, dados não publicados), Costa *et al.* (2006) e Possobom (2007, dados não publicados). Para as glândulas localizadas nas pétalas e nos conectivos dos estames são encontradas informações anatômicas e histoquímicas unicamente nos trabalhos de Cocucci *et al.* (1996) e Vieira (2005, dados não publicados).

Diplopterys pubipetala (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis, objeto de estudo deste trabalho, é uma espécie de ampla distribuição pelo Brasil e pode ser encontrada sob a forma de liana ou de arbusto escandente (Gates 1982).

Em trabalho monográfico de Gates (1982) são referidas glândulas diminutas nas margens da lâmina foliar, glândulas conspícuas nas sépalas e glândulas nas margens fimbriadas basais das pétalas posteriores desta espécie.

Sigrist & Sazima (2004), estudando espécies simpátricas de Malpighiaceae ocorrentes em uma reserva de floresta estacional semidecidual relataram para *D. pubipetala* a ocorrência de flores pseudo-hermafroditas (funcionalmente femininas) com anteras indeiscentes, baixa viabilidade polínica, grande produção de frutos resultantes de agamospermia e visita de uma espécie de abelha (*Paratetrapedia* sp.) coletando óleo e pólen como recursos florais, sem participação efetiva na polinização. Entretanto, em vegetação de cerrado verificamos uma ampla guilda de visitantes florais em *Diplopterys pubipetala*, os quais contactam as estruturas reprodutivas no momento em que coletam a secreção das glândulas calicinais.

A ocorrência de diversos tipos de estruturas glandulares em uma mesma espécie permite investigar diferenças em sua estrutura, composição química da secreção produzida e o papel dos visitantes em cada tipo de glândula. Estes dados podem auxiliar no entendimento da evolução das interações planta-animal (Freitas *et al.* 2001). No caso de Malpighiaceae, alguns autores têm detectado similaridade morfológica entre nectários extraflorais e glândulas do cálice (Subramanian *et al.* 1990, Castro *et al.* 2001, Attala 2004, Vieira 2005) e segundo Vogel (1990), tal semelhança pode explicar a evolução da família.

Diante do exposto, neste trabalho foram investigados aspectos anatômicos, ultra-estruturais e histoquímicos das glândulas florais e foliares de *D. pubipetala* com o objetivo de estudar a dinâmica de secreção e compreender o papel das diferentes glândulas nesta espécie, principalmente no que diz respeito à interação planta-animal.

Revisão bibliográfica

Caracterização geral, aspectos taxonômicos, filogenéticos e evolutivos de Malpighiaceae

Malpighiaceae apresenta 65 gêneros e cerca de 1250 espécies as quais são predominantemente tropicais, ocorrendo também em regiões subtropicais (Cameron *et al.* 2001).

Dentre as espécies conhecidas, cerca de 85% ocorrem no Novo Mundo (Anderson 1990), onde ocupam uma grande variedade de habitats podendo distribuir-se desde o sudoeste dos Estados Unidos até a região temperada da Argentina (Anderson 1979). Ocorrem preferencialmente em ambientes abertos, como bosques, savanas e campos, mas podem ocorrer em margens de rios e em florestas (Anderson 1979). Poucas espécies ocorrem em ambientes xéricos e nenhuma ocorre nas regiões de clima temperado dos Andes e da América do Norte (Anderson 1979). No Brasil, são encontrados mais de 38 gêneros e cerca de 300 espécies amplamente distribuídas nas diferentes formações vegetais (Barroso 1984, Souza & Lorenzi 2005).

Pertencente à ordem Malpighiales (Judd *et al.* 1999), Malpighiaceae é considerada monofilética com base em dados moleculares, suportados também pelos caracteres morfológicos (Judd *et al.* 1999, Davis *et al.* 2001). Embora existam inúmeros trabalhos que contribuem para a taxonomia e filogenia de Malpighiaceae (Nieden zu 1928, Anderson 1967, Morton 1968, Anderson 1977, Anderson 1979a, Anderson 1979b, Gates 1979, Cuatrecasas & Croat 1980, Gates 1982, Anderson 1983, Estabrook & Gates 1984, Anderson 1985, Simpson 1989, Anderson, C 1992, Mamede 1992, Anderson 1998, Anderson 2001, Cameron *et al.* 2001, Davis *et al.* 2001, Amorim 2002, Davis 2002, Anderson, C. 2003, Amorim 2004, Anderson & Davis 2005a, 2005b, Anderson & Davis 2006), a classificação sistemática desta família ainda não está bem esclarecida.

Nieden zu (1928 *apud* Barroso 1984) dividiu a família em duas subfamílias, considerando principalmente a forma do receptáculo e o tipo de fruto. Assim, propôs a

subfamília Pyramidotoraе (subdividida em três tribos, Hiraeae, Banisterieae, Tricomarieae), na qual incluiu espécies pantropicais com receptáculo piramidal e frutos alados, na maior parte das vezes do tipo samaróide; e a subfamília Planitorae (subdividida em duas tribos, Malpighiae e Galphimieae), na qual incluiu espécies neotropicais com receptáculo plano e frutos não alados. A classificação feita por Niedenzu (1928) sofreu poucas modificações e, basicamente, persiste até os dias de hoje. Morton (1968) por motivos de adequação nomenclatural, propôs o nome Gaudichaudioideae para Pyramidotoraе e Malpighioideae no lugar de Planitorae. Anderson (1977) considerando Malpighioideae não monofilética, propôs a subfamília Byrsonimoideae (subdividida em três tribos, Byrsonimeae, Galphimeae e Acmanthereae) em seu lugar, argumentando que alguns gêneros com frutos não alados são filogeneticamente mais próximos daqueles gêneros com frutos alados pertencentes à subfamília Gaudichaudioideae. Assim, os gêneros retirados de Byrsonimoideae, inclusive o gênero tipo *Malpighia*, foram incluídos em Gaudichaudioideae a qual passou a se chamar Malpighioideae (Anderson 1993).

Estudos recentes (Cameron *et al.* 2001 e Davis *et al.* 2001) baseados em genética molecular tem sido de grande importância na sistemática da família. Nestes trabalhos, a monofilia de Byrsonimoideae foi rejeitada e os autores discutem a dificuldade de classificação das malpigiáceas. Estes autores propõem a adoção de termos informais para tratar das relações filogenéticas na família, pois acreditam que não é possível dividi-la satisfatoriamente em um pequeno número de subfamílias monofiléticas. Desta forma, Cameron *et al.* (2001) dividiram os representantes de Malpighiaceae nos seguintes clados: byrsonimoides, hiraecoides e banisterioides, dos quais somente o clado das banisterioides é considerado monofilético. Outra proposta foi elaborada por Davis *et al.* (2001), na qual os representantes de Byrsonimoideae foram divididos em dois clados informais (byrsonimoides

e acmantheroides) enquanto os representantes de Malpighioideae foram divididos em quatro clados informais (galphimioides, acridocarpoides, mcvaughioides e banisterioides).

Com relação às características morfológicas, as malpigiáceas exibem grande variedade de hábitos, podendo ser encontradas espécies arbóreas, arbustivas, trepadeiras e ocasionalmente herbáceas perenes (Anderson 1979, Barroso 1984, Judd *et al.* 1999).

A presença de tricomas malpigiáceos é uma característica de relevante importância diagnóstica na família (Cameron *et al.* 2001) e são normalmente encontrados nos pecíolos ou em partes jovens da maioria das espécies (Vicentini & Anderson 1999). Estes tricomas são unicelulares e providos de pé com comprimento variável e dois braços com extremidades afiladas, os quais podem ser em forma de T, V ou Y. (Barroso 1984, Judd *et al.* 1999).

As folhas são predominantemente opostas, simples e pecioladas. Apresentam margens normalmente inteiras, venação pinada e frequentemente, estípulas inter ou intrapeciolares. Comumente são observadas duas ou mais glândulas no pecíolo ou na face abaxial do limbo (Judd *et al.* 1999).

As flores são predominantemente hermafroditas e zigomorfas e na maioria das vezes encontram-se reunidas em inflorescências, as quais podem ser determinadas (cimosas) ou indeterminadas (racemosas) (Barroso 1984, Judd *et al.* 1999). O cálice é composto por cinco sépalas livres ou levemente conadas basalmente, cada uma podendo conter um par de glândulas. A corola apresenta cinco pétalas unguiculadas livres entre si, alternadas com as cinco sépalas. Geralmente, uma das pétalas diferencia-se das demais pela forma do limbo, pela fimbriação dos bordos ou pela espessura da unha. O androceu normalmente contém 10 estames os quais podem apresentar filetes basalmente conados e o gineceu é tipicamente tricarpelar, com ovário súpero e três estiletes e estigmas livres entre si (Anderson 1979, Barroso 1984, Judd *et al.* 1999).

Os frutos podem ser deiscentes ou indeiscentes, secos ou carnosos, alados ou não alados (Barroso 1984, Judd *et al.* 1999). São encontrados representantes com frutos esquizocárpicos, constituídos de três samarídeos ou cocas, drupáceos ou nuculânios (Barroso 1984, Judd *et al.* 1999). Esta grande diversidade nos tipos de frutos dentre os membros desta família representa importante ferramenta na delimitação dos gêneros (Davis *et al.* 2001).

Informações a respeito dos números cromossômicos em Malpighiaceae foram reunidas em trabalho de Anderson (1993). Segundo o autor, de maneira geral, a subfamília Byrsonimoideae apresenta representantes cujos números cromossômicos baseiam-se em $n = 6$, enquanto que a subfamília Malpighioideae caracteriza-se pelo número cromossômico básico $n=10$. Existem inúmeras variações destes números as quais são resultantes de poliploidias e aneuploidias e apesar da grande variedade de números cromossômicos existentes, estes são relativamente constantes dentre os gêneros de Malpighiaceae.

Lombello & Forni-Martins (2003) analisaram a existência de correlação entre o hábito, tipo de fruto e número cromossômico a partir das informações existentes na literatura para 128 espécies, pertencentes a 35 gêneros de Malpighiaceae. Os autores verificaram que os números cromossômicos $x=5$ e $x=10$, relacionam-se mais estreitamente com o hábito trepador e frutos alados, enquanto os números cromossômicos baseados em $x=6$ relacionam-se mais freqüentemente com os hábitos arbustivo e arbóreo e frutos não alados. Estes resultados mostram que em Malpighiaceae existe uma relação entre a evolução de características morfológicas e a variação do número cromossômico, além de corroborarem com a idéia de que características como hábito trepador e frutos alados são derivados nesta família.

Embora existam características bastante variáveis como o hábito, tipos de frutos e número cromossômico, a família Malpighiaceae exibe grande uniformidade na morfologia das flores. Em 1979, Anderson descreveu as variações e similaridades encontradas nas flores das espécies de Malpighiaceae, encontrando características bastante fixas na família as quais se

relacionam principalmente com atração, orientação e recompensa de polinizadores. Dentre estas características, o autor ressaltou a presença de cinco sépalas com glândulas dispostas aos pares, cinco pétalas livres unguiculadas, com uma normalmente diferenciada das demais pela espessura da unha e, apesar da diversidade de detalhes que podem ser observados nas flores de Malpighiaceae com relação ao androceu e ao gineceu, a orientação destes verticilos é, de maneira geral, bastante conservada. Neste trabalho, Anderson (1979) conclui que a uniformidade floral observada nas malpigiáceas tropicais é provavelmente resultante da pressão de seleção exercida pelos seus polinizadores específicos que são, na grande maioria, himenópteros pertencentes à família Anthophoridae.

Em 1974, Vogel relatou a ocorrência de estruturas especializadas na secreção de óleo como recurso floral, as quais denominou “elaióforos”. Os elaióforos foram primeiramente observados em cinco famílias de plantas (Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae, Orchidaceae e Scrophulariaceae), porém atualmente são referidas cerca de 10 famílias de plantas oferecendo óleo como recurso floral em substituição ou em complementação ao néctar e ao pólen (Buchmann 1987).

Em Malpighiaceae, as glândulas localizadas no cálice de espécies neotropicais são responsáveis pela produção de óleos (Vogel 1974, Vogel 1990), os quais são coletados por abelhas fêmeas da família Anthophoridae (tribos Centridini, Exomalopsini e Tetrapediini) e são utilizados para a alimentação das larvas, impermeabilização dos ninhos e, possivelmente, também na alimentação dos adultos (Buchmann 1987). A maioria destas abelhas apresenta patas especializadas (Neff & Simpson 1981) com as quais raspam as glândulas para coletar o óleo secretado (Buchmann 1987).

Glândulas no cálice ocorrem em mais de 90% das espécies neotropicais (cerca de 870 espécies pertencentes a 37 gêneros) e em apenas 52% das espécies paleotropicais (cerca de 60 espécies pertencentes a apenas 4 gêneros) (Vogel 1990). As glândulas localizadas no cálice

das espécies paleotropicais são menores e dispõem-se entre as sépalas (Vogel 1974 *apud* Vogel 1990). Além de serem morfológicamente muito semelhantes a nectários extraflorais, Vogel (1974 *apud* Anderson 1990) afirma, ainda, que as glândulas do cálice de uma destas espécies paleotropicais, *Hiptage benghalensis*, produzem néctar, não sendo, portanto, elaióforos. Lobreau-Callen (1989) analisou as principais substâncias presentes nas secreções glandulares de espécies neotropicais e paleotropicais, encontrando açúcares redutores na secreção de glândulas do cálice de espécies paleotropicais, assim como anteriormente relatado por Vogel (1974). Estes resultados sugerem que as glândulas do cálice de espécies paleotropicais são nectários, enquanto as glândulas do cálice de espécies neotropicais são elaióforos (Vogel 1974).

Existem duas teorias controversas a respeito da evolução das glândulas do cálice e ambas, de certa forma, refletem teorias sobre a origem da família Malpighiaceae.

Anderson (1979) sugere que os elaióforos presentes nas sépalas das malpighiáceas representam uma apomorfia para toda a família, sendo sua ausência, nos representantes do Velho Mundo, considerada derivada e secundária. As poucas espécies de Malpighiaceae existentes no Velho mundo, segundo Anderson (1979) são derivadas de um ancestral sul americano com cálice glandular que alcançou a África quando os dois continentes ainda eram suficientemente próximos para ocorrer dispersão através da água. Como no Velho Mundo os polinizadores específicos de Malpighiaceae são ausentes, o autor acredita que as espécies dos paleotrópicos perderam a condição glandular devido à inexistência de pressão de seleção para a retenção deste caráter.

Taylor & Crepet (1987) estudaram fósseis de flores parcialmente conservadas encontradas no sudeste dos Estados Unidos pertencentes ao Eoceno Médio. As evidências morfológicas observadas nas flores e nos grãos de pólen fósseis apontaram afinidades com Malpighiaceae, principalmente pela presença de glândulas no cálice. O fóssil estudado

representa um táxon extinto, *Eoglandulosa warmanensis* o qual apresenta um mosaico de características ancestrais e derivadas e provavelmente pertence à subfamília Byrsonimoideae. Estes resultados corroboram a hipótese de Anderson, na qual a presença de glândulas no cálice é uma característica primitiva e sugerem, ainda, que a estreita relação existente entre Malpighiaceae e Anthoporidae é bastante antiga (Taylor & Crepet 1987).

Em outro trabalho, Anderson (1990) esclareceu sua hipótese sobre a origem sul-americana das malpigiáceas a partir de argumentos baseados em características consideradas ancestrais, as quais podem ser claramente observadas na subfamília Byrsonimoideae que ocorre exclusivamente do Novo Mundo.

Vogel (1990), por sua vez, acredita que as malpigiáceas do Velho e do Novo Mundo evoluíram a partir de um ancestral comum aglandular o qual já existia no continente gonduânico e apresentava flores não especializadas cuja única recompensa oferecida aos visitantes era o pólen. Assim, a presença dos elaióforos nas espécies neotropicais seria uma apomorfia conquistada após a separação do continente. Vogel baseou seus argumentos principalmente na semelhança anatômica existente entre os elaióforos do cálice e os nectários extraflorais presentes em folhas e brácteas. Segundo ele, os elaióforos teriam evoluído a partir destes nectários extraflorais através da co-evolução com os polinizadores específicos exclusivos dos neotropicais.

Trabalhos mais recentes envolvendo técnicas moleculares (Davis *et al.* 2002, Davis *et al.* 2004) sugerem a hipótese da “migração laurásiana”, ou seja, as malpigiáceas teriam surgido na América do Sul, porém teriam alcançado os paleotrópicos através do hemisfério Norte. Segundo os autores, esta migração pode ter ocorrido em períodos cujo clima no hemisfério norte era favorável à expansão de florestas tropicais (Davis *et al.* 2002). Além disso, Davis *et al.* (2004), estimaram a origem de Malpighiaceae em 75-65 m.a., idade esta que não condiz com a origem gonduânica proposta por Vogel (1990).

Aspectos da reprodução em Malpighiaceae

Diversos autores estudaram aspectos relacionados à fenologia, à ecologia da polinização e/ou à biologia reprodutiva de espécies de Malpighiaceae (Anderson 1980, Steiner 1985, Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988, Sazima & Sazima 1989, Simpson 1989, Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Duarte 2002, Sigrist & Sazima 2004, Barbosa *et al.* 2005, Bernardo 2006 e Costa *et al.* 2006), sendo importante ressaltar algumas informações.

Alguns estudos ao nível de comunidade em Malpighiaceae (Sigrist & Sazima 2004, Costa *et al.* 2006, Barros 1992) referem a presença de flores durante praticamente o ano todo. Esta constante oferta de flores de Malpighiaceae é discutida com relação à manutenção e sobrevivência das larvas de abelhas coletoras de óleo, extremamente dependentes deste recurso (Costa *et al.* 2006).

A maioria das espécies estudadas quanto à biologia reprodutiva são bissexuais, predominantemente alógamas, com grande dependência dos polinizadores (Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Costa *et al.* 2006). Apesar disto, existem relatos sobre ocorrência de autofecundação críptica em flores cleistogâmicas (Anderson 1980), dioícia funcional (Steiner 1985), agamospermia (Sigrist & Sazima 2004) e mais frequentemente, de autocompatibilidade (Barros 1992, Sigrist & Sazima 2004).

Sigrist & Sazima (2004) em estudo com 12 espécies de Malpighiaceae verificaram uma série de características que podem limitar a ocorrência de autopolinização em algumas espécies, como a hercogamia, a protoginia e a presença de cutícula estigmática. Segundo as autoras, para que ocorra a aderência e hidratação dos grãos de pólen e conseqüente germinação, a cutícula estigmática deve sofrer algum tipo de pressão mecânica para ser rompida e esta pressão é geralmente exercida pelos polinizadores.

A maioria dos trabalhos apontam as abelhas pertencentes à tribo Centridini como as mais freqüentes visitantes em Malpighiaceae (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988, Sazima & Sazima 1989, Simpson 1989, Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Carvalho *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006). Estas abelhas podem coletar óleo das glândulas do cálice ou pólen como recurso floral, sendo consideradas importantes agentes polinizadores.

Muitos autores (Gates 1982, Buchmann 1987, Vogel 1990, Teixeira & Machado 2000, Castro *et al.* 2001, Carvalho *et al.* 2005 e Costa *et al.* 2006) relatam variação do número de glândulas no cálice a qual pode ocorrer entre espécies de um mesmo gênero, entre indivíduos de mesma espécie e entre flores de um mesmo indivíduo. Além disso, existem gêneros em que as glândulas encontram-se ausentes em todas as espécies, como *Coleostachys*, *Echinopterys*, *Lasiocarpus*, *Psilochaeta* e *Thryalis* (Anderson 1979). Segundo Vogel (1990) a redução do número de glândulas calicinais ou sua ausência em algumas espécies de Malpighiaceae pertencentes a gêneros do Novo Mundo ocorreu secundariamente como forma de economia de recursos energéticos. Carvalho *et al.* (2005), por sua vez, verificaram que em *Stigmaphyllon paralias* a produção de óleo é aumentada em flores com redução do número de glândulas no cálice, demonstrando existir compensação no uso dos recursos energéticos.

Glândulas florais e extraflorais em Malpighiaceae: estrutura e composição química da secreção

Apesar de escassos, alguns trabalhos podem ser citados a respeito da estrutura, ultra-estrutura e/ou funcionamento de estruturas glandulares em Malpighiaceae (Subramanian *et al.* 1990, Cocucci *et al.* 1996, Castro *et al.* 2001, Attala 2004, Vieira 2005, Possobom 2007).

As glândulas mais estudadas são as localizadas no cálice, as quais já foram descritas em *Hiptage sericea* (Subramanian *et al.* 1990), *Dinemandra ericoides* (Cocucci *et al.* 1996),

Galphimia brasiliensis (Castro *et al.* 2001), *Banisteriopsis stellaris*, *Banisteriopsis variabilis*, *Byrsonima intermedia*, *Byrsonima subterranea*, *Peixotoa reticulata* (Attala 2004), *Byrsonima sericea*, *Heteropterys chrysophylla* e *Peixotoa hispidula*, (Vieira 2005) e *Byrsonima intermedia* (Possobom 2007). De maneira geral, estas glândulas apresentam cutícula, epiderme secretora em paliçada e parênquima o qual apresenta região vascularizada por xilema e floema. Em todos os trabalhos acima citados as glândulas do cálice produzem secreção predominantemente lipofílica.

Glândulas localizadas em órgãos vegetativos foram descritas em *Hiptage sericea* (Subramanian *et al.* 1990), *Galphimia brasiliensis* (Castro *et al.* 2001), *Banisteriopsis stellaris*, *Banisteriopsis variabilis*, *Peixotoa reticulata*, (Attala 2004), *Peixotoa hispidula* e *Heteropterys chrysophylla* (Vieira 2005). As glândulas foliares são morfologicamente semelhantes às glândulas do cálice, entretanto são consideradas nectários extraflorais, pois a secreção é rica em açúcares.

Segundo Vogel (1990) alguns táxons apresentam glândulas nas pétalas ou no conectivo das anteras e ambos fazem parte da secreção de óleo, entretanto o significado ecológico destas estruturas ainda é desconhecido. Trabalhos com estas estruturas foram realizados apenas em *Dinemandra ericoides* (Cocucci *et al.* 1996), *Byrsonima sericea*, *Peixotoa hispidula*, e *Heteropterys chrysophylla* (Vieira 2005), limitando-se a aspectos anatômicos e histoquímicos. Vieira (2005) sugere que as glândulas localizadas nas pétalas são osmóforos enquanto as glândulas do conectivo das anteras são pseudonectários. Com relação à ultra-estrutura celular destas glândulas, nada foi encontrado.

Com relação à composição química da secreção produzida pelas estruturas glandulares em Malpighiaceae, destacam-se os trabalhos de Vinson *et al.* (1997), Seipold *et al.* (2004) Giese (2005) e Reis *et al.* (2007).

Vinson *et al.* (1997) encontraram mono e diglicerídeos, pequena quantidade de triglicerídeos, além de ácidos graxos livres e traços de carboidratos no óleo floral de *Byrsonima crassifolia*. Além disso, estes autores analisaram quimicamente o óleo retirado das patas de abelhas *Centris* (*C. adana* e *C. flavofasciata*) e do líquido retirado do ninho destas abelhas encontrando mesmo padrão de compostos químicos.

Reis *et al.* (2007) avaliaram a existência de mimetismo químico entre espécies de *Oncidium* (Oncidiine - Orchidaceae) e *Byrsonima intermedia*. Para isso, foram analisados os óleos produzidos pelos elaióforos presentes nas espécies de Orchidaceae e na espécie de Malpighiaceae. Além disso, foi analisado o líquido retirado do ninho de uma espécie de abelha, *Tetrapedia diversipes*, visitante comum das espécies vegetais estudadas. Os autores verificaram que os óleos florais de *Byrsonima intermedia* (ácido birsônico) e os óleos florais de Oncidiinae (oncidinol) são constituídos dos mesmos derivados de ácidos graxos. No ninho de *T. diversipes* foram encontrados dois compostos (ácido tetrapédico A e ácido tetrapédico B) estruturalmente relacionados aos compostos presentes nas espécies de Oncidiinae e em *Byrsonima intermedia*. Dessa maneira, os autores sugerem que os ácidos tetrapédico A e B são produtos da biotransformação do oncidinol e do ácido birsônico através da ação das hidrolases mandibulares de *Tetrapedia diversipes*.

***Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis**

Diplopterys pubipetala era até pouco tempo conhecida como *Banisteriopsis pubipetala* e pertencia ao subgênero *Pleiopterys* dentro de *Banisteriopsis* (Gates 1982). Recentemente, Anderson & Davis (2006) baseados em dados moleculares e morfológicos transferiram todas as espécies incluídas por Gates (1982) no gênero *Banisteriopsis* subg. *Pleiopterys* para o gênero *Diplopterys*. Desta forma, o gênero *Diplopterys* que era constituído

de apenas quatro espécies (Gates 1982) passou a compreender 31 espécies estritamente neotropicais (Anderson & Davis 2006).

Segundo Gates (1982) *D. pubipetala*, conhecida popularmente como “cipó preto”, “cipó de rego” ou “crista de galo”, é uma liana ou arbusto escandente com ampla distribuição pelo Brasil, ocorrendo também em regiões da Colômbia, Peru, Bolívia e Paraguai. Apresenta flores reunidas em inflorescências axilares e caracteriza-se pela presença de cinco sépalas das quais quatro são geralmente glandulares; cinco pétalas amarelas, unguiculadas e com margens fimbriadas, e segundo Gates (1982) as fimbrias basais da pétala posterior podem ser glandulares. Os frutos são alados e formados por até três sâmaras e as folhas apresentam glândulas diminutas nas margens do limbo, sendo mais numerosas na região apical.

O único trabalho disponível na literatura referente à *Diplopterys pubipetala* (como *Banisteriopsis pubipetala*), foi o realizado por Sigrist & Sazima (2004). Para esta espécie as autoras relataram a ocorrência de flores pseudo-hermafroditas (funcionalmente femininas) com anteras indeiscentes, baixa viabilidade polínica, grande produção de frutos resultantes de agamospermia, ocorrendo visita de apenas uma espécie de abelha (*Paratetrapedia sp.*) que coleta óleo e pólen como recursos florais, sem participação efetiva na polinização.

D. pubipetala representa importante componente da flora de cerrados na região centro-oeste do estado de São Paulo. A diversidade de estruturas glandulares associada à abundante entomofauna torna esta espécie um bom modelo para estudos relacionados com a função das glândulas na manutenção das interações planta-animal, especialmente com relação ao sucesso reprodutivo.

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos neste trabalho estão sendo apresentados na forma de capítulos os quais foram redigidos segundo normas da revista *Acta Botanica Brasilica*, sendo divididos da seguinte forma:

Capítulo I – Glândulas florais e a polinização de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis

Capítulo II – Estrutura, ultra-estrutura e mecanismo de secreção das glândulas florais em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis

Capítulo III – Estrutura, mecanismo de secreção e papel dos nectários foliares em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis

Capítulo I

Glândulas florais e a polinização de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis

RESUMO (Glândulas florais e reprodução de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis) – *Diplopterys pubipetala*, uma espécie de ampla distribuição em florestas semidecíduais e cerrado apresenta diferentes tipos de glândulas florais. Neste estudo procurou-se elucidar o papel destas glândulas na reprodução desta espécie ocorrente em um fragmento de cerrado, a partir de observações sobre a biologia floral, comportamento dos visitantes, além da análise do sistema reprodutivo. A população estudada produziu flores e frutos ao longo do ano, sendo que o pico de floração ocorreu entre agosto e setembro e o de frutificação entre outubro e novembro. As flores apresentam sete a dez glândulas conspicuas dispostas aos pares nas sépalas e glândulas diminutas na margem fimbriada de todas as cinco pétalas, sendo maiores na pétala posterior, a qual difere das demais pelo tamanho, formato e coloração. Além disto, todos os estames apresentam conectivo glandular. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a população estudada é predominantemente alógama e suas flores são funcionalmente hermafroditas. Os polinizadores mais frequentes foram abelhas dos gêneros *Centris* e *Monoeca*, as quais coletaram óleo das glândulas calicinais. As espécies de *Monoeca* foram consideradas as polinizadoras mais eficientes podendo coletar, além do óleo, pólen e a secreção viscosa produzida pelo conectivo glandular. As glândulas da pétala atuam como osmóforos e acredita-se que seu papel esteja relacionado à orientação química no direcionamento do pouso. Constatou-se que todas as glândulas florais desempenham funções como atrativos primários ou secundários, estando relacionadas também com o aumento da eficiência na transferência de pólen, sendo, portanto, fundamentais na manutenção da interação com os vetores de pólen e na reprodução da população de *D. pubipetala* estudada.

Introdução

Malpighiaceae distribui-se pelas regiões tropicais e subtropicais, possui 66 gêneros e aproximadamente 1200 espécies, das quais mais de 80% ocorrem no Novo Mundo (Anderson 1979, 1990, Cameron *et al.* 2001). No Brasil, são encontrados 38 gêneros e cerca de 300 espécies amplamente distribuídas em diferentes formações vegetais (Barroso 1984, Souza & Lorenzi 2005), especialmente no cerrado (Oliveira & Leitão Filho 1987, Mendonça *et al.* 1998).

Esta família caracteriza-se pela uniformidade na arquitetura geral das flores, sendo comum a presença de cinco sépalas portadoras de glândulas dispostas aos pares, cinco pétalas livres unguiculadas e androceu e gineceu com orientação bastante conservada (Anderson 1979). Estas características florais relacionam-se principalmente com atração, orientação e recompensa aos visitantes e, segundo Anderson (1979), esta uniformidade é provavelmente resultante da pressão de seleção exercida pelos polinizadores específicos que são, principalmente, abelhas da tribo Centridini.

Dentre as malpigiáceas paleotropicals, estas glândulas estão presentes em apenas 52% das espécies, sendo frequentemente referidas como nectários (Vogel 1990, Teixeira & Machado 2000). Por outro lado, estas glândulas estão presentes no cálice de mais de 90% das espécies de Malpighiaceae neotropicais (Vogel, 1990), nas quais são elaióforos e sua secreção representa importante recompensa aos polinizadores (Vogel 1974, Anderson 1979, 1990, Neff & Simpson 1981, Buchmann 1987, Taylor & Crepet 1987, Lobreau-Callen 1989, Sazima & Sazima, 1989, Vogel 1990, Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Carvalho *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006). Os óleos secretados por estas glândulas, consistem de ácidos graxos saturados (Roubik, 1989) e ácidos graxos livres (Vogel, 1974), que são coletados por abelhas fêmeas, principalmente da tribo Centridini e são utilizados como fonte de alimentação de suas larvas e como impermeabilizante dos ninhos (Neff & Simpson 1981, Buchmann 1987, Vogel 1990, Vinson *et al.* 1997, Sigrist & Sazima 2004). Há também indicações de que os óleos florais podem ser utilizados para nutrição dos adultos, sendo este um recurso mais energético do que o néctar (Buchmann, 1987).

Além das glândulas do cálice, que oferecem recursos aos visitantes florais, merecem destaque outras glândulas localizadas nas flores como as que ocorrem nas margens fimbriadas das pétalas posteriores (Gates 1982) ou no conectivo das anteras de alguns táxons, que são também referidas como secretoras de substâncias lipídicas, porém o seu significado ecológico ainda é desconhecido (Vogel 1990). Segundo Gates (1982), apesar de não haver estudos sobre a função do tecido glandular do conectivo, sua localização na flor favorece o contato com a superfície ventral das abelhas durante as visitas, sugerindo que a secreção possa atuar na adesão dos grãos de pólen ao corpo do inseto.

A estreita relação existente entre Malpighiaceae e seus polinizadores específicos tem despertado o interesse de inúmeros pesquisadores com relação à ecologia da polinização e ao sistema reprodutivo de espécies desta família (Anderson 1980, Steiner 1985, Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988, Sazima & Sazima 1989, Simpson 1989, Barros 1992,

Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Bernardo 2006, Costa *et al.* 2006, Vilhena & Augusto 2007).

A maioria das espécies estudadas quanto à biologia reprodutiva é hermafrodita, predominantemente alógama e apresenta grande dependência dos polinizadores (Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Costa *et al.* 2006). Entretanto, estudos apontam a existência de flexibilidade e diversidade no sistema reprodutivo de várias espécies de Malpighiaceae (Anderson 1980, Steiner 1985, Barros 1992, Sigrist & Sazima 2004, Costa *et al.* 2006).

Diplopterys pubipetala (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis distribui-se por todo o Brasil e América do Sul, sendo freqüente em áreas de cerrado e de floresta estacional semidecidual (Gates 1982, Batalha & Mantovani 2000, Morelato & Leitão-Filho 1996, Sigrist & Sazima 2004), onde ocorre como liana ou arbusto escandente. Esta espécie pode apresentar populações com flores hermafroditas (Gates 1982) e populações com flores pseudo-hermafroditas, macho-estéreis (Sigrist & Sazima 2004). Em plantas com flores macho-estéreis foi relatada a formação de sementes exclusivamente por agamospermia, não tendo sido registrada ocorrência de visitas legítimas (Sigrist & Sazima 2004). Entretanto, existem as características florais que parecem estar relacionadas com atração primária e secundária de polinizadores e sugerem o estabelecimento de interações, especialmente com abelhas coletoras de óleo. Desta forma, estudos sobre a biologia reprodutiva de plantas pertencentes à outras populações são fundamentais para a compreensão do papel das estruturas secretoras na interação planta-animal nesta espécie.

Neste estudo procurou-se elucidar o papel das glândulas florais nas interações com as abelhas visitantes e sua importância na reprodução de *Diplopterys pubipetala*.

Material e métodos

Área de estudo e espécie

Foram acompanhados indivíduos de *Diplopterys pubipetala* pertencentes a uma população localizada na borda de um fragmento de cerradão em área sob intensa ação antrópica, próximo a culturas de *Citrus* e rodovias, no município de Botucatu-SP (22°42'38" S e 48°18'35" W). As observações foram realizadas no período de agosto de 2006 a dezembro de 2007 e totalizaram aproximadamente 70 horas.

Como documento taxonômico, ramos férteis de *D. pubipetala* foram coletados, identificados e depositados no Herbário “Irina Delanova Gemtchujnicov” (BOTU) sob os números 25306-310.

Fenologia e biologia floral

A ocorrência das fenofases reprodutivas foi avaliada mensalmente em todos os indivíduos da população de *D. pubipetala*, sendo registrados os eventos de floração, frutificação e dispersão.

Para entender o funcionamento das flores, foram feitas observações sobre a morfologia e longevidade floral, horário de abertura, porcentagem de flores em antese por dia, além da verificação de odor através de testes organolépticos e detecção de osmóforos através da imersão de flores em vermelho neutro (Vogel, 1990). A receptividade do estigma foi avaliada através da observação, com lupa manual, de alterações morfológicas, presença de exudatos, mudanças de coloração e reação ao peróxido de hidrogênio (Dafni 2005). A viabilidade dos grãos de pólen (n=29 flores, 12 plantas) foi avaliada com carmim acético (Dafni 2005).

Sistema reprodutivo

Com o intuito de avaliar o sistema reprodutivo de *D. pubipetala*, ramos contendo botões florais pré-antese foram ensacados. No momento em que se iniciava a abertura das primeiras pétalas, antes de ocorrer a deiscência das anteras, as flores foram cuidadosamente emasculadas com auxílio de tesoura oftalmológica para verificação de agamospermia e na ocasião da antese foram realizados tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada manual, além da verificação da ocorrência de autopolinização espontânea e polinização em condições naturais (controle). Os tratamentos para verificação de agamospermia, autopolinização e polinização cruzada manual foram mantidos ensacados até a senescência das flores ou início do desenvolvimento de frutos. Em cada planta utilizada nos experimentos de verificação do sistema reprodutivo, foi estimada a viabilidade do pólen com objetivo de comparar os níveis de viabilidade em plantas com ocorrência de agamospermia ou diferentes graus de autocompatibilidade. Além da avaliação da frutificação natural (controle) foi realizado um experimento com controle de visitas no qual flores mantidas ensacadas durante todo o seu desenvolvimento foram expostas aos visitantes, logo após sua abertura, por cerca de 40 minutos.

Para avaliação do sistema reprodutivo foram utilizadas 1020 flores, pertencentes a 12 indivíduos. Considerando-se que cada flor pode originar até três unidades de dispersão

(samarídeos) provenientes do gineceu tricarpetal, cada diásporo em potencial foi contabilizado como uma unidade de polinização, sendo o número de flores utilizadas nos tratamentos multiplicado por três, totalizando 3060 carpelos avaliados. Os tratamentos foram feitos de acordo com metodologia descrita em Dafni (2005) e os experimentos de fecundação cruzada foram realizados entre plantas distantes, no mínimo, 20 metros entre si. Os frutos formados foram avaliados periodicamente durante seis semanas.

Com o intuito de avaliar a importância da ruptura da cutícula para adesão e germinação dos grãos de pólen sobre a superfície estigmática de *D. pubipetala*, experimentos de polinização manual foram realizados envolvendo dois tratamentos, um com aplicação de pressão mecânica (n=60 flores) e outro sem aplicação de pressão mecânica (n=49 flores) durante a deposição dos grãos de pólen sobre os estigmas.

Visitantes florais

O comportamento dos visitantes foi descrito com base nas observações de campo, análise de fotografias e de filmagens. As observações foram feitas no período das 6 às 20hs, sendo registrados principalmente o horário, duração e frequência de visitas, comportamento, tipo de recurso coletado e local de contato do corpo dos visitantes com anteras e estigmas. A maioria dos visitantes registrados foram coletados, analisados em estereomicroscópio para verificar a presença e a localização de grãos pólen e óleo no corpo e, posteriormente, enviados para identificação por especialista.

Caracterização das estruturas florais envolvidas na polinização

A distribuição, localização, atividade secretora durante a antese e tamanho das estruturas glandulares presentes no cálice, nas pétalas e no conectivo foram registrados, sendo as medições realizadas com auxílio de paquímetro digital. A morfologia destas estruturas foi analisada sob estereomicroscópio Olympus SZ 61 (Japan) equipado com câmera digital Olympus C7070 (Olympus, Japan) e sob microscópio eletrônico de varredura (MEV) Fei – Quanta 200 (Phillips, Tchecoslováquia). Para a análise em MEV, flores em diferentes fases de desenvolvimento foram coletadas e fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) por 24 horas, seguida de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas e de desidratação em série etílica crescente. As amostras foram submetidas ao ponto crítico e metalizadas com ouro em aparelho MED 010 da Balzers Union.

Para avaliar o efeito do contato dos visitantes com as glândulas do cálice, um conjunto de flores foi mantido isolado desde o início do desenvolvimento até a antese. Neste momento,

o isolamento foi retirado e flores, nunca visitadas, foram imediatamente coletadas, enquanto outras ficaram expostas e foram coletadas logo após a ocorrência de visita, sendo as glândulas calicinais das flores de ambos os tratamentos processadas e analisadas em MEV.

Resultados

Fenologia

Na área de estudo, os indivíduos de *Diplopterys pubipetala* ocorrem como arbustos com ramos escandentes (Fig. 1, 2) nos quais, na fenofase de floração, são observadas inflorescências axilares mistas, constituídas de racemos com unidades dicasiais, sendo que em cada axila pode ser encontrada mais de uma inflorescência com até cinco pares de flores cada (Fig. 3-5). Na fenofase de frutificação verificam-se frutos alados constituídos por 1-3 samarídeos de coloração avermelhada quando imaturos (Fig. 6), os quais, durante o amadurecimento tornam-se secos com coloração castanha e são dispersos individualmente.

A fenologia reprodutiva foi semelhante nos anos de 2006 e 2007 na população estudada, sendo observados botões, flores e frutos em pequenas proporções ao longo de praticamente todo o ano. Entretanto, maior proporção de estruturas reprodutivas foi observada entre julho e novembro (Fig. 7). As inflorescências começam a se desenvolver em meados de maio na maioria dos indivíduos da população sendo o pico de floração observado entre agosto e setembro. A partir deste momento, as plantas passaram a apresentar grande proporção de frutos imaturos, cujo desenvolvimento se conclui em cerca de dois meses, sendo o pico da dispersão observado em novembro.

Morfologia e eventos florais

As flores de *Diplopterys pubipetala* são amarelas, marcadamente zigomorfas e hermafroditas, medindo aproximadamente 2,5 cm de largura (Fig. 8) e a antese dura cerca de 2 dias.

Em um mesmo indivíduo foram identificadas flores com número de glândulas variando de sete a dez. Esta variação foi analisada, verificando-se predomínio de flores com oito glândulas no cálice (46,7%), sendo a ausência verificada na sépala oposta à pétala posterior. Flores com dez, nove e sete glândulas foram menos comuns e corresponderam a respectivamente a 23,3%, 23,3% e 6,7%, sendo as ausências verificadas na sépala oposta à pétala posterior e nas sépalas adjacentes.

Estas glândulas do cálice são conspícuas, verdes e variam de 1,9-3,3 mm de comprimento e 1,2-1,8 mm de largura (Fig. 9). Em glândulas de botões em pré-antese já é possível visualizar um volumoso espaço onde a secreção produzida é acumulada (Fig 17). Quando as abelhas coletoras de óleo visitam legitimamente as flores de *D. pubipetala* elas não contactam as sépalas opostas à pétala posterior, onde foram observadas as ausências.

A análise da superfície de glândulas visitadas unicamente por abelha *Monoeca* sp. revelou que a cutícula, que delimitava o espaço onde a secreção estava acumulada, foi rompida pela atividade de coleta do óleo por esta abelha. Esta ruptura apresentou-se sob a forma de uma estria no sentido longitudinal da glândula (Fig. 18).

A corola de *D. pubipetala* apresenta uma pétala disposta posteriormente, duas dispostas postero-lateralmente e duas antero-lateralmente (Fig. 8). A pétala posterior, diferenciada das demais pelo menor tamanho do limbo e maior espessura da unha, apresentou, na população estudada, variações na coloração. Foram observados indivíduos com pétalas posteriores totalmente amarelas e outros com pétalas posteriores contendo manchas avermelhadas de tamanhos variáveis localizadas na região central do limbo, próximas à unha (Fig. 8).

Todas as pétalas apresentaram margens fimbriadas com terminações dilatadas as quais correspondem a diminutas glândulas (Fig. 8, 11, 13). Na pétala posterior estas glândulas são mais numerosas e aparentemente mais desenvolvidas, especialmente na porção basal do limbo. Algumas vezes foram observadas gotículas próximas às glândulas da pétala posterior, entretanto não foi possível confirmar se estas gotículas eram provenientes das glândulas. Além disto, não foi observado comportamento de coleta de secreção por parte de nenhum dos insetos visitantes.

Dentre os dez estames presentes nas flores de *D. pubipetala*, dois localizam-se posteriormente, cinco na região mediana e três localizam-se na região anterior da flor, opostos à pétala posterior (Fig. 8, 11, 12). Todos os estames apresentaram conectivo glandular amarelo-claro e anteras deiscentes contendo grãos de pólen viáveis (Fig. 11-13).

O conectivo glandular dos estames apresenta as regiões apical e mediana compostas por estruturas arredondadas, túrgidas, que se assemelham a grãos de pólen (Fig. 11-13, 19). Sobre estas estruturas são frequentemente observadas pequenas gotas translúcidas de secreção as quais apresentam viscosidade ao toque (Fig. 13). Embora todos os visitantes florais entrem em contato com esta secreção, apenas abelhas do gênero *Monoeca* apresentam comportamento que sugere a coleta da mesma, conforme relatado mais adiante.

Os grãos de pólen, por sua vez, são brancos, de tamanhos variáveis, e são expostos de forma agregada, a partir das 8:00 h, cerca de 2 horas após a abertura da flor, quando ocorre a deiscência das anteras. A viabilidade polínica foi alta em praticamente todos os indivíduos amostrados, com média de 93,51%, exceto em uma planta que apresentou viabilidade média de 83,11%.

O gineceu é composto por ovário súpero tricarpelar, três estiletes e estigmas livres entre si. Os estigmas apresentam disposição triangular na flor, sendo dois localizados próximos à pétala posterior junto a cada um dos estames e um localizado em posição central adjacente aos três estames anteriores (Fig. 8). Estigmas de flores visitadas unicamente por abelha do gênero *Monoeca* sp. apresentaram cutícula rompida e superfície repleta de grãos de pólen, alguns dos quais foram observados germinando (Fig. 20).

As flores têm antese diurna e aproximadamente 5% dos botões abrem-se, a cada dia, perto das 6:00 h. A abertura inicia-se pelas pétalas antero-laterais, seguida pelas duas pétalas postero-laterais sendo a posterior, a última a se abrir.

Em vários indivíduos da população, era freqüente a presença botões, aparentemente em pré-antese, cujas pétalas frouxas não completavam a abertura, permanecendo com este aspecto até sua senescência e abscisão. Estes botões foram acompanhados para verificar a ocorrência de cleistogamia nesta espécie, entretanto em nenhum deles observou-se a formação de frutos. Análises em estereomicroscópio revelaram a presença de larvas de insetos e teias, no interior dos mesmos, sugerindo que a não abertura esteja associada a este fato.

O odor exalado pelas flores é suave e reações positivas com vermelho neutro foram visualizadas principalmente na região próxima à unha de todas as pétalas, nas terminações das fímbrias (região das glândulas) e na região apical dos conectivos dos estames (Fig. 14-16).

Sistema reprodutivo

Os resultados referentes aos experimentos para verificação do sistema reprodutivo encontram-se reunidos na Tabela 1.

Foram produzidos frutos em todos os experimentos realizados, havendo pequena proporção de frutos formados por agamospermia e por autopolinização. O experimento de polinização cruzada realizado com ruptura da cutícula estigmática resultou em taxa de frutificação 11 vezes superior à verificada no experimento em que não foi realizada esta ruptura.

A produção de frutos por agamospermia e por autofecundação manual verificada na população ocorreu em um mesmo indivíduo, cujas taxas de frutificação foram de cerca de 4%

por agamospermia, 15% por autopolinização manual e 33% por polinização cruzada manual. Este mesmo indivíduo foi o que apresentou a menor viabilidade polínica relatada anteriormente (83,11%).

No experimento com controle de visitas, as flores foram visitadas por uma única espécie de abelha, *Monoeca* sp, a qual realizou diversas seqüências durante os 40 minutos em que as flores permaneceram desensacadas, que resultaram em uma taxa de frutificação de 25%, semelhante à taxa de frutificação resultante dos experimentos de polinização cruzada (21,7%) e cerca de quatro vezes maior que a taxa de frutificação natural (4,9%).

Visitantes

As primeiras visitas ocorreram a partir das 7:30 h e foram restritas às plantas localizadas em áreas expostas ao sol. Com o passar do dia, as abelhas ampliavam sua área de visitação, havendo um pico entre 9:00-10:00 h (Fig. 21), quando a maioria das plantas encontrava-se exposta ao sol. Foram observadas diferentes espécies de abelhas, de pequeno a grande porte, pertencentes aos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Epicharis*, *Monoeca* e *Xylocopa* (Tab. 2) visitando as flores de *D. pubipetala*, sendo a maioria das visitas legítima ocorrendo contato das abelhas com anteras e estigmas durante a coleta de óleo das glândulas calicinais, que é realizada com as pernas anteriores.

As abelhas mais freqüentes foram aquelas pertencentes aos gêneros *Centris* (64%) e *Monoeca* (34%), totalizando 98% das visitas registradas. Chama a atenção nestas abelhas, a exatidão no comportamento pouso, propiciado pela adequação do seu corpo à morfologia, disposição e dimensão dos elementos florais. Estas abelhas pousam diretamente sobre a flor com a cabeça voltada para a pétala posterior e as pernas encaixadas precisamente entre as pétalas laterais. Toda a porção ventral fica em contato com as estruturas reprodutivas da flor enquanto alcançam as glândulas do cálice com os primeiros pares de pernas, com as quais coletam o óleo secretado, através da raspagem das glândulas, o qual é armazenado nas pernas posteriores.

Foram observadas abelhas do gênero *Centris* (Fig. 22-24) de pequeno, médio e grande porte e todas realizaram seqüências bastante rápidas, visitando grande número de flores em poucos segundos. Após algumas seqüências de visitas em flores de um mesmo indivíduo e de indivíduos próximos, estas abelhas pousavam em um galho ou uma folha para realizar a limpeza do corpo empacotando o pólen, possivelmente junto com alguma secreção do conectivo, nas pernas posteriores. Estas abelhas também foram observadas coletando óleo de flores velhas e de botões florais. A análise em laboratório dos espécimes de *Centris*

evidenciou pequena quantidade de pólen espalhado pelo corpo e grande quantidade de grãos de pólen agrupados em densa massa de cor clara, provavelmente uma mistura de pólen e óleo, no último par de pernas.

As abelhas do gênero *Monoeca* (Fig. 25-26), de pequeno porte, realizaram sequências de visitas a flores de um mesmo indivíduo ou de indivíduos próximos, sendo seu tempo de permanência na flor maior do que o das abelhas do gênero *Centris*. O comportamento de coleta de óleo das glândulas do cálice foi semelhante ao observado em *Centris*, entretanto as duas espécies de *Monoeca* pressionavam o abdome sobre os órgãos reprodutivos em movimentos repetitivos, durante a coleta. Abelhas deste gênero também foram observadas coletando pólen, sempre imediatamente após a coleta de óleo. Para esta coleta, os dois estames posteriores eram pressionados com o primeiro par de pernas, em movimento ascendente e, desta forma a secreção produzida pelas glândulas do conectivo também era coletada. A análise em laboratório dos espécimes de *Monoeca* evidenciou grande quantidade de grãos de pólen distribuídos ao longo do corpo, concentrados principalmente na região ventral do abdome, correspondente à localização do estigma central, sendo também observados grãos de pólen no tórax, junto à inserção das pernas anteriores e nas laterais da cabeça, próximo aos olhos e ao aparelho bucal, região que corresponde exatamente à localização dos dois estigmas posteriores. Grãos de pólen foram observados em todas as pernas, sendo que nas posteriores encontram-se agrupados em massa amarelo-clara, contendo possivelmente mistura de pólen e óleo.

Visitas esporádicas e muito rápidas de abelhas pertencentes aos gêneros *Bombus*, *Epicharis* e *Xylocopa*, todas de grande porte, foram verificadas, entretanto não foi possível observar com detalhes o comportamento de visita e o tipo de recurso coletado por estas espécies.

Discussão

Fenologia

A população de *D. pubipetala* estudada iniciou seu ciclo reprodutivo no final do outono, sendo o pico de floração no final do inverno, período de transição da estação seca para a estação úmida, e o de frutificação na primavera, com dispersão no início da estação úmida, semelhante ao observado por Batalha & Mantovani (2000) em área de cerrado no município de Santa Rita do Passa Quatro, SP.

Em estudo da fenologia reprodutiva de lianas em área de reserva de floresta semidecidual na região de Campinas, Morellato & Leitão Filho (1996) observaram que dentre as famílias com maior número de lianas está Malpighiaceae, com 17 espécies, as quais, de maneira geral, apresentaram pico de floração em março ou setembro/outubro e curto período de maturação dos frutos. Com relação a *Diplopterys pubipetala* (sin. *Banisteriopsis pubipetala*) estes autores observaram florescimento no mês de outubro, semelhante ao verificado por Sigrist (2001, dados não publicados) na mesma reserva.

Batalha & Mantovani (2000) verificaram florescimento e frutificação de espécies de Malpighiaceae ao longo de todo o ano e, segundo Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger (1988), apesar das malpighiáceas florescerem quase que continuamente no cerrado, há uma intensificação na época quente e chuvosa, que coincide com o período de maior atividade das abelhas pertencentes à tribo Centridini.

Ecologia da polinização

As flores de *D. pubipetala* são semelhantes à de outras espécies de Malpighiaceae conforme relatado por Anderson (1979) em seu trabalho sobre a uniformidade floral nesta família. Entretanto, algumas características morfológicas merecem destaque como a presença de zigomorfia evidente em todos os verticilos florais (cálice, corola, androceu e gineceu), além da presença de diversas estruturas glandulares na flor.

Embora a zigomorfia seja uma característica predominante nas flores de Malpighiaceae, é possível identificar certo grau de actinomorfia em alguns táxons (Anderson 1979). Segundo Vogel (1990), flores que tendem a actinomorfia são mais basais do que as flores zigomorfas e, na maioria das vezes, apresentam glândulas calicinais aos pares em todas as cinco sépalas, como ocorre com a maioria das espécies de *Byrsonima*, por exemplo. Em flores actinomorfas os visitantes circundam a flor coletando óleo de todas as glândulas, já em flores zigomorfas o comportamento dos visitantes torna-se fixo devido à orientação pela pétala diferenciada. Desta forma, a fixação do posicionamento do visitante com relação à flor restringe a coleta da secreção nos elaióforos presentes nas sépalas anteriores (opostas à pétala posterior), o que pode explicar a perda destas estruturas principalmente nesta posição, representando maior economia com relação a custos energéticos.

Variação no número de glândulas calicinais foi observada em *D. pubipetala*, evidenciando a tendência de redução nas regiões não alcançadas pelos visitantes florais. A ausência ou redução do número de glândulas no cálice foi relatada em diversos estudos (Buchmann 1987, Sazima & Sazima 1989, Teixeira & Machado 2000, Castro et al. 2001,

Carvalho *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006), podendo ocorrer entre indivíduos de uma população ou entre flores de um mesmo indivíduo, como é o caso de *D. pubipetala*.

Abelhas pertencentes à tribo Centridini, principalmente do gênero *Centris* são referidas como os visitantes florais mais freqüentes em Malpighiaceae (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988, Sazima & Sazima 1989, Simpson 1989, Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigris & Sazima 2004, Carvalho *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006), fato também verificado no presente trabalho.

Além de *Centris*, espécies de abelhas do gênero *Monoeca*, também coletoras de óleo, apresentaram alta freqüência de visitas às flores de *D. pubipetala*. As duas espécies de *Monoeca* apresentaram aglomerados de pólen na região ventral do abdome, concentrados justamente nas regiões do corpo que contactam os três estigmas. Além disto, a ruptura da cutícula estigmática e germinação dos grãos de pólen depositados após suas visitas foram registradas e, nos experimentos de polinização controlada, as visitas de *Monoeca* sp resultaram em altas taxas de frutificação, indicando sua eficiência na polinização de *D. pubipetala*. Já nas abelhas do gênero *Centris*, não foi observada quantidade significativa de pólen em nenhuma porção do corpo, possivelmente devido ao fato de estas espécies se limparem constantemente, empacotando todo o pólen disponível nas pernas posteriores. Considerando que estas abelhas são os visitantes mais freqüentes de *D. pubipetala*, sua eficiência em estocar o pólen, tornando-o indisponível para a polinização, pode ser parcialmente responsável pela baixas taxas de frutificação natural na população estudada.

De acordo com o exposto, é possível afirmar que a presença das glândulas nas pétalas e do conectivo glandular em *D. pubipetala*, além das glândulas características do cálice, sugere níveis adicionais de especialização relacionados com a interação com animais antófilos, especialmente com espécies do gênero *Monoeca*, que coletam ativamente as secreções produzidas pelas glândulas calicinais e pelo conectivo glandular.

Sistema reprodutivo

Diferente do observado por Sigris & Sazima (2004), as anteras de *D. pubipetala*, em todas as plantas da população estudada, são deiscentes e apresentam alta porcentagem de grãos de pólen viáveis, sendo as flores consideradas funcionalmente hermafroditas. Estes resultados confirmam, portanto, a variação interpopulacional na funcionalidade das flores hermafroditas nesta espécie, referida por Anderson (com. pessoal, em Sigris & Sazima 2004).

Os resultados aqui obtidos com relação ao sistema reprodutivo de *D. pubipetala* indicaram que esta população é predominantemente alógama, principalmente considerando

que o maior sucesso na formação de frutos foi obtido através dos experimentos de polinização cruzada manual (com ruptura da cutícula) e do controle com observação de visitas, cuja polinização foi efetuada exclusivamente por *Monoeca* sp. Resultado semelhante é descrito para a maioria das espécies de Malpighiaceae estudadas, sendo grande a dependência dos polinizadores nesta família (Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Costa *et al.* 2006).

Com relação ao sistema de compatibilidade observaram-se diferenças entre os indivíduos da população, indicando a ocorrência de sistema de reprodução misto, já que um dos indivíduos estudados apresentou formação de frutos em flores autopolinizadas, evidenciando a ocorrência de autocompatibilidade. Segundo Lipow & Wyatt (2000), apesar de muitos autores se referirem às espécies como autocompatíveis ou auto-incompatíveis, os sistemas de reprodução são mais complexos, podendo existir diferentes níveis de autocompatibilidade entre os indivíduos de uma população, conforme verificado em *D. pubipetala*.

A presença de autocompatibilidade é uma característica relativamente freqüente em Malpighiaceae (Barros 1992, Sigrist & Sazima 2004, Costa *et al.* 2006). A baixa taxa de frutos produzidos por autofecundação na população de *D. pubipetala* estudada, pode ser interpretada tendo em vista a existência de mecanismos que limitam a autofecundação tais como hercogamia e presença da cutícula estigmática que necessita ser rompida para que os grãos de pólen germinem (Sigrist & Sazima 2004). Em condições naturais, esta ruptura pode ser ocasionada por fatores mecânicos, principalmente pelos visitantes florais, o que facilitaria a germinação de grãos de pólen tanto da própria planta (geitonogamia), quanto de plantas distintas (xenogamia). A importância da ruptura desta cutícula para o sucesso da polinização é claramente evidenciada quando se compara o resultado das polinizações cruzadas efetuadas sem ruptura e com ruptura, cujas taxas de frutificação foram de 2% e 22%, respectivamente.

A produção de frutos em condições naturais (controle) apresentou-se baixa na população estudada, sendo este fato referido para outras espécies da família (Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004). Teixeira & Machado (2000) relacionaram a baixa taxa de frutificação por polinização natural em *Byrsonima sericea* ao comportamento de abelhas que forrageiam por longo tempo em um único indivíduo, levando à intensa geitonogamia nesta espécie, que é auto-incompatível. Em *D. pubipetala* a baixa produção de frutos também pode estar associada aos diferentes comportamentos dos visitantes os quais podem ser mais ou menos eficientes como vetores de pólen, além da possibilidade de existir na população, plantas com diferentes níveis de autocompatibilidade.

Por outro lado, Sigrist & Sazima (2004) verificaram alta taxa de frutificação por agamospermia em um indivíduo de *D. pubipetala* ocorrente em área de floresta semidecidual. Entretanto, na população de *D. pubipetala* avaliada no presente estudo, a formação de frutos por agamospermia esteve restrita a uma única planta, que também produziu frutos por autopolinização manual, polinização cruzada manual e polinização livre, indicando não se tratar, portanto, de uma planta exclusivamente agamospérmica.

A agamospermia (apomixia *stricto sensu*) é um tipo de reprodução assexuada em que sementes, geneticamente idênticas à planta mãe, podem ser formadas através de diferentes mecanismos como aposporia, diplosporia e embrionia adventícia (Salomão & Allem 2001; Koltunow & Grossniklaus 2003). Este tipo de reprodução tem sido correlacionado com a ocorrência de poliembrionia e de reprodução sexual, sugerindo a presença de sistemas de cruzamento múltiplos em algumas espécies de cerrado (Salomão & Allem 2001; Martins & Oliveira 2003; Mendes-Rodrigues 2005).

A agamospermia pode assegurar a reprodução da espécie mesmo na ausência de polinizadores. Quando comparado com a propagação vegetativa, este tipo de reprodução apresenta vantagens por permitir a disseminação de um genótipo extremamente adaptado às condições locais através de sementes, podendo alcançar maiores distâncias e contar com mecanismos de dormência, que podem ser fundamentais para o seu estabelecimento em novos habitats (Richards 1986). Por outro lado, a agamospermia, por não permitir a recombinação gênica, restringe as possibilidades de evolução face às variações ambientais. Deste modo, evitar a perda de variabilidade, mantendo possibilidades de recombinação, através de reprodução sexual pode ajudar a preservar o potencial para mudanças adaptativas (Ellstrand & Elam 1993). Segundo Endress (1994), há mecanismos que evitam sistemas reprodutivos restritos, podendo ser verificado um balanço flexível em várias famílias de plantas, evidenciando que a evolução dos mecanismos envolvidos nestes sistemas não é unidirecional, podendo regredir em alguns momentos da história evolutiva ou ocorrer repetidamente dentro de um pequeno grupo.

Os resultados aqui apresentados para esta espécie, analisados juntamente com resultados obtidos por Sigrist & Sazima (2004) confirmam a existência de plasticidade no sistema reprodutivo de *D. pubipetala*. Considerando que esta espécie ocorre em áreas perturbadas, como bordas de fragmentos e beiras de estradas, esta variação pode representar um maior potencial na ocupação destes ambientes, facilitando a disseminação de genótipos localmente adaptados, através da agamospermia e, por outro lado permitindo a recombinação gênica através da reprodução sexual.

Glândulas florais

Glândulas presentes no cálice de espécies de Malpighiaceae, denominadas elaióforos (Vogel 1974) são frequentemente relacionadas à oferta de óleos como recompensa aos polinizadores (Buchmann 1987). Neste estudo, todos os visitantes registrados nas flores de *D. pubipetala* apresentaram comportamento de coleta de secreção junto a estas estruturas, indicando sua importância como atrativo primário para os polinizadores.

As glândulas da margem fimbriada de todas as pétalas e a região apical do conectivo reagiram ao teste com vermelho neutro, indicando produção de aroma nestas regiões. Os odores florais atuam na atração de polinizadores, principalmente abelhas as quais são particularmente sensíveis a eles, utilizando-os para localização à curta distância (Proctor e Yeo 1979). Observou-se que as primeiras visitas do dia às flores de *D. pubipetala* ocorrem em indivíduos expostos ao sol, sendo possível que a elevação de temperatura, decorrente da incidência solar, aumente a volatilização destas substâncias, resultando em maior atração olfativa sobre as abelhas.

A observação do comportamento das abelhas visitantes revelou grande precisão no pouso que pode ser direcionado tanto por orientação visual quanto por orientação química. Além das características morfológicas que fazem da pétala posterior importante guia de orientação visual para os visitantes, suas glândulas são mais desenvolvidas e numerosas que as das pétalas laterais, podendo estar relacionadas com produção diferencial de aroma que pode auxiliar no correto posicionamento dos polinizadores no momento do pouso.

Na superfície do conectivo foram frequentemente observadas pequenas gotas de secreção viscosa que eram coletadas juntamente com pólen por *Monoeca* sp. Considerando suas características morfológicas e a viscosidade apresentada por sua secreção, foram atribuídas duas prováveis funções ao conectivo glandular em *Diplopterys pubipetala*. Como a superfície do conectivo apresenta aparência semelhante a grandes grãos de pólen, pode atuar na atração visual de visitantes, função semelhante à atribuída aos estaminódios de *Commelina dianthifolia* por Hrycan & Davis (2005) os quais mimetizam, através da coloração e das características morfológicas, grandes quantidades de grãos de pólen que atuam na atração de insetos às flores. Adicionalmente, a secreção liberada pode permitir melhor aderência dos grãos de pólen ao corpo dos visitantes possibilitando maior eficiência na transferência destes grãos de pólen para outras flores, além de mantê-los úmidos favorecendo a aderência aos estigmas. Steiner (1985), estudando a polinização de *Drymonia serrulata* (Gesneriaceae), verificou a presença de elaióforos tricomáticos no interior da corola, cuja secreção lipofílica era depositada nas anteras e transferida para o corpo dos visitantes facilitando a aderência dos

grãos de pólen, atuando como um “pollen kit” externo. Moyano et al. (2003), observaram tricomas glandulares nas anteras de *Leonurus sibiricus*, os quais secretam substâncias pegajosas que atuam como um adesivo acessório para os grãos de pólen, aumentando a eficiência da transferência dos mesmos para os estigmas. Deste modo, a secreção presente no conectivo das anteras de *D. pubipetala* pode desempenhar papel semelhante a fios de viscina ou “pollen kit”, que aumentam a eficiência na polinização zoófila.

De acordo com as informações obtidas no presente estudo, é possível concluir que todas as glândulas florais desempenham funções essenciais atuando como atrativos primários e secundários para os polinizadores, além de aumentar a eficiência na transferência de pólen. A população de *D. pubipetala* estudada é predominantemente alógama e por isso a presença de vetores de pólen é indispensável para o sucesso reprodutivo, sendo as glândulas florais fundamentais na manutenção desta interação. Assim, o presente estudo contribui para o conhecimento da diversidade de estruturas glandulares em flores de Malpighiaceae e seu papel na reprodução.

Agradecimentos

À Fapesp pela bolsa de mestrado (06/54268-0). À Profa. Dra. Rita de Cássia S. Maimoni-Rodella, pelas sugestões, pelo auxílio no processo de identificação das abelhas e pelo empréstimo do material utilizado nos trabalhos de campo. Ao Prof. Dr. João Maria Franco de Camargo pela identificação das abelhas. Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica pelo auxílio no preparo das amostras.

Referências bibliográficas

- Anderson, W.R. 1979. Floral conservation in Neotropical Malpighiaceae. **Biotropica** 11:219-223.
- Anderson, W.R. 1990. The origin of the Malpighiaceae – The evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 64: 210-224.
- Barros, M. A. G. 1992. Fenologia da floração, estratégias reprodutivas e polinização de espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* Rich (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 52(2): 343-353.
- Barroso, G. M. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. p.325-329.

- Batalha, M.A. & Mantovani, W. 2000. Reproductive phenological patterns of cerrado plant species at the Pé-de-gigante reserve (Santa Rita do Passa quarto, SP, Brazil): a comparison between the herbaceous and woody floras. **Revista Brasileira de Biologia** 60(1): 129-145.
- Bernardo, D.S. 2006. Biologia reprodutiva de *Byrsonima sericeae* (Malpighiaceae) em fragmentos de diferentes tamanhos na restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. **Dissertação (mestrado)** – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical, 41fls.
- Buchmann, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Rev. Ecol. Syst.** 18: 343-369.
- Cameron, K.M.; Chase, M. W.; Anderson, W. R. AND Hills, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. **American Journal of Botany** 88:1847-1862.
- Carvalho, P.D.; Borba, E.L.; Lucchese, A.M. 2005. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Bot. Bras.* Vol.19 No.2
- Castro, M.A; Vega, A.S & Múlgura, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). **American Journal of Botany** 88(11): 1935-1944.
- Costa, C.B.N.; Costa, J.A.S.; Ramalho, M. 2006. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 103-114.
- Crudem, R. W. & Jensen, K. G. 1979. Viscin threads, pollination efficiency and low pollen-ovule ratios. *American Journal of Botany* 66(8): 875-879.
- Dafni A, Kevan PG, Husband BC. 2005. **Pollination ecology: a practical approach**. Enviroquest Ltd. Ontario, Canada.
- Endress PK. 1994. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge. Cambridge University Press
- Ellstrand, N.C. ; Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small populations size : implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics** 24: 217-242.
- Gates, B. 1982. *Banisteriopsis* and *Diplopterys* (Malpighiaceae). **Flora Neotropica Monograph** 30: 1-237.

- Hrycan WC, Davis AR. 2005. Comparative structure and pollen production of the stamens and pollinator-deceptive staminodes of *Commelina coelestis* and *C. diathifolia* (Commelinaceae). **Annals of Botany** 95: 1113-1130.
- Koltunow, A.M. & Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biol.** 54: 547-574.
- Lipow, S. R. & Wyatt, R. 2000. Towards an understanding of the mixed breeding system of swamp milkweed (*Asclepias incarnata*). **Journal of the Torrey Botanical Society** 127(3): 193-199.
- Lobreau-Callen, D. 1989. Les Malpighiaceae et leurs pollinisateurs. Coadaptation ou coévolution. **Bull. Mus. natn. Hist. nat.**, Paris, 4a. série. 11, section B, Adansonia, no. 1: p. 79-94.
- Lorenzo, E. 1981. Sobre la Inflorescencia, Morfología floral y Embriología de *Janusia guaranitica* (Malpighiaceae). **Kurtziana** 14: 101-124.
- Mendes-Rodrigues, C., Carmo-Oliveira, R., Talavera, S., Arista, M., Ortiz, P. L., Oliveira, P. E. 2005. Polyembryony and Apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae – Bombacoideae). **Plant Biol** 7: 533-540.
- Mendonça, R.C. , Felpili, J.M. Walter, B.M.T., Silva Júnior, M.C., Rezende, A.V. Filgueiras, T.S. & Nogueira, P.E. 1998. Flora vascular do cerrado. In: Sano, S.M. & Almeida, S.P. (eds). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa-CPAC, Planaltina.
- Morelato, P.C. & Leitão-Filho, H.F. 1996. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian forest. **Biotropica** 28(2):180-191.
- Moyano, F., Cocucci, A., Sérsic, A. 2003. Accessory Pollen Adhesive from Glandular Trichomes on the Anthers of *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae). **Plant Biology** 5: 411-418.
- Neff, J. L. & Simpson, B. B. 1981. Oil-Collecting Structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): Morphology, Function, and Use in Systematics. **Journal of the Kansas Entomological Society** 54(1): 95-123.
- Oliveira, P.S. & Leitão-Filho, H. F. 1987. Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in southeast Brazil. **Biotropica** 19(2): 140-148
- Proctor M, Yeo P. 1979. **The pollination of flowers**. William Collins Sons & Co Ltd, London.
- Richards, A.J. 1986. **Plant Breeding systems**. George Allen & Unwin, London

- Roubik DW. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge. Cambridge University Press.
- Salomão, A. N. & Allem. A. C. 2001. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. **Acta Bot. Bras.** 15(3): 369-378.
- Sazima, M. & Sazima, I. 1989. Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oil-producing Malpighiaceae. **Botanica Acta**. 102: 106-111.
- Sigrist, M. R. 2001. Biologia Reprodutiva de Doze Espécies simpátricas de Malpighiaceae em Mata Semidecídua do Sudeste Brasileiro. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biologia, Unicamp.
- Sigrist, M.R. & Sazima, M. 2004. Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. **Annals of Botany** 94: 33-41.
- Silberbauer-Gottsberger, I.; Gottsberger, G. 1988. A polinização de plantas do cerrado. **Rev. Brasil. Biol.**, 48 (4): 651-663.
- Simpson, B. B & Neff, J. L. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 68: 301-322.
- Simpson, B.B. 1989. Pollination biology and taxonomy of *Dinemandra* and *Dinemagonum* (Malpighiaceae). **Systematic Botany**, 14 (3): 408-426.
- Souza, V. C. & Lorenzi H. 2005. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum.
- Steiner, K.E. 1985. Functional Dioecism in the Malpighiaceae: The Breeding System of *Spachea membranacea* Cuatr. **American Journal of Botany** 72 (10): 1537-1543.
- Taylor, D.W; Crepet, W.L. 1987. Fossil floral evidence of Malpighiaceae and an early plant-pollinator relationship. **Amer. J. Bot.** 74 (2): 274-286.
- Teixeira, L.A.G. & Machado, I.C. 2000. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* dc (malpighiaceae). **Acta bot. bras.** 14 (3): 347-357.
- Vieira, A.C.M. 2005. Estudos em espécies de Malpighiaceae de restingas do Rio de Janeiro: estruturas secretoras em folhas e flores e biologia floral. **Tese de Doutorado – USP**.
- Vilhena, A.M.G.F & Augusto, S.C. 2007. Polinizadores da aceroleira *Malpighia emarginata* D.C. (Malpighiaceae) em área de cerrado no triângulo mineiro. **Biosci. J.** 23(1):14-23.
- Vinson, S.B; Williams, H.J; Frankie, G.W & Shrum, G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipid by Centris bees (Hymenoptera: Apidae). **Biotropica**. 29 (1): 76-83.

Vogel, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische und subtropische Pflanzenwelt** 7: 283-547.

Vogel, S. 1990. History of Malpighiaceae in the light of pollination ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 55: 130-142.

Vogel, S. 1990. **The role of scent glands in pollination. On the structure and function of osmophores.** Model Press Ltd., Nova Delhi, Índia.

Figuras e Tabelas

Figuras 1-6 – Aspectos gerais de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis

1. Indivíduo localizado na borda do fragmento em estudo, mostrando hábito arbustivo com ramos escandentes. **2.** Ramo envolvendo caule de planta vizinha **3.** Botões jovens reunidos em inflorescências axilares racemosas com unidades dicasiais. **4.** Inflorescência contendo botões e flores. **5.** Flores em diferentes estágios de desenvolvimento. **6.** Frutos imaturos constituídos por três sâmaras.



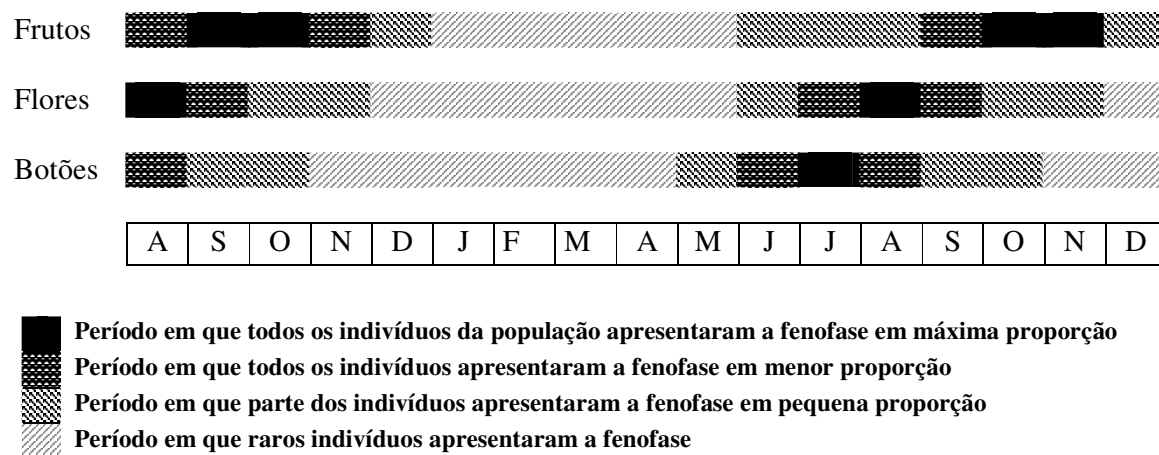
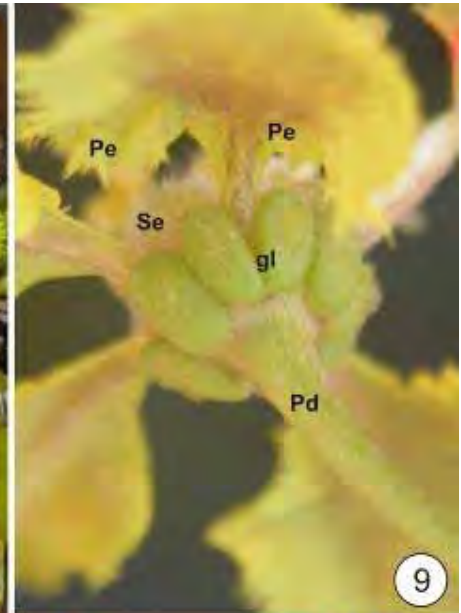


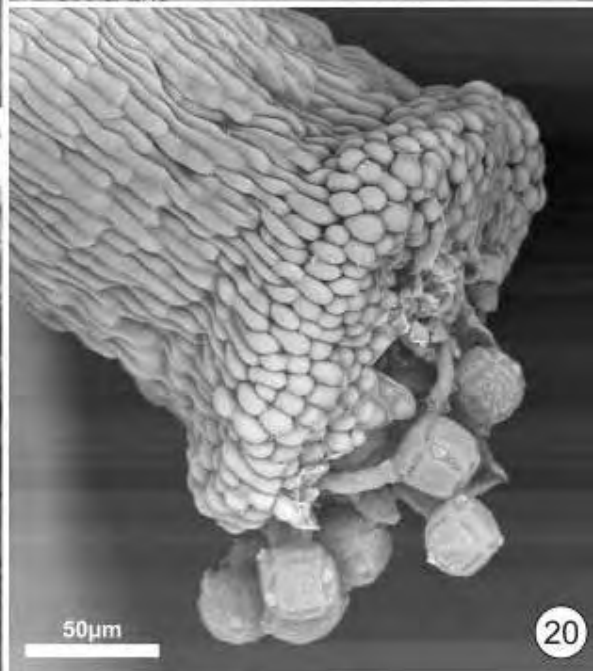
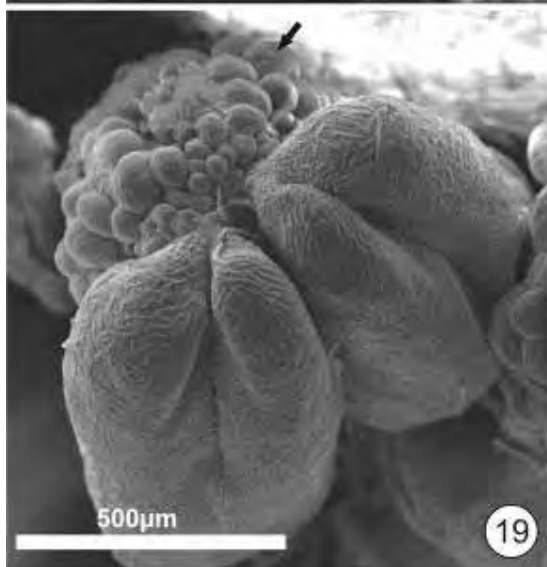
Figura 7 – Fenologia reprodutiva de *Diplopterys pubipetala* na área de estudo entre agosto de 2006 e dezembro de 2007.

Figuras 8-16 – Caracterização das flores de *Diplopterys. pubipetala* (A. Juss.) W.R.

Anderson & C.Cav. Davis 8. Flor mostrando disposição geral dos verticilos. Notar pétala posterior diferenciada das demais pela espessura da unha (*) e coloração do limbo que pode apresentar variação (detalhe). As setas indicam a localização dos estigmas. **9.** Vista geral do cálice. Notar glândulas conspícuas dispostas aos pares nas sépalas. **10.** Detalhe mostrando as glândulas localizadas nas terminações das fimbrias das pétalas (setas). **11-13.** Estames mostrando antera deiscente, conectivo glandular (*) e grãos de pólen de coloração clara. **14.** Reação positiva ao teste com vermelho neutro. Notar região próxima à unha de todas as pétalas intensamente corada juntamente com a região glandular do conectivo. **15.** Detalhe mostrando reação positiva na região glandular do conectivo de todas os estames. **16.** Detalhe mostrando reação positiva na região das glândulas das pétalas. gl = glândula. pe = pétala. pal = pétala antero-lateral. pd = pedúnculo. pp = pétala posterior. ppl = pétala postero-lateral. se = sépala.



Figuras 17-20 – Estruturas florais de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis (MEV) **17.** Glândula no cálice de botão floral na pré-antese com acúmulo de secreção. **18.** Glândula do cálice após visita por abelha *Monoeca* sp. **19.** Estame mostrando porção apical glandular do conectivo (seta) e anteras antes da deiscência. **20.** Superfície do estigma após visita por abelha *Monoeca* sp. Notar cutícula rompida e grãos de pólen germinando.



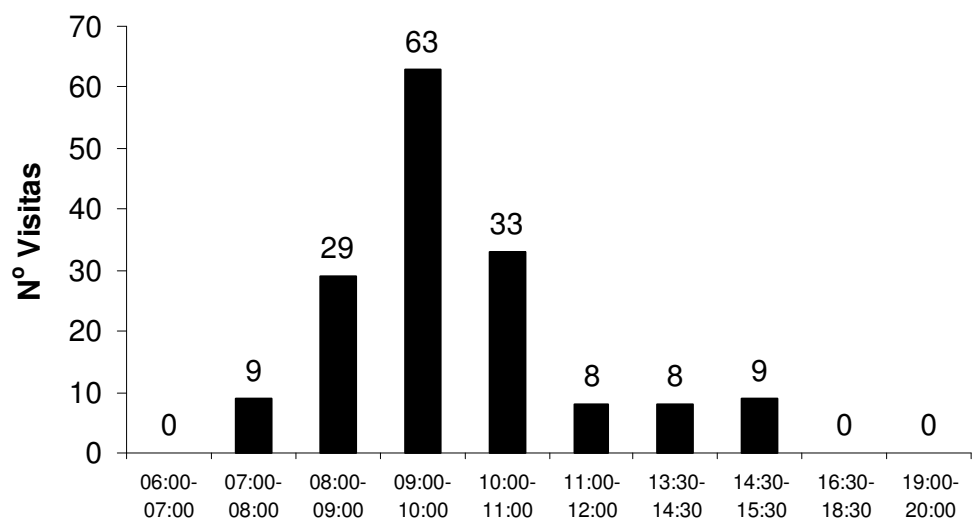


Figura 21. Distribuição das visitas observadas em *Diplopterys pubipetala* ao longo do dia.

Figuras 22-26 – Visitantes florais de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. 22-24. Abelhas do gênero *Centris*. Notar posição das abelhas com relação à flor com as pernas anteriores inseridas entre as pétalas para a raspagem das glândulas do cálice (22-seta, 23). Observar volumosa massa amarela nas pernas posteriores (22, 24-seta). **25-26.** Abelha *Monoeca* sp. coletando óleo (25) e pólen juntamente com a secreção do conectivo (26). Notar locais de contato do corpo desta abelha com as anteras (setas).



Tabela 1. Avaliação do sistema reprodutivo de *D. pubipetala* em 12 plantas de uma população localizada em vegetação de cerrado no município de Botucatu, SP, Brasil.

Agamospermia	Autopolinização		Polinização cruzada		Controle natural	Controle com visita
	espontânea	manual	sem ruptura da cutícula	com ruptura da cutícula		
0,7% (2/297)	0,1% (1/771)	4,9% (7/141)	2,0% (3/147)	21,7% (39/180)	4,9% (73/1488)	25% (9/36)

Os valores entre parêntese correspondem ao número de samarídeos formados/carpelo

Tabela 2. Lista das espécies de abelhas pertencentes à família Apidae (segundo Michener 2000) observadas visitando as flores de *Diplopterys pubipetala* na população estudada.

Tribos	Abelhas	Frequência de visitas N° (%)	Recurso coletado
Centridini	<i>Centris (Centris) aenea</i> (Erichson, 1848)	37 (23,3)	O
	<i>Centris (Centris) varia</i> (Erichson, 1848)	37 (23,3)	O
	<i>Centris (Heterocentris) analis</i> (Fabricius, 1804)	4 (2,5)	O
	<i>Centris</i> sp 1	22 (13,8)	O
	<i>Centris</i> sp 2	1 (0,6)	O
	<i>Centris</i> sp 3	1 (0,6)	O
	<i>Epicharis</i> sp	1 (0,6)	?
Tapinotaspidini	<i>Monoeca</i> sp 1 (<i>cf. brasiliensis</i> Lapeletier, 1825)	24 (15,1)	O
	<i>Monoeca</i> sp 2	30 (19)	O/P
Bombini	<i>Bombus</i> sp	1 (0,6)	?
Xylocopini	<i>Xylocopa</i> sp	1 (0,6)	?
Total de visitas observadas		159	

Capítulo II

Estrutura, ultra-estrutura e mecanismo de secreção das glândulas florais em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis

RESUMO (Estrutura, ultra-estrutura e mecanismo de secreção das glândulas florais em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis) – *Diplopterys pubipetala* é uma malpigiácea de ampla distribuição pelo Brasil que pode ocorrer sob a forma de liana ou de arbusto escandente. Para esta espécie são referidas glândulas na margem das pétalas e presença de conectivo glandular, além das glândulas características nas sépalas, para as quais são referidas importantes funções no processo de polinização desta espécie. Neste trabalho são descritos aspectos anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais das glândulas florais de *D. pubipetala*. As glândulas do cálice são conspícuas e dispõem-se aos pares na face abaxial das sépalas; são vascularizadas por xilema e floema e constituídas por epiderme secretora em paliçada e parênquima especializado. A secreção, na qual foi detectada a presença de lipídeos, acumula-se no espaço subcuticular e é liberada através da ruptura da cutícula. As glândulas localizadas nas margens fimbriadas de todas as cinco pétalas são diminutas e constituídas por epiderme secretora unisseriada envolvendo um pequeno grupo de células parênquimáticas e reagiram positivamente ao teste para a detecção de terpenos. As glândulas presentes na pétala posterior são vascularizadas e estruturalmente mais complexas do que as glândulas presentes nas pétalas laterais. O conectivo apresenta superfície irregular e é constituído por células epidérmicas secretoras globulares, as quais reagiram positivamente ao teste para detecção de terpenos. Células epidérmicas portadoras de substâncias fenólicas não secretoras e células do endotécio, presentes na região subepidérmica do conectivo, parecem participar do mecanismo de liberação da secreção das células globulares. Embora tenham sido observadas peculiaridades ultra-estruturais, os três tipos de glândulas florais de *D. pubipetala* possuem em comum a habilidade para secretar substâncias hidrofílicas e, predominantemente, lipofílicas.

Palavras-chave: glândulas florais, Malpighiaceae, secreção, ultra-estrutura.

Introdução

Malpighiaceae é uma família predominantemente tropical cuja presença de glândulas em diversos órgãos vegetativos e reprodutivos é uma característica importante e de valor diagnóstico (Barroso 1984, Anderson 1990).

Glândulas no cálice ocorrem na maioria das espécies, sendo referidas como elaióforos nas espécies neotropicais (Vogel 1974, Anderson 1979, 1990), os quais desempenham importante função na recompensa de polinizadores. Os óleos produzidos por estas glândulas são coletados por abelhas fêmeas, principalmente da tribo Centridini e são utilizados na impermeabilização dos ninhos e na alimentação das larvas (Simpson & Neff, 1981, Buchmann 1987, Vogel 1990, Vinson et al 1997).

Glândulas localizadas nas pétalas ou no conectivo dos estames ocorrem em um número mais limitado de táxons e foram referidas como secretoras de substâncias lipídicas por Vogel (1990).

Apesar dos valores taxonômico e ecológico das glândulas em Malpighiaceae amplamente relatados por diferentes autores (Anderson 1977, 1979, 1990, Neff & Simpson 1981, Buchmann 1987, Lobreau-Callen 1989, Sazima & Sazima, 1989, Vogel 1990, Barros 1992, Teixeira & Machado 2000, Sigrist & Sazima 2004, Carvalho *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006), informações sobre sua estrutura e modo de secreção são escassas. Com relação às glândulas do cálice merecem destaque os trabalhos de Subramanian *et al.* (1990), Cocucci *et al.* (1996), Castro *et al.* (2001), Attala (2004, dados não publicados), Vieira (2005, dados não publicados) e Possobom (2007, dados não publicados). Para as glândulas localizadas nas pétalas e nos conectivos dos estames são encontradas informações anatômicas e histoquímicas unicamente nos trabalhos de Cocucci *et al.* (1996) e Vieira (2005, dados não publicados).

Diplopterys pubipetala (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis é uma malpigiúcea de ampla distribuição pelo Brasil, podendo ser encontrada em áreas de cerrado e de floresta estacional semidecidual (Gates 1982, Batalha & Mantovani 2000, Morelato & Leitão-Filho 1996, Sigrist & Sazima 2004). Para esta espécie são referidas glândulas conspícuas nas sépalas e glândulas nas margens fimbriadas das pétalas e no conectivo dos estames (Gates 1982). Estudo preliminar (C.C.F. Possobom, dados não publicados) mostrou que as glândulas localizadas nas pétalas e nos estames de indivíduos de *D. pubipetala* ocorrentes em borda de cerradão apresentam importantes funções na atração e na orientação dos visitantes, ambas atuando como osmóforos. Além disso, para a secreção viscosa observada sobre o conectivo glandular foi sugerida função na adesão dos grãos de pólen ao corpo dos visitantes.

Neste trabalho são descritas a anatomia, histoquímica e ultra-estrutura das glândulas florais de *D. pubipetala*, sendo este o primeiro relato de aspectos ultra-estruturais para as glândulas das pétalas e dos estames de Malpighiaceae.

Material e métodos

Material vegetal

As coletas foram realizadas em indivíduos de *Diplopterys pubipetala* pertencentes a uma população localizada na borda de um fragmento de Cerradão no município de Botucatu-SP (22°42'38" S e 48°18'35" W).

Amostras de sépalas, pétalas e estames em diferentes fases de desenvolvimento foram coletadas e processadas segundo técnicas usuais em microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Como documento taxonômico, exsicatas foram depositadas no Herbário "Irina Delanova Gemtchujnicov" (BOTU) sob os números 25306-310.

Microscopia de luz (ML)

Para a descrição anatômica das glândulas florais, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas, desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato (Leica®). Secções transversais e longitudinais (6-8µm) foram obtidas em micrótomo rotativo, as quais foram coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montadas entre lâminas e lamínulas com resina sintética Entellan®.

Para a verificação da natureza química das paredes e componentes celulares foram empregados os seguintes reagentes em amostras de material fresco ou fixado e incluído em resina metacrilato: sudan IV para detecção de substâncias lipídicas (Johansen 1940), reagente de NADI (David & Carde 1964) para detecção de terpenos, solução de acetato de cobre a 7% para detecção de resinas (Johansen 1940), cloreto férrico III para detecção de substâncias fenólicas (Johansen 1940), reagente de Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos totais (Mac Manus 1948), vermelho de rutênio para detecção de mucilagem e pectinas (Johansen 1940), azul mercúrio de bromofenol para detecção de proteínas totais (Mazia *et al.* 1953) e reagente de Wagner para detecção de alcalóides (Furr & Mahlberg 1981).

Além disso, amostras de todas as pétalas das flores de *D. pubipetala* foram submetidas à técnica de diafanização segundo Fuchs (1963).

Todo o laminário obtido foi analisado em microscópio ótico Olympus BX 41 (Japão) equipado com câmera digital Olympus C7070.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise da superfície das glândulas florais, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série etílica, submetidas ao ponto crítico e metalizadas com ouro em aparelho MED 010 da Balzers Union. A análise das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Fei – Quanta 200 (Phillips)

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a caracterização ultra-estrutural das glândulas florais, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3), incubadas em acetato de uranila 0,5% em solução aquosa; desidratadas em série crescente de soluções de acetona e incluídas em Araldite. As secções ultrafinas (50nm) foram contrastadas com solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 100, a 80kV.

Para confirmar a presença de inclusões lipídicas nestas glândulas, as amostras foram submetidas à técnica do ósmio-imidazol segundo Angermüller e Fahini (1982). Para impregnação de sistemas de endomembranas, as amostras foram submetidas à técnica do tetróxido de ósmio/iodeto de zinco (ZIO) segundo Reinecke & Walther (1978).

Resultados

Glândulas do cálice

As glândulas do cálice de *D. pubipetala* dispõem-se aos pares na face abaxial das sépalas e apresentam formato esférico a ovóide, superfície lisa e são visíveis a olho nu já em botões florais em início de desenvolvimento. Em botões florais jovens, a superfície da glândula é regular (Fig. 1); à medida que se aproxima da antese observa-se a formação de uma saliência na região distal da glândula devido ao acúmulo de secreção sob a cutícula. Nas flores recém-abertas esta saliência é bastante proeminente (Fig. 2) e a secreção é liberada através da ruptura da cutícula (Fig. 3) ocasionada pelos insetos visitantes que raspam a superfície da glândula.

Em secção longitudinal observa-se que estas glândulas são subsésseis, encontram-se inseridas na região basal das sépalas e são constituídas por epiderme secretora e parênquima especializado (Fig. 4).

A epiderme é unisseriada, constituída por células colunares dispostas em paliçada (Fig 5, 6). As paredes anticlinais e periclinal interna destas células são delgadas, enquanto a parede periclinal externa é espessa e contígua à cutícula. O parênquima apresenta nítida diferenciação em duas regiões, principalmente pelo tamanho e disposição das células, além da presença ou ausência de vascularização (Fig 5, 6). O parênquima localizado na região subepidérmica compreende 1-3 camadas de células pequenas, justapostas e de formato tendendo a quadrangular, as quais apresentam vacúolos preenchidos com substância fenólica. A região parenquimática subjacente é vascularizada por xilema e floema e compreende várias camadas de células de tamanhos e formas variáveis separadas por espaços intercelulares desenvolvidos.

Os testes histoquímicos revelaram a presença de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos nas células epidérmicas (Tab. 1). Na secreção acumulada no espaço subcuticular foi detectada a presença de substâncias lipídicas (Tab. 1), sendo este espaço formado pelo gradual desprendimento da cutícula (Fig 6).

A análise de glândulas ao MET possibilitou distinguir quatro fases de desenvolvimento que serão apresentadas separadamente.

Fase 1 (glândulas presentes em botões florais em estágio inicial de desenvolvimento) - Nesta fase, observam-se células epidérmicas com citoplasma denso, reduzido a uma camada parietal e vacúolo central desenvolvido; as paredes anticlinais e periclinal interna são delgadas e a parede periclinal externa é espessa, lamelada, sendo as fibrilas de disposição laxa. A cutícula é espessa e encontra-se fortemente aderida à parede periclinal externa das células epidérmicas (Fig. 7, 8). Apresenta uma camada externa delgada, de aspecto homogêneo e elétron-opaca, constituindo a cutícula propriamente dita (cutícula *sensu stricto*) e o estrato cuticular, mais espesso, de aspecto heterogêneo, com regiões elétron-opacas entremeadas por ramificações elétron-densas de aspecto fibroso formando uma rede desenvolvida, principalmente na região de contato da parede periclinal externa com as anticlinais (Fig. 8).

No citoplasma destas células observam-se ribossomos livres, plastídeos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (RER), dictiossomos, corpos multivesiculares e vesículas dispersas (Fig. 9-11). As mitocôndrias são pouco numerosas e podem ser elípticas ou globulares (Fig. 9, 10). Os plastídeos apresentam formatos variáveis, ausência de membranas internas e estroma finamente granular com pequenas gotas de óleo (Fig. 9). Os dictiossomos (Fig. 10), melhor evidenciados através da técnica do ZIO (Fig. 11), são escassos e pouco desenvolvidos, sendo constituídos por três a cinco cisternas com poucas vesículas adjacentes. A membrana plasmática apresenta-se deslocada da parede anticlinal dando origem ao espaço periplasmático onde se observam estruturas membranosas (Fig. 9)

As células do parênquima subepidérmico apresentam conexão com as células epidérmicas através dos plasmodesmos. O citoplasma destas células é menos denso e nele são observados ribossomos, mitocôndrias e plastídeos elípticos com estroma denso e membranas internas organizadas em tilacóides e granum (Fig. 12).

Fase 2 (glândulas presentes em botões florais em estágio intermediário de desenvolvimento) – Esta fase caracteriza-se pela presença de pequenos sítios de acúmulo de secreção (Fig. 13, 14), os quais são evidentes entre a parede periclinal externa das células epidérmicas e o estrato cuticular, principalmente na região fibrosa relatada anteriormente. Estes sítios tornam-se gradualmente mais amplos (Fig. 15), até que se fundem formando um único espaço delimitado externamente pela cutícula e internamente pela parede periclinal externa (Fig. 16). A secreção é vista como acúmulos de material elétron-denso entremeados com material granular elétron-opaco (Fig. 13-16). Acúmulos de material elétron-denso também são visíveis nas camadas fibrilares da parede periclinal externa (Fig. 16).

O citoplasma das células epidérmicas, conectado através de plasmodesmos nas paredes anticlinais (Fig. 17), apresenta-se mais denso e abundante nesta fase. De maneira geral ocorre aumento na população de ribossomos, mitocôndrias, plastídeos e retículo endoplasmático (Fig. 17-20). Os plastídeos apresentam-se maiores, são globulares, apresentam estroma finamente granular onde são observadas gotículas elétron-densas e são caracteristicamente circundados pelo retículo endoplasmático rugoso (Fig. 18, 19). Algumas imagens sugerem que os plastídeos estejam em divisão nesta fase (Fig. 18). Entre o protoplasto e as paredes anticlinal e periclinal interna das células epidérmicas observa-se espaço periplasmático com diferentes graus de desenvolvimento (Fig. 17, 20). São observados numerosos vacúolos com conteúdo granular fortemente elétron-denso e figuras de mielina, além de vacúolos com inclusões membranáceas (Fig. 17).

Nas células subepidérmicas o citoplasma apresenta-se mais denso em relação à fase anterior; o vacúolo é volumoso e preenchido por substância granular elétron-densa, a qual foi histoquimicamente identificada como sendo conteúdo fenólico. Nos cloroplastídeos observam-se gotas de óleo e pequenos grãos de amido elipsóides (Fig. 20).

Fase 3 (glândulas presentes em botões florais na pré-antese e em flores recém-abertas) – As glândulas nesta fase caracterizam-se pelo espaço subcuticular bastante desenvolvido, no qual é possível observar acúmulos de secreção (Fig. 21). Por entre as lamelas da parede periclinal externa são visíveis acúmulos de material fortemente elétron-denso (Fig. 22-24). O espaço periplasmático encontra-se bastante desenvolvido (Fig. 21-24); além disso, observa-se a dissolução da lamela mediana entre as paredes anticlinais, formando canais entre as células

epidérmicas onde nota-se acúmulo de secreção (Fig. 21). Nesta fase, observa-se fusão de pequenos vacúolos na região central da célula, os quais contêm corpos elétron-densos de aspecto homogêneo ou vacúolos maiores preenchidos com substância elétron-densa de aspecto granular (Fig. 21). As mitocôndrias tornam-se mais abundantes e podem ser observadas em maior número na região periférica do citoplasma (Fig. 23-27). As imagens sugerem que as mitocôndrias estão em processo de divisão (Fig. 26,27). Caracteristicamente, nesta fase as mitocôndrias estão circundadas pelo retículo endoplasmático rugoso (Fig. 27). Os plastídeos, ainda bastante numerosos, são conspícuos e passam a apresentar pequenos grãos de amido além das gotículas elétron-densas (Fig. 30). Retículo endoplasmático dos tipos rugoso e liso continua abundante nestas células sendo freqüentemente observado ao redor das mitocôndrias e dos plastídeos (Fig. 23-27, 29, 30). Além disto, evidenciou-se um expressivo aumento de gotas de óleo dispersas no citoplasma (Fig. 25, 28), nitidamente visíveis com a aplicação da técnica do ósmio-imidazol (Fig. 29).

Fase 4 (glândulas presentes em flores com dois dias após antese) – Glândulas nesta fase exibem células epidérmicas desconectadas entre si, total ou parcialmente, devido ao maior desenvolvimento dos canais formados entre elas (Fig. 31). O núcleo é conspícuo e ocupa, geralmente posição basal na célula; o citoplasma continua denso e abundante, entretanto observa-se maior desenvolvimento do vacúolo, sendo possível observar em seu interior conteúdo granular juntamente com corpos elétron-densos (Fig. 31).

Nas células do parênquima subepidérmico observam-se plasmodesmos nas paredes periclinais conectando-as com as células epidérmicas (Fig 32, 33). O citoplasma destas células apresenta características similares às descritas para as fases anteriores, sendo observadas mitocôndrias, cloroplastídeos, retículo endoplasmático rugoso e gotas de óleo dispersas (Fig. 32). No vacúolo são observadas inclusões densas e material membranoso (Fig. 32).

Glândulas da corola

As glândulas da corola de *D. pubipetala* são diminutas e localizam-se nas extremidades das fimbrias de todas as cinco pétalas, sendo mais numerosas e mais desenvolvidas as glândulas presentes na pétala posterior (Fig. 34-36, 40-42), quando comparadas com aquelas presentes nas margens das pétalas laterais (Fig. 37-39, 43).

A análise da vascularização destas glândulas evidenciou diferenças entre as glândulas da pétala posterior e as das pétalas laterais. Na pétala posterior as terminações vasculares, constituídas por elementos traqueais e floema alcançam as células bem próximas à epiderme

glandular (Fig. 36, 40-42); nas pétalas laterais a vascularização percorre a fimbria, contudo não alcança a região glandular (Fig. 39, 43).

Vistas ao ML estas glândulas são espatuladas e revestidas por cutícula delgada (Fig. 40). Consistem de epiderme unisseriada que envolve um pequeno grupo de células centrais parenquimáticas (Fig. 40-43) vascularizado por xilema e floema nas pétalas posteriores (Fig. 40-42).

As células epidérmicas de glândulas presentes nas pétalas posteriores (Fig. 42-44) são colunares, dispostas em paliçada e apresentam paredes celulares delgadas com exceção da parede periclinal externa que é espessa. As células parenquimáticas centrais apresentam tamanhos e formatos variáveis. Nas glândulas das pétalas laterais (Fig. 43) as células epidérmicas apresentam menor comprimento e maior largura, tendendo ao formato quadrangular ou cuneiforme, além do número reduzido de células parenquimáticas na região central e ausência de vascularização.

Nestas glândulas tanto em pétalas posteriores como em pétalas laterais, foi detectada a presença de terpenos. Além disto, foram detectados polissacarídeos e proteínas nas células secretoras (Tab. 1).

A descrição de aspectos ultra-estruturais será feita unicamente para as glândulas presentes nas pétalas posteriores em função de dificuldades técnicas para a obtenção de cortes das glândulas presentes nas pétalas laterais.

Vistas ao MET, as células epidérmicas secretoras apresentam parede periclinal externa espessa, de aspecto laxo e cutícula com dois estratos distintos sendo que o mais interno apresenta áreas com sinais de degradação (Fig. 44). As paredes periclinal interna e as anticlinais são delgadas e possuem plasmodesmos (Fig. 45, 50, 52, 53). O citoplasma é denso e abundante com numerosos plastídeos (Fig. 45), mitocôndrias (Fig. 46), dictiossomos esparsos (Fig. 46, 47), retículo endoplasmático rugoso (Fig. 48), além de gotas de óleo dispersas (Fig. 52, 53). Os plastídeos são volumosos (Fig. 49-54), podendo ser encontrados plastídeos muito grandes (Fig. 49), sempre contendo inúmeras gotas lipídicas, as quais são elétron-opacas em MET convencional (Fig. 52), e fortemente elétron-densas quando submetidas à técnica do ósmio-imidazol, assim como o que ocorre com as gotas lipídicas presentes no citoplasma destas células (Fig. 53, 54). O retículo endoplasmático rugoso é abundante (Fig. 48) e frequentemente observado ao redor de plastídeos (Fig. 50, 51).

As células centrais são tipicamente parenquimáticas e caracterizadas por um vacúolo central desenvolvido, ficando o citoplasma reduzido a uma fina camada na periferia da célula

(Fig. 45). Plasmodesmos são freqüentes e conectam estas células entre si e com as epidérmicas.

Glândulas do androceu

O conectivo das anteras de *D. pubipetala* apresenta superfície irregular onde são observadas duas regiões distintas (Fig. 55). Na base, próximo à inserção do filete, e nas laterais do conectivo a superfície apresenta-se levemente ondulada, enquanto nas regiões apical e mediana do conectivo observa-se superfície formada por inúmeras células globosas. Esta região corresponde à porção secretora do conectivo onde frequentemente são observadas pequenas gotas hialinas as quais apresentam certa viscosidade ao toque.

Em estames retirados de botão floral, as células globosas do conectivo são túrgidas e apresentam superfície reticulada sendo que cada retículo delimita uma pequena depressão (Fig. 56). Em estames retirados de flores recém-abertas a superfície destas células apresenta-se irregular com inúmeras vesículas formadas nas regiões de depressão descritas anteriormente (Fig. 57, 58). Nesta fase é comum observar as células globosas murchas, podendo apresentar formato côncavo, sendo freqüente a presença de secreção sobre elas.

Em secção transversal do estame na região do conectivo, notam-se células epidérmicas conspícuas tanto na região externa, a qual fica exposta, quanto na região interna, localizada entre as anteras (Fig. 59). Nestas regiões são visíveis dois diferentes tipos celulares diferenciados pelo tamanho e conteúdo das células.

Dentre os dois tipos celulares, predominam células mais volumosas as quais se apresentam justapostas somente até o segundo terço basal, ficando o terço apical livre (Fig. 59, 60). Estas células caracterizam-se por apresentar vacúolos preenchidos por substância heterogênea. Tais células são secretoras e correspondem às células globosas vistas ao MEV. Proteínas, polissacarídeos e terpenos foram histoquimicamente detectados nestas células (Tab. 1).

Ao lado das células globosas, ocorrem células epidérmicas menos volumosas, não secretoras, as quais se apresentam justapostas (Fig. 59) e acumulam substâncias fenólicas no vacúolo (Tab 1). Tais células formam a região lateral do conectivo a qual se apresenta ondulada ao MEV.

No conectivo, em posição subepidérmica encontram-se até quatro camadas de células do endotécio que é contínuo desde a região das tecas. A região central do conectivo é vascularizada e composta por células parenquimáticas (Fig. 59).

Quando analisadas ao MET as células secretoras do conectivo exibem, em sua porção apical, regiões planas onde a parede é mais espessa e com aspecto laxo e regiões protuberantes onde a parede é extremamente delgada e revestida por uma fina cutícula (Fig. 61). Tais regiões protuberantes correspondem às vesículas observadas na superfície destas células quando analisadas ao MEV.

Em regiões do protoplasto subjacente à parede celular espessa nota-se uma leve evaginação da membrana plasmática acompanhada de citoplasma (Fig. 61 - círculo). As imagens sugerem que ocorre uma degradação gradual da parede em determinadas regiões da célula permitindo a extrusão do protoplasto o qual aparece delimitado por uma fina parede celular (Fig. 61-65). A parede espessada é de natureza pécto-celulósica, enquanto a parede delgada é composta unicamente por celulose.

Em toda a extensão da célula notam-se invaginações da parede celular revestidas pela membrana plasmática caracterizando-a como parede labiríntica (Fig. 63-68, 72). O citoplasma subjacente às invaginações é mais denso e rico em polirribossomos, mitocôndrias com cristas desenvolvidas e retículo endoplasmático liso e rugoso (Fig. 66-68, 72).

O citoplasma destas células possui numerosos plastídeos conspícuos que se caracterizam por apresentar uma região periférica preenchida pelo estroma denso finamente granular contendo pequenas inclusões lipídicas e uma região central formada por túbulos/vesículas (Fig. 66, 69-72, 74). As mitocôndrias apresentam matriz densa e cristas desenvolvidas (Fig. 71). Os dictiossomos são escassos e pouco ativos na produção de vesículas (Fig. 68, 72, 73). Chama atenção nestas células a presença de organelas volumosas, ovóides, delimitadas por membrana simples e preenchidas por material de aspecto granular (Fig. 69, 72, 74).

As células epidérmicas não secretoras apresentam núcleo conspícuo, citoplasma pouco denso e reduzido e um vacúolo central desenvolvido contendo substância elétron-densa identificada histoquimicamente como sendo substância fenólica (Fig. 75).

Discussão

As glândulas florais de *D. pubipetala* aqui estudadas diferem quanto à morfologia, anatomia e mecanismo de secreção. Contudo, a análise ultra-estrutural possibilitou evidenciar uma série de similaridades com relação à maquinaria celular presente nestes três tipos glandulares.

Glândulas do cálice

Estas glândulas apresentam cutícula, epiderme secretora em paliçada e parênquima especializado com região vascularizada, conforme já descrito para *Hiptage sericea* (Subramanian *et al.* 1990), *Dinemandra ericoides* (Cocucci *et al.* 1996), *Banisteriopsis stellaris*, *B. variabilis*, *Byrsonima intermedia*, *B. subterranea*, *Peixotoa reticulata* (Attala 2004, dados não publicados), *Byrsonima sericea*, *Heteropterys chrysophylla* e *Peixotoa hispidula* (Vieira 2005, dados não publicados). As glândulas presentes no cálice de *Dinemandra ericoides* (Cocucci *et al.* 1996) diferem das glândulas aqui estudadas por serem pediceladas de forma que a superfície glandular permanece distante cerca de 2 mm do local de sua inserção nas sépalas. Outras diferenças podem ser observadas com relação à espessura da cutícula e forma de liberação da secreção que pode ocorrer através de orifícios pré-determinados ou, mais frequentemente, através de rupturas mecânicas ocasionadas pelo acúmulo de secreção ou através da raspagem das glândulas pelos insetos visitantes. Em *D. pubipetala* a secreção é acumulada no espaço subcuticular e é liberada através da ruptura da cutícula causada pelos visitantes florais.

Como já relatado para glândulas calicinais de Malpighiaceae, em *D. pubipetala* foi constatada histoquimicamente a presença de secreção predominantemente lipofílica.

Ao MET estas células exibem características típicas de glândulas lipofílicas, especialmente a presença de numerosos plastídeos conspícuos, com sistema de membranas internas ausente e inclusões lipofílicas de tamanhos variáveis. Estas organelas estão diretamente associadas à síntese de substâncias lipídicas e são frequentemente descritas em diferentes estruturas glandulares lipofílicas (Vermeer & Peterson 1979, Werker & Fahn 1981, Ascensão *et al.* 1997, Silva & Machado 1999, Machado *et al.* 2006).

A análise das diferentes fases do desenvolvimento das glândulas do cálice indicou que a síntese de secreção tem início desde as fases iniciais de desenvolvimento destas glândulas, assim como relatado por Subramanian *et al.* (1990) para as glândulas calicinais de *Hiptage sericea* e por Possobom (2007, dados não publicados) para as glândulas de *Byrsonima intermedia*. Entretanto, as modificações que ocorrem na parede periclinal externa das células epidérmicas das glândulas calicinais em *D. pubipetala* sugerem que a liberação da secreção do protoplasto para o espaço extracelular só ocorre em estágios mais adiantados do desenvolvimento destas glândulas, em botões florais próximos da antese. Nesta fase, as glândulas apresentam espaço subcuticular bastante desenvolvido com acúmulo de secreção visível. A eliminação da secreção para a superfície da glândula, geralmente ocorre após a antese, quando é observada a maioria das visitas nesta espécie (ver capítulo I).

As modificações na maquinaria celular observadas ao longo do desenvolvimento destas glândulas, principalmente o aumento da população de organelas como plastídeos e mitocôndrias são comuns em diferentes tipos de estruturas secretoras (Silva & Machado 1999, Machado et al. 2006, Paiva & Machado, 2008).

Plastídeos são importantes organelas presentes em diversas estruturas glandulares e podem estar relacionados com a síntese e armazenamento de diferentes substâncias como proteínas, polissacarídeos e lipídeos (Silva & Machado 1999). As características desta organela variam de acordo com o material secretado e com a fase de desenvolvimento da glândula (Fahn 1979), fato observado nos plastídeos presentes nas células epidérmicas das glândulas do cálice de *D. pubipetala*. Plastídeos conspícuos contendo inclusões lipídicas são típicos de glândulas envolvidas na secreção de substâncias lipofílicas (Hammond & Mahlberg 1978, Figueiredo e Pais 1992, Monteiro *et al.* 1999, Machado *et al.* 2006). As gotas lipídicas dispersas no citoplasma podem ser oriundas dos plastídeos ou do retículo endoplasmático liso, que é considerado um elemento celular básico nos processos secretores em nectários e glândulas de substâncias lipofílicas, principalmente terpenos (Fahn 1979, 1988, Monteiro *et al.* 1999).

O retículo endoplasmático (RE) está relacionado aos processos de síntese, modificação e transporte de proteínas e lipídeos, sendo que estes componentes podem permanecer no RE, seguir para outras organelas ou ser encaminhado para o exterior da célula por meio da secreção. Além disto, o RE pode assumir diferentes funções dependendo do estado metabólico da célula, incluindo síntese protéica, síntese de lipídeos, síntese de hormônios esteróides, transferência de proteínas solúveis e proteínas transmembranas e comunicação entre organelas via tráfego de vesículas (Bertachini-Lombello & Carvalho 2001). Assim, o RE presente em torno dos plastídeos e das mitocôndrias nas glândulas calicinais de *D. pubipetala* podem estar desempenhando estas diferentes funções.

A presença de numerosos ribossomos livres e polirribossomos no citoplasma das células epidérmicas, além da abundância de RER, associada à reação positiva do teste histoquímico para proteínas, são evidências de intensa síntese protéica (Bertachini-Lombello & Carvalho 2001). Embora não tenham sido feitos testes para enzimas, a ocorrência de síntese de enzimas nestas células é bastante provável, visto os processos de degradação da parede periclinal externa durante a formação do espaço subcuticular e da lamela mediana para a formação dos canais entre paredes anticlinais das células epidérmicas.

Nas glândulas calicinais de *D. pubipetala*, há evidências de secreção granulócrina e écrina, sendo a primeira caracterizada pela fusão de vesícula (oriundas do RE ou dos

dictiossomos) com a membrana plasmática e posterior liberação da secreção para o espaço periplasmático; a segunda caracteriza-se pelo transporte de partículas individuais via membrana (plasmalema e tonoplasto) como resultado de um gradiente de concentração ou por um processo ativo (Fahn 1979). Em *D. pubipetala*, a presença de vesículas e corpos multivesiculares no citoplasma e de espaço periplasmático com estruturas membranosas caracteriza a secreção granulócrina, enquanto a abundância de mitocôndrias e presença de amido nos plastídeos (Razem & Davis 1999) são indicativas de secreção écrina. Numerosos plasmodesmos conectando as células epidérmicas e as células parênquimáticas constituem uma forte evidência de que o transporte de substâncias célula-a-célula ocorre via simplasto (Lüttge 1971, Taiz & Zeiger 1998).

Glândulas da corola

Aspectos anatômicos de glândulas presentes nas pétalas de espécies de Malpighiaceae foram estudadas em *Dinemandra ericoides* por Cocucci *et al.* (1996) e em *Byrsonima sericea*, *Heteropterys chrysophylla* e *Peixotoa hispidula* por Vieira (2005, dados não publicados). Contudo, este é o primeiro registro de aspectos celulares destas glândulas.

Com relação à estrutura anatômica, todas estas espécies exibem glândulas com epiderme secretora em paliçada envolvendo uma região central composta por células parênquimáticas, semelhante ao observado em *D. pubipetala*.

Em *Dinemandra ericoides* (Cocucci *et al.* 1996) as glândulas foram observadas na margem de todas as cinco pétalas, entretanto localizam-se unicamente na base do limbo. Nas espécies estudadas por Vieira (2005), glândulas foram observadas unicamente nas pétalas posteriores. Em *D. pubipetala* as glândulas encontram-se presentes na margem fimbriada de todas as cinco pétalas, entretanto foram observadas diferenças quanto à estrutura e vascularização das glândulas presentes na pétala posterior e nas pétalas laterais. As glândulas das pétalas posteriores apresentam-se estruturalmente mais desenvolvidas e a vascularização, constituída por xilema e floema, alcança as células centrais da glândula. Já nas pétalas laterais a vascularização percorre a fimbria, mas não atinge a região glandular. Em todas estas glândulas observou-se reação positiva ao vermelho neutro, sugerindo que tais estruturas podem atuar como osmóforos (ver capítulo I), fato que foi confirmado através da reação positiva ao reagente de NADI indicando a presença de terpenos. Considerando que a pétala posterior é de suma importância na orientação visual dos polinizadores, é provável que ela também desempenhe importante papel na orientação química dos mesmos como anteriormente sugerido por C.C.F. Possobom (ver Capítulo I) sendo possível que a diferença

com relação à vascularização esteja relacionada com diferenças na quantidade ou qualidade do exudato.

Segundo Harborne (1997) dentre os terpenóides, os mono e sesquiterpenos podem estar presentes em pequenas quantidades nos odores florais, atuando na atração de polinizadores, principalmente abelhas as quais são particularmente sensíveis aos odores terpênicos. É provável que os monoterpenos sejam o principal componente secretado pelas glândulas presentes nas pétalas de *D. pubipetala*, pois são frequentemente relacionados com a presença de odor atrativo quando comparados aos sesquiterpenos, normalmente relacionados com toxicidade (Larcher 2000).

As características ultra-estruturais das glândulas presentes na pétala posterior de *D. pubipetala* (plastídeos destituídos de sistema de membranas internas contendo gotas de óleo, mitocôndrias numerosas com cristas bem desenvolvidas, retículo endoplasmático liso e gotas lipídicas dispersas no citoplasma) associadas às evidências histoquímicas (reação positiva para terpenos) são indicativas de síntese de secreção lipofílica, assim como já discutido para as glândulas calicinais. Já, a presença de dictiossomos e retículo endoplasmático rugoso associada à reação positiva para polissacarídeos e proteínas são evidências de secreção hidrofílica. Assim, pode-se considerar que tais glândulas produzem secreção de natureza mista a qual, aparentemente se acumula em pequenos espaços formados no estrato cuticular.

A presença de plasmodesmos conectando as células parenquimáticas centrais com as epidérmicas sugere que a região central das glândulas participa no processo de secreção, provavelmente no transporte de substâncias oriundas dos tecidos vasculares até as células epidérmicas.

Glândulas do androceu

Aspectos anatômicos do conectivo glandular foram descritos para as mesmas espécies cujas glândulas presentes nas pétalas foram estudadas (Cocucci *et al.* 1996, Vieira 2005, dados não publicados). Desta forma, assim como para as glândulas presentes nas pétalas, este é o primeiro registro de aspectos celulares do conectivo glandular em Malpighiaceae.

As características anatômicas do conectivo aqui observadas são semelhantes às descritas para outras espécies anteriormente estudadas (Cocucci *et al.* 1996, Vieira 2005), entretanto, diferentemente das espécies estudadas por Vieira (2005), o conectivo de *D. pubipetala* apresenta superfície mais irregular e endotécio contínuo na região subepidérmica. Como normalmente as células do endotécio limitam-se à região das tecas, promovendo a deiscência das anteras, é provável que em *D. pubipetala* estas células, ao exercerem pressão

mecânica sobre os tecidos subjacentes, contribuam para a liberação da secreção produzida pelas células epidérmicas globulares. Nossos dados sugerem que o endotécio pressionaria as células epidérmicas não secretoras localizadas predominantemente nas laterais do conectivo o que, conseqüentemente, levaria a uma compressão das células secretoras globulares localizadas na região mediana do conectivo. Como conseqüência, ocorreria o deslocamento do conteúdo celular para a região apical protuberante, ficando a região basal colapsada e a apical vesiculada, conforme observado ao MEV. É importante ressaltar que as características das células epidérmicas não secretoras, principalmente o acúmulo de substâncias fenólicas no vacúolo capacitam-nas a manter sua turgescência e integridade durante processos de desidratação, como reportado para as células motoras de pulvinos (Machado & Rodrigues 2004) e células buliformes em folhas de gramíneas (Alvarez *et al.*, *in press*).

Uma característica importante das células secretoras é a presença de projeções em toda a extensão da parede caracterizando-a como parede labiríntica, cuja presença está associada com o aumento da superfície da parede celular e da membrana plasmática, aumentando a eficiência no transporte via apoplasto (Lüttge 1971). Próximo a estas projeções é comum a presença de mitocôndrias e de retículo endoplasmático (Lüttge 1971), assim como observado em *D. pubipetala*.

As características ultra-estruturais observadas nas células secretoras do conectivo de *D. pubipetala* como abundância de retículo endoplasmático liso, mitocôndrias com matriz densa e cristas desenvolvidas e plastídeos com gotas de óleo, associadas à reação positiva para terpenos, indicam que tais células estão envolvidas com secreção predominantemente lipofílica (Hammond & Mahlberg 1978, Figueiredo e Pais 1992, Monteiro *et al.* 1999, Machado *et al.* 2006).

Os plastídeos nestas células possuem características peculiares como a presença de uma região central formada por túbulos e vesículas e uma região periférica contendo inclusões lipofílicas. Tal morfologia é semelhante à de mitocôndrias envolvidas na síntese de hormônios esteróides em animais (Alberts *et al.* 1997). Tais substâncias, pertencentes aos terpenóides, além da importância como componente da membrana plasmática, podem atuar como sinalizadores moleculares, hormônios (fitoecdisona e brassinoesteróides), toxinas e deterrentes alimentares (Croteau *et al.* 2000, Larcher 2000, Taiz & Zeiger 1998).

Uma outra peculiaridade nestas células é a presença de organelas bastante volumosas, delimitadas por membrana simples e preenchidas com material floculado cujo aspecto é similar a de polissacarídeos ou glicoproteínas em células animais (Carvalho & Recco-Pimentel 2001).

As características ultra-estruturais das células secretoras do conectivo (presença de retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos e organelas portadoras de polissacarídeos e/ou glicoproteínas), associadas à reação positiva para polissacarídeos e proteínas sugerem que tais células também estão envolvidas na secreção de substâncias hidrofílicas, as quais devem estar associadas com a viscosidade da secreção presente na superfície do conectivo. Esta secreção foi interpretada como importante veículo para a adesão do pólen no corpo do polinizador (C.C.F. Possobom, dados não publicados).

Com base nas evidências histoquímicas e ultra-estruturais os três tipos de glândulas florais de *D. pubipetala* possuem em comum habilidade para secretar substâncias lipofílicas e hidrofílicas. Contudo, a secreção lipofílica parece predominar nos três tipos glandulares, corroborando com Vogel (1990) sobre o envolvimento destas estruturas na síntese de lipídeos. Observações de campo obtidas por C.C.F. Possobom (dados não publicados) mostram que cada uma destas glândulas desempenha papel particular na polinização de *D. pubipetala*. As glândulas calicinais estão envolvidas na oferta de óleos como recompensa às abelhas polinizadoras; as glândulas da pétala atuam como osmóforos na atração e orientação química das abelhas, enquanto que a secreção viscosa produzida pela superfície glandular do conectivo serve como veículo para a adesão do pólen ao corpo das abelhas polinizadoras.

Agradecimentos

À Fapesp pela bolsa de mestrado (06/54268-0) e aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica pelo auxílio no preparo das amostras.

Referências bibliográficas

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. 1997. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Alvarez, J.M., Rocha, J.F., Machado, S.R. Bulliform cells in *Loudetiopsis chrysothrix* (Nees) Conert and *Tristachya liostachya* Nees (Poaceae). Structure in relation to function. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (no prelo).
- Anderson, W.R. 1977. Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae. **Leandra** anos VI e VII (7): 5-18.
- Anderson, W.R. 1979. Floral conservation in Neotropical Malpighiaceae. **Biotropica** 11:219-223.

- Anderson, W.R. 1990. The origin of the Malpighiaceae – The evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 64: 210-224.
- Angermüller, S. & Fahini, D.H. 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.** 14: 823-825.
- Ascensão, L., Marques, N. & Pais, M.S. 1997. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of plant sciences* 158: 249-258.
- Attala, N.C. 2004. Morfoanatomia da lâmina foliar, estrutura e histoquímica das glândulas foliares e calicinais em espécies de Malpighiaceae de cerrado. Tese de Doutorado – UNESP, Botucatu – SP.
- Barros, M. A. G. 1992. Fenologia da floração, estratégias reprodutivas e polinização de espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* Rich (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 52(2): 343-353.
- Barroso, G. M. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. p.325-329.
- Batalha, M.A. & Mantovani, W. 2000. Reproductive phenological patterns of cerrado plant species at the Pé-de-gigante reserve (Santa Rita do Passa quarto, SP, Brazil): a comparison between the herbaceous and woody floras. **Revista Brasileira de Biologia** 60(1): 129-145.
- Buchmann, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Rev. Ecol. Syst.** 18: 343-369.
- Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. 2001. **A célula 2001**. Ed. Manole, 287 p.
- Carvalho, P.D.; Borba, E.L.; Lucchese, A.M. 2005. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Bot. Bras.* Vol.19 No.2
- Castro, M.A; Vega, A.S & Múlgura, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). **American Journal of Botany** 88(11): 1935-1944.
- Cocucci, A. A.; Holgado, A. M.; Anton, A. M. 1996. Estudio morfológico y anatómico de los eleóforos pedicelados de *Dinemandra ericoides*, Malpighiaceae endémica del desierto de Atacama, Chile. *Darwiniana*. 34 (1-4):183-192.
- Costa, C.B.N.; Costa, J.A.S.; Ramalho, M. 2006. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 103-114.

- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of plants**.
- David, R. & Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au moyen du réactif de Nadi. **Comptes Rendus de L'Académie des Sciences**, Paris, Serie D 258: 1338-1340.
- Fahn, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. New York, Academic Press.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytol.** 108: 229-257.
- Figueiredo, A.C.M. & Pais, M.S. 1992. Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum arbortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae). **Annals of Botany** 70: 325-331.
- Fuchs, C.H. 1963. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology** 38: 141-144.
- Gates, B. 1982. *Banisteriopsis* and *Diplopterys* (Malpighiaceae). **Flora Neotropica Monograph** 30: 1-237.
- Hammond, C. T. & Mahlberg, P.G. 1977. Morphogenesis of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* (Cannabaceae). **Am. J. Bot.** 64 (8): 1023-1031.
- Harborne, J.B. 1997. plant secondary metabolism. In: Crawley, M.J. (ed.). *Plant ecology* 2th ed. Berlin: Blackwell publishing 132-155.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill: New York.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137 A - 138A.
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, RiMA, 531 p.
- Lobreau-Callen, D. 1989. Les Malpighiaceae et leurs pollinisateurs. Coadaptation ou coévolution. **Bull. Mus. natn. Hist. nat.**, Paris, 4a. série. 11, section B, Adansonia, no. 1: p. 79-94.
- Lüttge, U. 1971. Structure and function of plant glands. **Annual Review of Plant Physiology** 22: 23-44.
- Machado, S.R. & Rodrigues, T.M. 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 27(1):135-147.
- Machado, S.R. & Gregório, E.A. 2001. Zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reactive sites in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae). **Tissue & Cell** 33 (1): 72-77.
- 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.

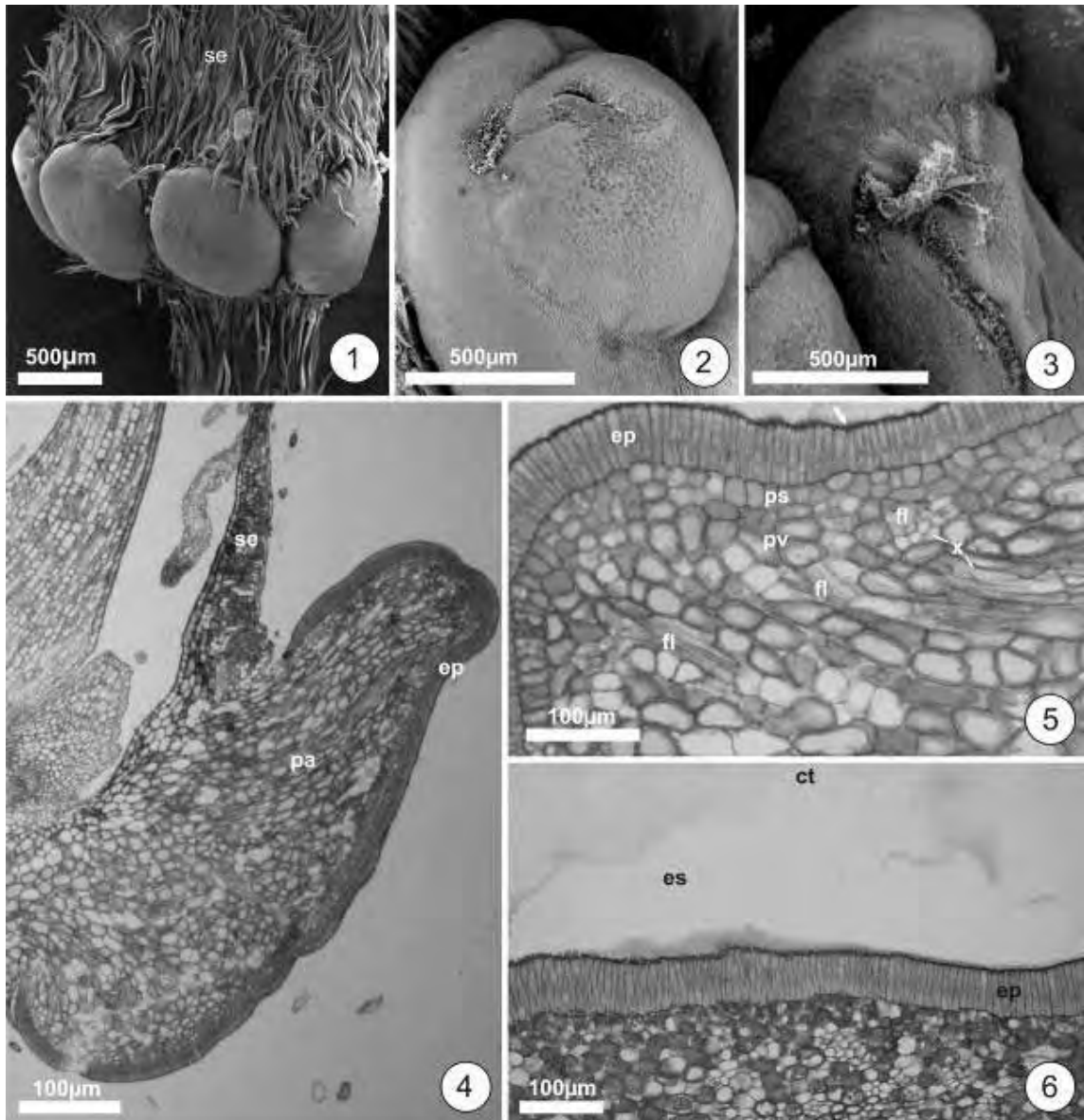
- Monteiro, W.R., Fahn, A., Caldeira, W. & Castro, M.M. 1999. Ultrastructural observations on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae). **Flora** 194: 113-126.
- Morelato, P.C. & Leitão-Filho, H.F. 1996. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian forest. **Biotropica** 28(2):180-191.
- Neff, J.L. & Simpson, B.B. 1981. Oil-collecting structures in the Anthoporidae (Hymenoptera): morphology, function and use in systematics. **Journal of the Kansas entomological society** 54(1): 95-123.
- Simpson, B.B. & Neff, J.L. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 68: 301-322.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373.
- 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.
- Possobom, C.C.F. 2007. Ultra-estruturas das glândulas do cálice de *Byrsonima intermedia*. **Monografia (Bacharelado)** – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu
- Razem, F.A. & Davis, A.R. 1999. Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L. during flower development. **Annals of Botany** 95(5): 749-756.
- Reinecke, M. & Walther, C. 1978. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. **Journal of Cell Biology** 21: 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.
- Sigrist, M.R. & Sazima, M. 2004. Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. **Annals of Botany** 94: 33-41.
- Silva, E.M.J. & Machado, S.R. 1999. Ultrastructure and cytochemistry of the pearl glands of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). **Nordic Journal of Botany**
- Subramanian, R.B., Arumugasamy, K. & Inamdar, J.S. 1990. Studies in secretory glands of *Hiptage sericea* (Malpighiaceae). **Nordic Journal of Botany** 10(1):57-62.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1998. **Plant Physiology**. 2a. Ed. Massachusetts: Sinauer associates.

- Teixeira, L.A.G. & Machado, I.C. 2000. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* dc (malpighiaceae). **Acta bot. bras.** 14 (3): 347-357.
- Vermeer, J. & Peterson, R.L. 1979. Glandular trichomes on the inflorescence of *Chrysanthemum morifolium* cv. Dramatic (Compositae). II. Ultrastructure and histochemistry. **Can. J. Bot.** 57: 714-729.
- Vieira, A.C.M. 2005. Estudos em espécies de Malpighiaceae de restingas do Rio de Janeiro: estruturas secretoras em folhas e flores e biologia floral. **Tese de Doutorado – USP.**
- Vinson, S.B; Williams, H.J; Frankie, G.W & Shrum, G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipid by Centris bees (Hymenoptera: Apidae). **Biotropica.** 29 (1): 76-83.
- Vogel, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische und subtropische Pflanzenwelt** 7: 283-547.
- Vogel, S. 1990. History of malpighiaceae in the light of pollination ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 55: 130-142.
- Werker, E. & Fahn, A. 1981. Secretory hairs of *Inula viscosa* L. Ait. – development, ultrastructure and secretion. **Bot. Gaz.** 142: 461-476.

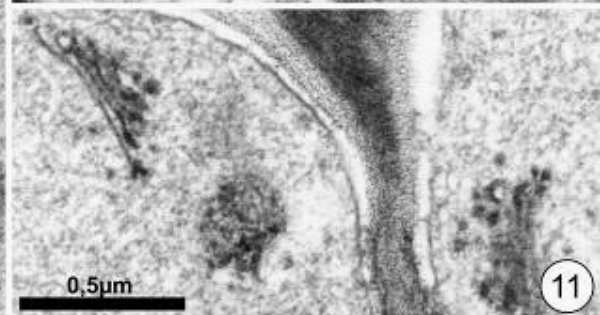
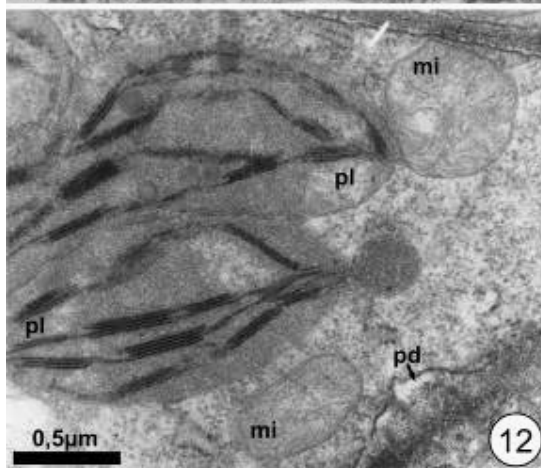
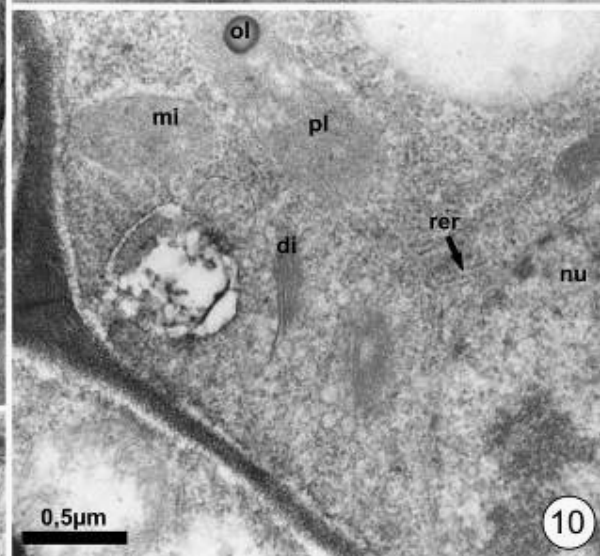
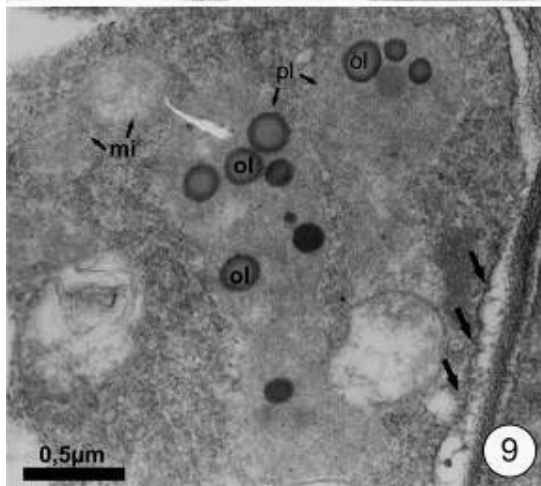
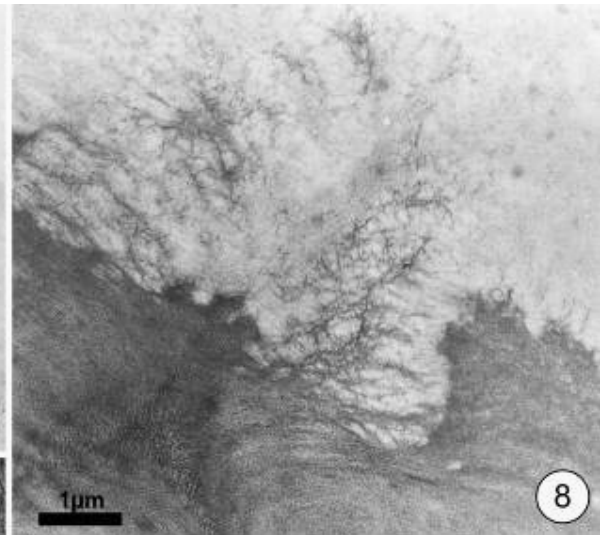
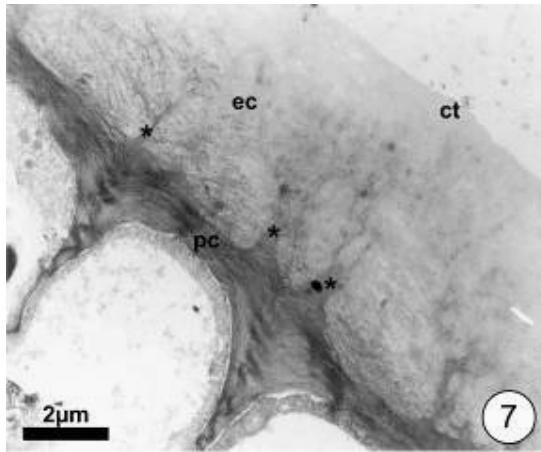
Figuras e Tabelas

Figuras 1-6 – Glândulas do cálice de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MEV e ML)

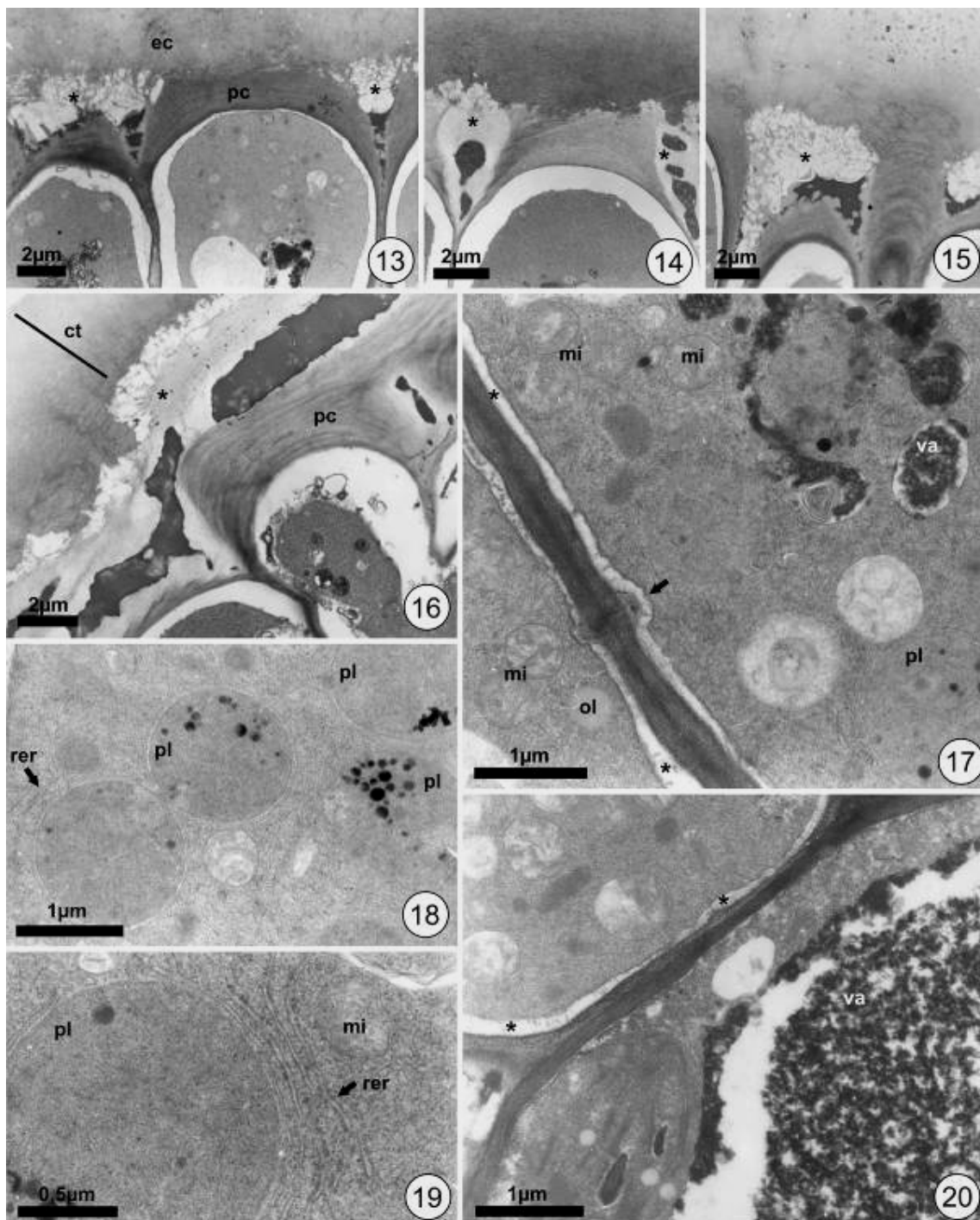
1. Glândulas do cálice de botão floral jovem, com superfície lisa e intacta. **2.** Glândula do cálice de flor recém-aberta. Notar saliência devido ao acúmulo de secreção. **3.** Glândula do cálice após liberação da secreção. **4.** Secção longitudinal da glândula mostrando localização com relação à sépala e disposição geral dos tecidos. **5.** Detalhe da glândula em secção longitudinal mostrando epiderme unisseriada em paliçada revestida por cutícula, parênquima subepidérmico e parênquima vascularizado por xilema e floema. **6.** Detalhe mostrando espaço subcuticular onde a secreção é acumulada. ct = cutícula. ep = epiderme. es = espaço subcuticular. fl = floema. pa = parênquima. ps = parênquima subepidérmico. pv = parênquima vascularizado. se = sépala. x = xilema.



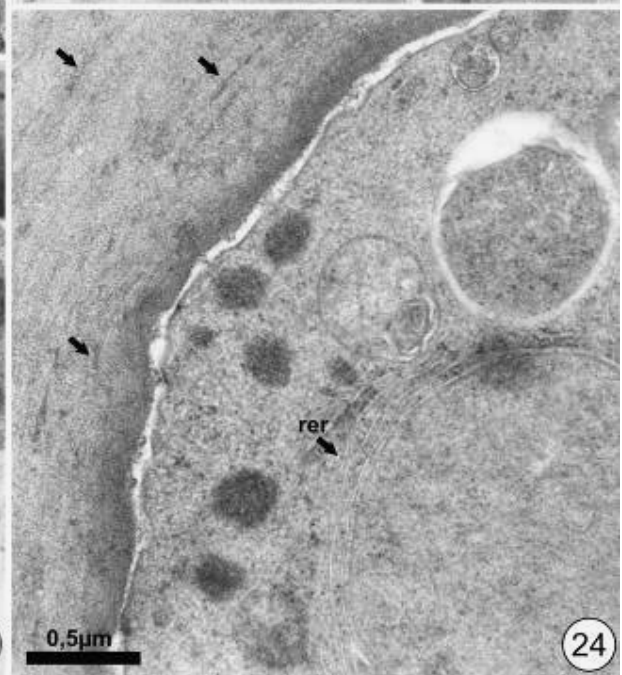
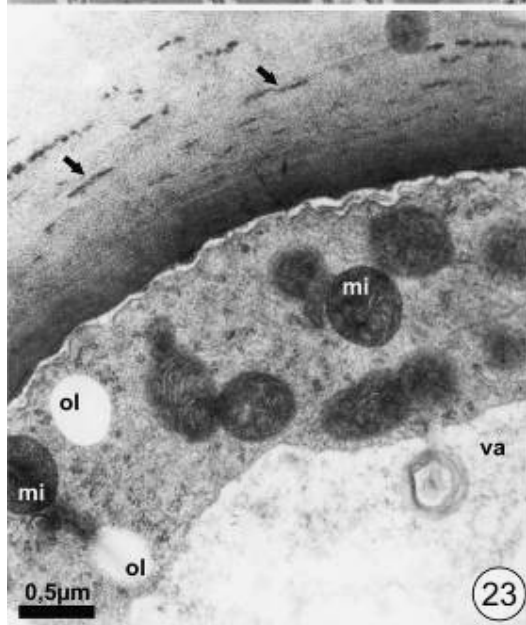
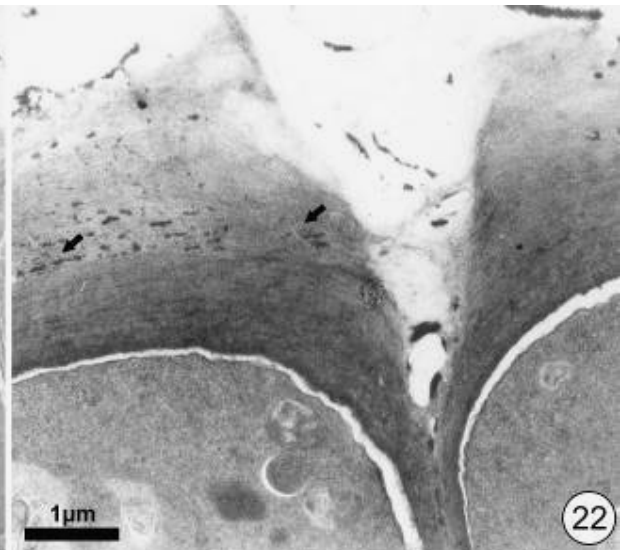
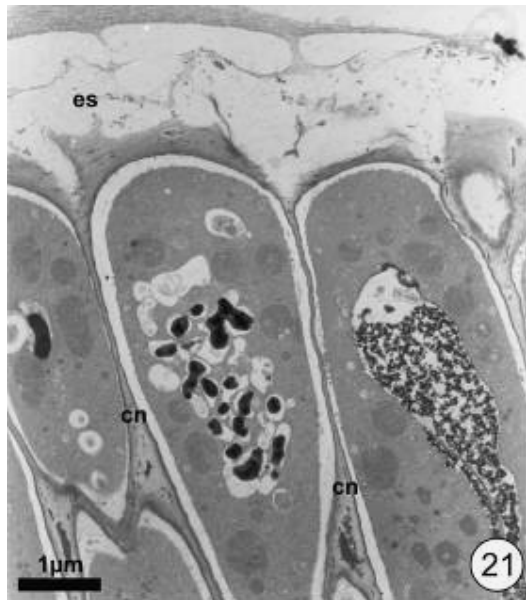
Figuras 7-12 – Glândulas do cálice (fase 1) de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). **7.** Detalhe da região da parede periclinal externa de células epidérmicas. Notar parede espessa aderida à cutícula (ct + ec) **8.** Detalhe da região entre a parede celular e o estrato cuticular mostrando ramificações fibrosas na região de contato entre a parede periclinal e as paredes anticlinais (*). **9.** Citoplasma de célula epidérmica mostrando plastídeos com gotas de óleo, mitocôndrias, corpos multivesiculares e espaço periplasmático (setas). **10.** Citoplasma de célula epidérmica mostrando dictiossomo, mitocôndrias, plastídeo com gotas de óleo, retículo endoplasmático rugoso e corpo multivesicular. **11.** Detalhe de dictiossomos e mitocôndria no citoplasma de célula epidérmica marcados através da reação com o ZIO. **12.** Plastídeo de célula parenquimática subepidérmica com estroma denso e sistema de membranas internas organizado. Notar mitocôndrias e plasmodesmo conectando duas células parênquimáticas. ct = cutícula. di = dictiossomo. ec = estrato cuticular. mi = mitocôndria. nu = núcleo. ol = óleo. pc = parede celular. pl = plastídeo. pd = plasmodesmo. rer = retículo endoplasmático rugoso.



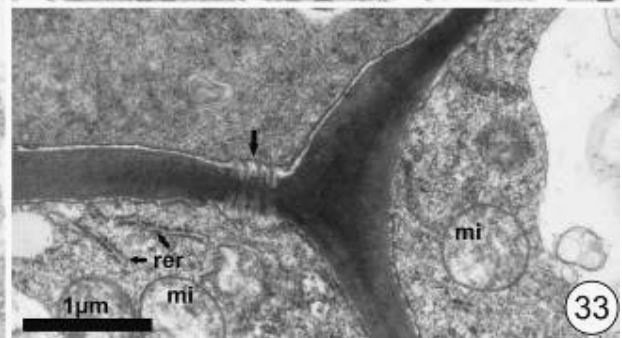
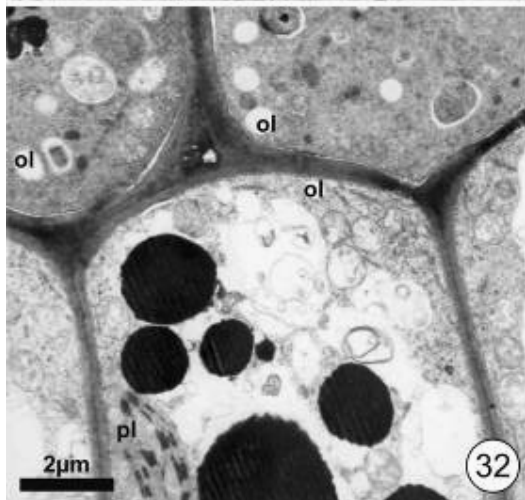
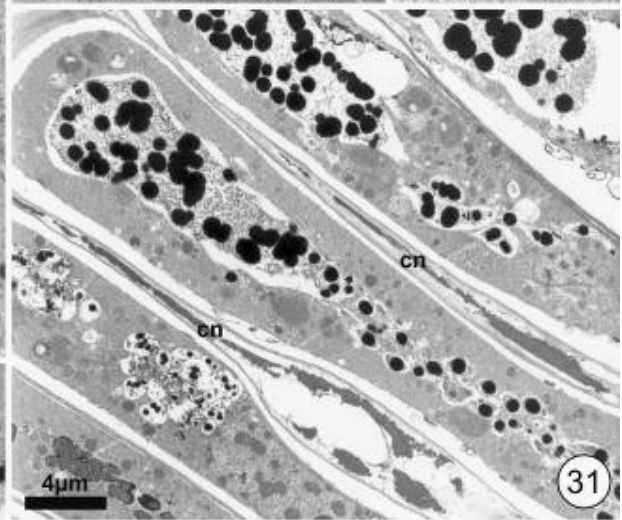
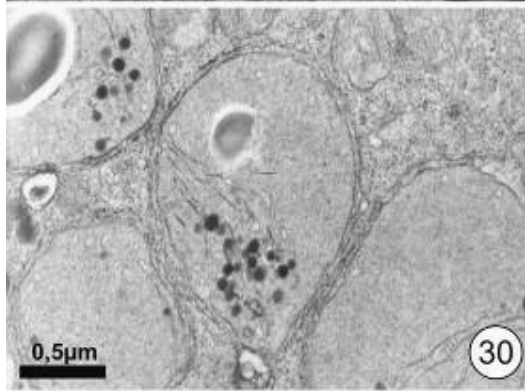
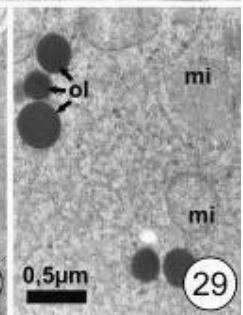
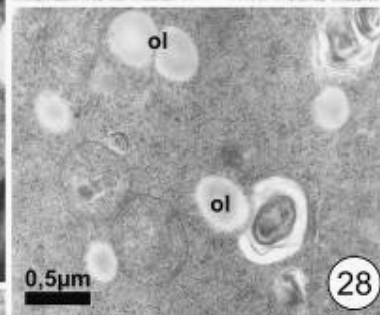
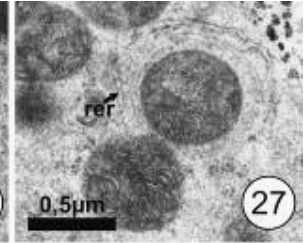
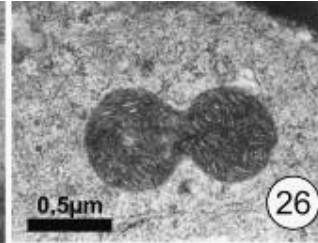
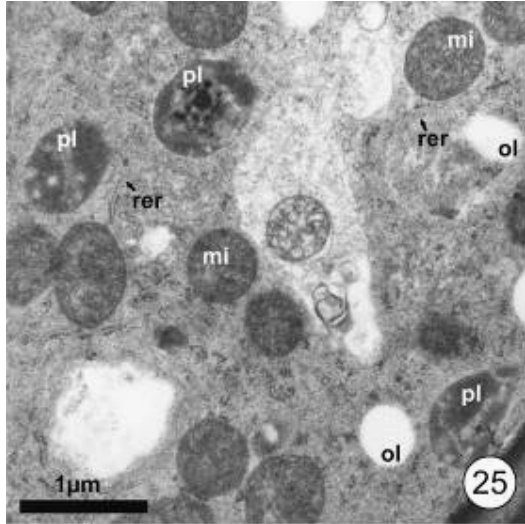
Figuras 13-20 – Glândulas do cálice (fase 2) de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). 13-16. Formação do espaço subcuticular. Notar gradual aumento dos sítios de acúmulo da secreção (*) e afastamento da cutícula. **17.** Células epidérmicas conectadas através de plasmodesmos (setas). Notar plastídeos, mitocôndrias e gotas de óleo dispersas no citoplasma, além de espaço periplasmático entre o protoplasto e a parede anticlinal. **18.** Plastídeo em divisão (seta), mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso no citoplasma de célula epidérmica - **19.** Detalhe de um plastídeo em célula epidérmica circundado por retículo endoplasmático rugoso **20.** Região entre célula epidérmica e célula parenquimática mostrando espaço periplasmático entre o protoplasto e a parede periclinal interna da célula epidérmica. Notar cloroplastídeo com gotas de óleo e amido. ct = cutícula. ec = estrato cuticular. mi = mitocôndria. ol = óleo. pc = parede celular. pl = plastídeo. rer = retículo endoplasmático rugoso.



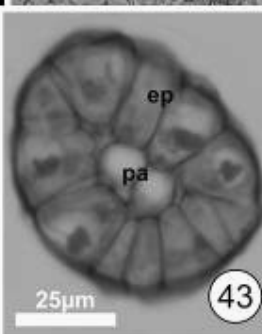
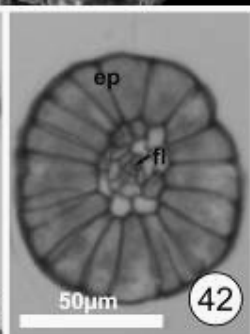
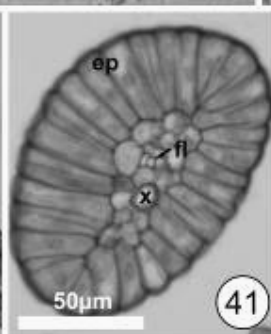
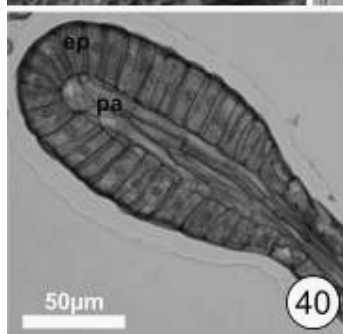
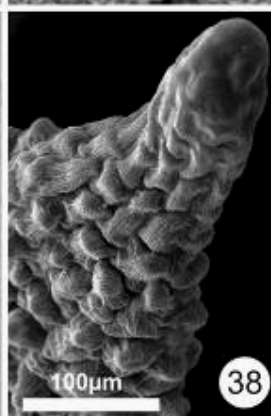
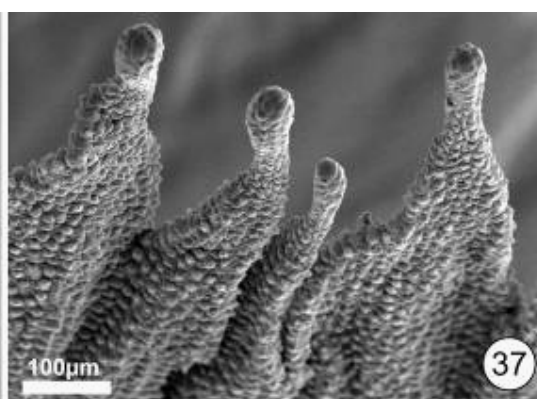
Figuras 21-24 – Glândulas do cálice (fase 3) de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). 21. Aspecto geral das células epidérmicas, mostrando espaço subcuticular bem desenvolvido com acúmulo de secreção e canais formados entre as paredes anticlinais. **22-24.** Células epidérmicas. Notar parede periclinal externa com acúmulos de material elétron-denso (22, 24 - setas). Mitocôndrias (23, 24), gotas de óleo e retículo endoplasmático rugoso são observados no citoplasma. cn = canal. es = espaço subcuticular. mi = mitocôndria. ol = óleo. rer = retículo endoplasmático rugoso. va = vacúolo



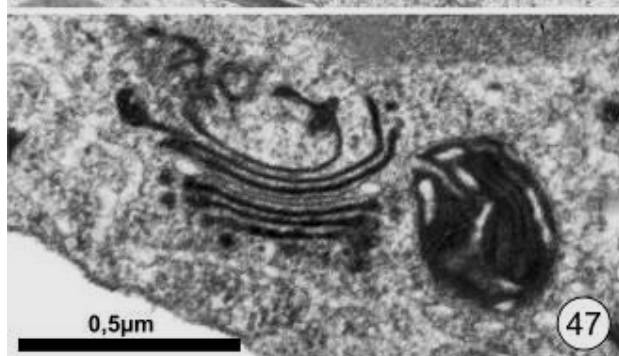
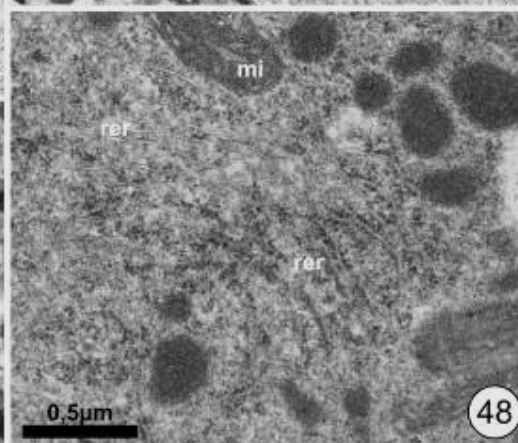
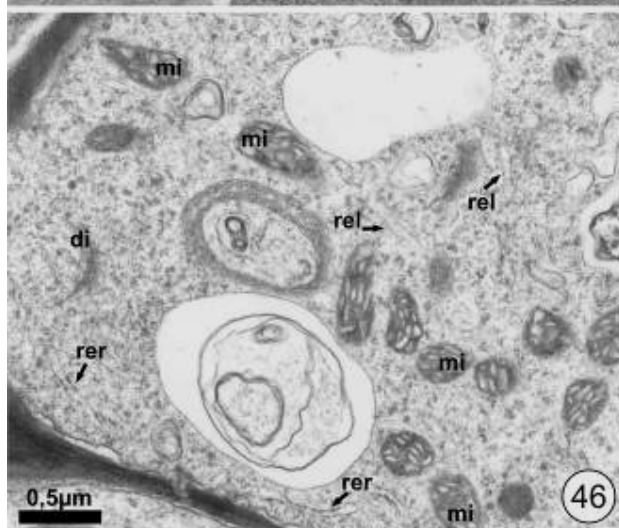
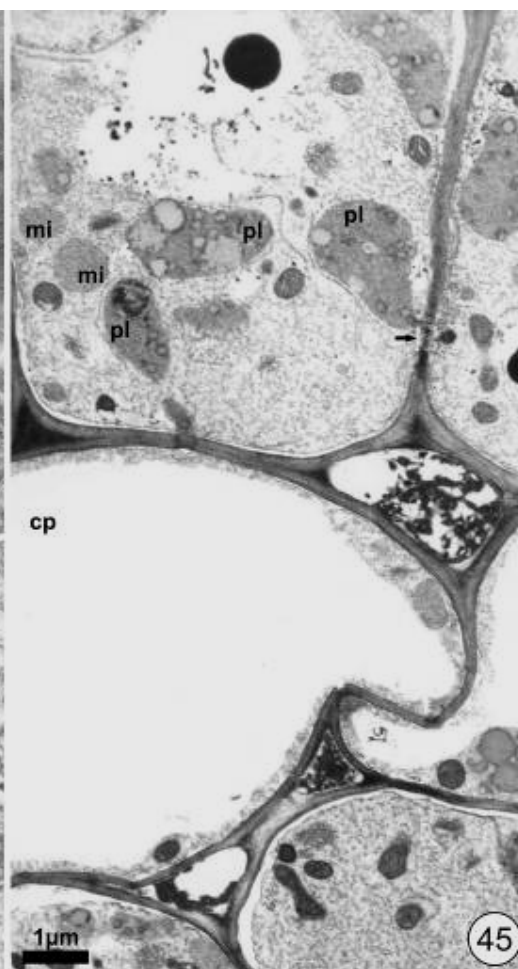
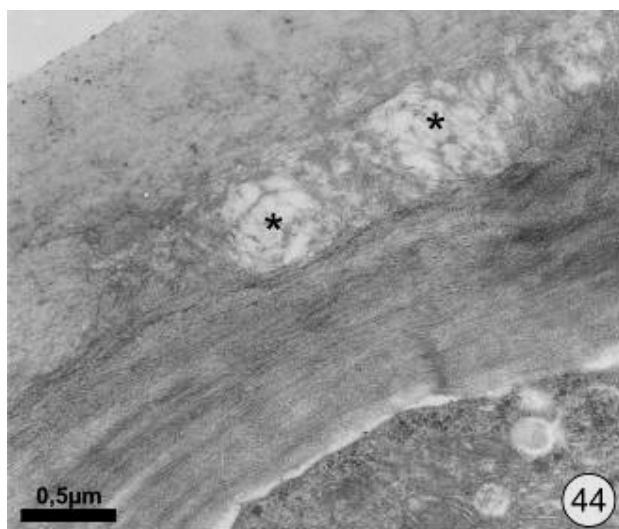
Figuras 25-33 – Glândulas do cálice (fases 3 e 4) de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). 25-30. Fase 3. 25. Citoplasma de célula epidérmica com mitocôndrias, plastídeos, retículo endoplasmático rugoso e gotas de óleo dispersas. **26-27.** Mitocôndrias em processo de divisão. Notar retículo endoplasmático rugoso ao redor. **28-29.** Gotas de óleo dispersas no citoplasma de célula epidérmica. Notar marcação através da técnica do ósmio-imidazol (29). **30.** Plastídeos conspícuos com gotas lipídicas e grãos de amido em células epidérmica. **31-33. Fase 4. 31.** Células epidérmicas parcialmente desconectadas devido à presença de canais entre as paredes anticlinais. **32.** Célula epidérmica e célula parenquimática. Notar vacúolo contendo inclusões densas e material membranoso, além de mitocôndrias, cloroplastídeos e gotas de óleo no citoplasma da célula parenquimática. **33.** Detalhe de plasmodesmo conctando citoplasma de célula epidérmica e célula parenquimática onde são observadas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. cn = canal. mi = mitocôndria. ol = óleo. rer = retículo endoplasmático rugoso.



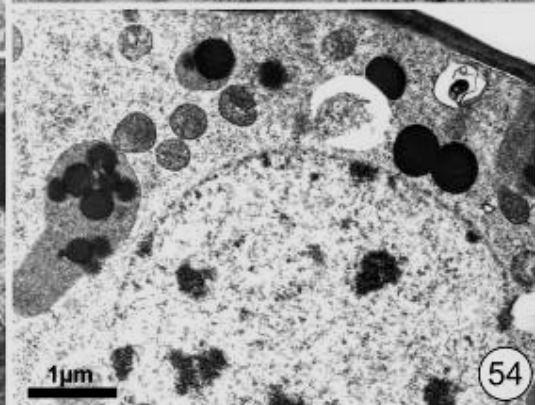
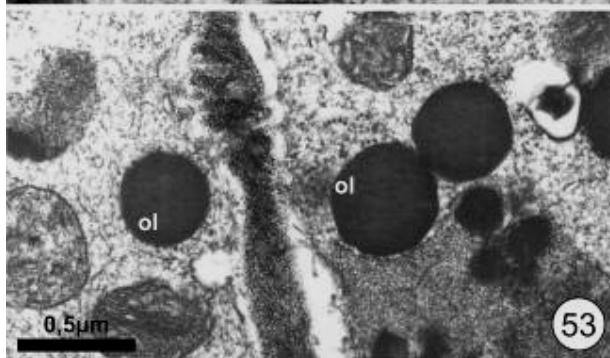
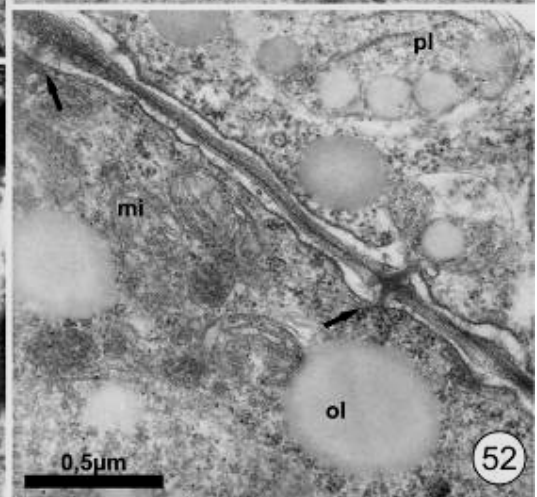
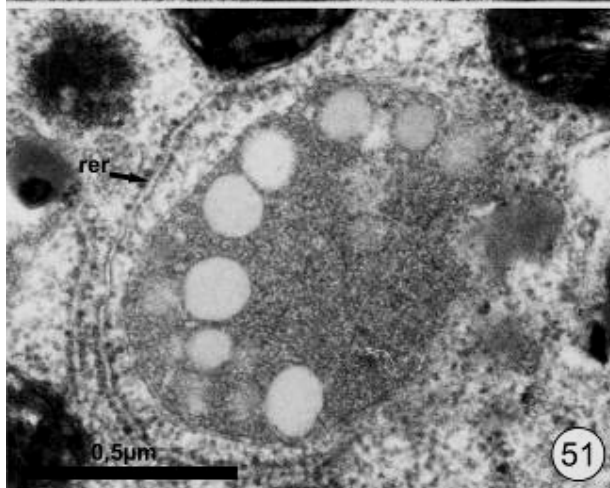
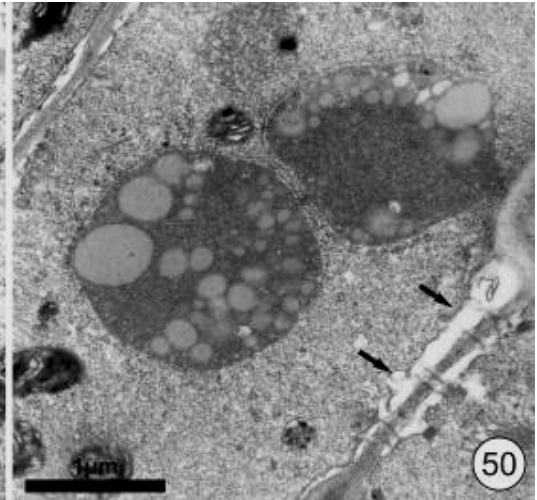
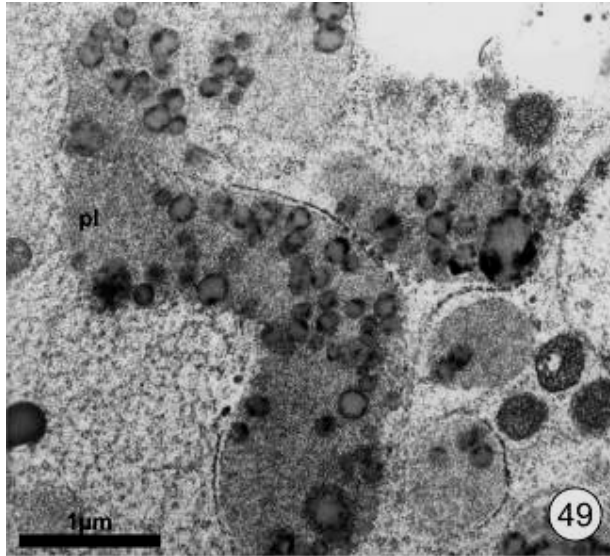
Figuras 34-43 – Glândulas das pétalas de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MEV e ML). 34-36. Glândulas presentes nas margens fimbriadas de pétala posterior. Notar vascularização alcançando a região glandular da fimbria (36). **37-39.** Glândulas presentes nas margens fimbriadas de pétalas laterais. Notar menor tamanho quando comparadas às glândulas da pétala posterior. A vascularização não alcança a região glandular. **40.** Secção longitudinal de glândula de pétala posterior mostrando formato espatulado. Notar células epidérmicas em paliçada e células parenquimáticas na região central. **41-42.** Secção transversal de glândulas de pétala posterior. Notar epiderme e parenquima vascularizado por xilema e floema. **43.** secção transversal de glândula de pétala lateral, mostrando epiderme com células quadrangulares ou cuneiformes e parênquima central com número reduzido de células. ep = epiderme. et = elemento traqueal. fl = floema. pa = parênquima. x = xilema.



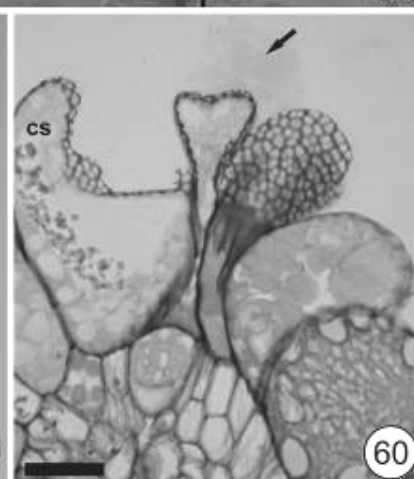
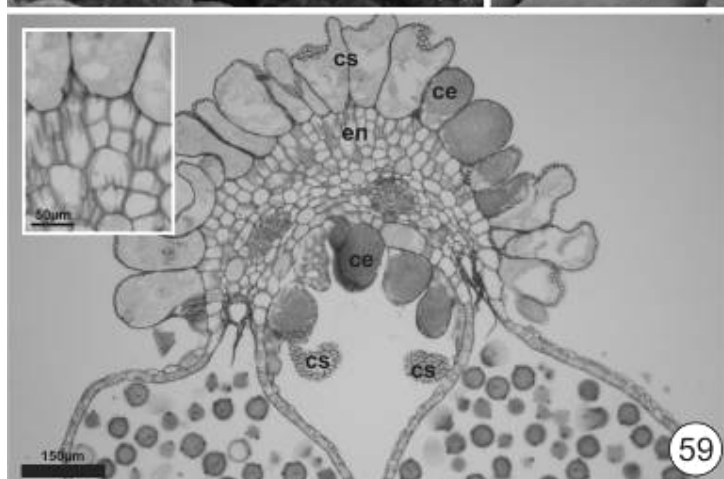
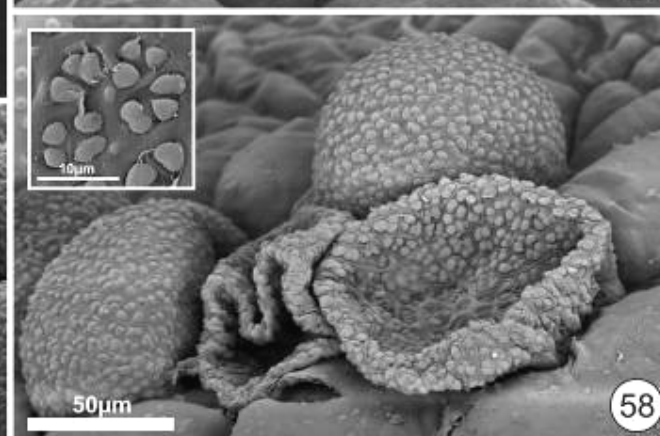
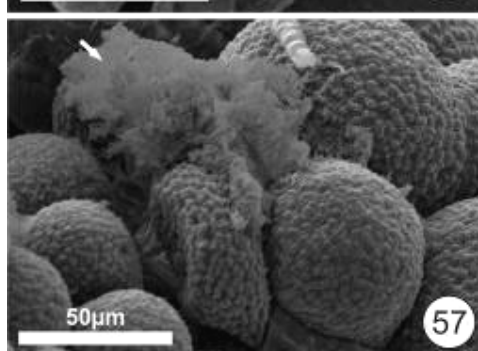
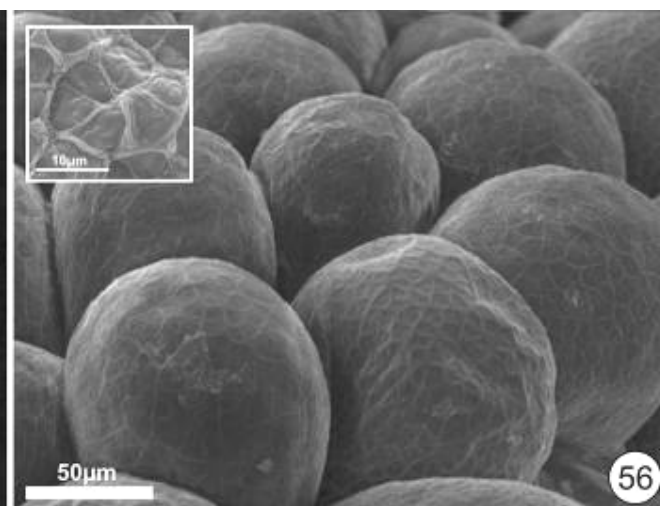
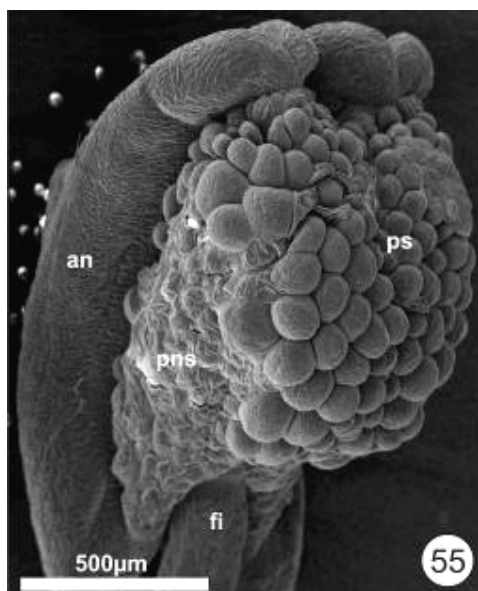
Figuras 44-48 – Glândulas da pétala posterior de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). **44.** parede periclinal externa de célula epidérmica com sinais de degradação (*) **45.** Células epidérmicas e células parênquimáticas centrais. Notar plasmodesmos entre as paredes anticlinais e citoplasma denso onde observam-se plastídeos e mitocôndrias. O citoplasma ns células do parênquima é reduzido e o vacúolo é bem desenvolvido. **46.** Citoplasma de célula epidérmica onde se observam mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso. **47.** Detalhe de um Dictiossomo e uma mitocôndria bem marcados através da reação com o ZIO. **48.** Citoplasma de célula epidérmica exibindo abundância de retículo endoplasmático rugoso. cp = célula parenquimática. di = dictiossomo. mi = mitocôndria. pl = platídeo. rel = retículo endoplasmático liso. rer = retículo endoplasmático rugoso.



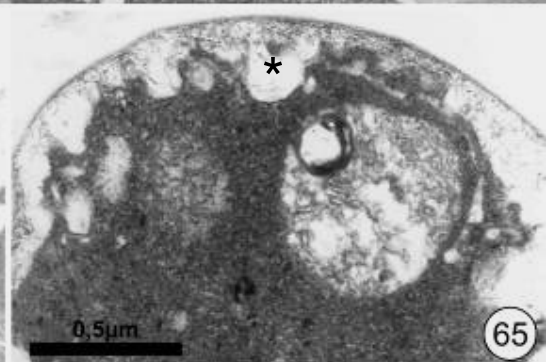
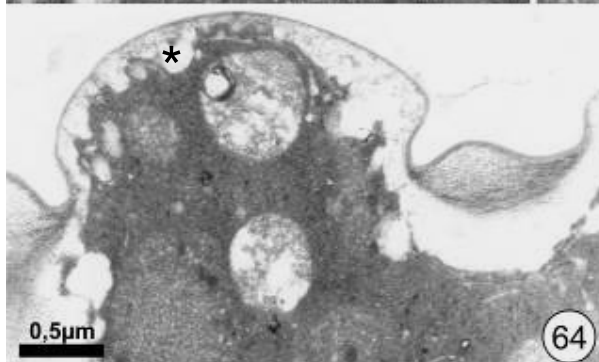
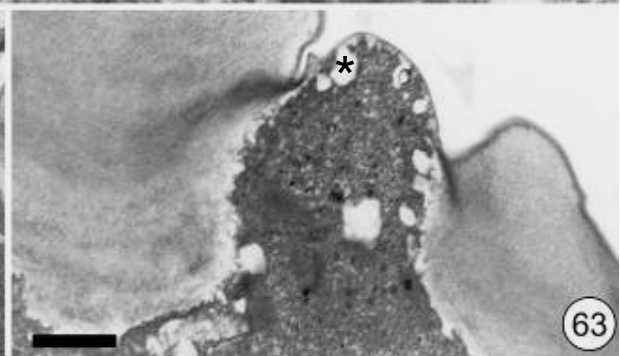
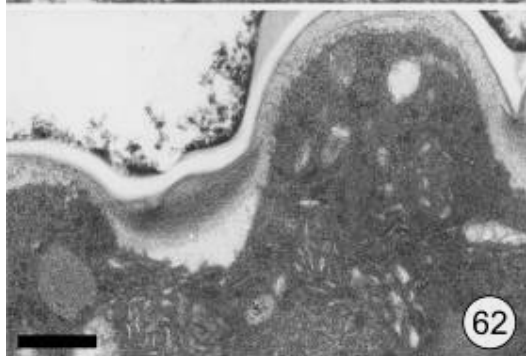
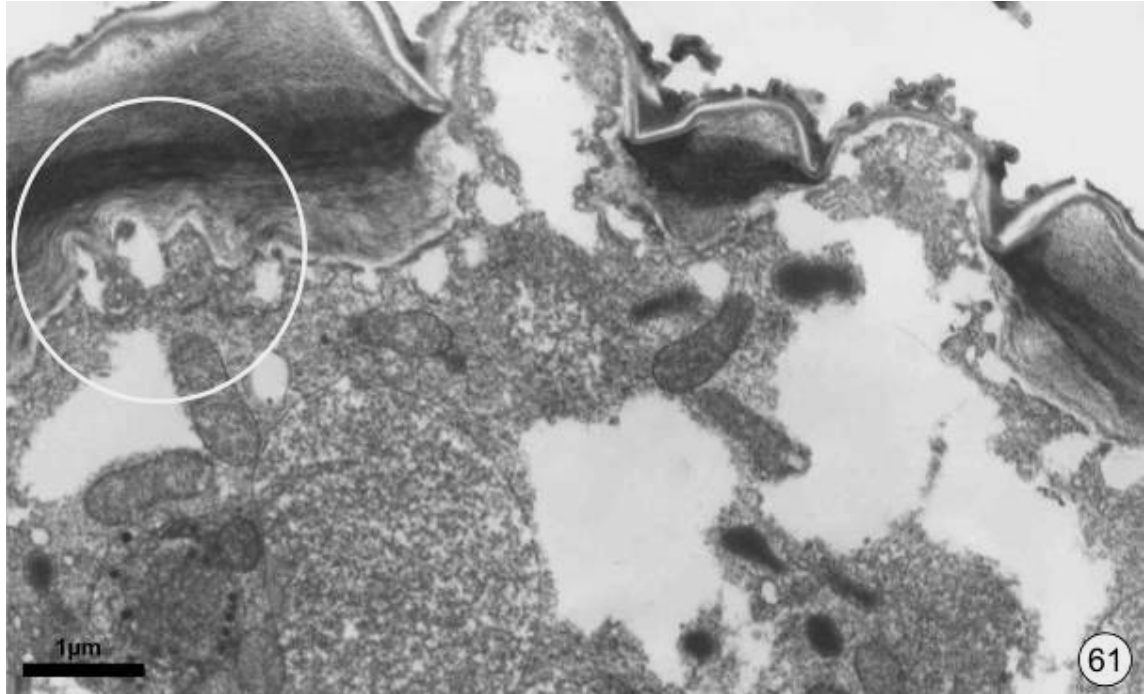
Figuras 49-54 – Glândulas da pétala posterior de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). 49-51. Plastídeos volumosos de células epidérmicas. Notar gotas de óleo no seu interior, além de retículo endoplasmático rugoso ao redor destas organelas (51). **52.** Citoplasma entre duas células epidérmicas conectado através de plasmodesmos (setas). Notar plastídeo com gotas de óleo, as quais são observadas dispersas no citoplasma. **53-54.** Marcação das gotas lipídicas no citoplasma (53, 54) e nos plastídeos (54) das células epidérmicas através da reação com o ósmio-imidazol. mi = mitocôndria. ol = óleo. pl = plastídeo. rer = retículo endoplasmático rugoso.



Figuras 55-60 – Conectivo glandular de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MEV e ML). **55.** Aspecto geral de um estame na região do conectivo. Notar células globulares na porção secretora e células com superfície homogênea na porção não secretora. **56.** Células globulares de conectivo de estames retirados de botão floral. Nota a turgidez e superfície reticulada (detalhe) destas células. **57-58.** Conectivo de estame retirado de flor na antese. Notar células murchas, com formato côncavo e presença de secreção (seta). As células apresentam superfície vesiculada (58, detalhe). **59.** Secção transversal de estame na região do conectivo, mostrando células epidérmicas globulares ao lado de células epidérmicas com conteúdo fenólico. Notar presença de endotécio na região subepidérmica (detalhe). **60.** Detalhe de células epidérmicas secretoras e não secretoras do conectivo. Notar células globulares com região apical livre e secreção sendo liberada (seta). an = antera. en = endotécio. fi = filete. ce = célula epidérmica não secretora. cs = célula epidérmica secretora. ps = porção secretora. pns = porção não secretora.



Figuras 61-65 – Conectivo glandular de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). 61. Aspecto geral da porção apical de uma célula secretora. Notar parede com regiões espessas e regiões delgadas onde nota-se a extrusão do protoplasto. O círculo ressalta região de parede espessa onde nota-se início de evaginação da membrana plasmática. **62-65.** Detalhes de regiões da parede onde o protoplasto encontra-se protuberante. Notar diferentes espessuras da parede celular, além da presença de parede labiríntica (*).



Figuras 66-75 – Conectivo glandular de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). **66-68.** Citoplasma de células epidérmicas secretoras mostrando retículo endoplasmático rugoso (66, 68) e liso (67) e dictiossomos (68) subjacentes à invaginações da parede celular anticlinal (*). **69.** Citoplasma de célula secretora mostrando abundância de mitocôndrias, plastídeos e organelas cuja identidade não foi reconhecida. **70.** Detalhe de um plastídeo mostrando região periférica com estroma denso e inclusões lipofílicas, além de região central constituída por pequenas vesículas. **71.** Detalhe de dois plastídeos, um com vesículas e outro com túbulos na região central. Notar mitocôndrias com cristas desenvolvidas. **72.** Plastídeos, mitocôndrias e organelas com membrana simples no citoplasma de célula secretora. Notar retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias próximos à parede labiríntica. **73.** dictiossomo marcado com a reação com o ZIO. **74.** Detalhe de organela não identificada mostrando membrana simples e material de aspecto granular no interior. **75.** Célula epidérmica não secretora exibindo núcleo conspícuo e basal, citoplasma reduzido e vacúolo preenchido por composto fenólico.

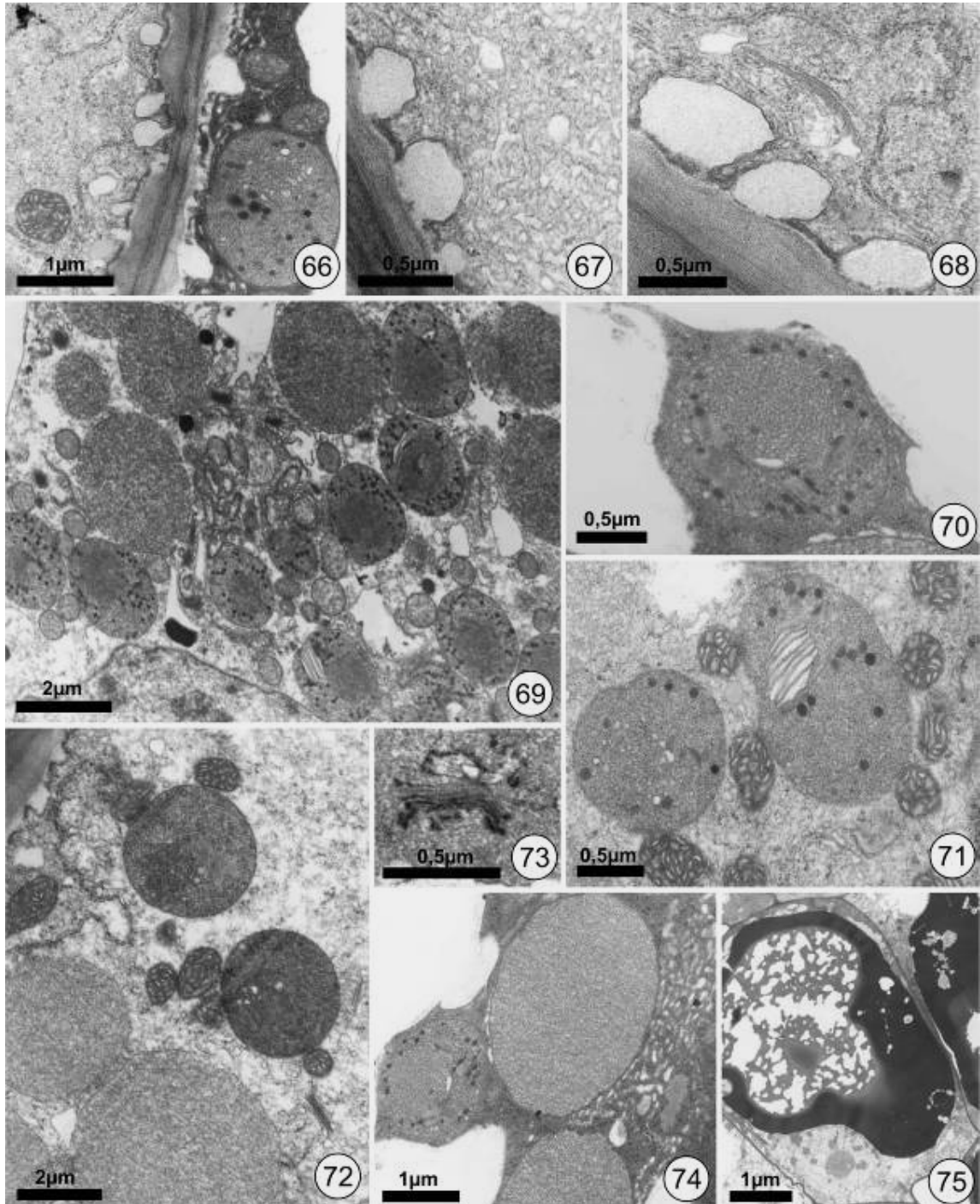


Tabela 1. Testes histoquímicos realizados nas glândulas florais de *D. pubipetala*

Teste	Composto detectado	sépala		pétala		estame	
		reação	local	reação	local	reação	local
Sudan IV	lipídeo	++	cutícula	++	cutícula	++	cutícula
		++	espaço subcuticular				
NADI	terpenos	-		++	epiderme	++	epiderme
Cloreto Férrico III	Compostos fenólicos	+	epiderme	-		+	epiderme secretora
		++	parênquima			++	epiderme comum
Acetato de cobre	resinas	-		-		-	
PAS	Polissacarídeos totais	++	paredes celulares	++	paredes celulares	++	paredes celulares
		+	epiderme	+	epiderme	+	epiderme secretora
Vermelho de Rutênio	Mucilagem/pectina	++	Paredes celulares	++	Paredes celulares	++	paredes celulares
		+	epiderme	+	epiderme	+	epiderme secretora
Azul mercúrio de bromofenol	Proteínas totais	++	epiderme	++	epiderme	++	epiderme
Wagner	alcalóides	-		-		-	
Lugol	amido	+	parênquima	-		-	

- reação negativa, + reação fraca, ++ reação intensa

Capítulo III

Estrutura, mecanismo de secreção e papel dos nectários foliares em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis

RESUMO (Estrutura, mecanismo de secreção e papel dos nectários foliares em *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C. Cav. Davis) – Em Malpighiaceae há indícios de que nectários são estruturas homólogas aos elaióforos calicinais, os quais mostram semelhanças na organização anatômica e no mecanismo de secreção diferindo apenas quanto à natureza química da secreção. Contudo, faltam estudos detalhados destas glândulas para a maioria das espécies desta família. O presente estudo descreve aspectos anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais dos nectários foliares, além de observações sobre aspectos fenológicos e do comportamento dos visitantes foliares de *D. pubipetala*. Os nectários ocorrem ao longo da margem do limbo foliar, sendo mais desenvolvidos aqueles localizados no ápice e na base do limbo. São ativos unicamente em folhas jovens e frequentemente visitados por formigas com comportamento agressivo, as quais se alimentam da secreção, o que sugere a existência de associação benéfica entre nectários e formigas. Os nectários são ovóides, sésseis, vascularizados por floema e constituídos por epiderme secretora em paliçada e parênquima especializado. As células epidérmicas exibem núcleo volumoso, citoplasma abundante com inúmeras mitocôndrias, dictiossomos hipersecretores, retículo endoplasmático, plastídeos polimórficos de conteúdo variável e gotas de óleo dispersas; o vacuoma é pouco desenvolvido e contém substância fenólica e lipídeos. Análises histoquímicas mostraram que polissacarídeos e açúcares redutores são os principais componentes da secreção, a qual se acumula no espaço subcuticular sendo liberada através da ruptura da cutícula. As características ultra-estruturais das células secretoras são típicas de glândulas com secreção mista visto que possuem maquinaria para a síntese de secreção hidrofílica e lipofílica. Este resultado corrobora com hipóteses sobre a existência de algum tipo de relação evolutiva entre nectários e elaióforos nesta família.

Palavras-chave: anatomia, Malpighiaceae, nectários foliares, secreção, ultra-estrutura.

Introdução

Malpighiaceae é uma família predominantemente tropical, composta por mais de 1250 espécies distribuídas em aproximadamente 65 gêneros os quais ocorrem tanto no Novo como no Velho Mundo (Cameron *et al.* 2001).

Dentre as espécies conhecidas, 85% ocorrem no Novo Mundo (Anderson 1990), onde ocupam uma grande variedade de habitats, podendo ocorrer em ambientes abertos, como bosques, savanas e campos, ou em margens de rios e em florestas (Anderson 1979). No Brasil, são encontrados mais de 38 gêneros e cerca de 300 espécies amplamente distribuídas nas diferentes formações vegetais (Barroso 1984; Souza & Lorenzi 2005), sendo a família Malpighiaceae uma das mais representativas dos cerrados (Oliveira & Leitão Filho 1987, Mendonça *et al.* 1998).

A presença de glândulas distribuídas em órgãos vegetativos e reprodutivos é uma característica importante em Malpighiaceae (Anderson 1990). Dentre elas, as glândulas localizadas no cálice são as mais estudadas devido à conhecida importância na atração de polinizadores, já que nas espécies neotropicais estas glândulas são apontadas como produtoras de óleo (Vogel 1974) como recompensa aos visitantes florais (Buchmann 1987). As glândulas localizadas nos órgãos vegetativos, especialmente foliares são frequentemente descritas como nectários extraflorais, estando presentes em quase todas as lianas da família (Elias 1983). De acordo com Vogel (1990), elaióforos evoluíram de nectários a partir da transformação da secreção predominantemente hidrofílica para lipofílica e, segundo este autor, tal hipótese pode explicar a evolução da família.

A similaridade morfológica entre nectários e glândulas do cálice tem sido discutida em literatura e os estudos sugerem que se tratam de estruturas homólogas (Subramanian *et al.* 1990, Castro *et al.* 2001). Entretanto, informações sobre a estrutura, composição química e mecanismo de secreção destas glândulas são escassas.

Diplopterys pubipetala, conhecida vulgarmente por “cipó-preto”, “cipó-de-rego” ou “crista-de-galo”, é uma espécie de ampla distribuição pelo Brasil, podendo ocorrer sob a forma de liana ou de arbusto com ramos escandentes (Gates 1982). Apresenta grande diversidade morfológica, mostrando variação na forma e pubescência das inflorescências, no tamanho das brácteas e das bractéolas, tamanho das flores, forma e tamanho das folhas, tamanho dos frutos e forma das alas (Gates 1982). Esta espécie apresenta diminutas glândulas localizadas na margem do limbo foliar (Gates 1982), as quais são frequentemente visitadas por formigas (observação pessoal).

Neste trabalho foram estudadas a anatomia, histoquímica e ultra-estrutura dessas glândulas, além de observação de aspectos fenológicos e do comportamento dos visitantes nas folhas de indivíduos de *D. pubipetala*. Os resultados aqui apresentados poderão subsidiar estudos de interações inseto-plantas e de evolução das estruturas glandulares em Malpighiaceae.

Material e Métodos

Material vegetal

As observações e as coletas foram realizadas em indivíduos de *Diplopterys pubipetala* pertencentes a uma população localizada na borda de um fragmento de Cerradão no município de Botucatu-SP (22°42'38" S e 48°18'35" W). Exsiccatas foram depositadas no Herbário "Irina Delanova Gemtchujnicov" (BOTU) sob os números 25306, 25307, 25308, 25309 e 25310.

Fenologia, atividade secretora dos nectários e visitantes foliares.

As observações fenológicas foram realizadas mensalmente de agosto de 2006 a dezembro de 2007 com o intuito de avaliar a dinâmica de renovação foliar. Neste período, também foi registrado o comportamento dos visitantes junto aos nectários de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento. Folhas com nectários ativos em secreção foram marcadas e observadas em dias consecutivos. A secreção produzida foi coletada com capilares de vidro e analisada em campo através de refratômetro de bolso Carl Zeiss (0-30% - Jena) para a medição da concentração de sólidos solúveis. Além disso, a secreção dos nectários foliares de *D. pubipetala* foi submetida ao teste para detecção de glicose através de tiras reagentes (Alamar Tecno Científica LTDA), cuja concentração de glicose pode ser estimada através da mudança de coloração da área reativa da tira que deve ser comparada com a escala cromática (azul/verde a marrom) fornecida pelo fabricante.

Morfologia, anatomia, histoquímica e ultra-estrutura dos nectários foliares

Foram feitas medidas de comprimento e diâmetro em folhas coletadas aleatoriamente em pelo menos cinco plantas (n=20), nas quais foram efetuadas contagens do número de nectários com auxílio de microscópio estereoscópio Olympus SZ 61 equipado com câmera digital Olympus C7070.

Amostras do limbo foliar de *D. pubipetala* em diversas fases de desenvolvimento foram coletadas e processadas para as análises em microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

ML - As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas, desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato (Leica®). Secções transversais e longitudinais (6-8µm) foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montadas entre lâminas e lamínulas com resina sintética Entellan®.

Secções de material fixado e incluído foram submetidas aos seguintes testes: Sudan IV para detecção de substâncias lipídicas (Johansen 1940), cloreto férrico III para detecção de substâncias fenólicas (Johansen 1940), azul mercúrio de bromofenol para detecção de proteínas (Mazia *et al.* 1953), vermelho de rutênio para detecção de mucilagem e pectina, (Johansen 1940) e reagente de Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos totais (Jensen 1962). Para a detecção de açúcares redutores, amostras de nectários foliares recém-coletadas foram submetidas ao teste com reagente de Fehling (Sass 1951).

Folhas de *D. pubipetala* também foram diafanizadas segundo técnica descrita por Fuchs (1963) para observação da localização e vascularização dos nectários.

O material obtido foi analisado em microscópio Olympus BX 41 equipado com câmera digital Olympus C7070.

MEV - As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série etílica, submetidas ao ponto crítico e metalizadas com ouro em aparelho MED 010 da Balzers Union. A análise das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Fei – Quanta 200 (Phillips)

MET – Para a caracterização ultra-estrutural, amostras de nectários ativos em secreção foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,3), incubadas em acetato de uranila 0,5% em solução aquosa; desidratadas em série crescente de soluções de acetona e incluídas em Araldite. As secções ultrafinas (50nm) foram contrastadas com solução saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 100, a 80kV. Para confirmar a presença de inclusões lipídicas as amostras foram submetidas à técnica do ósmio-imidazol segundo Angermüller e Fahini (1982). Para impregnação de sistemas de endomembranas, as amostras foram submetidas à técnica do tetróxido de ósmio/iodeto de zinco (ZIO) segundo Reinecke & Walther (1978).

Resultados

Características gerais das folhas, distribuição e morfologia dos nectários no limbo foliar

As folhas de *Diplopterys pubipetala* apresentam filotaxia oposta cruzada, são simples, pecioladas e apresentam limbo elíptico com ápice cuspidado, base obtusa e margens inteiras (Fig. 1). As folhas jovens, de consistência membranácea, apresentam coloração avermelhada

exceto na região apical que pode ser esverdeada (Fig. 1-4); são pilosas e apresentam tricomas malpighiáceos em forma de “T” em ambas as faces, os quais sofrem ablação à medida que as folhas se desenvolvem (Fig. 2-4). As folhas adultas variam de 6.1-10.2 cm de comprimento e de 2.0-5.8 cm de largura, são verde-escuras, glabras e apresentam consistência cartácea (Fig. 5).

Nectários diminutos distribuem-se por toda a margem da face abaxial do limbo foliar, e localizam-se nas terminações das nervuras secundárias ou de ramificações destas (Fig. 6-13). Ocorrem em número variável, de 25 a 49 nectários por folha, sendo mais desenvolvidos aqueles localizados no ápice e na base do limbo. No ápice cuspidado podem ser encontrados 2-5 nectários de cada lado do limbo, dispostos aleatoriamente (Fig. 6-8). Na base do limbo, próximo ao pecíolo, ocorre geralmente um par de nectários conspícuos (Fig. 9-11). No restante do limbo os nectários são menos desenvolvidos (Fig. 12, 13).

Fenologia, atividade secretora das nectários e visitantes foliares

Na população de *D. pubipetala* estudada, a renovação foliar ocorre ao longo do ano, entretanto há um predomínio de rebrota e de folhas jovens durante os períodos de florescimento e de frutificação, entre julho e outubro (Fig. 14). A partir da segunda quinzena de maio observou-se intensa rebrota foliar e início da produção das inflorescências. Entre os meses de agosto e setembro, período em que se observou o pico da floração e início da frutificação predominaram as folhas jovens. A partir de outubro, quando ocorre a dispersão de frutos maduros, predominam folhas adultas e senescentes.

Os nectários apresentaram-se ativos unicamente em folhas jovens, desde aquelas localizadas próximo ao ápice caulinar, ainda apostas (Fig. 15, 16), até aquelas totalmente expandidas, porém com consistência membranácea (Fig. 15, 17-19).

Maior atividade secretora dos nectários ocorre no período da manhã, entre 6-9 horas, evidenciada pela presença de grandes gotas translúcidas na superfície dos nectários localizados no ápice e da base do limbo foliar (Fig. 15-19). Nos demais, a presença de secreção é notada através de um brilho discreto em sua superfície, não havendo acúmulo na forma de gota. Em folhas completamente expandidas e de consistência cartácea, os nectários apresentam-se senescentes e inativos em secreção.

Em um mesmo ramo, as folhas jovens totalmente expandidas ou não, apresentam nectários ativos em secreção, aparentemente com produção de igual volume de exudato (Fig. 15). As observações em quatro dias subseqüentes evidenciaram uma diminuição na atividade secretora e progressivo enegrecimento dos nectários.

A secreção produzida por estes nectários apresenta sabor adocicado. A concentração de sólidos solúveis foi medida por volta das 07h30min, ultrapassando o limite de detecção do refratômetro (30%). A secreção foi diluída em água (2:1) e a solução obtida apresentou 23% de sólidos solúveis, possibilitando estimar a concentração da secreção em aproximadamente 35%. O resultado do teste para detecção de glicose foi positivo e, segundo a escala cromática das tiras reagentes, a secreção apresenta concentração máxima de glicose, em torno de 1000 mg/dl (10mg/ml).

Diferentes tipos de formigas, aparentemente pertencentes a três espécies, foram observadas visitando os nectários foliares de *D. pubipetala* (Fig. 20-28) e patrulhando ramos vegetativos e reprodutivos. As formigas maiores apresentaram comportamento agressivo frente à aproximação de outras formigas ou de qualquer objeto utilizado como estímulo para verificar sua reação. Estas formigas coletam a secreção produzida com auxílio das antenas as quais são posteriormente levadas junto ao aparelho bucal (Fig. 22, 23, 25-27), sem danificar os tecidos foliares.

Foi observada maior atividade das formigas junto aos ápices dos ramos (Fig. 26, 27) e folhas jovens subjacentes, principalmente nas regiões apical e basal do limbo foliar, onde os nectários são mais ativos (Fig. 23-25).

Formigas também foram observadas junto às populações de afídeos (ordem Homoptera) presentes no ápice de ramos caulinares em alguns indivíduos de *D. pubipetala*, contudo as observações sobre seu comportamento não foram conclusivas.

Anatomia, histoquímica e ultra-estrutura dos nectários foliares

Os nectários presentes nas margens do limbo foliar variam de ovóides a circulares no ápice e na base (Fig. 6, 7, 9, 10, 29, 30), sendo reconhecidos como pequenas manchas no restante do limbo (Fig. 12, 13).

Observados ao MEV, os nectários apresentam-se levemente salientes com relação à superfície foliar (Fig. 29, 30), sendo os basais mais proeminentes com uma leve depressão na região central (Fig. 30). Apresentam superfície glabra lisa, com sinais de ruptura da cutícula (Fig. 31) onde podem ser observadas hifas (Fig. 31, detalhe). Tricomas tectores malpighiáceos são restritos a região basal dos nectários (Fig. 29, 30).

Em secção transversal do limbo foliar, observa-se que os nectários são sésseis, parcialmente embutidos no mesofilo (Fig. 32) e constituídos por epiderme secretora e tecido parenquimático especializado (Fig. 32, 33, 34).

A epiderme é constituída por uma camada de células secretoras colunares, dispostas em paliçada. A altura destas células é maior na região central do nectário e diminui progressivamente em direção à periferia, onde as células são mais curtas. O citoplasma é denso e abundante, o núcleo é arredondado de posição central e os vacúolos distribuem-se nos pólos basal e apical da célula. As paredes anticlinais e periclinal interna são delgadas, enquanto a parede periclinal externa é espessa (Fig. 34,36). A cutícula é espessa e apresenta dois estratos distintos evidenciados pela diferença na intensidade de coloração produzida pelo Sudan IV e pela reação ao vermelho de Rutênio: reação fortemente positiva ao Sudan ocorreu no estrato mais externo e delgado evidenciando o a cutícula propriamente dita (*sensu stricto*), sendo que o estrato interno, espesso, reagiu fortemente ao vermelho de Rutênio, indicando a presença de substâncias pécticas.

Os resultados dos testes histoquímicos encontram-se na tabela 1. Nas células secretoras foram detectados polissacarídeos, açúcares redutores, proteínas e compostos fenólicos. A secreção é rica em açúcares redutores e se acumula no espaço subcuticular formado pelo afastamento da cutícula (Fig. 35, 36). A presença de glicose na secreção liberada na superfície das nectários foi confirmada através do uso das tiras reagentes conforme anteriormente relatado.

O tecido parenquimático apresenta nítida diferenciação em duas regiões: a) região subepidérmica não vascularizada, formada por 1-3 camadas de células isodiamétricas justapostas, de paredes celulares delgadas e vacúolo preenchido por substância fenólica (Fig. 33, 34) e b) região vascularizada, formada por células de tamanhos e formatos variáveis (Fig. 33), sendo que algumas possuem vacúolos preenchidos com substância fenólica, enquanto outras apresentam cristais na forma de drusa (Fig. 33). Na base do nectário encontra-se o sistema vascular do limbo foliar formado por xilema e floema, contudo somente o floema vasculariza o nectário.

Ultra-estruturalmente, as células epidérmicas de nectários ativos em secreção exibem núcleo volumoso, esférico, com disposição central ou basal sendo o nucléolo evidente e a cromatina pouco condensada; o citoplasma é abundante e os vacúolos estão distribuídos nos pólos basal e apical da célula (Fig. 36, 54). No citoplasma notam-se ribossomos livres, dictiossomos, mitocôndrias, corpos multivesiculares, retículo endoplasmático liso e rugoso, plastídeos polimórficos e gotas elétron-opacas dispersas (Fig. 37-44). Estas reagiram positivamente ao teste com ósmio-imidazol confirmando, portanto, sua natureza lipídica. As mitocôndrias são numerosas, alongadas ou globulares e ocorrem agrupadas na porção periférica do citoplasma; possuem cristas desenvolvidas (Fig. 37-40) e matriz com

granulações fortemente elétron-densas (Fig. 38). Os plastídeos são proeminentes, globulares ou elipsóides com sistema de membranas internas pouco desenvolvido e matriz finamente granulada e densa. Alguns plastídeos possuem gotas de óleo (Fig. 40), enquanto outros contêm corpos osmiofílicos de tamanhos variáveis e grãos de amido (Fig. 41-44). Imagens sugestivas de plastídeos em processo de divisão foram freqüentes nestas células (Fig. 42,44). Os vacúolos contêm material homogêneo fortemente elétron-denso, identificado histoquimicamente como sendo substância fenólica, além de gotas de óleo (Fig. 36).

As paredes anticlinais e periclinal interna das células epidérmicas são delgadas, com plasmodesmos evidentes. A membrana plasmática apresenta contorno sinuoso e, em algumas regiões afasta-se da superfície da parede celular originando o espaço periplasmático com diferentes graus de desenvolvimento (Fig. 37, 39). Neste espaço são visíveis materiais membranosos e pequenas vesículas. A parede periclinal externa é espessa e mostra dois estratos distintos: um interno, mais delgado e de aspecto homogêneo que delimita o protoplasto e outro externo, subjacente à cutícula, mais espesso, fibroso e de aspecto laxo cujas fibras se dispõem paralelamente à superfície da célula (Fig. 45, 46). A cutícula é espessa e formada por uma camada externa delgada, de aspecto homogêneo e elétron-opaca, constituindo a cutícula propriamente dita (cutícula *sensu stricto*) e o estrato cuticular, mais espesso e de aspecto reticulado. Este estrato apresenta elétron-densidade variável, sendo mais denso na região de contato com a parede periclinal externa (Fig. 45, 46). Esta região reagiu fortemente com o vermelho de Rutênio, indicando sua natureza péctica.

Durante o processo de formação do espaço subcuticular, o estrato mais interno da parede periclinal externa se mantém intacto, enquanto o estrato mais externo, principalmente na região de contato com a parede anticlinal passa a apresentar sinais de degradação, dando origem a lacunas (Fig. 45). Chama atenção a presença de inúmeras mitocôndrias no citoplasma periférico subjacente à parede periclinal externa das células epidérmicas (Fig. 46). O processo de degradação parietal se estende por toda a camada péctica do estrato cuticular culminando com o descolamento da cutícula e, originando, desta maneira, um espaço subcuticular (Fig. 47) onde se acumula a secreção. Neste local são observadas inúmeras hifas (Fig.48).

As células do parênquima situadas em posição subepidérmica (Fig. 49) apresentam núcleo volumoso, esférico ou ligeiramente lobado geralmente localizado no pólo basal da célula; o citoplasma é abundante e possui mitocôndrias, dictiossomas esparsos, retículo endoplasmático pouco desenvolvido e gotas lipídicas esparsas. A população destas organelas é menor do que a observada nas células epidérmicas. Os plastídeos são globulares, possuem

sistema de membranas internas relativamente mais desenvolvido e matriz densa com gotas de óleo de tamanhos variáveis (Fig. 49-51). Os vacúolos são pouco desenvolvidos e preenchidos com substância fenólica. Nas paredes anticlinais e periclinais ocorrem numerosos plasmodesmos conectando o protoplasto destas células entre si, destas com as células epidérmicas e com as do parênquima vascularizado (Fig. 49-51).

As células do parênquima vascularizado exibem citoplasma reduzido, vacuoma desenvolvido e plastídeos globulares conspícuos com o sistema de membranas internas organizado em tilacóides e grana (Fig. 52). Contudo, esses plastídeos são distintos dos cloroplastos típicos presentes nas células parenquimáticas do mesofilo que circunda o nectário (Fig. 53).

A reação com o ZIO possibilitou a nítida identificação da população de organelas presentes nas células da epiderme e do parênquima do nectário (Fig. 54). Esta técnica marcou dictiossomos e vesículas adjacentes, mitocôndrias, retículo endoplasmático e membranas internas de alguns plastídeos. Mitocôndrias, dictiossomos e retículo endoplasmático são as organelas mais abundantes nas células da epiderme secretora (Fig. 55, 56, 58). Nas células parenquimáticas subepidérmicas predominam dictiossomos associados ao retículo endoplasmático (Fig. 57, 59). Os dictiossomos são constituídos por cinco a sete cisternas compactas com inúmeras vesículas adjacentes cujo conteúdo é bem marcado pelo ZIO, podendo estar localizados no citoplasma periférico ou nas adjacências da membrana vacuolar. Foi possível também visualizar nitidamente as faces cis e trans (Fig. 58) e as redes pré e pós Golgiana (Fig. 57, 59). Segmentos de retículo endoplasmático foram facilmente reconhecidos e ocorrem entremeados aos dictiossomos e mitocôndrias e nas proximidades da membrana plasmática (Fig. 55-57, 59). É importante ressaltar que em uma mesma secção, foram observadas células epidérmicas com abundância de dictiossomos ao lado de células com predomínio de retículo endoplasmático e outras pobres em tais organelas (Fig. 54-56).

Discussão

Distribuição, atividade secretora e papel dos nectários foliares em D. pubipetala

Os resultados obtidos no presente trabalho, principalmente com relação à distribuição, composição predominante da secreção e função das glândulas foliares, permitem classificá-las como nectários extraflorais. Segundo diversos autores (Elias & Gelband 1976, Bentley 1977, Elias 1983, Beattie & Hughes 2002, Del-Claro 2004, Heil *et al.* 2004, Nepi 2007) nectários extraflorais (NEFs) são estruturas especializadas na secreção de néctar e constituem uma

fonte alimentar importante para muitos insetos, especialmente formigas agressivas as quais atuam no sistema de proteção da planta contra herbivoria.

Os nectários aqui estudados são pequenos, numerosos e ocorrem distribuídos ao longo de toda a margem do limbo foliar. Glândulas deste tipo foram descritas em outras espécies de Malpighiaceae como *Hiptage sericea* (Subramanian *et al.* 1990), *Galphimia brasiliensis* (Castro *et al.* 2001), *Banisteriopsis stellaris*, *Banisteriopsis variabilis*, *Peixotoa reticulata* (Attala 2004, dados não publicados), *Heteropterys chrysophylla* e *Peixotoa hispidula* (Vieira 2005, dados não publicados). Nestas espécies os nectários podem ocorrer no pecíolo, próximo às nervuras laterais, na base ou na margem do limbo, sendo na maioria das vezes conspícuos e pouco numerosos, diferente do observado no presente estudo.

A presença de numerosos e diminutos nectários extraflorais foi observada por Elias & Gelband (1976) no pecíolo, cálice, corola e frutos de *Campsis radicans* e *C. grandiflora* (Bignoniaceae). Esta característica foi interpretada por estes autores como uma estratégia avançada na atração de formigas, uma vez que durante a atividade de forrageamento as formigas tendem a visitar todos os nectários onde o néctar encontra-se disponível e a presença de inúmeras destas estruturas pode aumentar a área da planta protegida por estes insetos.

Assim como já descrito por diversos autores em outras espécies vegetais (Koptur 1984, Blüthgen & Reifenrath 2003, Korndörfer & Del-Claro 2006, Paiva & Machado 2006), os nectários de *D. pubipetala* apresentam-se ativos somente em folhas jovens, desde aquelas não expandidas e localizadas próximo aos ápices dos ramos até aquelas totalmente expandidas, porém ainda membranáceas.

Com base em observações fenológicas foi possível constatar que o período de intensa rebrota em *D. pubipetala* ocorre concomitantemente ao período de produção dos botões florais, sendo observadas folhas jovens em maior quantidade durante o pico da floração. Estas observações mostraram que maior quantidade de nectários ativos em secreção é encontrada durante o período reprodutivo da população estudada e, provavelmente, estão associados à proteção das estruturas reprodutivas principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento. Resultado semelhante foi verificado em *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), cujo período de atividade secretora dos nectários extraflorais coincide com todo o período reprodutivo, desde a formação de botões florais até a formação de frutos maduros, tendo sido comprovado experimentalmente que as formigas atraídas pelos nectários protegem as estruturas reprodutivas contra insetos herbívoros, aumentando o sucesso reprodutivo desta espécie (Vesprini *et al.* 2003). Em duas espécies de *Inga*, Koptur (1984) constatou a produção de folhas novas com nectários ativos ao longo de todo o ano, sendo esta característica

interpretada como importante para a manutenção do sistema de proteção pelas formigas por todo o período.

A concentração do néctar pode variar de acordo com o volume da secreção o qual pode ser afetado pela umidade atmosférica, temperatura, características do solo e fatores nutricionais (Bentley 1977, Fahn 1979). Maior atividade secretora nos NEFs de *D. pubipetala* no período da manhã pode estar relacionada com menores taxas de evaporação devido à maior umidade do ar e temperatura mais amena, permitindo que o volume e a concentração da secreção sobre os nectários sejam pouco alteradas (Bentley 1977). Sob condições de alta umidade do ar, os açúcares presentes na secreção, os quais apresentam grande potencial higroscópico, podem absorver a umidade do ar, diluindo a secreção. Por outro lado, em horários mais quentes do dia, quando a evaporação é maior, a secreção tende a apresentar maiores concentrações. No período da manhã, a secreção produzida pelos NEFs de *D. pubipetala* apresentou concentração de aproximadamente 35%. Segundo Frey-Wyssling & Agthe (1950 *apud* Durkee 1983) a concentração do néctar pode variar de 8 a 50%, mas em alguns casos pode chegar a 75%, dependendo de vários fatores, tais como as características do sistema vascular e as taxas fotossintéticas (Lüttge 1971, Bentley 1977, Fahn 1979).

Embora não tenham sido feitos registros das condições climáticas locais, é possível prever um aumento na concentração do néctar extrafloral em *D. pubipetala* ao longo do dia devido às variações de temperatura e umidade, como verificado em nectários florais de *Echinacea purpurea* cuja concentração do néctar variou de 33,4 a 53% ao longo do dia (Wist & Davis 2006).

No presente trabalho as formigas foram os principais visitantes dos nectários extraflorais de *D. pubipetala*, as quais foram observadas alimentando-se do néctar produzido ao mesmo tempo em que apresentaram comportamento de patrulha. Os resultados fenológicos associados com a observação dos visitantes na população de *D. pubipetala* indicam a complexidade deste sistema. Embora não existam dados experimentais para esta espécie, algumas evidências como a presença de nectários ativos coincidindo com as fenofases reprodutivas os quais são frequentemente visitados por formigas com comportamento agressivo possibilita sugerir a existência de uma relação mutualística entre as formigas visitantes e *D. pubipetala* mediada pelos nectários. Provavelmente, a intensa visitação de formigas nessas plantas explique a ausência de danos provocados por herbivoria nos órgãos em desenvolvimento, conforme já descrito para diferentes plantas (Bentley 1976, Bentley 1977, Koptur 1984, Del Claro *et al.* 1996, Oliveira 1997, Guimarães *et al.* 2006).

Morfologia, anatomia, histoquímica e ultra-estrutura dos nectários foliares

Conforme já descrito para a superfície abaxial de folhas de algumas espécies de Malpighiaceae (Elias 1983), os nectários foliares de *D. pubipetala* podem ser classificados como pertencentes ao tipo achatado (“flattened nectaries”) segundo classificação proposta por Zimmerman (apud Elias 1983). Esses nectários ficam em contato com o tecido fundamental do órgão onde estão inseridos, de modo que a superfície secretora é exposta pouco acima ou logo abaixo do nível da superfície do tecido circundante (Elias 1983).

Anatomicamente os nectários foliares de *D. pubipetala* possuem uma estrutura bem definida com epiderme secretora em paliçada e parênquima vascularizado predominantemente por floema, com somente alguns elementos de xilema localizados na base do nectário. Nectários com vascularização própria, segundo Elias *et al.* (1975) são altamente especializados e caracteristicamente, permanecem ativos somente por um curto período de tempo, geralmente algumas semanas, quando as folhas ainda estão se expandindo. Assim, a vascularização unicamente por floema é bastante significativa ao fornecer os precursores para a produção do néctar. A presença de substâncias fenólicas e de depósitos de cristais de oxalato de cálcio nas células do parênquima vascularizado por floema é também uma característica amplamente relatada em nectários florais e extraflorais (Durkee 1983, Elias 1983, Paiva & Machado 2006, 2008).

Estrutura anatômica semelhante à dos nectários em *D. pubipetala* foi relatada para outras espécies de Malpighiaceae (Subramanian *et al.* 1990; Castro *et al.* 2001; Attala 2004, dados não publicados, Vieira 2005, dados não publicados). Nestes estudos tem sido ressaltada a presença de cutícula com graus variáveis de espessura e de células parênquimáticas diferenciadas em posição subepidérmica. Esta região foi denominada por alguns autores de “zona taninífera” devido à abundância de substâncias fenólicas no vacúolo das células; o papel dessa região do nectário é discutível, sendo associada à proteção contra herbívoros e patógenos (Subramanian *et al.* 1990; Attala 2004, dados não publicados).

Os resultados aqui obtidos sugerem que a liberação do néctar ocorre através da ruptura da cutícula, já que não foram observados estômatos modificados na superfície dos nectários de *D. pubipetala*. Este tipo de liberação do néctar extrafloral foi relatado também por McDade & Turner (1997), Paiva *et al.* (2001) e Paiva & Machado (2006).

Os nectários extraflorais, em geral, constituem uma fonte alimentar importante para muitos himenópteros, dípteros e lepidópteros, sendo que a extensão na qual estes insetos dependem do néctar em sua dieta está diretamente relacionada ao valor nutricional do mesmo (Baker & Baker 1990). Embora a análise química do néctar extrafloral de *D. pubipetala* não

tenha sido realizada, os testes histoquímicos detectaram substâncias diversas e nutricionalmente importantes aos insetos visitantes como açúcares, polissacarídeos e proteínas. Os testes histoquímicos em associação com o teste para detecção de glicose na secreção, indicam que o néctar produzido pelos nectários foliares de *D. pubipetala* é composto predominantemente por açúcares não redutores (glicose e frutose), sendo este resultado diretamente associado com as peculiaridades estruturais do nectário estudado.

As células epidérmicas do nectário de *D. pubipetala* contêm plastídeos com grão de amido, o qual pode ser utilizado tanto como fonte de energia para os processos metabólicos e como fonte de açúcares para a síntese do néctar (Nepi *et al.* 1996). Estudos têm demonstrado que durante os estágios sucessivos da atividade secretora os plastídeos tornam-se alongados ou de contorno sinuoso sendo tais modificações associadas com a depleção no conteúdo de amido (Durkkee *et al.* 1981, Sawidis *et al.* 1989, Nepi *et al.* 1996, Machado *et al.* 2006, Paiva & Machado 2008).

Estudos sobre o movimento do pré-néctar dentro do tecido secretor têm sugerido que ambas as vias-apoplasto ou simplasto podem ocorrer simultaneamente, sendo que a predominância de um ou outro tipo está diretamente relacionada com o estágio de desenvolvimento do órgão ou do tecido investigado (Stpiczynska *et al.* 2003). A presença de numerosos plasmodesmos conectando as células parenquimáticas e epidérmicas do nectário de *D. pubipetala* é uma forte evidência de que o transporte do pré-néctar ocorre via simplasto, conforme apontado por outros autores (Fahn 1979, Wist & Davis 2006).

A abundância de dictiossomos e de retículo endoplasmático nos nectários de *D. pubipetala* em fase secretora é uma característica comum a nectários de diferentes espécies (Fahn, 1979a, Fahn 1979b, Durkee 1983, Mohan & Inamdar 1986, Stpiczynska *et al.* 2003, Paiva & Machado 2006, Wist & Davis 2006, Paiva & Machado 2008). A presença de dictiossomos hiperativos nas células secretoras em paliçada é uma forte evidência da participação desta organela na secreção do néctar, especialmente de seus componentes hidrofílicos. A participação do RE na translocação e/ou concentração temporária de açúcares nos nectários tem sido sugerida por diversos autores (Rachmilevitz & Fahn 1975, Fahn 1988, Sawidis *et al.* 1989, Figueiredo & Pais 1992, Jian *et al.* 1997, Paiva & Machado 2008). Assim, o aspecto dilatado das cisternas do RE pode indicar o potencial osmótico elevado dentro dessas estruturas resultante do acúmulo de açúcares.

Dictiossomos bem estruturados foram evidenciados com maior clareza, tanto nas células epidérmicas como nas células parênquimáticas pelo uso da técnica do ZIO, conforme também relatado por Machado & Gregório (2001) em nectários de *Citharexylum mirianthum*

(Verbenaceae). A presença de RE nas adjacências de dictiossomos com morfologia complexa, apresentando além de numerosas cisternas, as redes pré e pós-Golgiana desenvolvidas, como revelado pelo ZIO, sugere que nas células do nectário de *D. pubipetala* está ocorrendo síntese de proteínas com diferentes destinos e funções. Segundo Alberts et al. (1997), as vesículas densas que se originam do RER contêm proteínas, as quais se integram ao Golgi pela face cis, onde provavelmente passam por transformações, sendo, então, eliminadas pela face trans. Nesta face, as vesículas constituem a rede pós-Golgiana e podem coalescer formando vacúolos-estoque de proteínas/enzimas ou podem migrar em direção à membrana plasmática, onde liberam o conteúdo por exocitose. Embora não tenham sido feitos testes para a detecção de enzimas, a ocorrência de enzimas hidrolíticas nas células epidérmicas do nectário é bastante provável, visto os processos de degradação parcial da parede periclinal externa.

As diferenças na abundância de dictiossomos e RE nas células epidérmicas do nectário, facilmente visíveis pelo uso do ZIO, são um indício de que a participação de determinada organela pode variar em dado momento da secreção, ou que no mesmo tecido há células com populações distintas de organelas e conseqüentemente, com produção de substâncias distintas. Por exemplo, células secretoras onde predominam os dictiossomos estão relacionadas com a produção de secreção hidrofílica; células onde há predomínio de RE relacionam-se com a síntese de secreção lipofílica; em células ou glândulas com secreção mista, RE e dictiossomos são igualmente abundantes (Charrière-Ladreix 1975).

No nectário de *D. pubipetala* existem evidências de secreção granulócrina e secreção écrina. No primeiro caso, a presença de vesículas, corpos multivesiculares (ambos oriundos tanto do retículo endoplasmático como dos dictiossomos) e de espaço periplasmático com acúmulos de estruturas vesiculares sugerem a ocorrência secreção granulócrina, que se caracteriza pelo transporte de material célula-a-célula via fusão de vesículas com a membrana plasmática (Fahn 1979). Os corpos multivesiculares são apontados como importantes na manutenção da integridade da membrana plasmática, a qual é aumentada durante o processo de secreção granulócrina (ver Nepi 2007). Além disso, a considerável população de mitocôndrias e de plastídeos com grão de amido nas células do nectário constituem evidências de um processo que requer energia, característico do mecanismo de secreção écrina (Razem & Davis 1999).

A região parenquimática vascularizada dos nectários em geral é clorofilada, porém os plastídeos são morfologicamente distintos do clorênquima adjacente, conforme observado em *D. pubipetala*. Esta região do nectário, embora apresente intensa atividade metabólica e

também participe ativamente na coleta e/ou produção e transporte dos precursores do néctar tem recebido pouca atenção dos pesquisadores (Sawidis *et al.* 1987).

No nectário de *D. pubipetala* chama atenção a presença de plastídeos conspícuos, destituídos de lamelas internas e com inclusões lipídicas, mitocôndrias com granulações elétron-densas além de numerosas gotas de óleo no interior de vacúolos ou dispersas no citoplasma. A técnica do ósmio imidazol possibilitou confirmar a natureza lipídica das inclusões presentes nos plastídeos e das gotas dispersas no citoplasma as quais não foram detectadas através do teste histoquímico com o Sudan IV. Plastídeos com tais características são similares aos leucoplastos envolvidos na síntese de terpenóides em diferentes glândulas lipofílicas (Gleizes *et al.* 1980, Cheniclet & Carde 1985, Turner *et al.* 1999, Machado *et al.* 2006). Mitocôndrias com cristas desenvolvidas e granulações densas têm sido relacionadas, em células animais, com a síntese de esteróides, uma substância terpenóide (Alberts *et al.* 1997). Estas substâncias, além da importância como componentes da membrana plasmática podem atuar na defesa contra insetos fitófagos e pequenos herbívoros vertebrados. Um esteróide vegetal de grande importância é o chamado fitoecdísoma, que ao possuir a mesma estrutura básica dos hormônios que induzem a muda nos insetos, ao ser ingerido induz precocemente a muda e desorganiza os processos desenvolvimentais, com consequências letais aos insetos fitófagos (Taiz & Zeiger 1998).

Como já mencionado, tais características são pouco comuns em tecidos nectaríferos, mas tipicamente encontradas em glândulas envolvidas na secreção de substâncias terpenóides. Glândulas foliares classificadas como sendo NEFs porém com predominância de lipídeos e traços ou mesmo ausência de açúcares foram relatados em *Ailanthus glandulosa* (Clair Maczulajtys & Bory 1983), *Passiflora foetida* (Durkee *et al.* 1984) e *Citharexylum mirianthum* (Machado 1999). Em *P. foetida* os autores sugerem que os nectários extraflorais representam uma transição para glândulas secretoras de lipídeos.

A presença de substâncias lipídicas no néctar extrafloral e de açúcares na secreção dos elaióforos em plantas de Malpighiaceae tem servido de base para inferências sobre a filogenia da família e esclarecer a coevolução com seus polinizadores (Cocucci *et al.* 1996). Nas espécies de Malpighiaceae representantes do Velho Mundo as glândulas presentes no cálice são nectários, enquanto que nas espécies do Novo Mundo são elaióforos que produzem óleos como recompensa aos polinizadores (Faegri & Van der Pijl 1979). Estudos sobre elaióforos e nectários extraflorais em uma mesma espécie de Malpighiaceae (Subramanian *et al.* 1990, Castro *et al.* 2001, Vinson *et al.* 1997) têm mostrado que essas estruturas são homólogas as quais mostram semelhanças na organização anatômica e no mecanismo de secreção diferindo

apenas quanto à natureza química da secreção, corroborando assim, a hipótese de Vogel (1990) sobre a origem das glândulas lipofílicas a partir de nectários. Segundo este autor, a modificação de nectários em elaióforos pode ter ocorrido em resposta a mutualismos entre flores e abelhas silvestres da tribo Centridini. Tais abelhas usam os óleos juntamente com o pólen para a alimentação larval e óleo puro para o revestimento e impermeabilização das celas. Já, a produção de néctar concentrado em açúcares ocorre nas glândulas localizadas principalmente nas regiões de crescimento vegetativo que são mais vulneráveis a injúrias e predação.

Com base nas análises ultra-estruturais realizadas, os nectários extraflorais de *D. pubipetala* podem ser classificados como glândulas de secreção mista, visto que possuem maquinaria para a síntese de secreção hidrofílica e lipofílica. No entanto, a secreção liberada por essas glândulas é hidrofílica e composta predominantemente por açúcares, caracterizando-as como nectários. O fato de estas glândulas serem funcionais unicamente em folhas jovens e intensamente visitadas por formigas cujo comportamento é agressivo sugere a existência de um sistema de proteção à planta. Estudos morfológicos e químicos envolvendo maior número de espécies de Malpighiaceae são necessários para verificar a extensão em que tais características ocorrem neste grupo de plantas.

Agradecimentos

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida (06/54268-0) e aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica, IBB, UNESP, pelo auxílio no preparo das amostras.

Referências bibliográficas

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. 1997. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Anderson, W.R. 1979. Floral conservation in Neotropical Malpighiaceae. **Biotropica** 11:219-223.
- Anderson, W.R. 1990. The origin of the Malpighiaceae – The evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 64: 210-224.
- Angermüller, S. & Fahini, D.H. 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.** 14: 823-825.

- Attala, N.C. 2004. Morfoanatomia da lâmina foliar, estrutura e histoquímica das glândulas foliares e calicinais em espécies de Malpighiaceae de cerrado. **Tese de Doutorado** – UNESP, Botucatu – SP.
- Baker, H.G. & Baker, I. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator type. **Israel Journal of Plant Science** 159: 157-166.
- Barroso, G. M. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. p.325-329.
- Beattie, A.J. & Hughes, L. 2002. Ant-plant interactions. p. 211- 235. In: Herrera, C.M. & Pellmyr, O. (eds.). **Plant- animal interactions: an evolutionary approach**. Blackwell science. 313p.
- Bentley, B. 1976. Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. **Ecology** 57(4): 815-820.
- Bentley, B. 1977a. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. **Annual Review of Ecology and Systematics** 8: 407-427.
- Bentley, B. 1977b. The protective function of ants visiting the extrafloral nectaries of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). **Journal of ecology** 65: 27-38.
- Blüthgen, N. & Reifenrath, K. 2003. Extrafloral nectaries in an Australian rainforest: structure and distribution. **Australian Journal of Botany** 51: 515-527.
- Buchmann, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Rev. Ecol. Syst.** 18: 343-369.
- Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Anderson, W.R. & Hills, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid rbcL and matK sequences. **American Journal of Botany** 88(10): 1847-1862.
- Castro, M.A; Vega, A.S & Múlgura, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). **American Journal of Botany** 88(11): 1935-1944.
- Charrière-Ladreix, Y. 1975. La secretion lipophile des bourgeons d'*Aesculus hippocastanum* L.: modifications ultrastruturales des trichomes au cours du processus glandulaire. **J. Microscopie Biol. Cell** 24: 75-90.
- Cheniclet, C. & Carde, J.P. 1985. Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil a correlative study. **Israel Journal of Botany** 34: 219-238.
- Clair-Maczulajtys, D. & Bory, G. 1983. Les nectaries extrafloraux pédicellés chez l'*Ailanthus glandulosa*. **Canadian Journal of Botany** 61: 683-691.

- Del-Claro, K. 2004. Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. **Neotropical Entomology** 33(6):665-672.
- Del-Claro, K; Berto, V. & Reu, W. 1996. Effect of Herbivore Deterrence by Ants on the Fruit Set of an Extrafloral Nectary Plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology** 12(6): 887-892.
- Durkee, L.T. 1983. The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. In: Bentley, B. & Elias, T. (eds.). **The biology of nectaries**. New York, Columbia university Press: 1-29.
- Durkee, L.T., Baird, C.W & Cohen, P.F.1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 71(4): 596-602.
- Durkee, L.T., Gaal, D. & Reisner, W.H. 1981. The floral and extrafloral nectaries of *Passiflora*. 1. The floral nectary. **American Journal of Botany** 68: 453-462.
- Elias, T.S. & Gelband, H. 1976. Morphology and anatomy of floral and extrafloral nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). **American Journal of Botany** 63(10): 1349-1353.
- Elias, T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. P: 174-203. In: Bentley, B & Elias, T. (eds.). 1983. **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Elias, T.S., Rozich, W.R., Newcombe, L. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. **American Journal of Botany** 62(6): 570-576.
- Faegri K, Van der Pijl L. 1979. **The principles of pollination ecology**. Pergamon Press Oxford.
- Fahn, A. 1979a. **Secretory tissues in plants**. New York, Academic Press.
- Fahn, A. 1979b. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. **American Journal of Botany** 66(8): 977-985
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytol.** 108: 229-257.
- Figueiredo, A.C.M. & Pais, M.S. 1992. Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum arbortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae). **Annals of Botany** 70: 325-331.
- Fuchs, C.H. 1963. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of whole plants or plant organs. **Stain Technology** 38: 141-144.
- Gates, B. 1982. *Banisteriopsis* and *Diplopterys* (Malpighiaceae). **Flora Neotropica Monograph** 30: 1-237.
- Gleizes, M., Carde, J.P., Pauly, G. Bernard-Dagan, C. 1980. *In vivo* formation of sesquiterpene hydrocarbons in the endoplasmic reticulum of pine. **Plant Sci Lett.** 20: 79-90

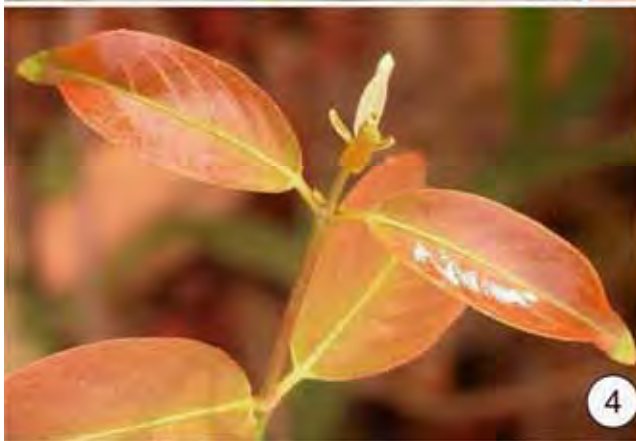
- Guimarães, P.R.; Raimundo, R.L.G.; Bottcher, C.; Silva, R.R. & Trigo, J.R. 2006. Extrafloral nectaries as a deterrent mechanism against seed predators in the chemically protected weed *Crotalaria pallida* (Leguminosae). **Austral Ecology** 31: 776-782.
- Heil, M.; Hilpert, A.; Krüger, R. & Linsenmair, E. 2004. Competition among visitors to extrafloral nectaries as a source of ecological costs of an indirect defence. **Journal of Tropical Ecology** 20: 201-208.
- Jensen, W. A. 1962. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 408p.
- Jian, Z. Zheng-Hai, H. Müller, M. 1997. Ultrastructure of the floral nectary of *Arabidopsis thaliana* L. prepared from high pressure freezing and freeze substitution. *Acta Bot. Sin.* 39(4): 289-295.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill: New York.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137 A - 138A.
- Koptur, S. 1984. Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. **Ecology** 65(6): 1787-1793.
- Korndörfer, A.P. & Del-Claro, K. 2006. Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian cerrado. **Biotropica** 38 (6): 786-788.
- Lüttge, U. 1971. Structure and function of plant glands. **Annual Review of Plant Physiology** 22: 23-44.
- Machado, S.R. & Gregório, E.A. 2001. Zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reactive sites in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae). **Tissue & Cell** 33 (1): 72-77.
- Machado, S.R., Gregório, E.A. & Guimarães, E. 2006. ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. **Annals of Botany** 97:357-369.
- 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.
- McDade, L.A. & Turner, M.D. 1997. Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). **American Journal of Botany** 84 (1): 1-15.
- Mendonça, R.C.; Felfili, J.M.; Walter, B.M.T. Silva Júnior, M.C.; Rezende, A.V. Filgueiras, T.S. & Nogueira, P.E. 1998. Flora vascular do cerrado. In: Sano, S.M & Almeida, S.P (eds). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa-CPAC, Planaltina, p 289-556.

- Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. **Annals of Botany** 57: 389-401.
- Nepi, M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In Nicolson, S.W; Nepi, M. & Pacini, E. (eds.). **Nectaries and Nectar**: 129–166.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373.
- Oliveira, P.S. & Leitão-Filho, H. F. 1987. Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in southeast Brazil. **Biotropica** 19(2): 140-148
- Oliveira, P.S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae). **Functional Ecology** 11(3): 323-330.
- Paiva, E.A.S & Machado, S.R. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica** 20(2): 471-482.
- 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.
- Paiva, E.A.S.; Morais, H.C.; Isaias, R.M.S.; Rocha, D.M.S. & Oliveira, P.E. 2001. Occurrence and structure of extrafloral nectaries in *Pterodon pubescens* Benth. and *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. (Fabaceae-Papilionoideae). **Pesquisa agropecuária Brasileira** 36(2): 219-224
- Rachmilevitz, T. & Fahn, A. 1975. The floral nectary of *Tropaeolum majus*. The nature of the secretory cells and the manner of nectar secretion. **Annals of Botany** 39: 721-728.
- Razem, F.A. & Davis, A.R. 1999. Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L. during flower development. **Annals of Botany** 95(5): 749-756.
- Reinecke, M. & Walther, C. 1978. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. **Journal of Cell Biology** 21: 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.
- Sass, J.E. 1951. **Botanical Microtechnique**. 2^aed. Ames, Iowa State College Press.
- Sawidis, T.H., Eleftheriou, E.P., Tsekos, I. 1987. The floral nectaries of *Hibiscus rosa-sinensis*. 1. Development of the secretory hairs. **Annals of Botany** 59: 643-652.

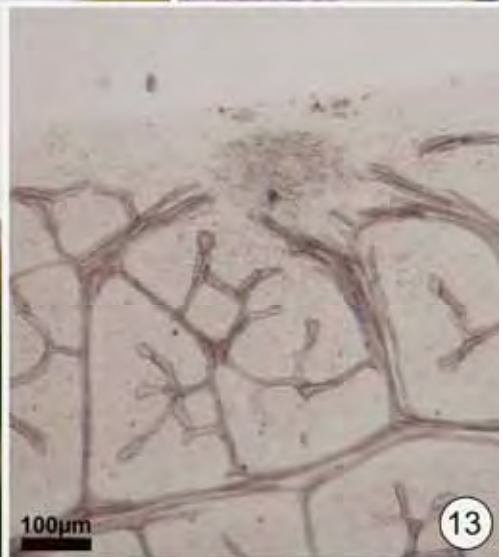
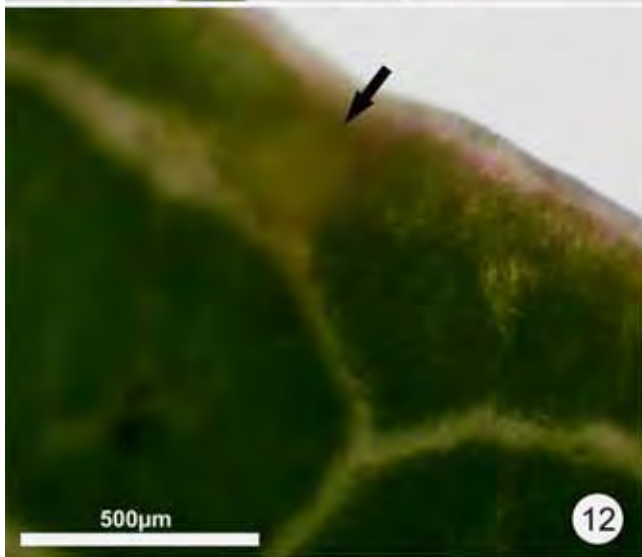
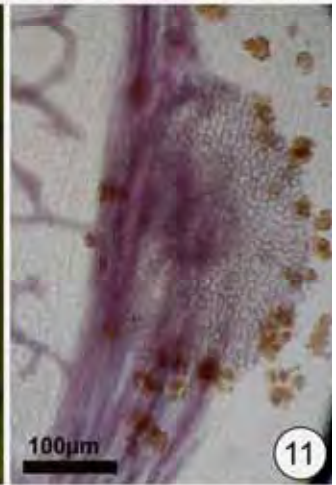
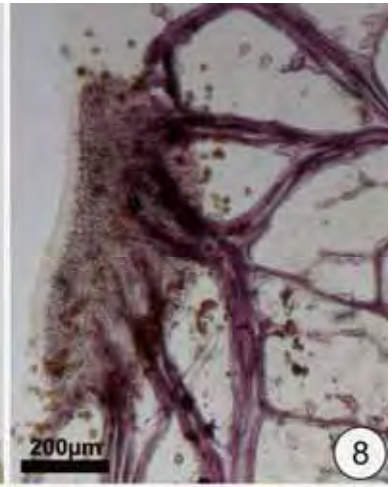
- Sawidis, T.H., Eleftheriou, E.P., Tsekos, I. 1989. The floral nectaries of *Hibiscus rosa-sinensis*. III. A morphometric and ultrastructural approach. **Nordic Journal of Botany** 9: 63-71
- Souza, V. C. & Lorenzi H. 2005. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum.
- Stpiczynska, M.; Davies, K.L. & Gregg, A. 2003. Nectary structure and nectary secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). **Annals of Botany** 93: 87-95.
- Subramanian, R.B., Arumugasamy, K. & Inamdar, J.S. 1990. Studies in secretory glands of *Hiptage sericea* (Malpighiaceae). **Nordic Journal of Botany** 10(1):57-62.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1998. **Plant Physiology**. 2a. Ed. Massachusetts: Sinauer associates.
- Turner, G., Gershenzon, J. Nielson, E.E., Froehlich, J.E. & Croteau, R.B. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized of oil gland secretory cells. **Plant Physiology** 120: 879-886.
- Vesprini, J.L.; Galetto, L. & Bernardello, G. 2003. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. **Canadian Journal of Botany** 81: 24-27.
- Vieira, A.C.M. 2005. Estudos em espécies de Malpighiaceae de restingas do Rio de Janeiro: estruturas secretoras em folhas e flores e biologia floral. Tese de Doutorado – USP.
- Vinson, S.B; Williams, H.J; Frankie, G.W & Shrum, G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipid by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae). **Biotropica**. 29 (1): 76-83.
- Vogel, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische und subtropische Pflanzenwelt** 7: 283-547.
- Vogel, S. 1990. History of malpighiaceae in the light of pollination ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 55: 130-142.
- Wist, T.J. & Davis, A.R. 2006. Floral Nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). **Annals of Botany** 97:177-193.

Figuras e Tabelas

Figuras 1-5 – Folhas de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. em diversas fases de desenvolvimento. 1. Ramo contendo folhas e inflorescências axilares jovens. Notar filotaxia oposta cruzada e formato elíptico das folhas, com base obtusa e ápice cuspidado. **2-3.** Folhas bem jovens recobertas por tricomas. Notar coloração avermelhada do limbo, exceto na região apical que é esverdeado. **4.** Folhas jovens em estágio mais avançado. Notar maior tamanho do limbo e superfície mais brilhante devido à diminuição dos tricomas. **5.** Folhas adultas. Notar coloração verde-escura e superfície glabra.



Figuras 6 -13 – Distribuição dos nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. **6.** Face abaxial do ápice de folha jovem mostrando distribuição das glândulas na margem do limbo. Notar 2-3 glândulas de cada lado (setas). **7.** Detalhe de uma glândula apical. Notar formato ovóide e leve saliência com relação à superfície foliar. **8.** Glândula apical diafanizada. Notar intensa vascularização. **9.** Face abaxial da base de folha jovem. Notar um par de glândulas próximo ao pecíolo (seta). **10.** Detalhe de glândula basal, mostrando formato mais circular e maior saliência com relação à superfície da folha. **11.** Detalhe de glândula basal diafanizada. Notar intensa vascularização. **12.** Glândula menos desenvolvida localizada na margem do limbo foliar (seta). **13.** Detalhe de glândula menos desenvolvida após diafanização.



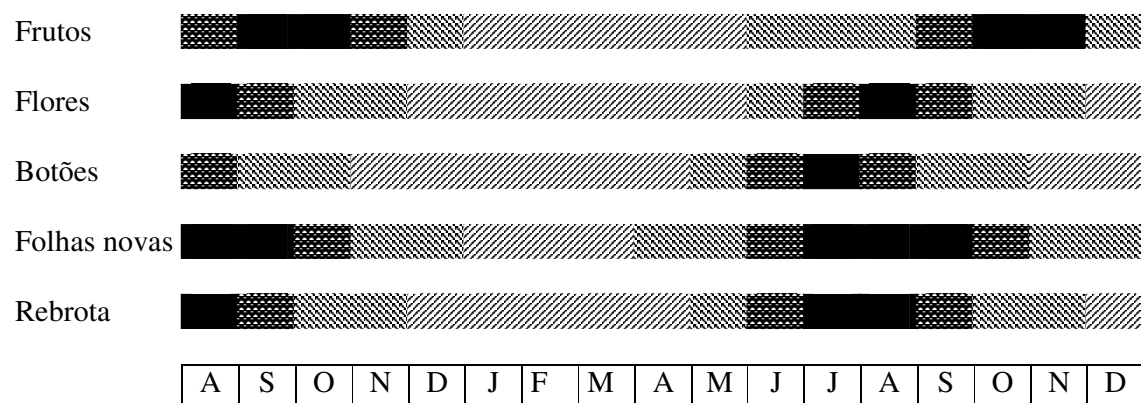
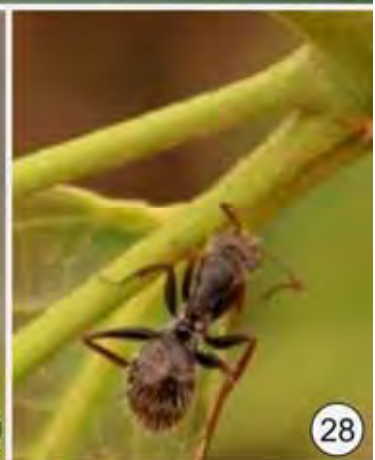
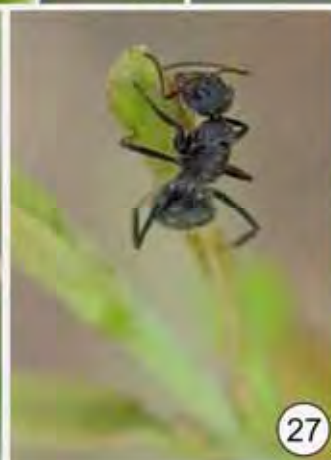


Figura 14 - Fenologia de *Diplopterys pubipetala*, em área de cerradão no município de Botucatu (SP) no período de agosto 2006 a dezembro 2007. Notar gradiente de intensidade das fenofases, sendo que a cor preta indica máxima intensidade.

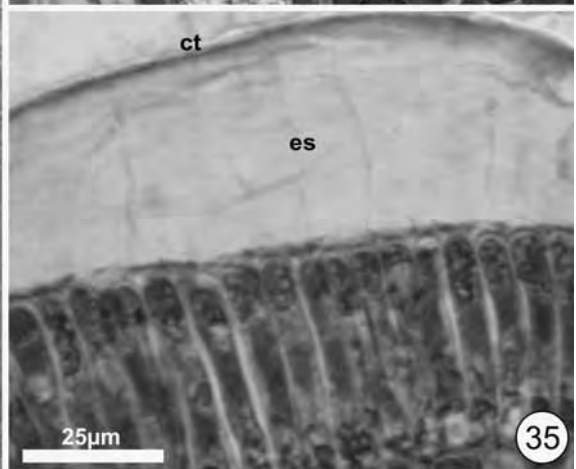
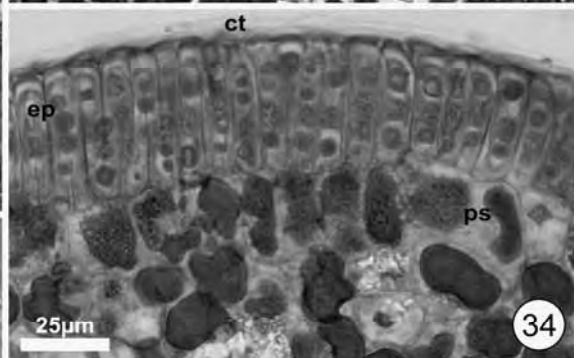
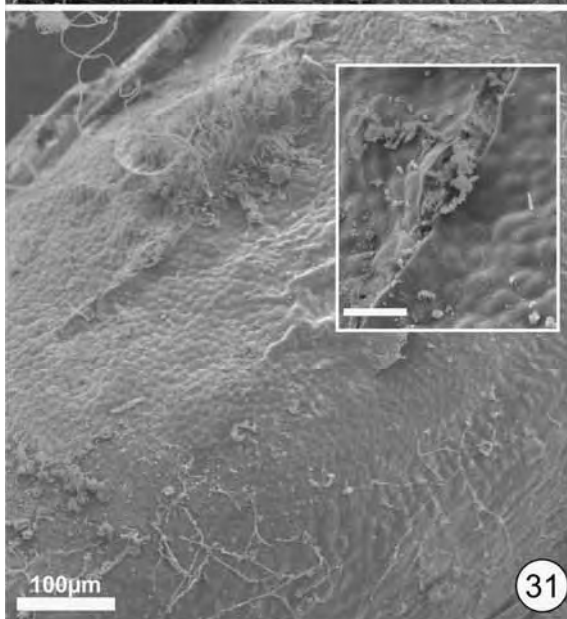
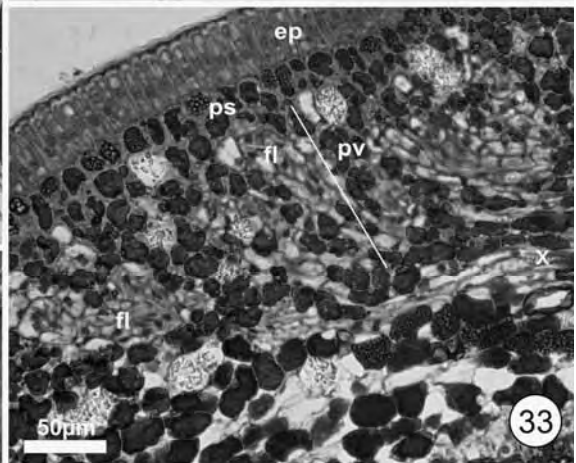
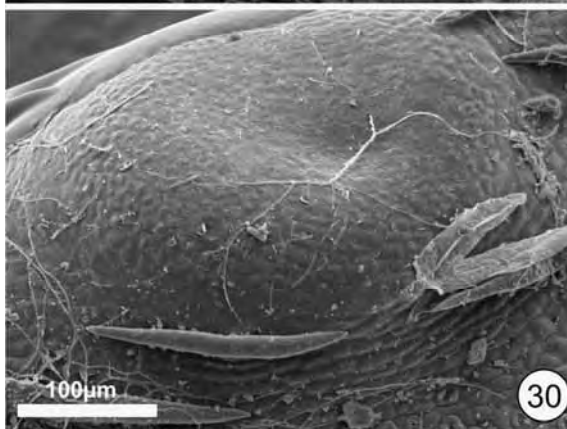
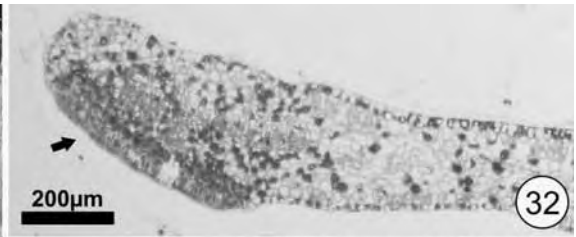
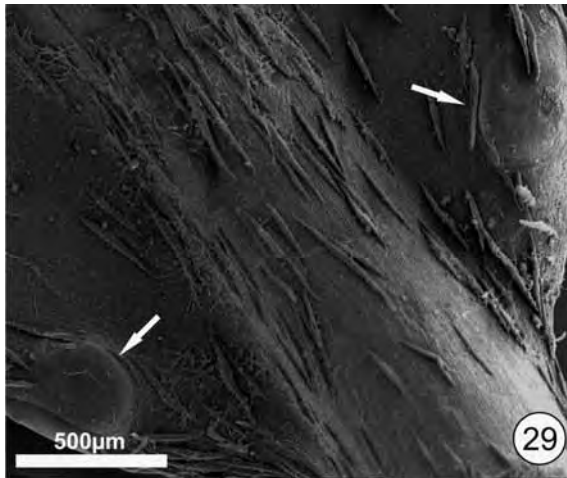
Figuras 15-19 – Atividade secretora dos nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. **15.** Ramo mostrando folhas jovens com diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento, exibindo secreção volumosa sobre os nectários (setas). **16.** Ápice de um ramo, mostrando folhas bem jovens com nectários ativos em secreção (seta). **17.** Folha jovem totalmente expandida exibindo secreção volumosa nos nectários do ápice e da base do limbo foliar. **18.** Detalhe mostrando secreção nos nectários apicais. **19.** Detalhe mostrando secreção nos nectários basais.



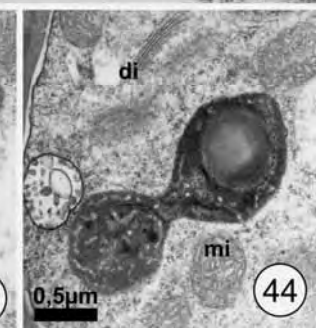
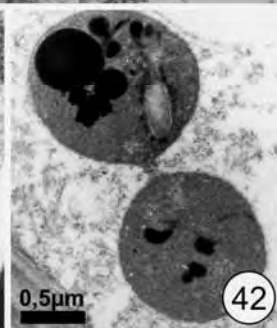
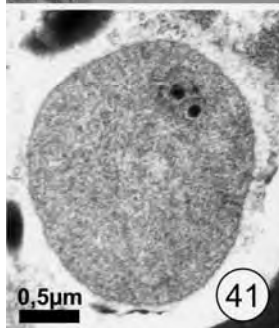
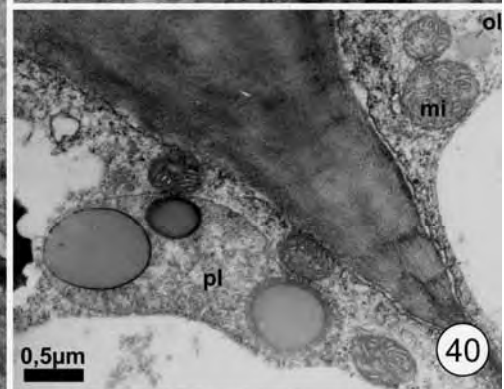
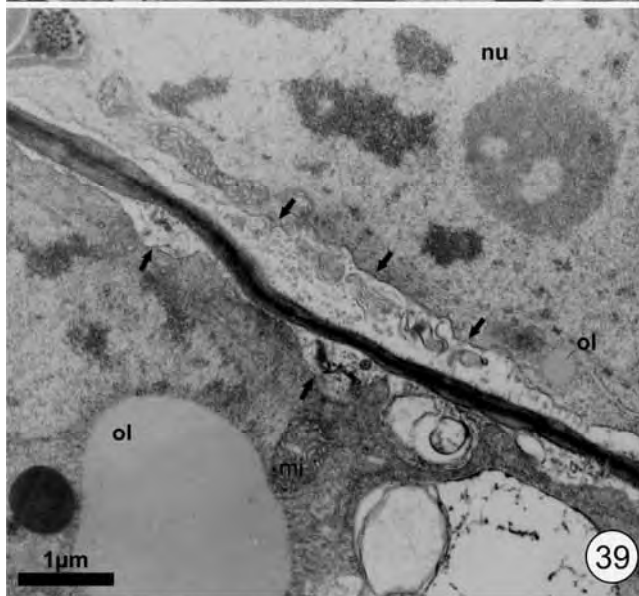
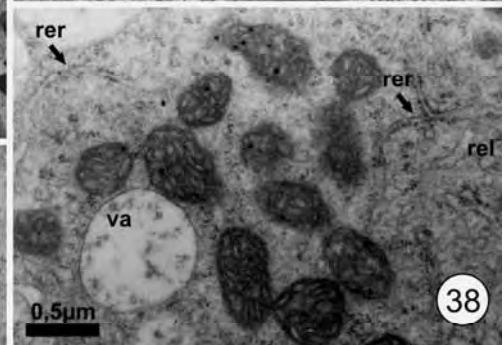
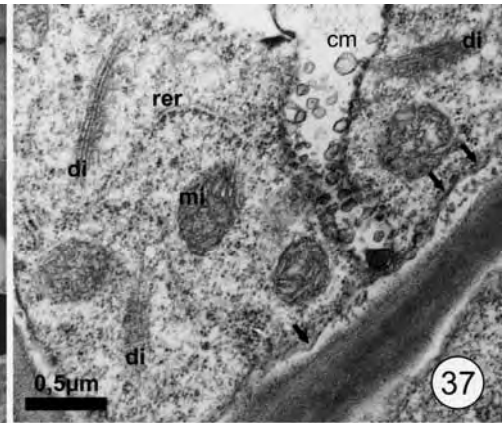
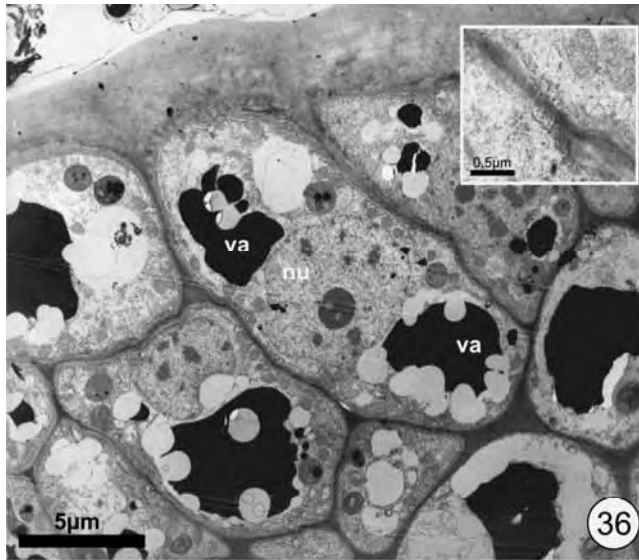
Figuras 20-28 – Visitantes foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. 20. Formiga percorrendo folha jovem. **21-23.** Formigas com comportamento de coleta da secreção. Notar localização das mesmas na face abaxial e antenas tocando as regiões onde se localizam os nectários do ápice (21, 23) e da base da folha (22). **24.** Formiga percorrendo folha em direção ao ápice. **25-27.** Formigas visitando folhas bem jovens nas quais se observa a coleta da secreção dos nectários apicais. **28.** Formiga visitando glândula basal de folha jovem totalmente expandida.



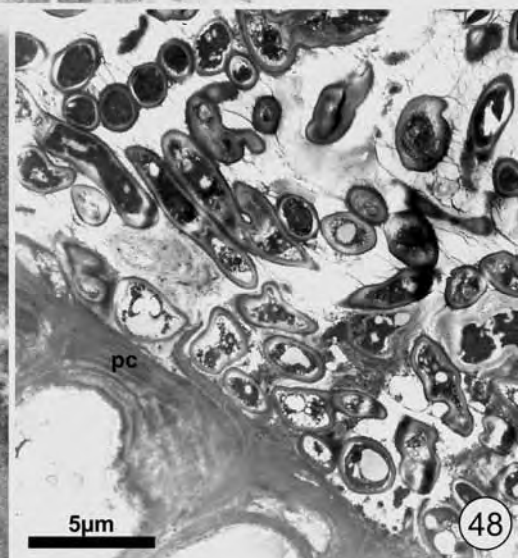
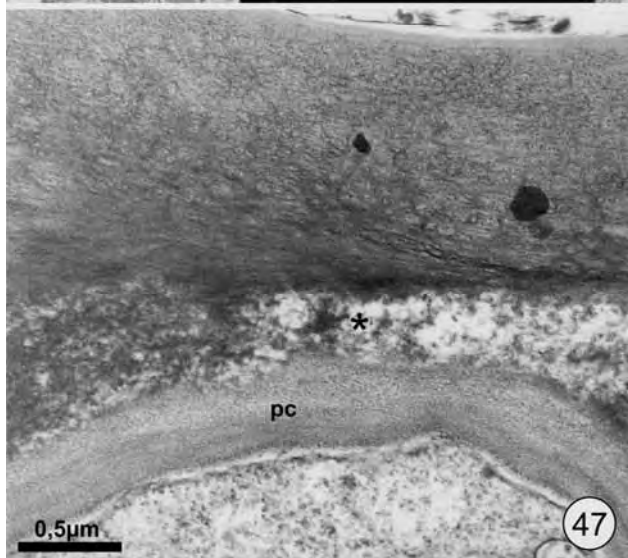
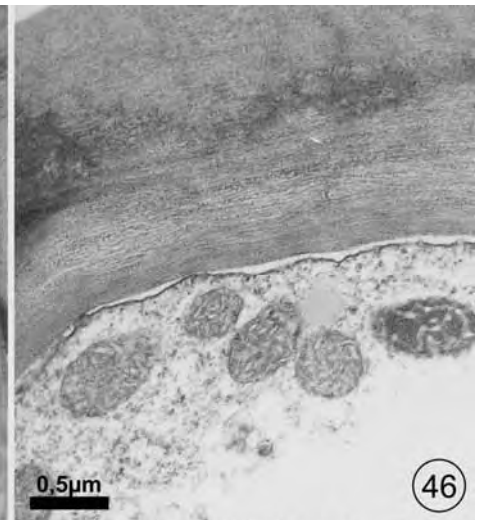
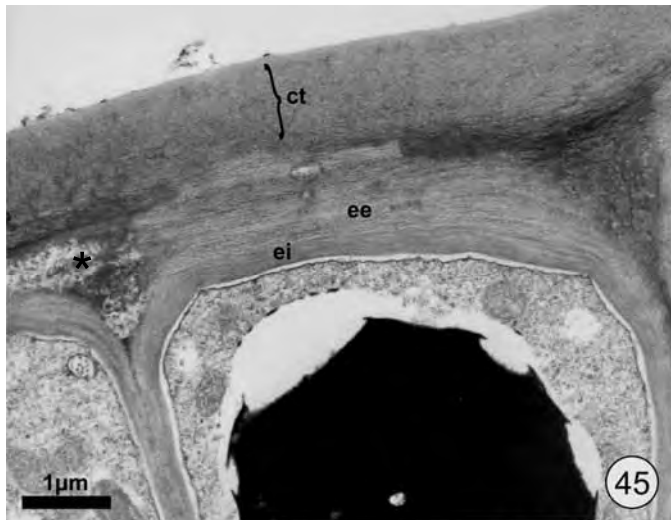
Figuras 29-35 – Nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MEV e ML). **29.** Face abaxial de folha jovem, mostrando um par de nectários na base do limbo (setas) e superfície coberta por tricomas malpighiáceos em forma de “T”. **30.** Detalhe de nectário em folha jovem mostrando superfície lisa e sem poros, além de tricomas malpighiáceos localizados basalmente. **31.** Superfície do nectário exibindo ruptura na cutícula. Notar hifas de fungos (detalhe - 25 µm). **32.** Secção transversal de folha jovem, mostrando nectário parcialmente embutido no mesofilo foliar. **33.** Secção transversal nectário, mostrando epiderme, parênquima subepidérmico com 1-2 camadas de células justapostas e parênquima vascularizado predominantemente por floema. **34.** Detalhe mostrando células epidérmicas colunares dispostas em paliçada, com citoplasma abundante, núcleo conspícuo e vacúolos localizados nos pólos. Notar paredes anticlinais e periclinal interna delgadas e parede periclinal externa espessa aderida à cutícula. **35.** Detalhe mostrando espaço subcuticular formado pelo afastamento da cutícula. ct = cutícula. ep = epiderme. es = espaço subcuticular, fl = floema. ps = parênquima subepidérmico. pv = parênquima vascularizado.



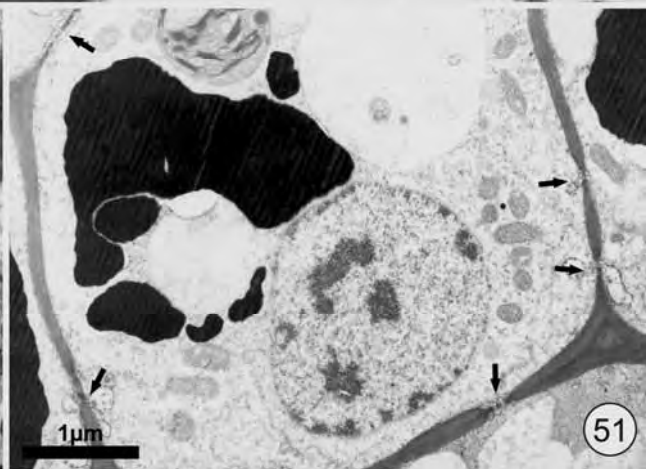
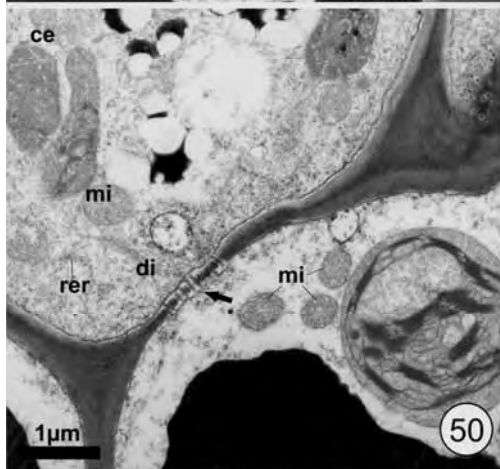
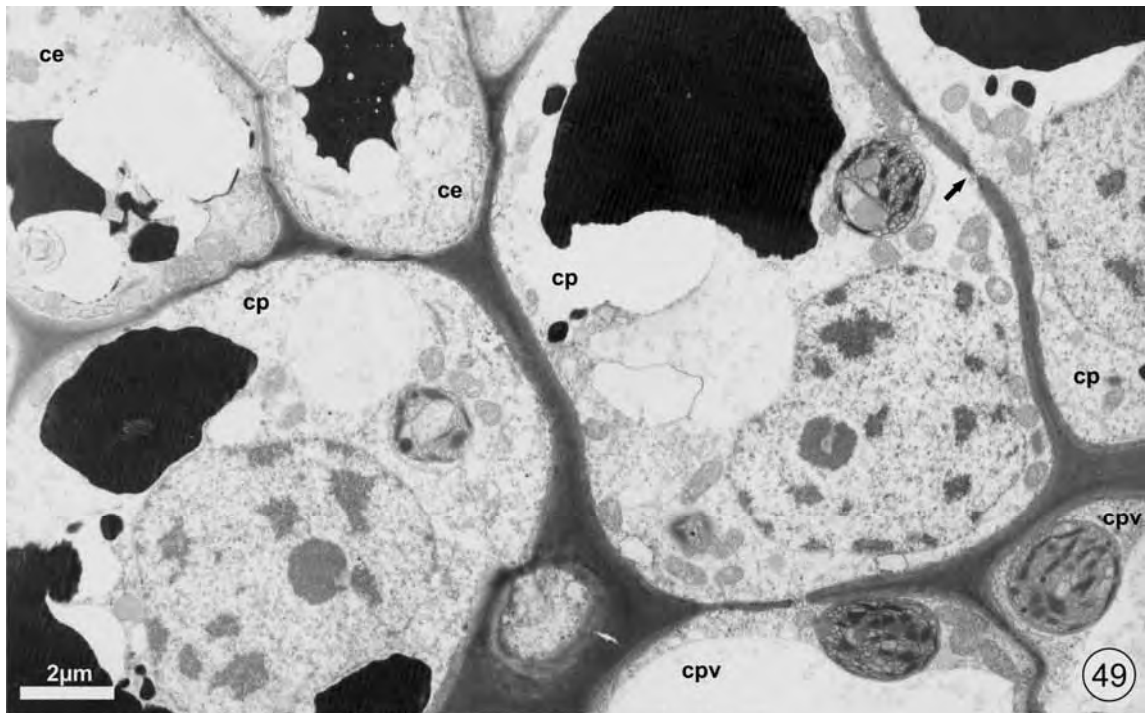
Figuras 36-44 – Nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). **36.** Células epidérmicas com núcleo volumoso, citoplasma abundante e vacúolos localizados nos pólos basal e apical. O detalhe mostra plasmodesmo entre as parede anticlinais das células epidérmicas. **37.** Citoplasma de célula epidérmica rico em organelas, tais como mitocôndrias, dictiossomos e retículo endoplasmático rugoso. Nota-se também a presença de corpos multivesiculares e espaço periplasmático entre o protoplasto e a parede celular (setas). **38.** Inúmeras mitocôndrias com cristas desenvolvidas e matriz contendo granulações elétron-densas. Notar a presença de retículo endoplasmático liso e rugoso, além de pequeno vacúolo. **39.** Espaço periplasmático (setas) bastante desenvolvido com materiais membranosos e vesículas. Notar mitocôndria e gotas de óleo dispersas no citoplasma. **40-44.** Detalhes de plastídeos com conteúdo variável. Notar a presença de gotas de óleo (40), corpos osmiofílicos (41-44) e amido (42-44). Platídeos em processo de divisão são observados (42, 44). cm = corpo multivesicular. di = dictiossomo. ol = óleo. mi = mitocôndria. nu = núcleo. pl = platídeo. rel = retículo endoplasmático liso. rer = retículo endoplasmático rugoso. va = vacúolo.



Figuras 45-48 – Nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). **45.** Célula epidérmica exibindo sinais de degradação no estrato externo da parede periclinal. Notar cutícula espessa e formação de lacunas (*). **46.** Detalhe desta região mostrando inúmeras mitocôndrias no citoplasma subjacente. **47.** Espaço subcuticular formado através do afastamento da cutícula. **48.** Hifas na região do espaço subcuticular. ct = cutícula. ee = estrato externo. ei = estrato interno. pc = parede celular.



Figuras 49-53 – Nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET). **49.** Aspecto geral de células parênquimáticas subepidérmicas. Notar núcleo volumoso de posição basal, citoplasma abundante e vacúolo preenchido com composto fenólico. **50.** Detalhe da região de contato entre uma célula epidérmica e uma parênquimática, as quais são conectadas via plasmodesmo. Notar plastídeos globular com sistema de membranas internas desenvolvido. **51.** Detalhe de célula parênquimática subepidérmica exibindo plasmodesmos entre as paredes anticlinais e entre as paredes periclinais. **52.** Plastídeos observados nas células do parênquima vascularizado. **53.** Cloroplastídeo observado no mesofilo. ce = célula epidérmica. cp = célula do parênquima subepidérmico cpv = célula do parênquima vascularizado. ol = óleo. di = dictiossomo. mi = mitocôndria. rer = retículo endoplasmático.



Figuras 54-59 – Nectários foliares de *Diplopterys pubipetala* (A. Juss.) W.R. Anderson & C.Cav. Davis. (MET - ZIO). **54.** Aspecto geral de células epidérmicas com grande população de organelas. O retângulo mostra células com abundância de retículo endoplasmático, diferente das outras células. **55.** Citoplasma de célula epidérmica mostrando mitocôndrias e retículo endoplasmático bem marcados. **56.** duas células epidérmicas com diferentes populações de organelas. Notar abundância de retículo endoplasmático na célula da direita. **57.** Marcação intensa nos dictiossomos e retículo endoplasmático tanto da célula epidérmica como da célula parenquimática. **58.** Detalhe de dictiossomo bem marcado presente na célula epidérmica. Notar plastídeo com amido e mitocôndrias. **59.** Detalhe de dictiossomo presente em célula do parênquima subepidérmico.

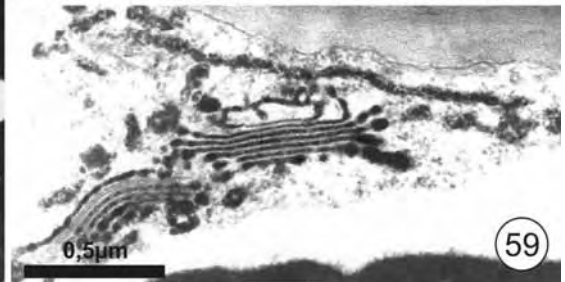
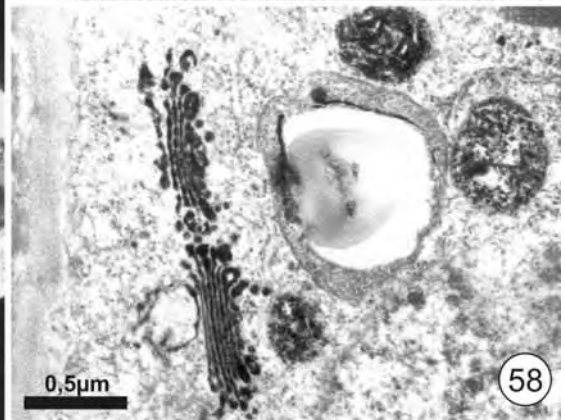
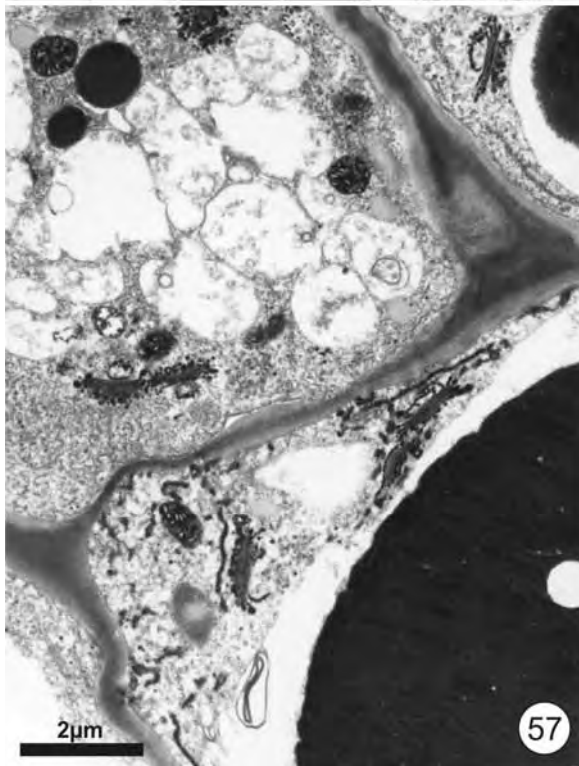
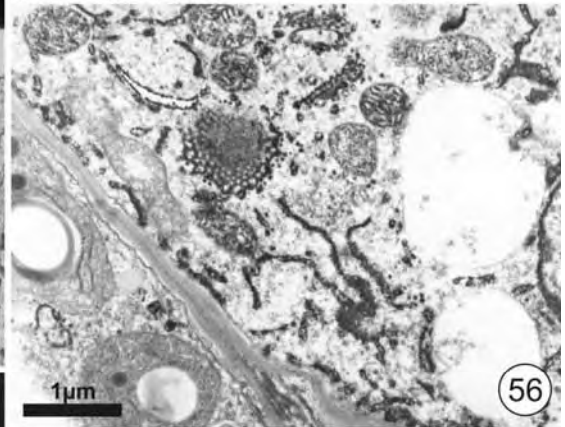
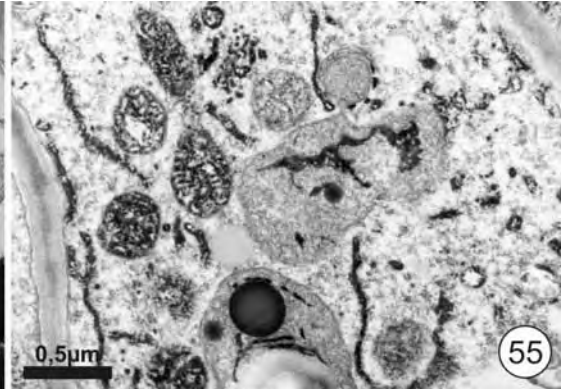
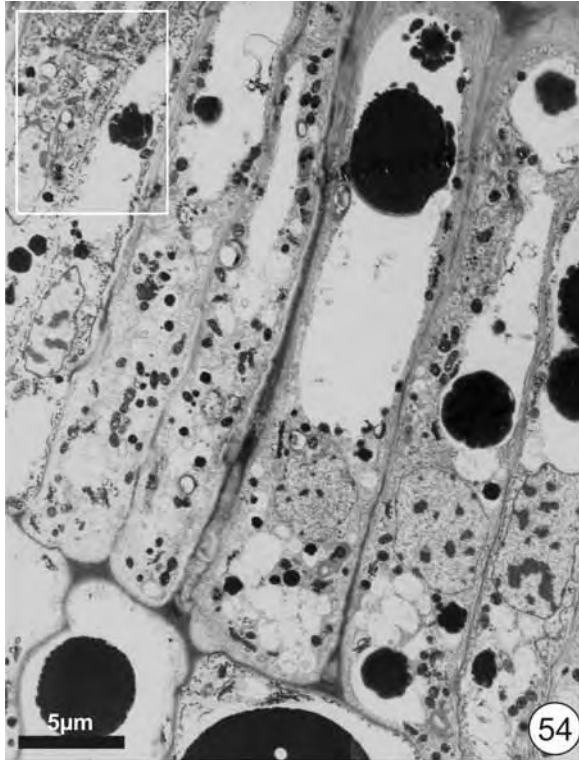


Tabela 1. Testes histoquímicos realizados nos nectários foliares de *D. pubipetala*.

Teste	Composto detectado	folha	
		reação	local
Sudan IV	Lipídeos totais	++	cutícula
Cloreto Férrico III	Compostos fenólicos	+	epiderme
		++	parênquima
PAS	Polissacarídeos totais	++	paredes celulares
		+	espaço subcuticular
		+	epiderme
		+	parênquima
Vermelho de Rutênio	Mucilagem/pectina	++	paredes celulares
		+	espaço subcuticular
		+	epiderme
Solução de Fehling	Açúcares redutores	+	espaço subcuticular
Azul mercúrio de bromofenol	Proteínas totais	++	epiderme
Wagner	Alcalóides	-	
Lugol	Amido	+	parênquima

- reação negativa, + reação fraca, ++ reação intensa

Considerações finais

Diplopterys pubipetala é uma espécie com diversidade de estruturas secretoras encontradas nas flores e nas folhas, as quais apresentam importantes funções nas interações inseto-planta, atuando na atração de polinizadores, como as abelhas, ou na atração de agentes defensores, como as formigas.

Os dados de fenologia e atividade secretora dos nectários mostraram fortes indícios da existência de associação benéfica com as formigas observadas. Estes nectários parecem estar envolvidos na atração e na recompensa destas formigas, as quais provavelmente atuam na defesa da planta contra herbivoria.

Os estudos do sistema reprodutivo indicaram que a população é predominantemente alógama, comprovando a grande dependência com relação aos agentes polinizadores e a importância das glândulas florais como mediadoras destas interações.

Os resultados sugerem que todas as glândulas florais estudadas apresentam importantes funções para a polinização de *D. pubipetala*: as glândulas calicinais atuam na oferta de recompensa aos visitantes enquanto as glândulas das pétalas e dos estames atuam na atração visual e olfativa. Além da função de atração de visitantes, observou-se a liberação de secreção relativamente viscosa pelo conectivo glandular a qual deve atuar no aumento da aderência dos grãos de pólen ao corpo dos visitantes. A partir disso, é possível concluir que esta espécie apresenta grande investimento energético na atração e recompensa de visitantes, foliares e florais.

As análises estruturais e histoquímicas trouxeram importantes contribuições com relação ao conhecimento da organização e funcionamento das glândulas, do mecanismo de liberação da secreção e principais componentes químicos encontrados nas células secretoras e, eventualmente na secreção.

Assim, o presente estudo contribui para o conhecimento da diversidade de estruturas glandulares em flores e folhas de Malpighiaceae e seu papel nas interações planta-animal.

Referências Bibliográficas

- Amorim, A.M. 2002. Five new species of Heteropterys (Malpighiaceae) from Central and South America. **Brittonia**, 54: 217-232.
- Amorim, A.M. 2004. A new species of Heteropterys (Malpighiaceae) from the semideciduous forests of Bahia, Brazil. **Brittonia**, 56(2): 143–146.
- Anderson, C. 1992. Stigmaphyllon bannisterioides, the correct name for a well-known neotropical species of Stigmaphyllon (Malpighiaceae). **Taxon**, 41(2): 327-328.
- Anderson, C. 2003. Resolution of the Galphimia langlassei Complex (Malpighiaceae) from the Pacific Slope of Mexico. **Systematic Botany** 28(4):714–722.
- Anderson, W.R. & Davis C.C. 2005. The Mascagnia cordifolia group (Malpighiaceae). **Contributions to the University of Michigan Herbarium** 24: 33-44.
- Anderson, W.R. & Davis C.C. 2005. Transfer of Mascagnia leticiiana to Malpighia (malpighiaceae). **Contributions to the University of Michigan Herbarium** 24: 45–49.
- Anderson, W.R. & Davis C.C. 2006. Expansion of Diplopterys at the expense of Banisteriopsis (Malpighiaceae). **Harvard Papers in Botany** 11(1): 1-16.
- Anderson, W.R. 1967. Banisteria Adr. Juss. **Taxon**, 16(5): 472-474.
- Anderson, W.R. 1977. Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae. **Leandra** anos VI e VII (7): 5-18.
- Anderson, W.R. 1979a. Floral conservatism in Neotropical Malpighiaceae. **Biotropica** 11(3):219-223.
- Anderson, W.R. 1979b. Mcvaughia, a new genus of Malpighiaceae from Brazil and Paraguay. **Taxon** 28: 157-161.
- Anderson, W.R. 1980. Cryptic self-fertilization in Malpighiaceae. **Science**, 207:892-893.
- Anderson, W.R. 1983. Lophanthera, genus of Malpighiaceae new to Central America. **Brittonia** 35: 37-41.
- Anderson, W.R. 1985. Peregrina, a genus new of Malpighiaceae from Brazil and Paraguay. **Systematic Botany** 10: 303-307.
- Anderson, W.R. 1990. The origin of the Malpighiaceae – The evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 64: 210-224.
- Anderson, W.R. 1993. Chromosome numbers of neotropical Malpighiaceae. **Contributions to the University of Michigan Herbarium** 17: 21-37
- Anderson, W.R. 1998. Two New Species of Heteropterys (Malpighiaceae) from Southern South America. **Novon**, 8(3): 215-217.
- Anderson, W.R. 2001. Observations on the Malagasy genus Rhynchophora (Malpighiaceae). **Contributions to the University of Michigan Herbarium** 23: 53-58.

- Attala, N.C. 2004. Morfoanatomia da lâmina foliar, estrutura e histoquímica das glândulas foliares e calicinais em espécies de Malpighiaceae de cerrado. **Tese de Doutorado** – UNESP, Botucatu – SP.
- Barbosa, R.I.; Mourão JR., M.; Casadio, G.M.L.; Silva, S.J.R. 2005. Fenologia do Mirixi-caju [*Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae)] em áreas de savana aberta do estado de Roraima. **Comunicado Técnico** 13, Embrapa.
- Barros, M. A. G. 1992. Fenologia da floração, estratégias reprodutivas e polinização de espécies simpátricas do gênero *Byrsonima* Rich (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Biologia** 52(2): 343-353.
- Barroso, G. M. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. p.325-329.
- Bernardo, D.S. 2006. Biologia reprodutiva de *Byrsonima sericeae* (Malpighiaceae) em fragmentos de diferentes tamanhos na restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. **Dissertação (mestrado)** – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical, 41fls.
- Buchmann, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18: 343-369.
- Cameron, K.M.; Chase, M. W.; Anderson, W. R. AND Hills, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. **American Journal of Botany** 88:1847-1862.
- Carvalho, P.D.; Borba, E.L.; Lucchese, A.M. 2005. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon Paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). **Acta Bot. Bras.** 19 (2).
- Castro, M.A; Vega, A.S; Múlgura, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). **American Journal of Botany** 88(11): 1935-1944.
- Cocucci, a. A.; Holgado, A. M.; Anton, A. M. 1996. Estudio morfológico y anatómico de los eleóforos pedicelados de *Dinemandra ericoides*, Malpighiácea endémica del desierto de Atacama, Chile. **Darwiniana**. 34 (1-4):183-192.
- Costa, C.B.N.; Costa, J.A.S.; Ramalho, M. 2006. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 29(1): 103-114.
- Cuatrecasas, J.; Croat, T.B.1980. Family 93. Malpighiaceae. In Flora of Panama, Woodson, R.E. et al. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 67: 851-945.

- Davis, C.C. 2002. Madagasikaria (Malpighiaceae): a new genus from Madagascar with implications for floral evolution in Malpighiaceae. **American Journal of Botany** 89:699-706
- Davis, C.C.; Anderson, W.R.; Donoghue, M.J. 2001. Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast ndhF and trnL-F nucleotide sequences. **American Journal of Botany** 88:1830-1846.
- Davis, C.C.; Bell, C.D.; Fritsch, P.W.; Mathews, S. 2002. Phylogeny of acridocarpus-brachylophon (malpighiaceae): implications for tertiary tropical floras and afroasian biogeography. **Evolution** 56 (12).
- Davis, C.C.; Fritsch, P.W.; Bell C.D.; Mathews S. 2004. High-latitude tertiary migrations of an exclusively tropical clade: evidence from malpighiaceae. **Int. J. Plant sci.** 165(4 suppl.):107–121.
- Davis, C.C.; Bell, C.D.; Mathews, S.; Donoghue, M.J. 2002. Laurasian migration explain gondwanan disjunctions: evidence from Malpighiaceae. **Evolution** 99 (10): 6833-6837.
- Duarte, T.R.A. 2002. Biologia da reprodução de Banisteriopsis oxyclada (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae). **Monografia (Bacharelado)** – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 28p.
- Elias, T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. P: 174-203. In: Bentley, B & Elias, T. (eds.). 1983. **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Estabrook, G. F. & Gates, B. 1984. Character Analysis in the Banisteriopsis campestris Complex (Malpighiaceae), Using Spatial Auto-Correlation. **Taxon**, 33(1): 13-25
- Freitas, L., Bernardello, G., Galetto, L., Paoli, A. A. S. 2001. Nectaries and reproductive biology of Croton sarcopetalus (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 136: 267-277.
- Gates, B. 1979. New Names in Banisteriopsis and Diplopterys (Malpighiaceae) of the Guayana Highland. **Brittonia**, 31(1): 108-109.
- Gates, B. 1982. Banisteriopsis and Diplopterys (Malpighiaceae). **Flora Neotropica Monograph** 30: 1-237.
- Giese, S.O.K. 2005. Estudo da composição química dos óleos florais de Byrsonima brachybotrya (Malpighiaceae). **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal do Paraná.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens P.F. 1999. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Sunderland.

- Lobreau-Callen, D. 1989. Les Malpighiaceae et leurs pollinisateurs. Coadaptation ou coévolution. Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris, 4a. série. 11, section B, **Adansonia**, no. 1: p. 79-94.
- Lombello, R.A.; Forni-Martins, E.R. 2003. Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. **Acta bot. bras.** 17(2): 171-178.
- Mamede, M.C.H.; Mayo, S.J. 1992. A Cladistic Analysis of the Genus *Camarea* (Malpighiaceae). **Kew Bulletin**, 47(3): 491-501.
- Morton, C.V. 1968. A typification of some subfamily, sectional, and subsectional names in the family Malpighiaceae. **Taxon** 17:314-324.
- Neff, J.L.; Simpson, B.B. 1981. Oil-collecting structures in the Anthoporidae (Hymenoptera): morphology, function and use in systematics. **Journal of the Kansas entomological society** 54(1): 95-123.
- Niedenzu, F. 1928. Malpighiaceae. Pg 1-870 in A. Engler, ed. Das Pflanzenreich. Vol Iv, 141. Wilhelm Engelmann, Leipzig. apud BARROSO, G. M. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol 2. p.325-329.
- Possobom, C.C.F. 2007. Ultra-estruturas das glândulas do cálice de *Byrsonima intermedia*. **Monografia** (Bacharelado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Reis, M.G.; Faria, A.D.; Santos, I.A.; Amaral, M.C.E.; Marsaioli, A.J. 2007. Byrsonic Acid—the Clue to Floral Mimicry Involving Oil-Producing Flowers and Oil-Collecting Bees. **J Chem Ecol**, 33:1421–1429.
- Sazima, M. & Sazima, I. 1989. Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oil- producing Malpighiaceae. **Botanica Acta**. 102: 106-111.
- Seipold, L.; Gerlach, G.; Wessjohann, L. 2004. A new type of floral Oil from *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) and chemical considerations on the evolution of oil flowers. **Chemistry & Biodiversity** 1: 1519-1528.
- Sigrist, M.R.; Sazima, M. 2004. Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. **Annals of Botany** 94: 33-41.
- Silberbauer-Gottsberger, I.; Gottsberger, G. 1988. A polinização de plantas do cerrado. **Rev. Brasil. Biol.**, 48 (4): 651-663.
- Simpson, B.B. 1989. Pollination biology and taxonomy of *Dinemandra* and *Dinemagonum* (Malpighiaceae). **Systematic Botany**, 14 (3): 408-426.

- Souza, V. C. & Lorenzi H. 2005. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum.
- Steiner, K.E. 1985. Functional Dioecism in the Malpighiaceae: The Breeding System of *Spachea membranacea* Cuatr. **American Journal of Botany** 72 (10): 1537-1543.
- Subramanian, R.B., Arumugasamy, K., Inamdar, J.S. 1990. Studies in secretory glands of *Hiptage sericea* (Malpighiaceae). **Nord. J. Bot.** 10(1):57-62.
- Taylor, D.W; Crepet, W.L. 1987. Fossil floral evidence of Malpighiaceae and an early plant-pollinator relationship. **Amer. J. Bot.** 74 (2): 274-286.
- Teixeira, L.A.G; Machado, I.C. 2000. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* dc (malpighiaceae). **Acta bot. bras.** 14 (3): 347-357.
- Vicentini, A.; Anderson, W. R. 1999. Malpighiaceae. In **Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**, Ribeiro, J.E.L. da S.; M.J.G. Hopkins; A. Vicentini; C.A. Sothers; M.A. da S. Costa; J.M. de Brito; M.A.D. de Souza; L.H.P. Martins; L.G. Lohmann; P.A.C.L. Assunção; E. da C. Pereira; C.F. da Silva; M.R. Mesquita e L.C. Procópio (eds). Manaus: INPA-DFID 1: 505-511.
- Vieira, A.C.M. 2005. Estudos em espécies de Malpighiaceae de restingas do Rio de Janeiro: estruturas secretoras em folhas e flores e biologia floral. **Tese de Doutorado – USP**.
- Vinson, S.B; Williams, H.J; Frankie, G.W; Shrum, G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipid by Centris bees (Hymenoptera: Apidae). **Biotropica**. 29 (1): 76-83.
- Vogel, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Tropische und subtropische Pflanzenwelt 7: 283-547. apud BUCHMANN, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18: 343-369.
- Vogel, S. 1990. History of malpighiaceae in the light of pollination ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 55: 130-142.