



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOANA PATRÍCIA PANTOJA SERRÃO FILGUEIRA

**ASPECTOS ONTOGÉNETICOS E ESTRUTURAIS DAS GLÂNDULAS NODAIS EM
REPRESENTANTES DE GÊNEROS BRASILEIROS DE POLYGALACEAE**

Hoffmannsegg & Link

Belém

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOANA PATRÍCIA PANTOJA SERRÃO FILGUEIRA

**ASPECTOS ONTOGÉNETICOS E ESTRUTURAIS DAS GLÂNDULAS NODAIS EM
REPRESENTANTES DE GÊNEROS BRASILEIROS DE POLYGALACEAE**

Hoffmannsegg & Link

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e ao Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: área de concentração Botânica Tropical, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias.

Belém

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOANA PATRÍCIA PANTOJA SERRÃO FILGUEIRA

**ASPECTOS ONTOGÊNETICOS E ESTRUTURAIS DAS GLÂNDULAS NODAIS EM
REPRESENTANTES DE GÊNEROS BRASILEIROS DE POLYGALACEAE**

Hoffmannsegg & Link

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: área de concentração Botânica Tropical, para obtenção ao título de Mestre.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias - Orientador
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Fernanda Ilkiu Borges de Souza– 1º Examinador
Embrapa Amazônia Orienta

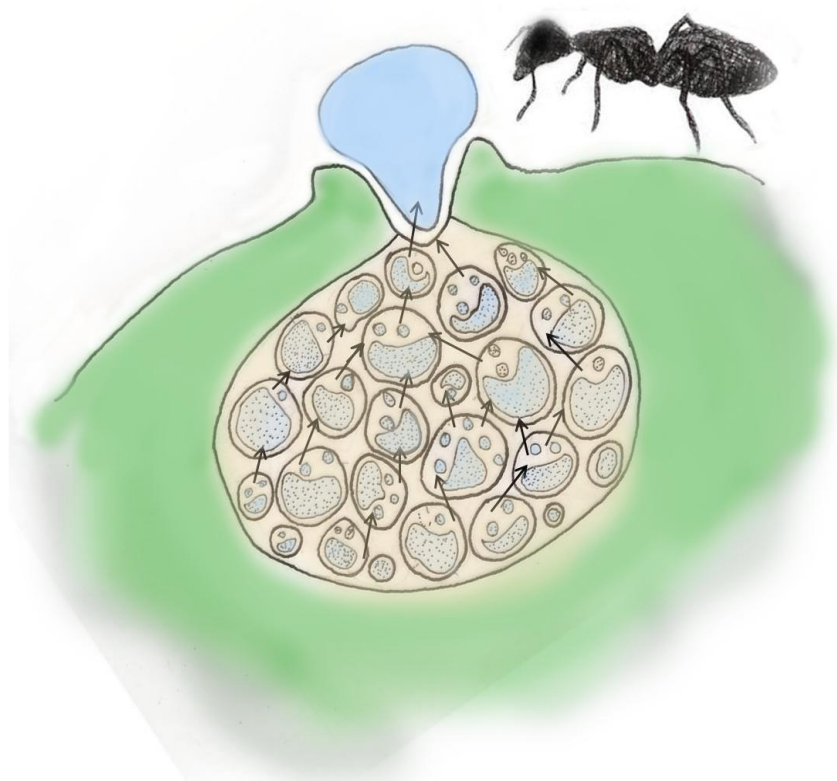
Profa. Dra. Alba Lucia Ferreira de Almeida Lins– 2º Examinador
Museu Paraense Emílio Goeldi

Prof. Dr. Joao Ubiratan Moreira dos Santos – 3º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Manoel Euclides do Nascimento – Suplente
Universidade Federal Rural da Amazônia

Palavras são, na minha nada humilde
opinião, nossa inesgotável fonte de
magia. Capazes de formar grandes
sofrimentos e também de remedia-los.

(Alvo Dumbledore)



I, I will be king
And you, you will be queen
Though nothing will drive them away
We can be Heroes, just for one day
We can be us, just for one day

(David Bowie)

AGRADECIMENTOS

A UFRA e ao MPEG, pela oportunidade de conclusão do mestrado em Ciências Biológicas – Botânica Tropical.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À coordenadoria do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas (POSBOT), por todo o auxílio prestado nesses dois anos.

A minha orientadora **Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias**, pela paciência, empolgação e por acreditar no potencial desse trabalho, e claro, por tentar sempre repassar um pouco do seu amor pelas “*Polyagalas*”.

Ao meu coorientador **Dr. Diego Demarco**, pelo aprendizado e pela atenção oferecida no período no qual estive em São Paulo para realização do MET.

Ao colaborador **Dr. José Floriano Pastore**, pela atenção dedicada na coleta realizada em Brasília e principalmente, nas discussões evolutivas do grupo em questão.

Ao Laboratório de Microscopia eletrônica de varredura do MPEG, pela obtenção das imagens de MEV.

A **Aletheia Vieira** pelo abrigo a mim dispensado no período em que passei em Brasília para coletas.

A **Thália Gama**, **Juliana Brasil** e todos os colegas que fiz no laboratório de Anatomia Vegetal da USP, pelos dois meses no qual me acolheram em São Paulo.

A **Wanderson Silva** pela ajuda nas coletas e auxílio nas fotos de campo.

A **Dra. Alba Lins** e a **Dra. Márlia Coelho-Ferreira**, pelas oportunidades e conhecimento repassado nesses anos de Museu.

A **Ms. Tatiani Yuriko Kikuchi**, pelos primeiros ensinamentos sobre o “mundo das plantas” e por ser sempre tão prestativa.

Aos meus colegas de turma, pela prazerosa convivência nesses dois anos. Em especial, aos amigos: **Anery Carvalho, Ilka Reis, Jessyca Pinho, Maria Queroz**. E aos amigos de turma e laboratório: **Rafaela da Trindade e Edilson Freitas**, meu “irmão de orientação”, por esses dois anos de ajuda mútua no laboratório, com leves doses de desespero e muitos momentos de boas risadas.

Aos amigos que já passaram pelo Laboratório de Anatomia Vegetal: **Haiwry Farias, Isabel Neri e Tarcymara Garcia** e aos que ainda estão: **Valéria Tavares, Marina Moraes, Rolf Junior, Damaris Búsman** pelos ensinamentos, ajuda e momentos de descontração.

Aos meus amigos de graduação da “**Armada de Dumbledore**”, em especial ao **Márlon da Graça**, amigo de infância, confidente e colega de profissão.

Aos meus amigos de escola da “**GB**”, pelo apoio, união e momentos de diversão, em especial ao **Breno da Silva**, vizinho, colega de escola, parceiro de laboratório e amigo de vida.

A **Braz Castro**, por todo apoio, carinho, atenção e por sempre perguntar como foi o meu dia.

Aos meus irmãos **Joana Paula Filgueira, João Paulo Filgueira e Kellen Carla Lima**, pelo amor, apoio e por serem meu melhor espelho, e a prima **Claudia Pantoja** por seu convívio, carinho e dedicação.

Ao meu sobrinho **Paulo Gabriel Filgueira**, pelos momentos de alegria que me proporciona desde o dia de seu nascimento.

Aos meus pais, **Jorgina Pantoja e Benedito Filgueira**, pelo amor depositado em mim e por nunca medirem esforços para me proporcionar uma educação que preze acima de tudo pelo o amor e respeito e a todos.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	8
CONTEXTUALIZAÇÃO	10
REVISÃO DE LITERATURA	13
□ Polygalaceae Hoffmanns. & Link.....	13
□ Nectários	14
□ Polygalaceae Brasileiras com glândulas nodais	16
Capítulo 1.....	18
RESUMO	19
ABSTRACT:	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	26
REFERENCIAS	38
Capítulo 2.....	43
RESUMO:	44
ABSTRACT:	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	51
REFERÊNCIAS	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS (Contextualização, referencial de literatura, conclusão e perspectivas).	67

RESUMO GERAL

Polygalaceae Hoffmannsegg & Link compreende 20 gêneros e cerca de 1.200 espécies. Posicionada na ordem Fabales, tem como grupos-irmãos o clado formado por Quillajaceae, Suciaceae e Fabaceae. Neste grupo, as estruturas secretoras têm um relevante valor taxonômico, em especial, as glândulas externas. Estas possuem também importância evolutiva e ecológica. Apesar disto, são pouco estudadas. Das estruturas secretoras que ocorrem em Polygalaceae, destacam-se as glândulas nodais que ocorrem em um terço dos seus gêneros. No Brasil, estão presentes em cinco dos onze gêneros registrados, são eles *Caamembeca* J.F.B. Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl., *Securidaca* L.. Tais glândulas há muito tempo são alvo de especulações sobre serem ou não estípulas modificadas, todavia, apenas recentemente foram feitas análises anatômicas para tal comprovação, porém em apenas um gênero. Este trabalho foi organizado em dois capítulos. O **Capítulo 1** confirmou todas as glândulas como nectários, destacando as interações inseto-planta entre os espécimes investigadas e, em especial, a entomofauna de formicídeos associada às glândulas. Por meio de análises anatômicas seriadas, constatou-se que estas estruturas estão vinculadas de fato a folha, e não ao caule como relatado por diversos autores, confirmando a origem estipular para todos os cinco gêneros brasileiros de Polygalaceae com glândulas nodais. Ainda nesse capítulo foram caracterizados anatomicamente os nectários desses cinco gêneros, buscando formular padrões evolutivos para o desenvolvimento dessas estruturas na família. O **Capítulo 2** destinou-se investigar os nectários estipulares de *Moutabea guianensis* Aubl. Nele foram feitas análises morfoanatomicas em dois diferentes estágios de desenvolvimento glandular. Neste capítulo foram realizados testes histoquímicos para caracterizar o conteúdo da secreção liberada, como também a ultraestrutura das glândulas nodais que revelou a atuação das principais organelas envolvidas na produção da secreção e as principais rotas de transporte do néctar. Pode-se concluir que os resultados apresentados

são de grande relevância para o conhecimento morfoanatômico e funcional das glândulas nodais encontradas neste grupo de plantas.

Palavras-chave: Polygalaceae, glândulas nodais, nectários, ultraestrutura.

CONTEXTUALIZAÇÃO

Polygalaceae Hoffmannsegg & Link compreende 20 gêneros e cerca de 1.200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas, especialmente no continente americano (Paiva, 1998; Souza & Lorenzi, 2012). No Brasil é representada por onze gêneros e cerca de 200 espécies (Pastore *et al.*, 2012) que ocorrem em todas as formações vegetacionais (Aguiar-Dias *et al.*, 2012). Atualmente, a família está posicionada na ordem Fabales, tendo como grupos-irmãos o clado formado por Quillajaceae, Sucianaceae e Fabaceae (APG II, 2003; Judd *et al.*, 2009; Friis *et al.*, 2011; Belo *et al.*, 2012).

Polygalaceae possui poucos estudos que ressaltem suas principais características. À grande maioria dos trabalhos realizados até o momento estão relacionados à taxonomia do grupo (Marques, 1979; Marques & Peixoto, 2007; Aguiar-Dias & Aranha Filho, 2008; Pastore & Marques, 2009; Pastore, 2012). Sendo ainda, escassas as informações oriundas de estudos estruturais, o que interfere em uma ampla visão evolutiva da família.

Ao contrário dos estudos taxonômicos, investigações anatômicas feitas com espécies brasileiras não são muitas. Ressalta-se os trabalhos de Baumgratz & Marques (1984), Aguiar-Dias *et al.* (2011), Aguiar-Dias & Cardoso-Gustavson (2011) e Aguiar-Dias *et al.* (2012), além das obras tradicionais como Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1950, 1979). Assim, é necessário que haja mais pesquisas relatando a estrutura de seus representantes.

Em todos estes trabalhos, as estruturas secretoras tiveram uma importante contribuição genérica e específica, porém estas são pouco conhecidas e, em sua grande maioria, só são citadas quanto a sua presença e ausência dentre as espécies (Lüdtke & Aguiar, 2008; Aguiar-Dias & Aranha Filho, 2008; Coelho *et al.*, 2008; Pastore & Marques, 2009). Dentre as estruturas com um relevante valor taxonômico estão as glândulas nodais. Estas possuem importância ecológica, taxonômica e evolutiva. Apesar disto, muitas vezes são pouco estudadas em trabalhos botânicos (Blüthgen & Reinfenrath, 2003).

No Brasil, tais estruturas estão presentes em cinco dos onze gêneros ocorrentes (*Caamembeca* J.F.B. Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl. e *Securidaca* L.) (Pastore et al., 2012). Estas são mencionadas nas investigações que englobam análises morfológicas e taxonômicas da família desde os estudos de Chodat (1891).

Tais glândulas há muito tempo, são alvo de especulações sobre serem ou não estípulas modificadas (Chodat, 1891; Dickson, 1973; Eriksen, 1993). Porém, apenas recentemente foram feitas análises anatômicas que verificaram que as glândulas nodais de *Caamembeca laureola* (A.St.-Hil. & Moq.) J.F.B.Pastore estão unidas ao traço foliar. Estas estruturas então foram classificadas pelos autores como glândulas estipulares (Aguar-Dias, *et al.* 2011).

Apesar da importância deste novo dado, não se tem informações sobre a estrutura anatômica dessas glândulas em outros gêneros da família, sobre essas serem ou não estípulas modificadas.

O fato de ter sido observado a ocorrência de estípulas em uma espécie da família não quer dizer que este é um caráter que esteja presente em todos os gêneros e que estes irão possuir sempre a mesma origem. Desta forma, o estudo das glândulas nodais nos gêneros brasileiros de Polygalaceae, em que essas ocorrem, irá contribuir para a ampliação do conhecimento morfológico, estrutural, ecológico e filogenético, pois proporcionará uma melhor visão da importância destas estruturas na história evolutiva dessa família, dado que o uso de características anatômicas é de grande importância não só para o conhecimento e identificação das espécies, mas para a elaboração de padrões filogenéticos (Judd *et al.*, 2009).

Diante do exposto, o presente estudo foi dividido em dois capítulos. O **Capítulo I** investigou a origem e estrutura das glândulas nodais em *Caamembeca oleifolia* (A.St.-Hil. Moq.) J.F.B.Pastore, *Diclidanthera laurifolia* Mart., *Monnina exalata* A.W.Benn., *Moutabea guianensis* Aubl., *Securidaca amazônica* Chodat, representando cada um dos cinco gêneros brasileiros. Este capítulo foi intitulado “**NECTÁRIOS ESTIPULARES EM**

POLYGALACEAE: UMA PERSPECTIVA ESTRUTURAL E EVOLUTIVA". Já o **Capítulo II** selecionou uma das espécies estudadas, *Moutabea guianensis*, para uma investigação ultraestrutural. Esse capítulo enfoca, além da estrutura e origem da glândula, aspectos quanto a sua formação, conteúdo da secreção, mecanismo de transporte do exsudato e suas organelas mais evidentes. Sendo denominado **"NECTÁRIOS ESTÍPULARES EM *Moutabea guianensis* Aubl.: ESTRUTURA E ASPECTOS FUNCIONAIS"**.

REVISÃO DE LITERATURA

- **Polygalaceae Hoffmanns. & Link**

Está posicionada na ordem Fabales como grupo-irmão do clado formado por Quillajaceae, Sucianaceae e Fabaceae (Judd *et al.*, 2009; Friis *et al.*, 2011; Bello *et al.*, 2012 - Figura 1). Esta família compreende 20 gêneros e cerca de 1.200 espécies incluídas em quatro tribos, das quais três foram estabelecidas por Chodat (1891), *Polygaleae*, *Moutabeae* e *Xanthophylleae*, e uma, *Carpolobeae*, por Eriksen (1993), as quais se encontram distribuídas nas regiões tropicais e temperadas da Terra, exceto Nova Zelândia, zonas Árticas e Antárticas (Marques & Peixoto, 2007; Souza & Lorenzi, 2012; Pastore *et al.*, 2012), sendo especialmente abundantes no continente americano (Paiva, 1998).

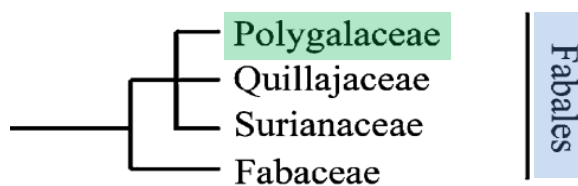


Figura 1: Parte do cladograma que mostra as relações hipotéticas dentro de Fabales (Friis, E.M; Pedersen, K.R; Crane, P.R, 2011).

No Brasil, a família está representada por aproximadamente 200 espécies, pertencentes a onze gêneros: *Acanthocladus* Klotzsch ex Hassk., *Asemeia* Raf. emend. Small, *Barnhartia* Gleason, *Bredemeyera* Willd., *Caamembeca* J.F.B.Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Gymnospora* (Chodat) J.F.B.Pastore, *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl., *Polygala* L., *Securidaca* L. (Marques & Peixoto, 2007; Pastore *et al.*, 2012; Souza & Lorenzi, 2012).

Muitas vezes Polygalaceae é confundida com Leguminosae (Faboideae) devido a semelhança entre suas flores zigomorfas (Judd *et al.*, 2009). Porém, é importante ressaltar que, embora as flores destas famílias sejam similares, as estruturas envolvidas não são homólogas (Lüdtke *et al.*, 2009), ou seja, não foram herdadas de um ancestral comum, logo, as alas das leguminosas são pétalas com disposição lateral, enquanto que nas poligaláceas as

alas representam sépalas laterais internas (Judd *et al.*, 2009), esses autores destacaram ainda que a carena nas leguminosas é formada pela fusão ou adnação de duas pétalas abaxiais, enquanto que a carena das poligaláceas, é constituída por uma única pétala abaxial, ambas com função de proteção dos órgãos reprodutivos.

Os representantes da família Polygalaceae estão distribuídos em todos os biomas brasileiros: Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Pampas e Amazônia (Pastore *et al.*, 2012). Geralmente ocorrendo como ervas, subarbustos, arbustos ou lianas e frequentemente produzindo saponinas triterpenoides e salicilato de metila (Judd *et al.*, 2009).

- **Nectários**

Nectários são glândulas especializadas do tecido vegetal descritas em mais de 93 famílias de angiospermas e 332 gêneros vegetais (Elias, 1983); também encontradas em pteridófitas (Koptur *et al.*, 1998), sendo mais comuns em plantas tropicais (Paiva, 1998).

Essas glândulas secretam uma substância denominada néctar, a qual é composta por aminoácidos, monossacarídeos, dissacarídeos, água, proteínas e outros compostos (Fahn, 1979; Elias, 1983).

Os nectários podem ser classificados de acordo com a posição que se encontram no vegetal, assim, podem ser divididos como florais (NF), localizados dentro do órgão reprodutor, e extraflorais (NEFs), quando observados em qualquer parte aérea da planta, como no caule, nas folhas (pecíolo, estípulas e lâmina foliar, inclusive as cotiledonares), nos pedicelos das flores e frutos, no eixo das inflorescências, brácteas e bractéolas (Castro e Machado, 2006).

Quanto à função, as glândulas nectaríferas são divididas em nupciais (NN), associadas diretamente com a polinização e/ou extranupciais (NEN), quando não apresentam qualquer relação com esse processo, mesmo quando localizadas próximo às partes reprodutivas vegetais (Castro e Machado, 2006).

Devido ao seu valor ecológico e taxonômico os nectários despertam bastante interesse, umas das interações que se busca entender envolvendo essas glândulas é a sua relação com outros animais, em especial com formicídeos.

Nessa associação planta-formicídeos existem duas correntes: a primeira, denominada exploracionista, confere a secreção nectarífera um papel genuinamente fisiológico para o vegetal, onde as formigas simplesmente “exploraram” esse recurso. Já a segunda corrente, chamada protecionista, acredita que os nectários extraflorais estariam envolvidos em um mutualismo inseto-planta. Nele as formigas utilizariam o néctar como fonte de alimento, em troca, defenderiam a planta hospedeira, atuando como predadores de diversos grupos de herbívoros (Buckley, 1983). Diversos estudos apontam que essa relação tem se mostrado benéfica para a planta em aspectos como redução da herbívora foliar, nos danos em botões e flores, além do aumento da produção de frutos e de sementes (Oliveira *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2004; Belo *et al.*, 2011).

Em Polygalaceae, há ocorrência de nectários no limbo foliar, nós, raque floral e na base do ovário (Eriksen & Persson, 2007). A interação inseto-planta é facilmente observada por Aguiar-Dias, *et al.* (2011) em *Caamembeca lauréola* (A. St.-Hil. & Moq.) J.F.B. Pastore e formicídeos do gênero *Paratrechina* Motschoulsky, 1863, que coletam o néctar secretado pelas glândulas nodais dessa espécie. Também existem relatos da interação entre abelhas (*Bombus pascuorum* queens) e o néctar secretado nas flores de *Polygala vayredae* Costa (Castro *et al.*, 2009).

- **Polygalaceae Brasileiras com glândulas nodais**

As glândulas nodais estão distribuídas em duas tribos – *Polygaleae* e *Moutabeae* – e ocorrem em cinco dos onze gêneros de Polygalaceae registrados para o Brasil (Lüdtke *et al.*, 2008; Aguiar-Dias *et al.*, 2011).

Incluídos em *Polygaleae* estão *Monnina* Ruiz & Paiva, *Securidaca* L. e *Caamembeca* J.F.B. Pastore. O primeiro, formado por arbustos ou arvoretas (Eriksen & Persson, 2007), é exclusivamente americano, composto por aproximadamente 200 espécies que se estendem do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, sendo os Andes Peruanos a área de maior concentração (Marques, 1979; Lüdtke *et al.*, 2009). No Brasil é representado por 13 espécies, distribuídas nos domínios fitogeográficos de Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, não sendo descritas para a região Norte (Pastore *et al.*, 2012).

Securidaca são lianas que habitam preferencialmente florestas com solos úmidos e que podem ser identificadas por apresentarem duas glândulas ou apenas uma única glândula nas regiões nodais (Marques, 1996; Aguiar-Dias & Aranha Filho, 2008). É um gênero neotropical, com cerca de 80 espécies (Marques, 1996), das quais 25 ocorrem no Brasil (Pastore *et al.*, 2012). Podem ser encontradas em todas as regiões do país, nos domínios de cerrado, restingas arbóreas e, mais raramente, em caatingas e campos rupestres (Marques, 1996; Pastore *et al.*, 2012).

Caamembeca, criado por J.F.B.Pastore (2012), é oriundo do subgênero *Liguistrina* (Chodat) Paiva, que pertencia a *Polygala* L. A circunscrição de um novo gênero para abrigar espécies de *Liguistrina* teve como base recentes estudos filogenéticos que demonstraram o parafiletismo em *Polygala* (Eriksen, 1993; Abbott, 2011; Pastore, 2012). Assim, para oferecer consistência ao clado, alguns subgêneros, por meio de distinções morfológicas e filogenéticas, foram elevados a gênero, como também aconteceu com o subgênero *Hebeclada* (Chodat) reagrupado em *Asemeia* Raf. emend. Small (Pastore e Abbott, 2012). Uma das

características adotadas no reordenamento de *Ligustrina* em *Caamembeca* é a presença de glândulas na base do pecíolo (Pastore, 2012), evidenciando a importância dessas estruturas para a família. De acordo com esta nova organização proposta por Pastore (2012), *Polygala* não possui nenhuma espécie com glândulas nodais, já que o único subgênero (subg. *Ligustrina*) que possuía tal característica foi elevado ao gênero *Caamembeca*.

Caamembeca é endêmico da América do Sul, sendo reportado para todas as regiões do Brasil (Marques e Peixoto, 2007; Pastore, 2012). Representada por ervas a subarbustos que se caracterizam por possuir além de glândulas nodais, também glândulas na raque da inflorescência (Marques e Peixoto, 2007), é o único gênero no qual já foi realizado estudos anatômicos que constatou a origem estipular de seus nectários nodais (Aguilar-Dias *et al.*, 2011; Filgueira, 2012).

A tribo *Moutabeae* é composta por cinco gêneros dos quais dois, dos três referidos para o Brasil, possuem pares de glândulas nodais (Eriksen e Persson, 2007; Pastore, 2012).

As *Moutabea* brasileiras são constituídas por sete espécies ocorrentes na Amazônia e Centro-Oeste (Pastore, 2012). Na América do Sul é relatada para Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela, e na América Central, Costa Rica e Panamá (Eriksen e Persson, 2007; Aymard *et al.*, 2004). Apesar de ser relativamente pequeno, este é dos gêneros em investigação, o que apresenta maior carência de estudos com seus representantes.

Diclidanthera é tropical da América do Sul (Eriksen, 1993), representado para o Brasil por três espécies e quatro variedades (Pastore, 2012). Quando foi descrito sua posição sistemática era incerta, sendo referido para várias famílias – Ebenaceae, Styraceae, e Sapotaceae – (Eriksen, 1993). Todavia, análises anatômicas e polínicas o incluem esse gênero em Polygalaceae (Paiva, 1998). Diclidantheraceae não foi sustentado por pesquisas filogenéticas (Souza e Lorenzi, 2012).

Capítulo 1

NECTÁRIOS ESTIPULARES EM POLYGALACEAE: UMA PERSPECTIVA ESTRUTURAL E EVOLUTIVA

**JOANA PATRÍCIA PANTOJA SERRÃO FILGUEIRA¹; JOSÉ FLORIANO BARÊA
PASTORE²; ANA CRISTINA ANDRADE DE AGUIAR-DIAS³**

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi. Av. perimetral, 1901. – Terra Firme, 66077-530, Belém – PA. Autor para correspondência: joanapfilgueira@gmail.com

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final) Brasília - DF, 70770-917, Prédio da Botânica e Ecologia (PBE)

³ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas Rua Augusto Corrêa. 66075-110, Belém – PA.

RESUMO: Glândulas nodais são encontradas em um terço dos gêneros de Polygalaceae, ocorrendo em cinco dos onze gêneros registrados para o Brasil. Essas glândulas tem importância taxonômica, evolutiva e ecológica. A origem estipular dessas glândulas tem sido debatida e parecem ser relevantes no contexto da evolução morfológica dentro da ordem Fabales. Este estudo investigou a origem das glândulas nodais nos gêneros brasileiros glandulares de Polygalaceae: *Moutabea*, *Diclidanthera*, *Monnina*, *Caamembeca* e *Securidaca*. Para isso, amostras das regiões nodais de cada gênero foram coletadas, fixadas e processadas de acordo com os métodos usuais para microscopia de luz e eletrônica de varredura. A glicose no exsudato e presença frequente de formigas dos gêneros *Crematogaster* e *Dolichoderus* nas glândulas nodais permitiu classificá-las como nectários extraflorais. Por meio de cortes anatômicos seriados da região nodal, observou-se que as glândulas têm sua origem nas extremidades do traço foliar, estando de fato vinculados às folhas, caracterizando-as como nectários estípules. As glândulas de todas as espécies apresentaram, em secção longitudinal, características semelhantes como epiderme uniestratificada; células do tecido nectarífero de formato isodiamétrico, parede delgada e núcleo evidente; e presença de um orifício orbicular conectando o tecido nectarífero com o ambiente para qual o néctar será secretado.

Palavras-Chave: Polygalaceae, glândulas nodais, estruturas secretoras, filogenia.

ABSTRACT: The nodal glands are found in about one third of Polygalaceae genera, occurring in five out the eleven genera registered in Brazil. These glands have taxonomic, evolutionary and ecological importance. The stipular origin of this glands has been disputed and seem to be relevance in the context of morphological evolution within order Fabales. This study has investigated the origin of nodal glands in the glandular Brazilian genera of Polygalaceae: *Moutabea*, *Diclidanthera*, *Monnina*, *Caamembeca* and *Securidaca*. It was studied nodal samples for each genus, which was collected, fixed and processed in accordance with the usual methods, i.e. light and scanning electron microscopy. The visiting of ants (*Crematogaster* spp. and *Dolichoderus* spp.) and glucose exudates ('Glicofita' test), which were recorded, on the field observations, on the nodal glands, allowing treat it, undoubtedly, as extrafloral nectaries. By means of anatomical serial sections of nodal region, it was observed that the glands have their origin at the ends of leaf trace, being in fact linked to the leaves, characterizing them as stipular nectaries. The glands of all species, in longitudinal section, had similar characteristics as uniseriate epidermis; the cells of nectariferous tissue have isodiametrical shaped, with thin walls and large nucleus. There is presence of an orifice connecting the nectary tissue with the environment, where the nectar will flow.

Key words: Polygalaceae, nodal glands, secretory structures, phylogeny.

INTRODUÇÃO

Estípulas são órgãos laterais localizadas aos pares nos nós caulinares em associação com folhas em Angiospermas (Tyler 1897). Essas estruturas ocorrem em várias famílias de plantas e contribuem como caráter para evidenciar relações filogenéticas entre grupos vegetais (Webberling 2006). A grande maioria das plantas possuem estípulas em formato de lâmina. No entanto, essas estruturas podem ser modificadas em formato de espinhos, como em algumas Mimosoideae, podem ser reduzida a estípulas rudimentares (Webberling 2006) ou podem também se apresentar como glândulas secretoras de néctar (Lubbock 1898, Nicolson et al. 2007) .

Polygalaceae Hoffmanns. & Link compreende 20 gêneros e cerca de 1.200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas, especialmente no continente americano (Paiva 1998; Souza & Lorenzi 2012). No Brasil é representada por onze gêneros e cerca de 200 espécies (Pastore et al. 2012) ocorrentes em todas as formações vegetais (Aguiar-Dias et al. 2012). Dentre os caracteres presentes na família com valor taxonômico significativo destacam-se as estruturas secretoras. Em particular, as glândulas externas que além da importância taxonômica, possuem valor ecológico e evolutivo. Apesar disso, essas estruturas são muitas das vezes pouco enfatizadas em trabalhos botânicos (Blüthgen & Reinfenrath 2003).

Neste estudo destacam-se as glândulas nodais, as quais ocorrem em um terço dos gêneros de Polygalaceae, possuindo relevante valor taxonômico para a família (Eriksen & Persson 2007). Estas estruturas estão presentes em cinco dos onze gêneros que ocorrem no Brasil: *Caamembeca* J.F.B. Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl. e *Securidaca* L. (Pastore et al. 2012, Pastore 2012).

Desde os trabalhos de Chodat (1891) estas glândulas são mencionadas para Polygalaceae em estudos morfológicos e taxonômicos, sendo por muito tempo alvo de

especulação sobre serem ou não estípulas modificadas. Dickison (1973) foi o primeiro que estudou essas estruturas no gênero *Xanthophyllum* Roxb., verificando que estavam ligados ao traço foliar. No entanto, apenas em pesquisas recentes, Aguiar-Dias et al. (2011) por meio de seções anatômicas das glândulas nodais de *Caamembeca laureola* (A. St-Hil. & Moq.) J. F.B. Pastore (tratada anteriormente como *Polygala laureola* A.St-Hil. & Moq.) corroborando essas estruturas como estípulas e nomeando-as glândulas estipulares.

A ocorrência de glândulas de origem estipular em Polygalaceae é principalmente relevante na compreensão da evolução dos caracteres morfológicos na ordem Fabales (segundo a APG II 2003), uma vez que um dos principais caracteres distintivos entre Leguminosae e Polygalaceae é a presença/ausência de estípulas respectivamente (Aguiar-Dias et al. 2011). Além disso, estas glândulas tem óbvia importância nos estudos de interação ecológica da família. Entretanto, a origem, homologia, e descrição anatômica comparativa não estava estabelecida para os diferentes gêneros glandulares da família que ocorrem no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

• Material vegetal e observações de campo

Foram selecionadas uma espécie de cada gênero (*Caamembeca oleifolia* (A.St.-Hil. Moq.) J.F.B.Pastore, *Diclidanthera laurifolia* Mart., *Monnina exalata* A.W.Benn., *Moutabea guianensis* Aubl. e *Securidaca amazonica* Chodat), sendo amostrados, desta forma, todos os gêneros de Polygalaceae com glândulas estipulares que ocorrem no Brasil. As coletas foram feitas *in loco* com o material testemunha incorporado no Herbário MG, localizado no Campus de pesquisa do Museu Paraense Emílio Goldi, Belém-PA. Para verificar a ocorrência de glicose no exsudado das estruturas nodais utilizou-se Glicofita Plus®. Amostras dos insetos observados visitando as glândulas e coletando o exsudato foram preservadas em etanol 70%

para posterior identificação por especialista. As ilustrações de campo foram obtidas em câmera digital *Canon EOS Rebel T2I*

- **Microscopia de luz**

Amostras das regiões nodais das cinco espécies analisadas foram fixadas em FAA₅₀ durante 24 horas (Johansen 1940). O material isolado foi desidratado em série butílica (álcool butílico terciário), etílica (álcool etílico) e incluído em *Paraplast*® e Hidroxietil Metacrilato, respectivamente (historesin *Leica*®; Gerrits & Smid 1983). Cortes seriados transversais e longitudinais foram realizados em micrótomo rotativo, corados em safranina e azul de astra (Gerlach 1984) e azul de toluidina (O'brien et al. 1965), e montadas em resina sintética *Permout*®. As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio com câmera digital acoplada. Amostras também foram submetidas à luz polarizada com intuito de evidenciar constituintes celulares de natureza birrefringente.

- **Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos nectários extraflorais, amostras previamente fixadas em FAA (Johansen, 1940) foram desidratadas em série etílica crescente, secas pelo método de ponto crítico de CO₂ (Souza 1998), montadas em suportes metálicos e metalizadas com ouro em camada de 20 nm de espessura, por 150 segundos em corrente de 25 mA. As eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Leo modelo 1450 VP, com escalas micrométricas projetadas nas mesmas condições ópticas.

RESULTADOS

• Observações de campo e dados morfológicos

A quantidade de exsudato liberado pelas glândulas nos indivíduos observados não é profusa, apesar disso, foi detectado por meio do teste de Glicofita Plus®, a presença de glicose nas glândulas nodais, caracterizando essas estruturas como nectários extraflorais (NEF). Em campo, foi possível observar a presença constante de formigas visitando os NEFs. Estes foram classificados como pertencentes aos gêneros *Dolichoderus* Lund, 1831 e *Crematogaster* Lund, 1831 (Figuras 1A-L).

Em todas as espécies as glândulas estão localizadas na região nodal do caule, em pares opostos, próximas à base do pecíolo. Em *Caamembeca oleifolia*, alguns nós apresentavam três a quatro glândulas nodais (Figuras 2A-E). Quanto ao formato, estas mostraram-se distintas, *C. oleifolia* possui forma cilíndrica com base bojuda (Figuras 2A e F); *Securidaca amazonica* e *Diclidanthera laurifolia*, crateriforme orbicular (Figuras 2B, 2G, 2E e 2J); *Monnina exalata*, circular pequena (Figuras 2C e 2H) e *Moutabea guianensis* plana orbicular (Figura 2D e 2I).

Na região nodal de todas as espécies foi observada a ocorrência de tricomas tectores ornamentados de ápice afilado, todavia a superfície dos nectários é glabra (Figuras 2F-J). As glândulas de *Monnina exalata* apresentaram estômatos e papilas (Figura 2H). No ápice nectarífero de todas as espécies há um orifício central de formato orbicular por onde o néctar é liberado para o ambiente (Figuras 2F-J). Hifas de fungos foram encontradas nas glândulas de néctar, sobretudo próximas ao orifício nectarífero (Figura 1I).

• Estrutura anatômica das glândulas

Às espécies estudadas apresentaram, em estágio já desenvolvido, nectários com formato cilíndrico a arredondado (Figuras 3A-E).

Em seção longitudinal, todas as glândulas nodais possuem epiderme uniestratificada, composta em sua maioria por células de parede periclinais incrustadas de cutina, sobretudo em *Securidaca amazonica* e *Caamembeca oleifolia* (Figuras 3A-E). O exsudado é secretado por meio de um orifício orbicular localizado na epiderme dos nectários, formado um canal que se estende até as células do parênquima nectarífero, conectando-o com o meio ambiente para qual o néctar será liberado (Figuras 2F-J e 3A-E). As células que constituem o tecido nectarífero são em geral semelhantes em todas as espécies, apresentando formato esférico, parede delgada e núcleo evidente (Figuras 3A-D).

Por meio da análise dos cortes seriados dos nós caulinares, as glândulas nodais de todas as espécies foram confirmadas como pertencentes à folha e não ao caule (Figuras 4A-D e 5A-L). Observou-se que as glândulas têm sua origem nas extremidades do traço foliar, no qual, através de sucessivas divisões periclinais em direção a cada nectário, esses são constituídos por floema e xilema. Assim, embora os pares nectaríferos estejam localizados em posição nodal, eles estão de fato vinculados à folha, caracterizando-se como nectários estípules.

Em todas as espécies, as células do parênquima nectarífero ocuparam a posição medular e são delimitadas pela epiderme na região apical, por feixes de floema na região mediada, estando os elementos do xilema localizados apenas na região basal ao parênquima nectarífero (Figuras 5B, 5J-L). Todavia em *S. amazonica* o tecido xilemático se estende delimitando também a região mediana das células do parênquima nectarífero (Figuras 5E-F). Cristais são observados ao redor do tecido nectarífero em *Securidaca amazonica*, *Caamembeca oleifolia*, *Moutabea guianensis* e *Diclidanthera laurifolia* (Figuras 5A, 5E).

DISCUSSÃO

Em todas as espécies estudadas, os NEFs estão conectados ao traço foliar, corroborando com os estudos que sugerem que estas estruturas sejam na realidade estípulas modificadas (Dickison 1973, Aguiar-Dias et al. 2011). Aguiar-Dias et al. (2011) nomearam os nectários nodais presentes em *C. laureola* como nectários estipulares. No entanto, ainda não estava definido se as glândulas nodais em outros gêneros de Polygalaceae tinham também a mesma origem estipular.

O registro de nectários estipulares nas cinco espécies representativas dos gêneros brasileiros (distribuídos em duas tribos) fornece maiores evidências de que Polygalaceae possui estípulas modificadas nesse tipo de glândula. Esse conhecimento é relevante, pois incluída na ordem Fabales, Polygalaceae tem como caráter distintivo das demais famílias do clado a ausência de estípulas (APG II 2003, Souza e Lorenzi 2012). Assim, embora os gêneros apresentados não possuam estípulas em termos morfológicos, a análise anatômica da região nodal fornece indícios que as glândulas nodais representam estípulas modificadas de origem semelhante às encontradas em toda a ordem Fabales.

Estípulas modificadas são frequentemente presentes nas Angiospermas (Webberling 2006). Espécies do gênero *Prestonia* R.Br. (Apocynaceae) geralmente possuem estípulas modificadas em coléteres (Rio et al. 2002, Rio & Kinoshita 2005). Esse mecanismo de substituição ou transformação possibilita que diferentes estruturas, como no caso as estípulas, adaptem-se anatomicamente de acordo com a evolução e necessidade da espécie (Evert 2006), atuando como glândulas secretoras de néctar nos gêneros de Polygalaceae.

A presença de estruturas transformadas propicia a redução do custo energético para planta e possivelmente diminui o investimento de recursos no desenvolvimento de uma nova estrutura (Díaz-Castelazo et al. 2005). Melo et al. (2010) relatam a presença de NEFs para 35 espécies de Leguminosae sensu lato em áreas de Caatinga no Brasil, no qual NEFs originados

de outras estruturas modificadas estão presentes principalmente em Papilionoideae, grupo mais derivado da família.

É possível que a distribuição dos NEFs em Leguminosae esteja relacionada à evolução reprodutiva dos grupos (Polhil et al. 1981). Mimosoideae e Caesalpinioideae têm maior número de representantes com NEFs e possuem flores com caracteres plesiomórficos, cujos órgãos reprodutivos são mais expostos e susceptíveis às agressões ambientais (Polhil et al. 1981). Papilionoideae apresentam caracteres apomórficos, tendo seu aparato reprodutivo melhor protegido (Polhil et al. 1981), o que reduziria o investimento em recursos no desenvolvimento de NEFs não originados de estruturas modificadas (Melo et al. 2010) e investimento em NEFs modificados.

Todavia, em Polygalaceae, a presença de NEFs não está associada à morfologia papilionada das flores, já que ocorrem em *Moutabea*, que apresentam flores subactinomorfas e o gênero *Polygala*, que possui flores papilionoides, não apresenta NEFs. É provável que em Polygalaceae os NEFs nodais estejam associados à longevidade e forma de vida de seus gêneros, visto que são observados em espécies de maior porte e perenes, enquanto que em gêneros que possuem espécies herbáceas anuais, como *Polygala* e *Asemeia*, o investimento em NEFs parece não ser viável. Esse fato também explica a ausência de NEFs em outros gêneros de Polygalaceae.

Em todos os gêneros, os NEFs estipulares foram classificados como estruturados, quando o tecido vegetal se diferencia para formação a glândula (Castro & Machado 2006). Quanto à forma, apresentaram formato cilíndrico a arredondado. Eriksen (1993) afirma que a forma das glândulas nodais em Polygalaceae possuem valor taxonômico para o nível de espécie, enquanto que a posição dessas estruturas tem valor genérico. Anatomicamente, todas as glândulas nodais demonstraram um padrão semelhante, com parênquima nectarífero evidente e formação na epiderme, de um orifício orbicular conectando esse tecido ao meio

externo, para onde o néctar será liberado. *Moutabea guianensis* foi à espécie que apresentou estruturalmente nectários mais diferenciados. Ao contrário dos outros gêneros, os NEFs de *M. guianensis* encontram-se totalmente inclusos no parênquima caulinar. O que coincide com o fato de *Moutabea* pertencer a uma tribo diferente, Moutabeae. Como as duas tribos citadas possuem delimitação monofilética (Forest et al. 2007), infere-se que os padrões das glândulas nodais são homólogos e representam importantes caracteres taxonômicos para as tribos.

Sobre o tamanho das formigas e suas relações no combate à herbívora de plantas portadoras de NEFs, Cruz Neto (2009) estudou o comportamento de formigas separando-as pelo seu porte, observando que espécies de grande porte não apresentam comportamento de grupo, mas podem defender mais recursos por unidade de tempo que formigas pequenas. Por outro lado, indivíduos de porte pequeno geralmente se locomovem intensamente entre os órgãos das plantas patrulhadas, indicando que a área de forrageio por unidade de tempo para esse tipo de formiga possa ser maior que para as de grande porte (Cruz Neto 2009).

Tais padrões podem estar ligados a coevolução entre plantas com NEFs e formigas. Em *Moutabea guianensis* foram observadas apenas formigas do gênero *Crematogaster*, que não possuem grande porte comparadas a espécies do gênero *Dolichoderus*, encontradas em *Monnina*, *Caamembeca* e *Securidaca*. A coevolução envolvendo plantas e animais, em função da defesa ou polinização, possivelmente conduziu o surgimento dos NEFs (Polhill et al. 1981). Do ponto de vista evolutivo, existem mecanismos coevolutivos responsáveis que mantêm a especificidade entre os parceiros de interação (Dáttilo et al. 2009). Em Polygalaceae, essa coevolução está claramente ligada ao tamanho dos NEFs. No entanto, estudos ainda são necessários para uma melhor compreensão desse processo ecológico-evolutivo.

Segundo Fahn (1979) a liberação do néctar pode ocorrer através de estômatos, de tricomas ou por ruptura da cutícula. Em todas as espécies estudadas a liberação é feita por

meio de um orifício localizado ao centro do ápice nectarífero. No parênquima nectarífero, a seiva elaborada, proveniente do floema, transforma-se em pré-néctar e posteriormente em néctar, para que assim possa ser liberado para o ambiente, por meio de uma corrente de transpiração (Fahn 1979). A grande lignificação observada na parede da epiderme do nectário e das células parenquimáticas subjacentes a ela é uma ferramenta vegetal para a impermeabilização dessas células, impedindo que o néctar seja liberado por outro percurso que não o orifício central glandular (Fahn 1979).

Ressalta-se ainda que nos NEFs estipulares foram encontradas hifas de fungo próximas ao orifício central, como também observou Leitão et al. (2002), Francino et al. (2006), Paiva e Machado (2006) e Aguiar-Dias et al. (2011). Hocking e Pitt (2001) e Houbraken et al. (2006), afirmam que produtos ricos em carboidratos, como o néctar, são mais susceptíveis a presença de fungos.

Anatomicamente, com exceção de *S. amazonica*, o parênquima nectarífero dos NEFs estudados está delimitado apenas por extensões do feixe de floema, permanecendo o tecido xilemático posterior à base glandular, semelhante ao encontrado por Aguiar-Dias et al. (2011) em *C. laureola*, porém diferente do que foi observado por Francino et al. (2006) em *Chamaecrista trichopoda* (Benth.) Britton & Rose ex Britton & Killip (Caesalpinioideae) onde o floema e também o xilema cercam as células nectaríferas. Glândulas ligadas somente ao floema provavelmente possuem maior concentração de carboidratos no néctar (Castro et al. 2009); por sua vez, essa concentração relaciona-se diretamente a quantidade e o tipo de fauna visitante do vegetal (Corbet et al. 1979). Variações ambientais, como a temperatura e umidade, também influenciam na concentração de açúcar nesse tipo de glândula (Corbet et al. 1979).

Outro fato relevante foi a grande quantidade de drusas de oxalato de cálcio em todos os táxons deste estudo, todavia *S. amazonica* apresentou maior quantidade de drusas próximas

aos NEFs, sendo esta também, à única espécie no qual o floema delimita todo o parênquima nectarífero. Cristais de oxalato de cálcio podem estar relacionados à eliminação do excesso de cálcio citossólico, comum no floema e imediações dos tecidos secretores (Paiva & Machado 2006).

Os NEFs nodais não estão presentes em todos os gêneros de Polygalaceae (Pastore 2012), e, mesmo para aqueles que possuem essa estrutura, não há uma proximidade filogenética clara. Por exemplo, *Moutabea* (clado basal) e *Caamembeca* (clado derivado), compartilham a presença de glândulas nodais. Todavia *Asemeia*, que é um gênero derivado e mais próximo filogeneticamente à *Caamembeca*, não apresenta glândulas nodais visíveis. Nectários podem ser facilmente perdidos e/ou adquiridos durante a evolução (Sugiura et al. 2006, Heil 2011) e tantos os extraflorais como, possivelmente, os florais, são fenotipicamente muito plásticos (Mondor et al. 2006, Doak et al. 2007). A facilidade com a qual são obtidos e perdidos, conjuntamente com as diferentes pressões ambientais sobre sua funcionalidade, fornecem explicações para a diversidade mecanicista e estrutural nas espécies de Angiospermas (Heil 2011) e também pode explicar a sua ausência em alguns gêneros de Polygalaceae.

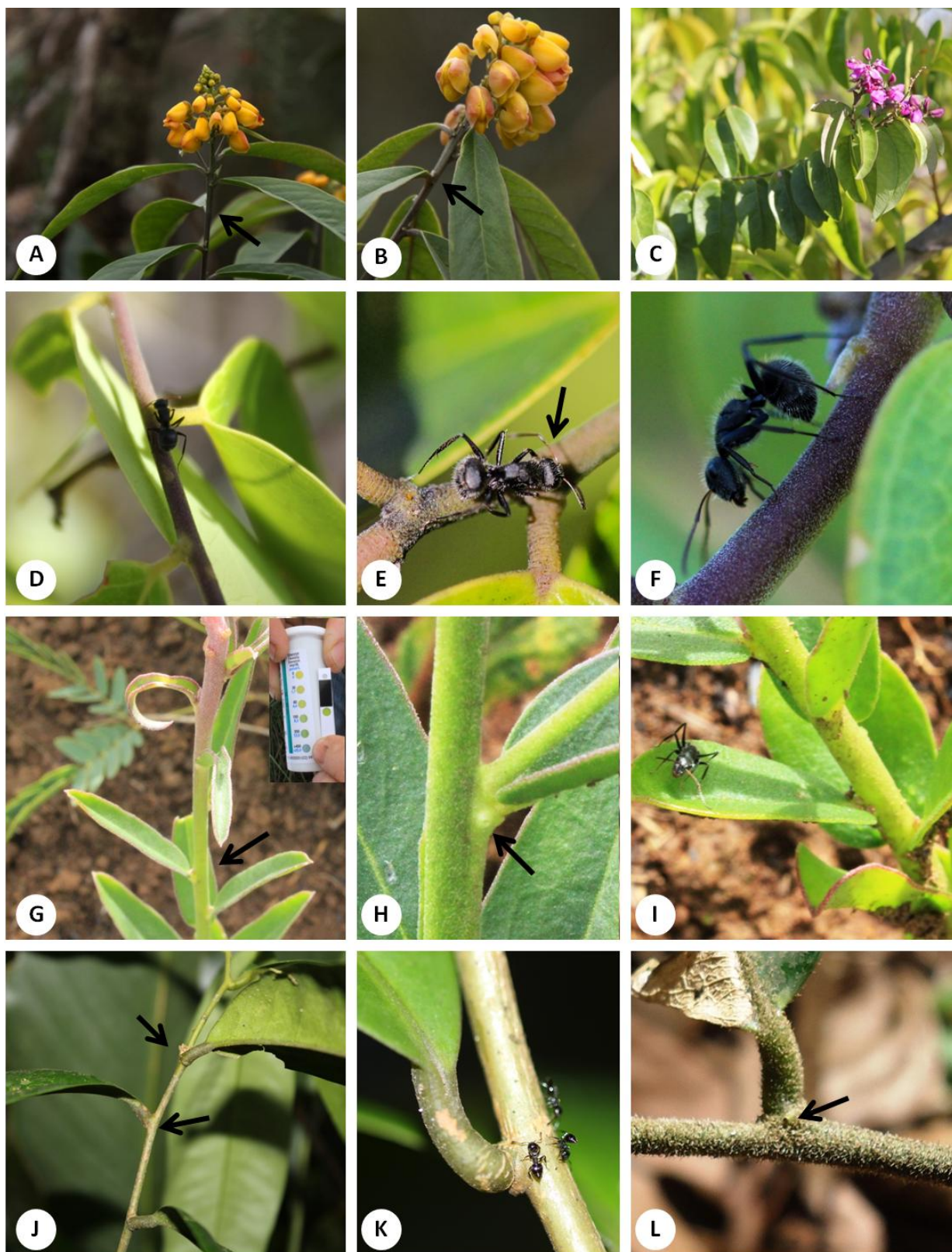


Figura 1:

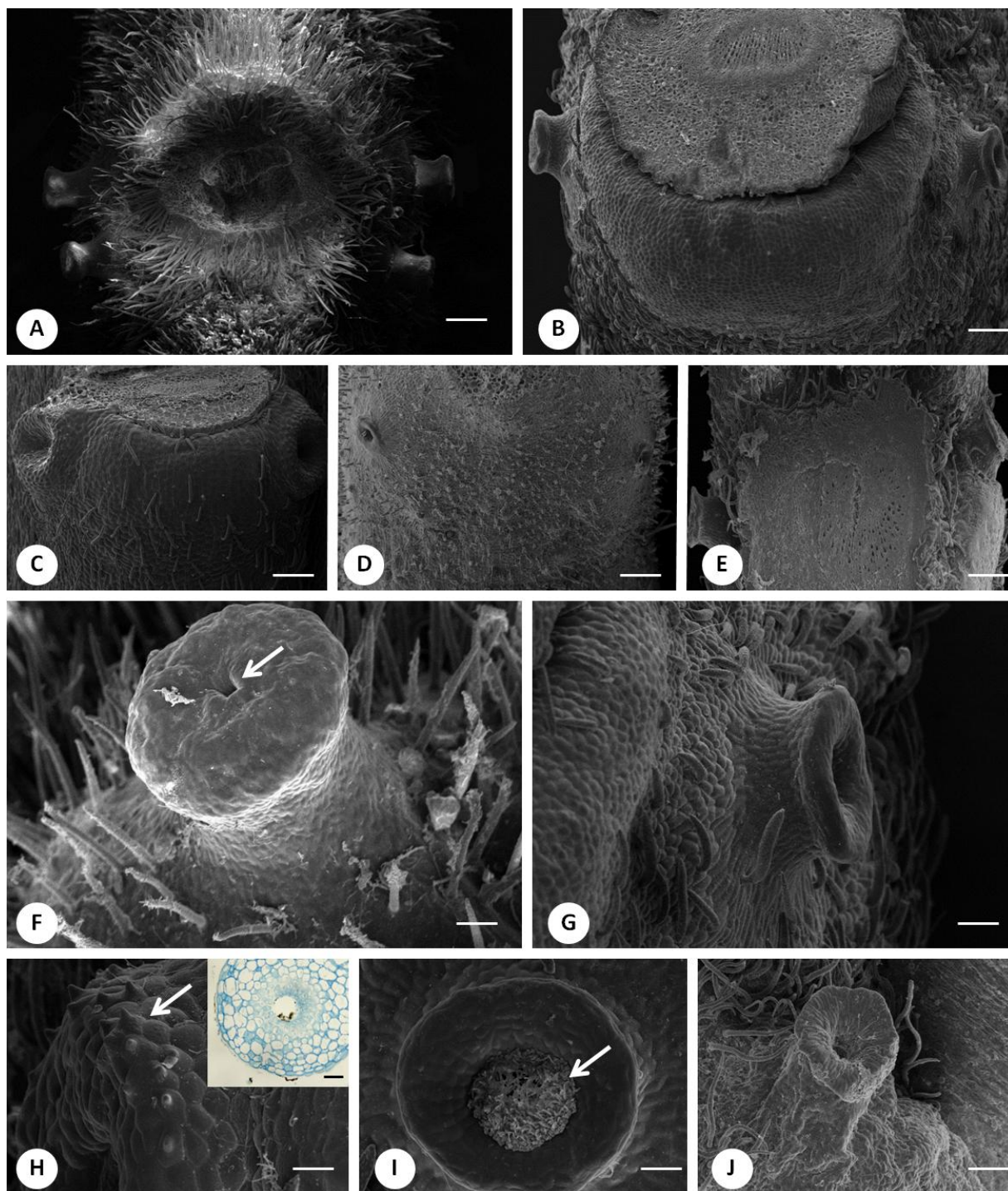


Figura 2:

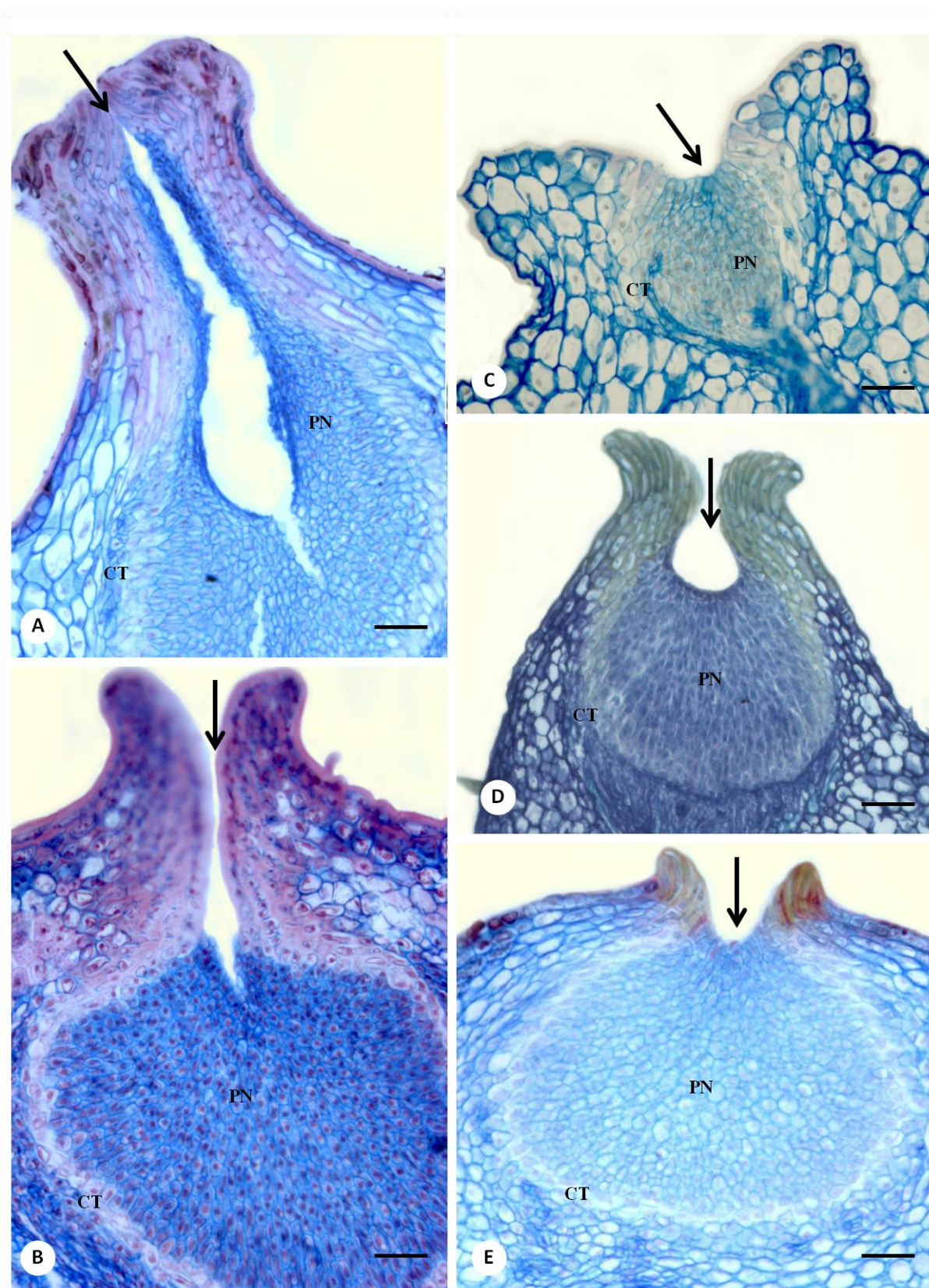


Figura 3:

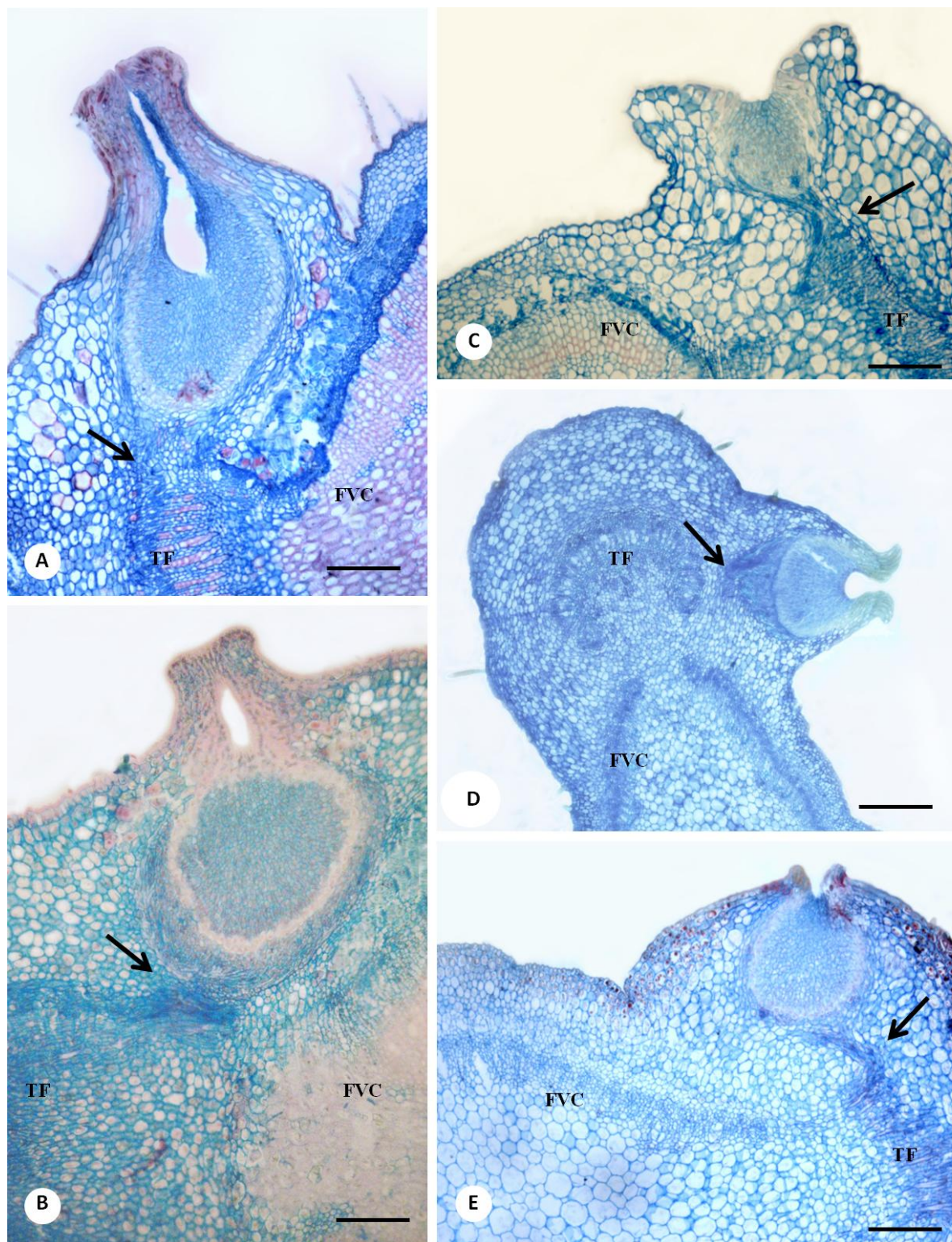


Figura 4:

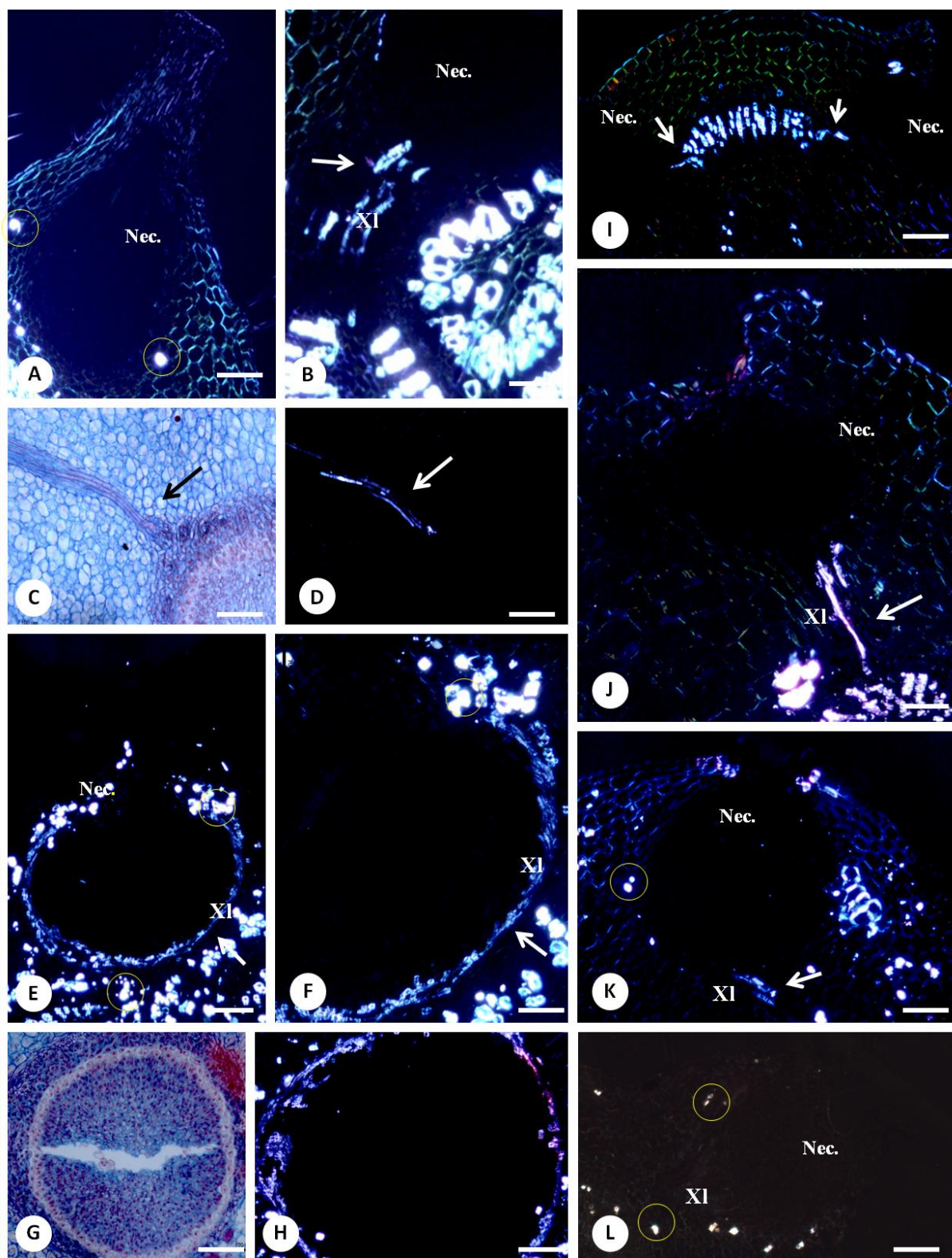


Figura 5:

LEGENDA DAS FIGURAS:

Figura 1: A-L: Localização dos nectários estipulares nas espécies de Polygalaceae. **A-B:** *Caamembeca oleifolia*. **C-F:** *Securidaca amazonica*. **C.** Vista geral da espécie. **D-E:** Formigas do gênero *Dolichoderus* frequentando os nectários nodais. **G-I:** *Monnina exalata*. **G.** Vista geral da espécie. Detalhe do teste da Glicofita feito em campo no *inset*. **H.** Localização do nectário. **I.** Formiga do gênero *Dolichoderus* frequentando a espécie. **J-F:** *Moutabea guianensis*. **J.** Vista geral. **K.** Detalhe da localização nodal dos nectários. **L.** *Diclidanthera laurifolia*, localização na glândula. Setas: Região nodal, no qual é localizada a glândula.

Figura 2: A-J: Eletromicrografia de varredura dos nectários estipulares em espécies de Polygalaceae. A e F: *Caamembeca oleifolia*. **A.** Vista geral. **F.** Formato cilíndrico com base bojuda da glândula. Seta apontando o orifício por qual o néctar será secretado. **B e G:** *Securidaca amazonica* **B:** Vista geral da localização nodal dos nectários. **G.** Formato cilíndrico com base bojuda. Seta indicando orifício nectarífero. Notar tricomas tectores na base. **C e H.** *Monnina exalata* **A.** Vista geral, notar formato cilíndrico da glândula. **H.** Papilas na superfície do nectário (seta). Detalhe do estômato na epiderme da glândula no *inset*. **D e I:** *Moutabea guianensis*. **D.** Vista geral do nectário. **I.** Notar hifas de fungo no orifício do nectarífero (seta). E e J: *Diclidanthera laurifolia*. **E.** Vista geral da localização das glândulas. **J.** Aspecto geral, formato cilíndrico do nectário. Barras: A: 500µm; B, D, E: 300µm; C: 400µm; F: 80µm; G: 120µm; H: 100µm; I: 50µm; J: 150µm.

Figura 3: A-E: Aspecto geral da estrutura dos nectários estipulares, em seção longitudinal, de espécies de Polygalaceae. **A.** *Caamembeca oleifolia*. Notar células nectaríferas em processo de lise. **B.** *Securidaca amazonica*. **C.** *Monnina exalata*. **D.** *Diclidanthera laurifolia*. **E.** *Moutabea guianensis*. Siglas: PN: parênquima nectarífero, CT: células transitórias. Barras: A-E: 100 µm.

Figura 4: A-E: Região nodal em seção transversal. Destaque para conexão entre o nectário estipular e o traço foliar em cinco espécies de Polygalaceae (seta). **A.** *Caamembeca oleifolia*. Notar células nectaríferas em processo de lise. **B.** *Securidaca amazonica*. **C.** *Monnina exalata*. **D.** *Diclidanthera laurifolia*. **E.** *Moutabea guianensis*. Siglas: TF: Traço foliar, FVC: Feixe vascular caular. Barras: A-E: 200 µm.

Figura 5: A-L: Nectário estipular de cinco espécies de Polygalaceae sob luz polarizada. **A-D:** *Caamembeca oleifolia*. **A.** Vista geral. **B.** Detalhe da região basal do nectário, notar feixe de xilema localizado apenas nessa região (seta). **C-D:** Região basal do nectário em seção transversal, evidenciando feixe colateral (seta). **E-F:** *Securidaca amazonica*. **E.** Vista geral. **F.** Detalhe do parênquima nectarífero, notar xilema delimitando todo esse tecido. **G-H:** Região basal do nectário em seção transversal, notar feixe colateral. **I-J:** *Monnina exalata*. **I.** Vista geral dos nectários. Notar traço foliar (seta) em direção as glândulas. **J.** Detalhe do feixe colateral, notar xilema apenas na região basal a glândula. **K.** *Moutabea guianensis*, vista geral, evidenciando feixe colateral a base do nectário. **L.** *Diclidanthera laurifolia*, notar cristais de oxalato de cálcio próximos ao nectário. Siglas: Xl: xilema, Nec: nectário. Barras: A, B, E e I: 200 µm; C, D, F, G, H, J, K e L: 100 µm

REFERENCIAS

- Aguiar-Dias ACA, Yamamoto K, Castro MM. 2011. Stipular extranuptial nectaries new to *Polygala*: morphology and ontogeny. Botanical Journal of the Linnean Society, 2011, 166, 40-50.
- Aguiar-Dias ACA, Yamamoto K, Castro, MM. 2012. Anatomia foliar de cinco espécies de *Polygala* de restinga e cerrado. Rodriguésia 63(2): 395-404.
- APG II (Angiosperm Phylogeny Group). 2003. Botanical Journal of the Linnean Society 141: 1-399.
- Blüthgen N, Reifenrath K. 2003. Extrafloral nectaries in an Australian rain forest: structure and distribution. Australian Journal of Botany. 51:515-527.
- Castro EM, Pereira FJ, Paiva R. 2009. Histologia vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos. Lavras. UFLA. 234 p. ISBN 978-86-87692-79-5
- Castro MM, Machado SR. 2006. Células e tecidos secretores. In Appezzato da-Glória, B. e Carmello Guerreiro, S. M. (eds.) Anatomia vegetal. 2ed. Ed. UFV, Viçosa.
- Chodat RH. 1891. Sur la distribution et l'origine Polygalacées. Archives des Sciences Physiques et Naturelles. 25: 695-714.
- Corbet SA, Unwin DM, Prys-Jones OE. 1979. Humidity, nectar and insects visits to flowers, with special reference to *Crataegus*, *Tilia* and *Echium*. Ecological Entomology. 4:9-22.
- Cruz-Neto, O. 2009. Mirmecofilia em *Passiflora coccinea* (Passifloraceae): relação entre a distribuição de nectários extraflorais e o tamanho das formigas. Relatório do Projeto:

Dinamica biológica de fragmentos florestais. INPA Acessado em 03 de novembro de 2011 <
http://pdbff.inpa.gov.br/cursos/efa/livro/2009/pdf/km41/relat_final_oswaldo.pdf>

Dáttilo WFC, Marques EC, Falcão JCF, Moreira DDO. 2009. Interações mutualísticas entre formigas e plantas. EntomoBrasilis, v. 2, p. 32-36, Meio de divulgação: Digital. Série: 2. ISSN/ISBN: 19830572.

Díaz-Castelazo C, Rico-Gray V, Ortega F, Ángeles G. 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of Coastal Veracruz, Mexico. Annals of Botany 96(7): 1175-1189.

Dickison WC. 1973. Nodal and leaf anatomy of *Xanthophyllum* (Polygalaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 67: 103-115.

Doak P, Wagner D, Watson A. 2007. Variable Extrafloral nectary expression and its consequences in quaking aspen. Canadian Journal Botany. 85. 1-9.

Eriksen B, Persson C. 2007. Polygalaceae. In: K. Kubitzki (ed.). The Families and Genera of Vascular Plants vol. IX. Springer. Verlag, Berlin. pp. 345-363

Eriksen B. 1993. Phylogeny of the *Polygalaceae* and its taxonomic implications. Plant Systematics and Evolution 186: 33-55.

Evert RF. 2006. Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body – Their structure, function, and development. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Fahn A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, London.

Francino DMT, Santanna-Santos BF, Silva KLF, Thadeo M, Meira RMSA, Azevedo AA. 2006 Anatomia foliar e caulinar de *Chamaecrista trichopoda* (Caesalpinioideae) e histoquímica do nectário extrafloral. Planta daninha. vol.24 no.4

- Forest F, Chase MW, Persson C, Crane PR, Hawkins JA. 2007. The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). *Evolution* 61: 1675,1694.
- Gerlach D. 1984. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme.
- Gerrids PO, Smid L. 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol Methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132(1): 81-85.
- Heil M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, v. 16, No. 4.
- Hocking AD, Pitt JIM. 2001. *In*: Moir CJ, Andrewkabilafkas C, Arnold G, Cox BM, Hocking AD, Jenson I. *Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis*. Australia: AIFST, p. 361-381
- Houbraken J, Samson RA, Frisvad J.C. 2006. Byssochlamys: significance of heat resistance and mycotox in product ion. *Advances in Food Mycology*, New York, v. 571, n. 3, p. 211-224. PMID: 16408604.
- Johansen D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, Mcgraw-Hill.
- Judd WS, Campbell CS, Kellongg EA, Stevens PF, Donogue, M.J. 2009. *Sistemática vegetal: um Enfoque Filogenético*, 3. ed., Porto Alegre, RS. Atmed Editora.
- Leitão CAE, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM. 2002. Ontogenia dos nectários extraflorais de *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae). *Planta daninha*. Vol.20 no.3
- Lubbock, Sir J. 1898. On buds and stipules. London Kegan Paul, Trench, Teubnee & co. Ltd Paternostek House, Chaeing cross road. p.192-194.

- Melo Y, Córdoba E, Machado SR, Alves M. 2010. Morfologia de nectários em Leguminosae senso lato em áreas de caatinga no Brasil. *Acta botânica brasílica*. 24(4): 1034-1045.
- Mondor EB, Tremblay MN, Messing RH. 2006. Extrafloral nectary phenotypic plasticity is damage and resource dependent in *Vicia faba*. *Biology hett*. 2. 583-585.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. 2007. Nectaries and nectar. Springer.
- O'brien TP, Feder N, Mccully ME. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59: 368-373.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). *Acta botânica brasílica*, 20(2): 471-482
- Paiva, JAR. 1998. *Polygalarum Africanum et madagascariensium prodromus atque gerontogaei generis Heterosamara Kunt-ze, a genere Polygala segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica*. Fontqueria 50: 1-346.
- Pastore JF, Marques MCM, Medeiros ES, Ludtke R. 2012. *Polygalaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000195>. Acessado 2013 Dez 20.
- Pastore JFB. 2012 *Caamembeca*: generic status and new name for *Polygala* subgenus *Ligustrina* (Polygalaceae). *Kew bulletin*. 67:1-8.
- Polhill RM, Raven PH, Stirton CH. 1981. Evolution and Systematics of the Leguminosae. Pp: 1-26. *In*: Polhill RM, Raven PH (eds). *Advances in Legumes systematic Part 1*. Kew Royal Botanic Gardens

- Rio MCS, Castro MM, Kinoshita LS. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista brasileira de botânica., V.25, n.3, p.339-349
- Rio MCS, Kinoshita LS. 2005. *Prestonia* (Apocynaceae) no Sul e Sudeste do Brasil. Hoehnea 32(2): 233-258.
- Souza VC, Lorenzi H. 2012. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p.313-317.
- Souza W. 1998. Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. p.1-44.
- Sugiura S, Tetsuto A, Shun'ichi M. 2006. Loss of extrafloral nectary on an oceanic island plant and its consequences for herbivory. American Journal of Botany 93(3): 491–495.
- Tyler AA. 1897. The nature and origin of stipules. Annals of the New York Academy of Sciences 10: 1-49.
- Weberling F. 2006. Las estípulas como caracteres sistemáticos confiables. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 41(1-2): 127-150.

Capítulo 2

NECTÁRIOS ESTÍPULARES EM *Moutabea guianensis* Aubl.: ESTRUTURA E ASPECTOS FUNCIONAIS

JOANA PATRÍCIA PANTOJA SERRÃO FILGUEIRA²; ANA CRISTINA ANDRADE DE AGUIAR-DIAS²; DIEGO DEMARCO³

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi. Av. perimetral, 1901. – Terra Firme, 66077-530, Belém – PA. Autor para correspondência: joanapfilgueira@gmail.com

² Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Rua Augusto Corrêa. 66075-110, Belém– PA.

³ Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Rua do Matão, 277. 05508-090, São Paulo – SP.

RESUMO: Nectários extraflorais (NEF) estão geralmente associados à proteção que conferem à planta contra herbivoria. Em Polygalaceae, NEFs localizados na região nodal são encontrados em mais de um terço dos gêneros. A presença desse tipo de estrutura é objeto de investigações ecológicas e filogenéticas. Mesmo com grande importância, há uma carência de estudos sobre a secreção, ultraestrutura e processo secretor dessas glândulas. Diante da importância dessas estruturas, investigou-se a estrutura e os mecanismos de secreção do néctar nos NEFs nodais de *Moutabea guianensis* Aubl. Para isso, amostras nodais foram coletadas, fixadas e processadas de acordo com os métodos usuais para microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Observações de campo possibilitaram o registro de insetos visitantes. Formigas do gênero *Crematogaster* Lund, 1831 foram frequentemente observadas nos NEFs nodais e percorrendo toda a planta. Cortes anatômicos seriados da região nodal, apontaram que as glândulas têm sua origem nas extremidades do traço foliar, estando de fato vinculadas às folhas, caracterizando-as como nectários estípules. Estruturalmente possuem epiderme uniestratificada, com presença de um orifício orbicular conectando o tecido nectarífero com o ambiente para qual o néctar será exsudado. As células do tecido nectarífero têm formato esférico, parede delgada, núcleo evidente e são delimitadas por uma camada de células suberizadas. A análise ultraestrutural evidenciou que células do parênquima nectarífero, em fase secretora, possuem vacuoma proeminente com vacúolos de diversos tamanhos, todos com conteúdo floculado. Mitocôndrias, plasmodesmos e retículo endoplasmático também estão presentes em grande quantidade. Muitas vesículas foram observadas translocando a secreção de uma célula para a outra em direção ao orifício do nectário.

Palavras-chave: Estruturas-secretoras, estípulas modificadas, Polygalaceae, ultraestrutura.

ABSTRACT: Extrafloral nectaries (NEF) are usually associated with conferring protection to the plant against herbivory. In Polygalaceae, the EFN positioned in the nodal region are found in more than a third of genus. The presence that type of structure is the object of not only ecological but also phylogenetic investigations. Recent studies indicate that the nodal EFNs of *Caamembeca* J.F.B. Pastore, are actually modified stipules. However little is known about possible stipulate origin in the other family's genus. Due the importance of these structures, was investigated the origin and the mechanisms of nectar secretion of EFN on nodal *Moutabea guianensis* Aubl. For this, nodal samples were collected, fixed and processed according to the usual methods for light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Field observations allowed the recording of visiting insects. Ants of the *Crematogaster* Lund genus, 1831 were frequently observed on nodal EFN and walking on the plant. Anatomical serial sections of nodal region indicated that the glands have their origin at the ends of leaf trace, being in fact linked to the leaves, characterizing them as stipular nectaries. Structurally it has uniseriate epidermis, with an orbicular orifice connecting the nectary tissue with the environment, where the nectar will flow. The cells of the tissue nectariferous have circular shaped, with thin walls, large nucleus and are surround by a layer of cutinized cells. The ultrastructure showed that the nectariferous parenchyma cells in the secretory phase have bulky vacuoles surrounded by several other smalls vacuoles, both with floc content. Mitochondria, plasmodesmata and endoplasmic reticulum were also observed and vesicles indicated a *granulocrine* release.

Keywords: Secretory structures, modified stipules, Polygalaceae, ultrastructure.

INTRODUÇÃO

Nectários extraflorais (NEF) são estruturas secretoras que podem estar localizadas no caule, folhas, pedicelos das flores e frutos, eixo das inflorescências, brácteas e bractéolas (Castro & Machado 2006).

Quanto à função, podem ser classificados como nectários nupciais (NN), se associados diretamente à polinização ou nectários extranupciais (NEN), quando não possuem relação com esse processo, ainda que localizados próximos às estruturas reprodutivas da planta (Castro & Machado 2006). Uma das interações que se busca entender envolvendo plantas com NEFs, é o mutualismo com outros animais, em especial as formigas. Nessa associação os NEFs atuam na proteção contra a herbívora de maneira indireta, pela ação das formigas visitantes que em troca do néctar extrafloral e combatem insetos herbívoros maiores (Buckley 1983, Bronstein et al. 2006, Bronstein 2009).

Polygalaceae é uma família cosmopolita (Ludtke et al. 2013), na qual a presença de NEFs é relatada para o limbo foliar, raque floral e nós de vários gêneros (Eriksen & Persson 2007). Todavia, estudos que enfoquem essas estruturas ainda são poucos.

Aguiar-Dias et al. (2011) observaram a ocorrência de uma relação inseto-plantas entre indivíduos de *Caamembeca laureola* (A.St.-Hil. & Moq.) J.F.B.Pastore e formicídeos do gênero *Paratrechina*, que coletam o néctar secretado pelos NEFs nodais dessa espécie. Além do valor ecológico, esses nectários nodais possuem um importante papel taxonômico e filogenético para Polygalaceae. Pois devido à ligação dessas estruturas com o traço foliar, foi visto que se tratam de estípulas modificadas (Aguiar-Dias et al. 2011).

A ocorrência de nectários de origem estipular é extremamente relevante. Marques & Peixoto (2007), interpretaram estas glândulas como nectários, porém as consideraram pertencentes ao caule e não à folha. Já para os estudos filogenéticos, ressalta-se que incluída

em Fabales (APG III 2009), a família possui como caráter distintivo dos outros clados da ordem, a ausência de estípulas (Souza & Lorenzi 2012).

No Brasil, as glândulas nodais estão presentes em cinco dos 11 gêneros de Polygalaceae (*Caamembeca* J.F.B. Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl., *Securidaca* L.) (Pastore et al. 2012), sendo até o momento *Caamembeca*, o único gênero que esse tipo de investigação já foi realizada.

O fato de ter sido verificada a ocorrência de estípulas modificadas em uma espécie de Polygalaceae, não quer dizer que este seja um caráter presente em todos os grupos com glândulas nodais. Logo, investigar a origem dessas glândulas em mais de um gênero, proporcionará um melhor entendimento destas na história evolutiva da família, pois características anatômicas são de grande importância não só para o conhecimento e identificação das espécies, mas para a elaboração de padrões filogenéticos (Judd et al. 2009).

Os estudos feitos até o momento abordaram os nectários nodais apenas com critérios morfoanatômicos, pouco se conhece sobre sua ultraestrutura e os mecanismos de transporte do néctar. Diante do exposto, se investigou a origem, estrutura e ultraestrutura das glândulas nodais presentes em *Moutabea guianensis* Aubl., para verificar a ocorrência de glândulas estipulares em mais de um gênero de Polygalaceae, como também compreender os mecanismos envolvidos no transporte e liberação do néctar.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de *Moutabea guianensis* Aubl., foram coletadas no *Campus* de Pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Botânica, Belém, PA (1°27'5,69"S e 48°26'40,38"O) com exsicata depositada no acervo do herbário MG, sob o registro MG. Formigas visitando as glândulas nodais foram coletadas e preservadas em álcool etílico 70% para posterior identificação por especialista.

No estudo estrutural, amostras das regiões nodais em início de desenvolvimento e plenamente desenvolvidas foram fixadas em FAA₅₀ e FNT, desidratadas em série butílica (Johansen 1940) e incluídas em Paraplast. Seções seriadas transversais e longitudinais foram feitas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo Leica® RM 2245) e posteriormente coradas com Safranina e Azul de Astra (Gerlach 1984). Amostras também foram submetidas à desidratação em série etílica, incluídas em metacrilato (Gerrits & Smid 1983) e coradas em azul de Toluidina (O' brien et al. 1965). Quatro testes histoquímicos foram realizados: reação PAS, para detectar a presença de carboidratos (McManus 1948); Sudan IV, para lipídeos (Pearse 1980); Cloreto Férrico, para compostos fenólicos (Johansen 1940); e Reagente de Dragendorff (Yoder & Mahlberg 1976), para alcaloides.

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras previamente fixadas em FAA (Johansen 1940) foram desidratadas em série etílica crescente, secas pelo método de ponto crítico de CO₂ (Souza 1998), montadas em suportes metálicos e metalizadas com ouro.

O material destinado às análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi fixado em glutaraldeído por 24h, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2, desidratado em série cetônica, para posterior inclusão em resina Spurr (Roland 1978). Secções ultrafinas foram feitas e contrastadas com acetato de uranila (Watson 1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963).

As fotomicrografias foram realizadas com auxílio de câmera fotográfica digital *Canon PowerShot A660IS*, acoplada ao microscópio *Zeiss Axiostar plus* e microscópio eletrônico modelo *Zeiss EM 900*. Alguns cortes foram submetidos à luz polarizada para evidenciar constituintes celulares de natureza birrefringente. As eletromicrografias de varredura foram obtidas por captura em microscópio Leo (modelo 1450 VP), que opera com *Software* Leo e as imagens de campo com câmera digital *Canon EOS Rebel T2I*.

RESULTADOS

✓ **Dados morfológicos**

Os nectários extraflorais (NEFs) de *Moutabea guianensis* foram, em sua maioria, observados na região nodal do eixo caulinar (Figuras 1A-B), em pares opostos à base do pecíolo (Figuras 3A-B). Raramente, em ramos mais jovens, apenas uma glândula é encontrada (Figuras 1A-B). O exsudato liberado pelos nectários nos indivíduos analisados não foi evidente, porém se observou a presença constante de formigas do gênero *Crematogaster* Lund, 1831 visitando as glândulas e percorrendo toda a planta (Figuras 1C-D).

Ao microscópio eletrônico de varredura, os NEFs possuem formato plano orbicular, com aproximadamente 0,01 - 0,02 mm de comprimento e 0,01 - 0,02 mm de largura (Figuras 3C-D). A região apical do nectário é plana rugosa, com orifício central arredondado. Hifas de fungo foram constatadas próximas a esse orifício nectarífero (Figuras 2B e 3C-D). Tricomas tectores de ápice afilado ocorrem apenas na base dos nectários, sendo a superfície das estruturas glabra (Figuras 2A-C e 3B).

✓ **Estrutura do nectário em desenvolvimento**

No início de seu desenvolvimento, os nectários possuem morfologia semelhante ao das glândulas já adultas, embora seus tecidos ainda apresentem aspecto meristemático (Figuras 1B-C). As células do meristema fundamental que irão originar o parênquima nectarífero estão, através de sucessivas divisões anticlinais e periclinais, em processo de formação e já é possível notar a diferenciação de um cordão procambial oriundo do traço foliar em direção a elas (Figuras 1C-D). Nesse estágio não é possível observar a presença da camada celular diferenciada envolvendo as células do parênquima nectarífero, todavia o orifício localizado na glândula já está formado (Figuras 1D-E).

✓ **Estrutura do nectário adulto**

Os NEFs nodais possuem, em seção longitudinal, epiderme nectárfera uniestratificada, composta por células de paredes periclinais e anticlinais recobertas por cutina na região central formando um orifício orbicular (Figuras 3E; Tabela 1). O parenquimático nectarífero é constituído por células esféricas, de parede delgada e núcleo evidente, sendo ele totalmente cercado por uma camada de células diferenciadas com paredes anticlinais suberizadas (Figura 3E-F; Tabela 1).

Por meio de cortes seriados da região nodal, verificou-se que os NEFs têm sua origem nas extremidades do traço foliar, através de divisões periclinais sucessivas no sentido de cada nectário (Figura 3F-G). Assim, embora os pares nectaríferos estejam localizados em posição nodal, eles estão de fato vinculados à folha, caracterizando-os como NEFs estipulares.

As células do parênquima nectarífero estão delimitadas por um feixe colateral na porção basal, por apenas elementos do floema na região mediada e pela epiderme nectárfera na região apical (Figuras 3E-G).

✓ **Ultraestrutura e histoquímica**

As células do parênquima nectarífero, em fase secretora, apresentam vacuoma composto por um vacúolo volumoso, cercado por vários outros vacúolos de menor tamanho, todos com conteúdo floculado (Figuras 4A-B). Estruturas vesiculares são observadas próximas ao tonoplasto dessas organelas (Figuras 4B-C).

O restante do citoplasma dessas células é comprimido por essa rede de grandes vacúolos à periferia celular, localizando-se próximo à membrana plasmática (Figuras 4A-B). Nele é notada a presença de muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e leucoplastas com estroma denso e sistema de membranas internas pouco diferenciadas (Figuras 4E). A

parede celular primária é fina, com muitos plasmodesmos que interligam todas as células do parênquima nectarífero e conferem a ela um aspecto fenestrado (Figuras 4C, E-F).

As células do parênquima nectarífero responderam negativamente para os testes de Sudan IV, Reagente de Dragendorff e Cloreto férrico. Enquanto que apontaram resultado positivo apenas para a reação de PAS (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A confirmação de nectários estipulares para mais de um gênero de Polygalaceae é um dado relevante, que corrobora a hipótese de presença de estípulas modificadas na família (Aguiar-Dias et al. 2011). A ausência de estípulas era um dos caracteres distintivos entre Polygalaceae e as demais famílias que compõe a ordem Fabales (Souza & Lorenzi 2012).

Estípulas modificadas são encontradas em muitas espécies de Angiospermas (Weberling 2006). Esse mecanismo de substituição ou transformação possibilita que diferentes estruturas, como no caso as estípulas, exerçam anatomicamente uma nova função de acordo com a evolução e necessidade da espécie (Evert 2006). A presença de estruturas adaptadas proporciona a redução do custo energético na planta e possivelmente limita o investimento de recursos no desenvolvimento de uma nova estrutura (Díaz-Castelazo et al. 2005).

A constante presença de formigas do gênero *Crematogaster* visitando os NEFs estipulares e percorrendo toda a planta, aponta a existência de uma relação mutualística entre estas e os espécimes de *M. guianensis*. Formigas desempenham importante função na proteção contra a herbivoria, detendo outros organismos maiores que reduzem a capacidade reprodutiva das plantas (Bronstein et al. 2006, Bronstein 2009, Dáttilo et al. 2009). A ocorrência de espécies de *Crematogaster* em plantas com NEFs é constantemente relatada em diversos estudos que reforçam o potencial de defesa contra herbivoria proporcionado por

essas formigas (Quinet 2007, Nishimura 2009). Aguiar-Dias et al. (2011) observaram uma relação entre espécimes de *Caammembeca laureola* e formigas do gênero *Paratrechina* Motschoulsky, 1863.

Os NEFs estipulares possuem tecido nectarífero bem definido com arranjo celular típico de células secretoras de néctar.

O néctar é exsudado por um orifício localizado ao centro da epiderme nectarífera e que forma um pequeno canal entre as células do parênquima nectarífero e o meio ambiente. A liberação do néctar pode ocorrer por diversos mecanismos. Nas células secretoras de *Lonicera japônica* Thunb. a liberação do nectár ocorre por meio da ruptura da cutícula que recobre a epiderme nectarífera (Fahn & Rachmilevitz 1970), enquanto que Davis & Gunning (1992) e Nepi et al. (1996) relataram a liberação do exsudado nectarífero através de estômatos modificados.

A presença de células com alta deposição de suberina envolvendo o tecido nectarífero provavelmente tem como função impedir o refluxo do néctar para o parênquima fundamental, prevenindo sua passagem via apoplasto e restringindo sua passagem ao simplasto (Paiva & Machado 2006, Melo et al. 2010), hipótese reforçada pela grande quantidade de plasmodesmos observados nas células do parênquima nectarífero. Essas células suberizadas também podem proporcionar proteção contra patógenos (Taiz & Zeiger 2009).

Nas análises estruturais é notada a presença de grandes vacúolos ocupando considerável volume da célula, aspecto comum encontrado em células parenquimáticas nectaríferas (Kraus et al. 2006). O fato de não ter sido observado substâncias eletro densas nessas organelas indicam que estas não armazenam substâncias lipofílicas, fato confirmado pelo resultado positivo para o teste histoquímico de PAS.

Fahn (1988) propõe dois métodos possíveis de secreção do néctar: écrina e granulócrina. No primeiro, moléculas são transportadas por passagem direta (passiva) pela

membrana. Já no segundo, a secreção é transportada ativamente dentro vesículas até a sua liberação para o exterior da célula (Fahn 1979). O fato de terem sido observadas vesículas no citoplasma das células do parênquima nectarífero, fundindo-se à membrana plasmática e liberando a secreção contida nelas para fora do protoplasto, sugere que mecanismo de secreção do néctar em *M. guianensis* é granulócrino.

Algumas organelas foram bastante evidentes, como mitocôndrias em grande quantidade, fato comum em células secretoras, estando relacionado à produção de energia para o processo de biossíntese (Kraus et al. 2006), leucoplastos e retículo endoplasmático liso que estão frequentemente envolvidos na produção de lipídios, porém, possivelmente, este último também está relacionado ao transporte de néctar no meio intracelular. Heinrich (1975) afirma que esta organela está atuando ativamente no transporte de néctar, visto que existe uma alta atividade de ATPase, nucleosídeo difosfatase e glucose-6-fosfatase no retículo endoplasmático dos nectários de *Aloe* L., e geralmente não há atividade destas fosfatases na membrana plasmática. O mesmo é apontado por Fahn (1988) e Stpiczyńska et al. (2005), ao afirmarem que o predomínio de retículo liso está associado ao metabolismo de lipídios, bem como o transporte de precursores do néctar, como ocorre em diversas estruturas secretoras destes compostos.

Os resultados encontrados nesse estudo permitem apontar o mecanismo de secreção do néctar e somados a outras características, como a constante presença de formigas podem ajudar a entender a função dessas estruturas em *Moutabea*, auxiliando também em futuros estudos químicos, taxonômicos e aprofundamentos ecológicos sobre os nectários estipulares de Polygalaceae e contribuir para o entendimento da filogenia do grupo.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Nectários estipulares em *Moutabea guianensis*: **A-B.** Localização nodal dos NEFs (seta); **C.** Formigas do gênero *Crematogaster* predando um inseto maior; **D.** Formigas *Crematogaster* próximas aos NEF nodais.

Figura 2: Nectários estipulares em fase meristemática de *Moutabea guianensis*: **A-B:** Microscopia eletrônica de varredura; **A.** Localização nodal do NEF; **B-C** **B.** Detalhe do nectário, notar hifas e estômatos na região caulinar (setas); **C.** Vista geral do NEF meristemático, notar traço foliar (seta); **D.** Estrutura do nectário meristemático, detalhe para feixe procambial oriundo do traço foliar (seta) e aspecto meristemático das células do parênquima nectarífero; **E.** Detalhe das células do ápice nectarífero com orifício já formado. Abreviações: nef: nectário extrafloral; tf: traço foliar.

Figura 3: Nectários estipulares em *Moutabea guianensis*: **A.** Localização nodal dos NEFs; **B-D:** Microscopia eletrônica de varredura; **B.** NEFs em vista geral **C-D.** Detalhe dos nectários, notar hifas próximas e néctar no orifício nectarífero; **E.** Estrutura do nectário; detalhe da camada de células cutinizada no *inset* **F-G.** Nectário estipular ligado ao traço foliar. Abreviações: pn: parênquima nectarífero; cc: células cutinizadas; FCo: feixe colateral; fc: feixe caulinar; tf: traço foliar.

Figura 4: Ultraestrutura dos nectários estipulares em *Moutabea guianensis*: **A.** Célula com grande vacúolo com conteúdo floculado e citoplasma comprimido contra a membrana plasmática; **B-D.** Corpos multivesiculares e vesículas próximas ao tonoplasto; notar fusão entre vesículas (C) e presença de mitocôndrias (D). **E.** Retículo endoplasmático, leucoplasto e plasmodiosmos (seta). **F.** Retículo endoplasmático e aspecto fenestrado da parede (seta). Abreviações: vs: vesículas; va: vacúolo; mi: mitocôndria; re: retículo endoplasmático; leu: leucoplasto.

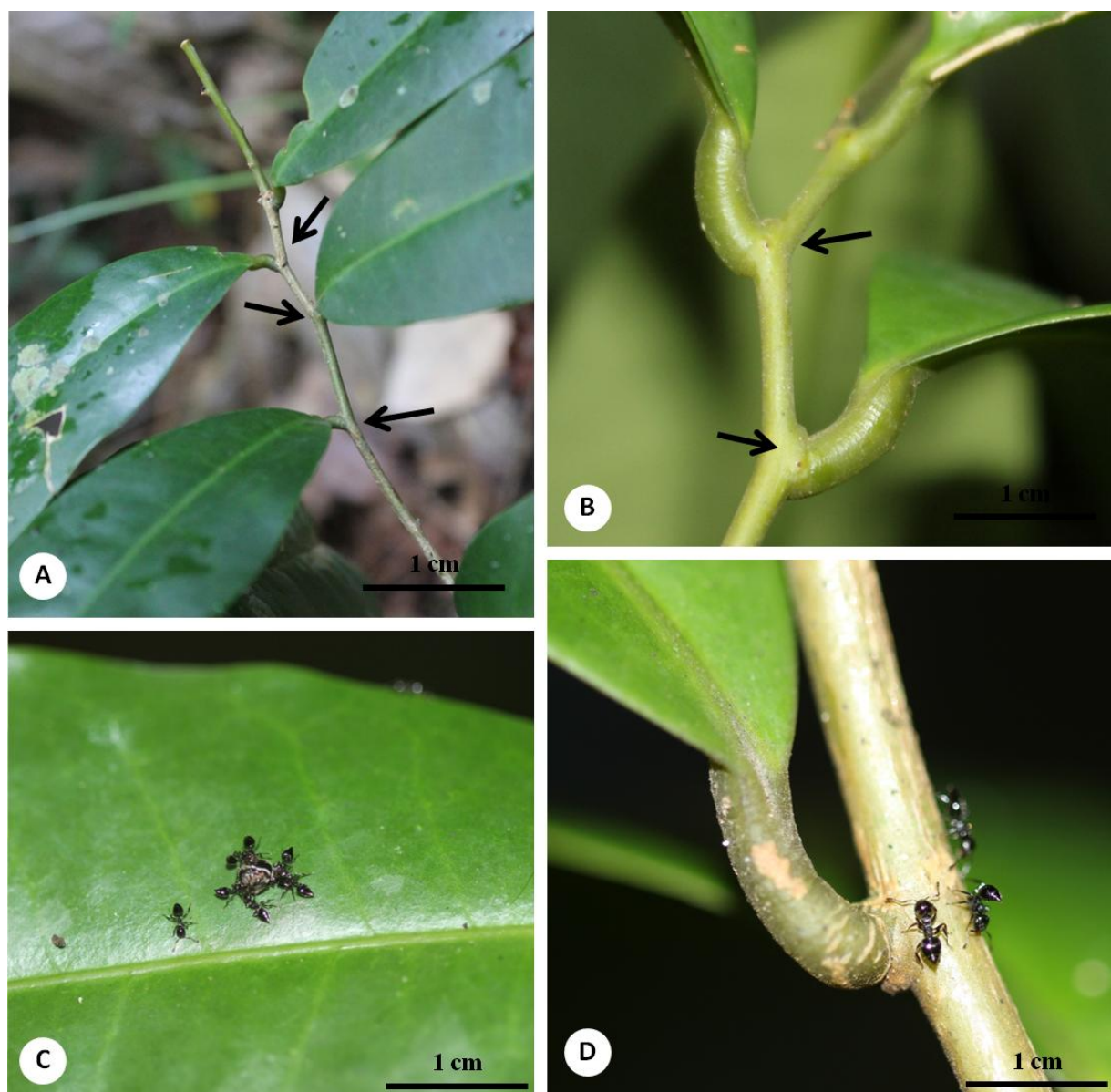


Figura 1:

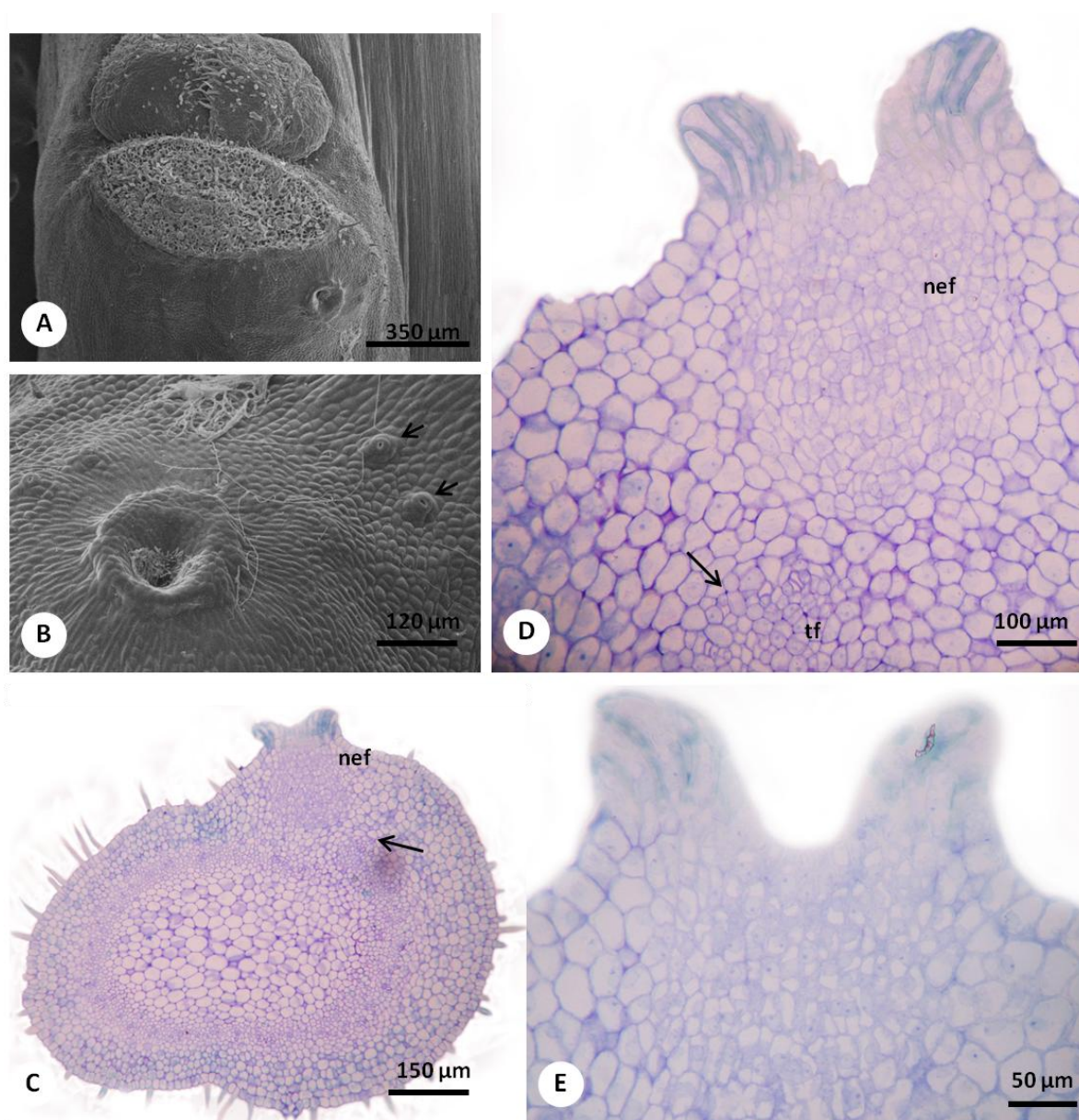


Figura 2:

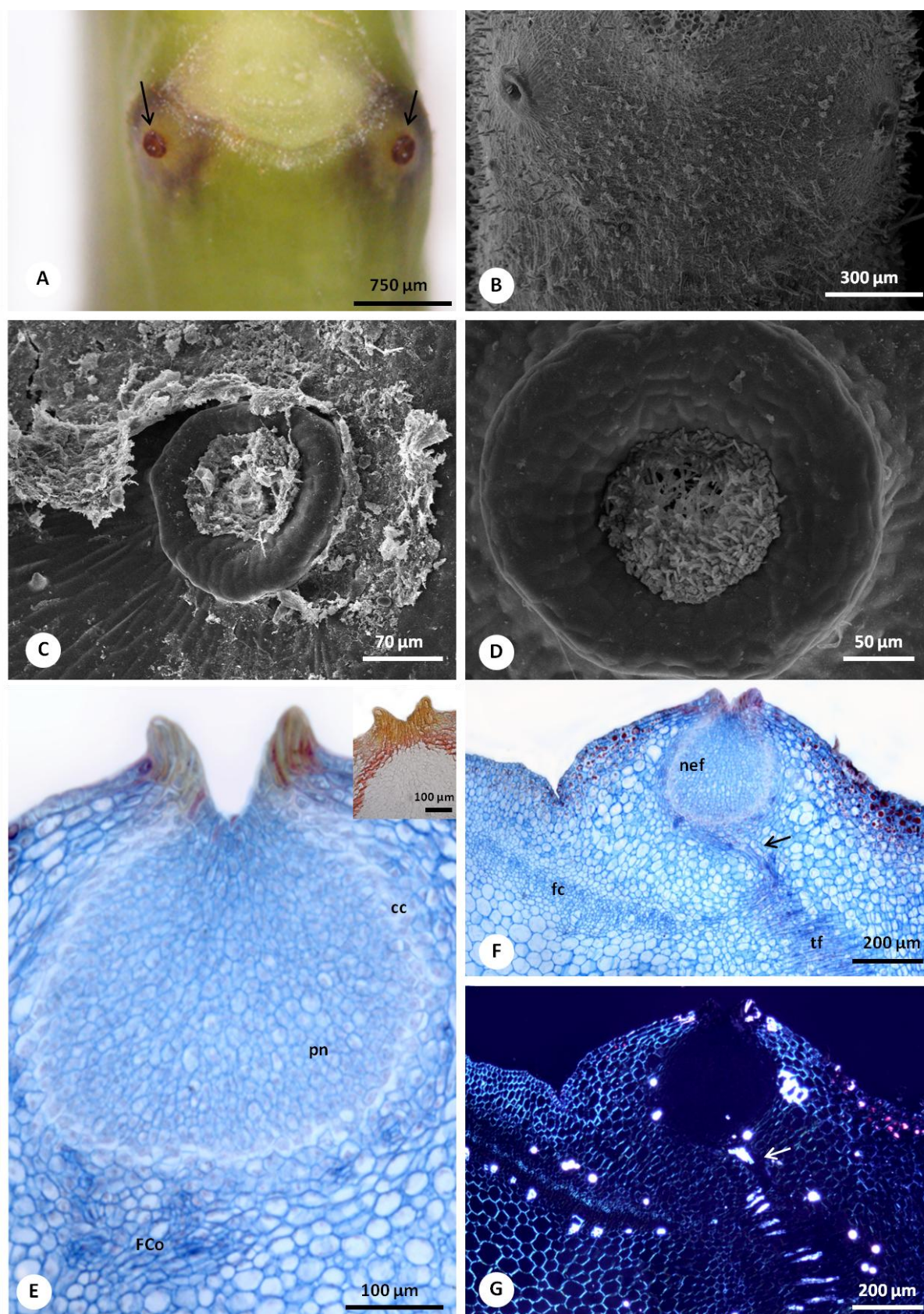


Figura 3:

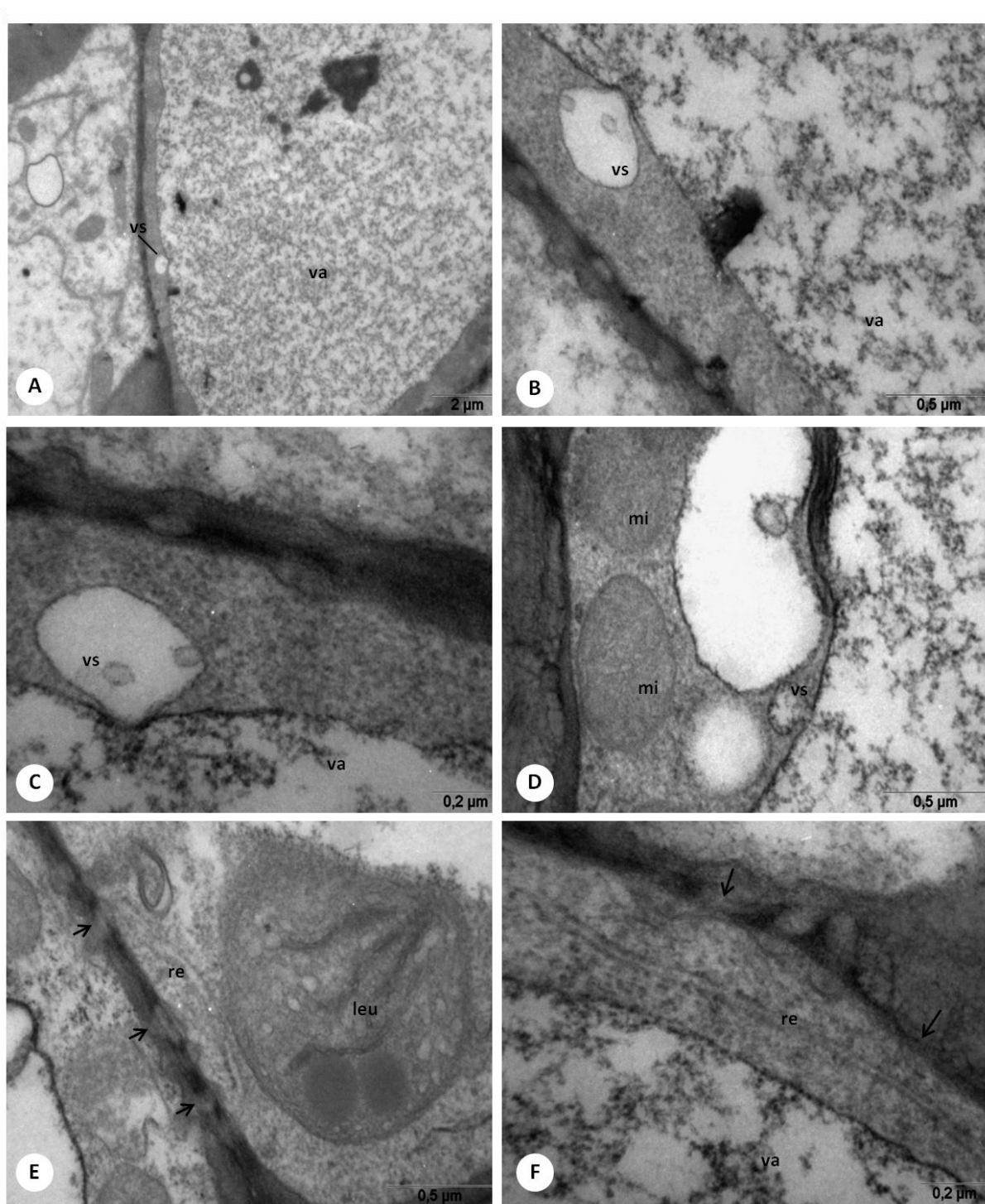


Figura 4:

Tabela 1: Resultados dos testes histoquímicos realizados em *Moutabea guianensis*

Reagentes	Parênquima nectarífero	Epiderme Nectarífera/ Células diferenciadas	Idioblastos caulinares
PAS	+	–	–
Dragendoff	–	–	+
Cloreto férrico	–	–	+
Sudan IV	–	+	+

Nota: + presente; - ausente.

REFERÊNCIAS

- Aguiar-Dias ACA, Yamamoto K, Castro MM. 2011. Stipular extranuptial nectaries new to *Polygala*: morphology and ontogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 166, 40-50.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Bronstein JL, Alarcon R, Geber M. 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*. 172: 412-428.
- Bronstein JL. 2009. The evolution of facilitation and mutualism. *Journal of Ecology*, 97, 1160–1170
- Bronstein JL., Alarcon R., Geber M. 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*. 172: 412-428.
- Buckley RC. 1983. Interaction between ants and membracid bugs decreases growth and seed set of host plant bearing extrafloral nectaries. *Oecologia*. 58:132-136
- Cardoso-Gustavson P, Andreazza NL, Sawaya ACHF, Castro MM. 2013 Only attractants? The versatility of petiolar extrafloral nectaries in *Passiflora*. *American Journal of Plant Sciences* 4:460–469.
- Castro MM, Machado SR. 2006. Células e tecidos secretores. In Appezzato da-Glória, B. e Carmello Guerreiro, S. M. (eds.) *Anatomia vegetal*. 2ed. Ed. UFV, Viçosa.
- Dáttilo WFC, Marques EC, Falcão JCF, Moreira DDO. 2009. Interações mutualísticas entre formigas e plantas. *EntomoBrasilis*, v. 2, p. 32-36, Meio de divulgação: Digital. Série: 2. ISSN/ISBN: 19830572.

- Davis AR, Gunning BES. 1992. The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. 1. Development, anatomy and ultrastructure. *Protoplasma*, 164:134–152.
- Díaz-Castelazo C, Rico-Gray V, Ortega F, Ángeles G. 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of Coastal Veracruz, Mexico. *Annals of Botany* 96(7): 1175-1189.
- Eriksen B, Persson C. 2007. Polygalaceae. *In*: K. Kubitzki (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants* vol. IX. Springer. Verlag, Berlin. pp. 345-363
- Evert RF. 2006. *Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body – Their structure, function, and development.* New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants.* Academic Press, London.
- Fahn, A. 1988. Tansley Review No. 14 Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108:229-257.
- Fahn A, Rachmilevitz T. 1970. Ultrastructure and nectar secretion in *Lonicera japonica*. *In*: Robson NKB, Cutler DF, Gregory M, editors. *New research in plant anatomy.* London: Academic Press: pp. 51–56.
- Gerlach D. 1984. *Botanische Mikrotechnik.* Stuttgart: Georg Thieme.
- Gerrits PO, Smid L. 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol Methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132(1): 81-85.
- Heinrich G. 1975. On the localization of different phosphatases in the nectary of *Aloe*. *Cytobiologie* 11: 247–263.
- Johansen D.A. 1940. *Plant microtechnique.* New York, Mcgraw-Hill.

- Judd WS, Campbell CS, Kellongg EA, Stevens PF, Donogue, M.J. 2009. Sistemática vegetal: um Enfoque Filogenético, 3. ed., Porto Alegre, RS. Atmed Editora.
- Kraus JE, Louro RP, Estelita MEM, Arduin M. 2006. A célula vegetal. In Appezzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM. Anatomia vegetal. 2ed. Ed. UFV. Viçosa.
- Lüdtke R, Souza-Chies TT, Miotto, STS. 2013. O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) na região Sul do Brasil. *Hoehnea* 40(1): 1-50
- Marques MCM, Peixoto, A.L. 2007. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). *Rodriguésia* 58 (1): 095-146.
- McManus, JFA. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23, 99-108.
- Melo Y, Córdula E, Machado SR, Alves M. 2010. Morfologia de nectários em Leguminosae senso lato em áreas de caatinga no Brasil. *Acta botânica brasílica*. 24(4): 1034-1045.
- Nepi M, Ciampolini F, Pacini E. 1996. Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers. *Annals of Botany* 78: 95±104.
- Nishimura, PY. 2009. Formigas ou esclerificação foliar: Quem irá proteger *Hibiscus pernambucensis* (Malvaceae) do ataque de herbívoros? In: Machado G, Prado PI, Oliveira AA (eds). Livro do curso de campo “Ecologia da Mata Atlântica”. São Paulo, Universidade de São Paulo.
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59: 368-373.

Paiva EAS, Machado SR. 2006. Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae). Acta botânica brasílica, 20(2): 471-482

Pastore JF, Marques MCM, Medeiros ES, Ludtke R. 2012. *Polygalaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000195>. Acessado 2013 Dez 20.

Pastore JFB. 2012 *Caamembeca*: generic status and new name for *Polygala* subgenus *Ligustrina* (Polygalaceae). Kew bulletin. 67:1-8

Pearse AGE. 1980. Histochemistry, Theoretical and Applied: Preparative and optical technology. London: Churchill Livingstone.

Quinet, Y. 2007. Defesa química em *Crematogaster* Lund, 1831 (Myrmicinae). Biológico. São Paulo. v.69. suplemento 2, p.243-247.

Reynolds ES. 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17: 208.

Roland, J.C. 1978. General preparations and staining of thin sections. In J.L. Hall, (Ed.), Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells, Elsevier, New York.

Souza VC, Lorenzi H. 2012. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p.313-317.

Souza, W. 1998. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade de Microscopia Eletrônica. 179p.

- Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2005. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 749–756.
- Taiz L, Zeiger E. 2009. *Fisiologia Vegetal*, 4ª edição. Porto Alegre. Artmed
- Watson, ML. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Citology* 4: 475.
- Weberling F. 2006. Las estípulas como caracteres sistemáticos confiables. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 41(1-2): 127-150.
- Yoder LR, Mahlberg PG 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63:1167-1173.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No **capítulo I** foi constatada que as glândulas nodais tratam-se de estípulas modificadas em nectários extraflorais, denominando-as através deste estudo como nectários estípu­lares. A relevância das glândulas posicionadas na altura do nó é utilizada por Eriksen & Persson (2007) para confirmar a separação do subgênero *Pterocarya* DC., dos demais subgêneros de *Monnina*, e sua elevação à categoria de gênero, como *Pteromon­nina* B. Eriksen. O registro de nectários extranupciais de origem estipular em Polygalaceae é um resultado de muita relevância para os estudos filogenéticos, pois esta família está atualmente incluída em Fabales (APG II 2003) e a ausência de estípulas era, até então, um dos caracteres distintivos entre Polygalaceae e os demais grupos da ordem.

É importante destacar que este estudo trouxe dados da origem estipular para mais de um gênero, distribuídos em duas tribos. Todavia, destaca-se a importância de que investigações semelhantes continuem a ser realizadas em todos os gêneros que possuem essas glândulas, como também que seja feita a anatomia nodal dos grupos que não apresentem essa estrutura em termos morfológicos, em especial com clados irmãos, atrás de vestígios da presença de estípulas. Assim, poderá compreender melhor como esse caráter surgiu e o número de vezes que nectários estípu­lares foram perdidos ou adquiridos em Polygalaceae.

Já no capítulo II, destacam-se os inéditos dados ultraestruturais. Até essa investigação nada se conhecia sobre os mecanismos envolvidos na secreção do néctar, sendo visto que esta é do tipo granulócrina e envolve as principais organelas associadas a estruturas secretoras.

Nos dois capítulos foi constatada a presença de formigas atraídas pelos nectários estípu­lares, evidenciando a existência de uma relação ecológica onde provavelmente as formigas atuam de forma benéfica contra outros herbívoros maiores e prejudiciais a planta. Ainda assim, ressalta-se a necessidade de novos estudos de cunho ecológico.

Atualmente, pesquisadores de diversas instituições mundiais realizam estudos moleculares com membros de Polygalaceae (Forest *et al.*, 2007; Abbott, 2011). Apesar da família não apresentar um número grande de espécies, existe uma grande dificuldade em analisá-la de forma geral. O estudo morfológico da família é de grande importância neste momento e todo o tipo de análise que auxilie no conhecimento do grupo poderá ser utilizado na circunscrição e no seu reposicionamento (Aguar-Dias, 2011).

Os resultados obtidos conseguiram responder positivamente as perguntas iniciais propostas por essa dissertação e contribuirão para um melhor entendimento sobre nectários estipulares e como esse caráter evoluiu em Polygalaceae. Ademais poderão ser utilizados em outros estudos sobre essa família.

REFERÊNCIAS (Contextualização, referencial de literatura, conclusão e perspectivas).

ABBOTT, J. R. 2011. Notes on the disintegration of *Polygala* (Polygalaceae), with four new genera for the flora of North America. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**. 5(1): 125 – 137.

AGUIAR, A.C.A.; ARANHA FILHO, J.L.M. 2008. A família Polygalaceae na planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 4, p. 321-328.

AGUIAR-DIAS, A. C. A.; YAMAMOTO, K.; CASTRO, M. M. 2012. Anatomia foliar de cinco espécies de *Polygala* de restinga e cerrado. **Rodriguésia** 63(2): 395-404.

AGUIAR-DIAS, A.C.A. 2008. Estudos morfológicos em cinco espécies de *Polygala* L. (Polygalaceae) com ênfase nas estruturas secretoras. **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

AGUIAR-DIAS, A.C.A.; CARDOSO-GUSTAVSON, P. 2011. Ontogeny of the mucilage ducts of *Polygala angulata* DC. (Polygalaceae). **Journal of the Torrey Botanical Society**, 138(3), pp. 255–26.

AGUIAR-DIAS, A.C.A.; YAMAMOTO, K.; CASTRO, M.M. 2011. Stipular extranuptial nectaries new to *Polygala*: morphology and ontogeny. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2011, 166, 40–50.

APG II (Angiosperm Phylogeny Group). 2003. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 141: 1-399.

AYMARD, G. A.; BERRY, P. E.; ERIKSEN, B. 2004. Polygalaceae. *In*: Steyermark, J.A., Berry, P.E., Yatskievych and Holst, B.K. (eds.) *Flora of the Venezuelan Guayana*, vol. 8. Missouri Botanical Garden. St. Louis.

BAUMGRATZ, J.F.A; MARQUES, M.C.M. 1984. Catálogo de nervação e epiderme foliar das Polygalaceae do Brasil-I. Gênero *Polygala* L, seção *Polygala*, subseção *Apterocarpae* Chod., série Timoutoideae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, 36 (59): 3-12.

BELLO, M. A.; RUDALL, P. J.; HAWKINS, J. A. 2012. Combined phylogenetic analyses reveal interfamilial relationships and patterns of floral evolution in the eudicot order Fabales. **Cladistics**. v. 1. p. 1–29.

BELO, R. M.; MOUTINHO M. F.; SICSU P.; FRIGERI E. 2011. Formigas diminuem a quantidade de visitantes florais em *Cordia curassavica* (Boraginaceae). **Relatórios do curso: prática de campo em ecologia da mata atlântica**. Página consultada em 02 de novembro de 2012 <http://ecologia.ib.usp.br/curso/2011/pdf/PO2-G1.pdf>.

BLÜTHGEN, N.; REIFENRATH, K. 2003 Extrafloral nectaries in an Australian rain forest: structure and distribution. **Australian Journal of Botany**. 51:515-527.

BUCKLEY, R.C. 1983. Interaction between ants and membracid bugs decreases growth and seed set of host plant bearing extrafloral nectaries. **Oecologia** 58:132-136.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. 2006. **Células e tecidos secretores**. *In* Appezzato da-Glória, B. e Carmello Guerreiro, S. M. (eds.) *Anatomia vegetal*. 2ed. Ed. UFV, Viçosa.

CASTRO, S.; SILVEIRA P.; NAVARRO L. 2009. Floral traits variation, legitimate pollination, and nectar robbing in *Polygala vayredae* (Polygalaceae). **Ecological Research**. 24: 47–55.

CHODAT, R. 1891. Monographia Polygalacearum. I. Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève, 31(1) suppl. 7: 1-143.

COELHO, V.P.M.; AGRA, M. F.; BARACHO, G.S. 2008. Flora da Paraíba, Brasil: Polygala L. (Polygalaceae). **Acta Botânica Brasílica**. 22(1):225-239.

DICKSON, W. C. 1973. Nodal and leaf anatomy of Xanthophyllum (Polygalaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. 67: 103-115.

ELIAS, T.S. 1983. Extrafloral nectarines: their structure and distribution. In The biology of nectarines (B.L. Bentley & T.S. Elias, eds.). **Columbia University Press**, New York, p.74-203.

ERIKSEN, B. 1993. Phylogeny of the Polygalaceae and its taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**. 186: 33-55.

ERIKSEN, B.; PERSSON, C. 2007. Polygalaceae, pp. 345-363. In: K. Kubitzki (ed.) **The Families and Genera of Vascular Plants** vol. IX. Springer-Verlag, Berlin.

FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London.

FILGUEIRA, J.P.P.S. 2012. Morfologia e estrutura de *Polygala spectabilis* dc. (Polygalaceae) com ênfase nos nectários extraflorais. **Monografia de conclusão de curso**. Universidade do Estado do Pará.

FOREST, F.; CHASE, M.W.; PERSSON, C.; CRANE, P.R., HAWKINS, J.A. 2007. The role of biotic and abiotic factors in evolution of ant dispersal in the milkwort family (Polygalaceae). **Evolution**. 61: 75-94.

FRIIS, E. M.; PEDERSEN, K.R.; CRANE, P.R. 2011. **Early flowers and angiosperm evolution**. Cambridge University Press. p. 333.

- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLONGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGUE, M. J. 2009. **Sistemática vegetal**: um Enfoque Filogenético, 3. ed., Porto Alegre, RS. Atmed Editora.
- KOPTUR, S.; RICO-GRAY, V.; PALACIOS-RIOS, M. 1998 Ant protection of the nectaried fern *Polypodium plebeium* in central México. **American Journal of Botany** 85(5): 736–739.
- LÜDTKE, R.; AGUIAR-DIAS, A.C.A.. 2008. Nota sobre a ocorrência de pétalas reduzidas em espécies de *Polygala* L. subgênero *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) da Região Sul do Brasil. **Biota Neotropical** 8 (1): 239-242.
- LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S. 2008. *Bredemeyera* Willd. e *Securidaca* L. (Polygalaceae) na Região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 69-79.
- LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T.T.; MIOTTO, S.T.S. 2009. O gênero *Monnina* (Polygalaceae) na Região Sul do Brasil. **Acta botânica brasílica**. 23(1): 175-195.
- MARQUES, M.C.M. (1996) *Securidaca* L. (Polygalaceae) do Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** 34: 7–144.
- MARQUES, M.C.M. 1979. Revisão das espécies do gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) do Estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia** 31: 69-339.
- MARQUES, M.C.M.; PEIXOTO, A.L. 2007. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia** 58 (1): 095-146.
- METCALFE, C. R. & CHALK, L. 1979. **Anatomy of the dicotyledons**. 2º ed. Oxford: Claredon Press. v. 1, 294p.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2, Claredon Press, Oxford.

OLIVEIRA, P.S.; RICO-GRAY, V.; DÍAZ-CASTELAZO, C.; CASTILLO-GUEVARA, C. 1999. Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruitset in *Opuntia stricta* (Cactaceae). **Ecological Society, Functional Ecology**, 13, 623–631.

PAIVA, J. A. R. 1998. Polygalarum Africanum et madagascariensium prodromus atque gerontogaei generis *Heterosamara* Kunt-ze, a genere *Polygala* segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica. **Fontqueria** 50: 1-346.

PASTORE, J. F. B. 2012 *Caamembeca*: generic status and new name for *Polygala* subgenus *Ligustrina* (Polygalaceae). **Kew bulletin** VOL. 67: 1-8.

PASTORE, J. F. B.; ABBOTT, J. R. 2012. Taxonomic notes and new combinations for *Asemeia* (Polygalaceae). **Kew bulletin** VOL. 67: 1–13.

PASTORE, J. F.; MARQUES, M. C. M.; MEDEIROS, E. S.; LUDTKE, R. 2012. *Polygalaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000195>).

PASTORE, J.F.B.; MARQUES, M.C.M. 2009. Duas novas espécies de *Polygala* (Polygalaceae) da região da Chapada dos Veadeiros, GO, Brasil. **Acta botânica brasílica**. 23(2): 446-450.

PASTORE, J.F.B.; MARQUES, M.C.M. 2009. Duas novas espécies de *Polygala* (Polygalaceae) da região da Chapada dos Veadeiros, GO, Brasil. **Acta botânica brasílica**. 23(2): 446-450.

RODRIGUES, L. F.; LEITÃO, R. P.; ROJAS, S. S. V.; SANTOS, B. A.; COLPAS, F. T. 2004. Efeito da presença de formigas na herbívora de *Passiflora quadriglandulosa* (PASSIFLORACEAE). Relatórios do curso: ecologia da floresta Amazônica. Página consultada em 06 de novembro de 2012 em <<http://pdbff.inpa.gov.br/cursos/efa/livro/2004/PDFs/po3g1.pdf>>.

SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of dicotyledons. Clarendon. Oxford.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2012.