



**MISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



THÁLIA DO SOCORRO SERRA GAMA

**ONTOGÊNESE, ESTRUTURA E ASPECTOS FUNCIONAIS DOS TRICOMAS
GLANDULARES DE *Adenocalymma magnificum* MART. EX DC. E *Bignonia
aequinocialis* L. (BIGNONIACEAE)**

BELÉM

2013



**MISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



THÁLIA DO SOCORRO SERRA GAMA

**ONTOGÊNESE, ESTRUTURA E ASPECTOS FUNCIONAIS DOS TRICOMAS
GLANDULARES DE *Adenocalymma magnificum* MART. EX DC. E *Bignonia
aequinocialis* L. (BIGNONIACEAE)**

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

Coorientador: Dr. Diego Demarco

BELÉM

2013

Gama, Thália do Socorro Serra

Ontogênese, estrutura e aspectos funcionais dos tricomas glandulares de *Adenocalymma magnificum* MART. EX DC. e *Bignonia aequinoctialis* L. (BIGNONIACEAE) / Thália do Socorro Serra Gama. – Belém, PA, 2013.

79 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Botânica Tropical) – Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi, 2013.

1. Bignoniaceae. 2. Cálice floral. 3. Células de transferência 4. Relação inseto-planta 5. Nectário Belém. I. Título .



**MISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



THÁLIA DO SOCORRO SERRA GAMA

**ONTOGÊNESE, ESTRUTURA E ASPECTOS FUNCIONAIS DOS TRICOMAS
GLANDULARES DE *Adenocalymma magnificum* MART. EX DC. E *Bignonia
aequinocialis* L. (BIGNONIACEAE)**

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

Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar Dias - Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr. João Ubiratã Moreira dos Santos – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Anselmo Nogueira - 2º Examinador
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Feio Gomes - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dedico

*Aos meus pais
E ao meu amado irmão,
por todo incentivo e carinho.*

“A minha prece é que aprendamos das flores,
De suas cores e odores,
Que muito da vida é apenas belo enquanto dura
Ainda que seja por fugaz instante ou imperceptível segundo
Tal qual raio que cai,
beija-flor que voa
ou reflexos ondulantes de sol em águas.

Que delas, das flores, extraíamos os odores e as cores,
Para perceber que são tão diversas e irrepetíveis
Quanto os instantes felizes,
Duradouros ou vãos,
De nossas próprias vidas.

Que sejamos, pois, gratos por cada flor
e cor
e odor.”

(Alex Palmer Ribeiro, SJ)

Agradecimentos

A **Deus**, pois é Nele que eu encontro a minha força, motivação e felicidade.

A UFRA e ao MPEG, pela oportunidade oferecida no curso de pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica Tropical.

A CAPES pela concessão da bolsa durante o curso. Ao ex-coordenador do curso Dr. **João Ubiratan Moreira dos Santos** e ao atual coordenador Dr. **Leandro Valle**, ao corpo docente e funcionários da pós-graduação.

Agradeço especialmente aos meus orientadores Profa. Dra. **Ana Cristina Andrade de Aguiar Dias** e Prof. Dr. **Diego Demarco**, por terem tornado possível a realização deste projeto. A Ana por sempre me motivar a ir além e estimular às visitas e realização de disciplinas em outras instituições, agradeço pela confiança depositada à mim, pelas correções feitas e pelas ideias e formações, não só profissionais, mas também morais, que certamente vou levar para a vida. Ao Diego pela sua paciência em passar a sua experiência como pesquisador, pela simplicidade em explicar um pouco mais sobre as estruturas secretoras e MET, pelos artigos, disponibilidade e acolhida na USP.

Ao Dr. **Hilton Túlio**, coordenador do MEV, e ao colega **Rolf Jr.**, pelo auxílio na Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Emely Siqueira e Marcília Gabriella Tavares, do Laboratório de Entomologia - Coordenação de Zoologia do MPEG, pela identificação das formigas.

Ao Dr. **Alexandre Bonaldo**, do Laboratório de Aracnologia do MPEG, pelo empréstimo do microscópio para a captura das imagens estruturais.

Ao projeto “Rede Interdisciplinar de Pesquisa na Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado” que concedeu o auxílio moradia no período da disciplina de Biologia Floral na Universidade Federal de Minas Gerais e as coordenadoras do mesmo.

A minha amiga e professora **Flávia Lucas**, quem iniciou-me na carreira científica e que também é responsável pelo meu desempenho acadêmico, pois foi ela a primeira a me incentivar. Agradeço por sempre estar disposta a ensinar, por ser uma pessoa simples, pelo carinho e principalmente, pelo exemplo de caráter e amor à Botânica, pois foi vendo toda esta dedicação e afeto que eu também passei a me apaixonar pela delicada e cativante vida das plantas.

À minha primeira orientadora, Dra. **Raimunda Conceição de Vilhena-Potiguara**, (*in memoriam*), que sempre estará nos nossos corações. Agradeço pela amizade, pelas risadas, por toda sua dedicação e contribuição à pesquisa da anatomia na Amazônia. Sei que a senhora sempre

estará nas minhas lembranças, afinal foi a pessoa que me apresentou a anatomia vegetal e despertou em mim a vontade de fazer uma viagem pelo interior da planta.

Aos meus amigos que passaram por este mesmo Laboratório de Anatomia Vegetal: **Carla Feio, Eunice Macedo, Marleide Chaves, Suelen Mata, Isabel Nery, Cyntia Porfirio e Pedro Paulo**, que muito contribuíram para o meu aprendizado de técnicas, preparo de substâncias, organização da dissertação, além dos momentos de lazer e diversão. Aos meus amigos que ainda estão no Laboratório de Anatomia Vegetal e que convivo todos os dias: **Tarcymara Garcia, Joana Filgueira e Breno Silva** (que me ajudaram nas coletas!), Dra. **Alba Lins, Haiwry Farias e Sueyla Bezerra**, que tornaram as atividades internas e externas ao laboratório mais prazerosas. Agradeço em especial a **Tatiani Kikuchi**, que tanto me auxiliou no texto e à amiga e vizinha de laboratório, Dra. **Léa Carneira**, pelos diversos ensinamentos.

Agradeço ainda aos meus colegas de turma, que sempre estavam à disposição quando lhes solicitava algo e também por terem tornado os meus dias mais alegres e as disciplinas mais motivadoras. Sou muito grata ao **João Silveira**, que fez ilustrações belíssimas para mim e também a **Fabíola Fernandes**, amiga da anatomia, que tanto me ajudou nas coletas, fotografias e nas disciplinas, agradeço pela sua bondade e por sempre me proporcionar gargalhadas.

Aos colegas que fiz enquanto estive na UFMG e USP, pela hospitalidade e troca de conhecimento, principalmente aqueles que me acolheram em suas casas.

Agradeço imensamente todo apoio que recebi dos meus amigos do MC, Centro Magis de Juventude, Unijovem e da Companhia de Jesus, em especial aos ternos **Alex Palmer SJ, Larissa Borges, Yúri Rebello, Arthur Carvalho, Luciana Souza, Francisco Neto, Carol Lobato, Thalita Luz, Clevisson Rabelo, Daniel Lima, Ricardo Avila SJ, João Pedro Cornado SJ e Edson Tomé SJ**.

A todos os amigos e primos pelo companheirismo e amizade, em especial ao **Thiago Listo**, pelas distrações, ao **Marcos Ortiz**, pelo estímulo e a **Sâmia Nunes**, por deixar que tantas vezes eu estudasse em sua casa para me concentrar melhor.

Ao meu irmão e amigo **Thalmus Gama**, que me proporciona muitos momentos felizes, cheios de risadas e afeto. Pelo empréstimo da sua câmera, que me auxiliou muito na pesquisa, pela paciência que ele teve enquanto me ensinava usar o Corel Draw, Photoshop e outros programas necessários no trabalho.

E, aos meus pais **Liana e Talis Gama**, que sempre me incentivaram aos estudos, pela imensurável compreensão da falta de tempo, por todo carinho, atenção e amor. A vocês toda a minha gratidão e respeito!

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	9
1. Contextualização	10
Referências	13
Capítulos:	
2. Capítulo 1. “Células de transferência em nectários de Bignoniaceae”	15
Resumo.....	16
Abstract.....	18
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	23
Discussão.....	26
Referências.....	32
Lista de legendas.....	36
Figuras.....	37
3. Capítulo 2. “Tricoma calicinal em <i>Adenocalymma magnificum</i> (Bignoniaceae): ontogênese, estrutura e aspectos funcionais”	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	46
Discussão.....	48
Referências.....	52
Lista de legendas.....	56
Figuras.....	57
4. Capítulo 3. “Estruturas secretoras em <i>Bignonia aequinoctialis</i> (Bignoniaceae): ontogênese, estrutura e aspectos funcionais”	59
Resumo.....	60
Abstract.....	61
Introdução.....	62
Material e Métodos.....	63
Resultados.....	65
Discussão.....	67
Referências.....	71
Lista de legendas.....	73
Tabela.....	74
Figuras.....	75
5. Conclusões Finais	78

RESUMO

Este trabalho destaca as estruturas secretoras de *Adenocalymma magnificum* e *Bignonia aequinoctialis*: desenvolvimento, estrutura e processo de secreção, tanto do eixo vegetativo, quanto do reprodutivo. Tricomas glandulares são estruturas características de plantas de Bignoniaceae (Bignoniaceae), por isso se tornam importantes caracteres diagnósticos para a tribo em questão. Diversos trabalhos estão voltando seu foco para a filogenia, entretanto, muitas vezes se faz necessário o entendimento das características morfológicas e funcionais de cada estrutura para complementar evidências acerca das hipóteses adaptativas. O capítulo 1, destinou-se investigar o desenvolvimento e analisar a função do tricoma glandular pateliforme presente em *Adenocalymma magnificum*; foi observado que eles se originam de uma única célula protodérmica, são assincrônicos e possuem distribuição no eixo vegetativo e reprodutivo da planta; durante a mesma fase secretora eles liberam açúcar, lipídios e compostos fenólicos, por diferentes vias metabólicas; os açúcares, produzidos no pré-néctar, são transportados até a célula secretora por células de transferência presentes no tricoma. No capítulo 2, estudou-se o tricoma glandular capitado de *A. magnificum*, seu desenvolvimento e função, foi detectado que ele ocorre no interior do cálice e desenvolve primeiro diversas células do pedúnculo, para posteriormente dividir anticlinalmente a célula apical em células da cabeça; a secreção deste tricoma capitado é lipofílica com atuação de três organelas na produção da secreção, sendo leucoplastos, retículo endoplasmático e, inclusive, mitocôndrias. No capítulo 3, descreveu-se a ontogenia dos tricomas glandulares peltados e pateliformes distribuídos no eixo vegetativo e cálice de *Bignonia aequinoctialis*; foi observado que os dois tricomas glandulares se originam de uma célula epidérmica e são assincrônicos; os peltados secretam substâncias lipofílicas, e os pateliformes secretam néctar e compostos fenólicos. A secreção de açúcar, nos tricomas pateliformes de ambas as espécies, possibilitou uma breve discussão sobre sua importância na relação inseto-planta, visto que podem servir de alimento para as formigas em troca, geralmente, de proteção. Pode-se concluir que tais resultados são importantes frente ao conhecimento funcional e morfológico dos tricomas, neste grupo de plantas.

Palavras-chave: Bignoniaceae, cálice, células de transferência, relação inseto-planta, folíolo, lipídio, nectário, perfilo da gema-axilar.

ABSTRACT

This study focused on the secretory structures of *Adenocalymma magnificum* and *Bignonia aequinoctialis*: their development, structure and secretory processes in both the vegetative axis and reproductive axis. Because glandular trichomes are characteristic structures of Bignoniaceae they become important diagnostic markers for the tribe in question. Several studies are turning their attention to the phylogeny, however it often becomes necessary to understand the evolutionary patterns of individual morphological features to complement evidence about the adaptive hypotheses. In the first chapter, we were interested in to know development and to study the function of patelliform glandular trichomes of *Adenocalymma magnificum*; the trichome originate from a single protodermic cell, is asynchronous and presents on both the vegetative and reproductive axes with, during this secretory fase they release sugar, lipids and phenolic compounds, by different metabolic pathways; the sugar, produced in the pre-nectar, is transported to the secretory cell by transfer cells present in trichome. In the second chapter, the study was only the capitate glandular trichome of *A. magnificum*, development and function of these structures. It occurs on the inner surface of the calyx and first develop various peduncle cells and then the apical cell divides in anticlinal form, forming the head cells; the secretion of this capitates trichome is lipophilic, being produced by three organelles, including mitochondria. The third chapter described the ontogenesis of peltate and patelliform glandular trichomes, distributed on the vegetative axes and calyx of *Bignonia aequinoctialis*; all the trichomes originate from a single cell and the development is asynchronous; The secretion of the peltate glandular trichomes consists of lipophilic substances and the patelliform consists of both nectar and phenolic compounds. The sugar secretion in the patelliform trichomes, from both species, allowed a brief discussion about an important role in insect-plant interactions, they serve as food for ants that reciprocate by protecting the plant (generally). We can conclude that functional and morphological information about trichomes are importante in this group of plants.

Key words: Bignoniaceae, calyx, transfer cells, insect-plant interactions, leaves, lipid, nectary, prophylls of axillary buds.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Bignonieae é a tribo neotropical mais representativa e diversa da família Bignoniaceae, compreende 21 gêneros e cerca de 400 espécies, no qual a grande maioria das espécies são lianas distribuídas sobre as florestas úmidas Neotropicais (Lohmann, 2006). A elevada variabilidade morfológica entre espécies da tribo fez com que este grupo possuísse uma delimitação complicada em nível genérico (Gentry, 1973, 1976), o que foi resolvido através da reconstrução de uma filogenia molecular para a tribo (Lohmann, 2006).

Diversos trabalhos têm descrito a estrutura geral dos tipos de tricomas em espécies de Bignoniaceae, pois proporcionam um importante caráter taxonômico devido, especialmente, à posição constante que ocupam nas espécies e variedades em que ocorrem (Solleder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950; Fahn, 1979, 1988). Sabe-se que o advento da sistemática filogenética em plantas foi, aproximadamente, no início da década de 90 (Souza & Lorenzi 2008), portanto, poucos foram os trabalhos que fizeram relação com a macroevolução do grupo. Dentre eles, está o de Nogueira (2011), que estudou os padrões macro-evolutivos dos tricomas peltados, pateliformes e/ou cupuliformes e concluiu que essas estruturas já estavam presentes no ancestral comum mais recente de Bignonieae (Nogueira, 2011).

Todas as informações obtidas a respeito das características morfológicas são valiosas para estudos taxonômicos. O conhecimento ontogenético, também é importante, por agregar mais informações aos estudos estruturais, verificando as similaridades presentes nos estádios iniciais e desvendando suas diferenças no decorrer do desenvolvimento das estruturas secretoras, indicando que este é independente (Elias, 1983; Vogel 1997).

Os tricomas são apêndices epidérmicos formados unicamente pela protoderme, que podem ter diversas formas, estruturas e funções (Esau, 1965; Fahn, 1974; Theobald *et al.*, 1979). Estes tricomas são divididos em dois grandes grupos, glandulares e não-glandulares (Theobald *et al.*, 1979), sendo os glandulares produtores e secretores de substâncias. Além de sua definição estrutural, os tricomas glandulares podem também ser caracterizados pelo tipo de substância que secretam, neste caso, recebem denominações funcionais (e.g. nectários de Bignoniaceae e coléteres – Fahn, 1974).

A fim de caracterizar as principais classes de substâncias secretadas e verificar se há uma uniformidade na natureza química do material secretado, é importante aplicar

testes histoquímicos, pois esses tricomas glandulares podem secretar mais de um tipo de exsudato, como identificado nos NEFs de *Anemopaegma* Mart. ex Meisn., onde espécies secretam açúcar e, potencialmente, lipídios e proteínas (Nogueira, 2011).

Vários estudos têm descrito a estrutura dos tipos de tricomas em espécies de Bignoniaceae (e.g Seibert, 1948; Inamdar, 1969; Hyakutake & Grotta, 1965; Laroche, 1974; Elias, 1983; Rivera, 2000; Díaz-Castelazo *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2006; Tresvenzol *et al.*, 2011; Gonzalez, 2011; Nogueira, 2011), sendo destacados os tricomas secretores de néctar (um tipo característico de nectário extrafloral - NEFs; Elias, 1983), que estão presentes na região interpeciolar, perfis da gema axilar, pecíolos, peciolulos e faces adaxial e abaxial dos folíolos, bem como em órgãos reprodutivos (Seibert, 1948; Elias, 1983).

Os tricomas secretores de néctar ou nectários extraflorais estão em pelo menos 90% dos gêneros de Bignoniaceae (Elias & Gelband, 1976), devido sua formação protodérmica, esses nectários não são vascularizados, logo, estruturalmente, são menores do que os supridos pelo sistema vascular. Entretanto, não menos especializados (Carlquist, 1969). Elias & Gelband (1976), viram que quando estão aglomerados, podem atrair formigas tanto quanto, ou até mais do que um nectário vascularizado, por serem facilmente acessados por esses insetos.

A interação inseto-planta, estabelecida pelos nectários extraflorais, pode ser benéfica ou não (Koptur, 1992), pois se sabe que os nectários são visitados por uma gama de animais, que buscam alimentos, sendo benéfica quando há patrulhamento realizado pelas formigas na superfície da planta (i.e. remoção dos herbívoros por parte das formigas visitantes), neste caso, a vantagem ocorre de forma direta, ou mesmo quando há ninhos de formigas no solo, próximo às plantas protegidas, o que faz aumentar a fertilidade desse solo e indiretamente melhorar o desempenho da planta em seu habitat (Frouz & Jilková, 2008). Não se pode esquecer que tal interação é de fato vantajosa se os benefícios das formigas forem maiores que os custos que a planta possui para produzir o néctar (e.g. *Catalpa speciosa*, Stephenson, 1982) e; maléfica quando as próprias formigas alteram o equilíbrio, predam, ou atraem insetos herbívoros adultos, que podem deixar seus ovos na planta (Koptur, 1992).

Neste trabalho, procurou-se investigar o desenvolvimento e analisar a secreção e função dos diferentes tipos de tricomas glandulares presentes em *Adenocalymma magnificum* e *Bignonia aequinoctialis* (Bignoniaceae), a fim de complementar e ampliar as informações sobre os tricomas secretores em representantes de Bignoniaceae e

proporcionar futuros trabalhos acerca da fisiologia, metabolismo celular, e função defensiva dos NEFs aqui descritos.

No **capítulo 1** apresenta-se o desenvolvimento e função dos tricomas pateliformes, também chamados funcionalmente de nectários extraflorais. Foram analisados os nectários distribuídos em órgãos vegetativos e reprodutivos de *Adenocalymma magnificum*. Em particular, foram descritas pela primeira vez células de transferência nos nectários de uma espécie de Bignoniaceae. O capítulo foi intitulado **“Células de transferência em nectários de Bignoniaceae”**.

No **capítulo 2** estudou-se o tricoma glandular capitado presente no cálice de *Adenocalymma magnificum*, com ênfase à sua formação e secreção, destacando as organelas mais evidentes e suas relações com a função do tricoma. Este capítulo foi intitulado **“Tricoma calicinal em *Adenocalymma magnificum* (Bignoniaceae): ontogênese, estrutura e aspectos funcionais”**.

O **capítulo 3** destinou-se investigar o desenvolvimento e analisar a secreção dos tricomas glandulares peltado e pateliforme presentes nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Bignonia aequinoctialis*. Este capítulo foi intitulado **“Estruturas secretoras em *Bignonia aequinoctialis* (Bignoniaceae): ontogênese, estrutura e aspectos funcionais”**.

REFERÊNCIAS

- CARLQUIST, S.J. 1969. Toward Acceptable Evolutionary Interpretations of Floral Anatomy. *Phytomorphology*: 19, No. 4, India.
- DÍAZ-CASTELAZO, C., RICO-GRAY, V., ORTEGA, F. & ANGELES, G. 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. *Annals of botany* 96:1175-89.
- ELIAS, T. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In (B.L. Bentley & T.S. Elias, eds.) *The biology of nectaries*. Oxford University Press, Oxford.
- ELIAS, T.S. & GELBAND, H. 1976. Morphology and Anatomy of Floral and Extrafloral Nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63:1349-1353.
- ESAU, K. 1965. Plant anatomy. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- FAHN, A. 1974. Plant Anatomy. 2ed, Pergamon Press, Oxford, New York.
- 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.
- FROUZ, J. & JILKOVA, V. 2008. The effect of ants on soil properties and processes (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 11: 191-199.
- GENTRY, A.H. 1973. Bignoniaceae. *Flora of Panamá* 60:781-977.
- GENTRY, A.H. 1976. Studies in Bignoniaceae. 19. Generic mergers and new species of South American Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63:46-80.
- GONZALEZ, A.M. 2011. Domacios y nectarios extraflorales en Bignoniáceas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46:271-288.
- HYAKUTAKE, S. & GROTTA, A.S. 1965. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld. var. *petiolata* Bur. Bignoniaceae. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* 3:51-78.
- INAMDAR, J.A. 1969. Structure and Ontogeny of foliar nectaries and stomata in *Bignonia chamberlaynii* Sims. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Section B* 70:232-241.
- KOPTUR, S. 1992. Interactions between Insects and Plants Mediated by Extrafloral Nectaries. In (E. Bernays, ed.). *Insect/Plant Interactions*. CRC series, p.85-132.

- LAROCHE, R.C. 1974. Anatomic Considerations of the Calyx of *Adenocalymma comosum* (Cham.) A.P. DC. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61:530-533.
- LOHMANN, L. 2006. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 93:304-318.
- MACHADO, S.R., GREGÓRIO, E. A & GUIMARÃES, E. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of botany* 97:357-69.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. Clarendon ed., Oxford.
- NOGUEIRA, A. 2011. Evolução e ecologia de tricomas em Bignoniaceae (Bignoniaceae): estruturas morfológicas de defesa anti-herbivoria? 28-11-2011. 222f. Tese - Universidade de São Paulo, SP.
- RIVERA, G.L. 2000. Nectarios extranupciales florales en especies de Bignoniaceae de Argentina. *Darwiniana* 38:1-10.
- SEIBERT, R.J. 1948. The Use of Glands in a Taxonomic Consideration of the Family Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 35:123-137.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic Anatomy of the Dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2008. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Nova Odessa, Plantarum.
- STEPHENSON, A.G. 1982. The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. *Ecology* 63:663-669.
- THEOBALD, W.L., KRAHULIK, J.L. & ROLLINS, R.C. 1979. Trichome Description and Classification. In (C. Metcalfe & L. Chalk, eds.). *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford University Press, Oxford.
- TRESVENZOL, L.M.F., FIUZA, T.S., REZENDE, M.H., FERREIRA, H.D., BARA, M.T.F., ZATTA, D.T. & PAULA, J.R. 2011. Morfoanatomia de *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers, Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20:833-842.
- VOGEL, S. 1997. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. I. Substitutive nectaries. *Flora; morphologie, geobotanik, oekophysiologie* 192:305-333.

2. CAPÍTULO 1

CÉLULAS DE TRANSFERÊNCIA EM NECTÁRIOS DE BIGNONIACEAE

T. S. S. Gama^{1*}; A. C. A. A. Dias²; D. Demarco^{3*}

1. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora. 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.
2. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. Rua Augusto Corrêa. 66075-110, Belém – PA.
3. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Rua do Matão, 277. 05508-090, São Paulo – SP.

*Autores para correspondência: thaliagama@gmail.com; diegodemarco@usp.br.

* **Manuscrito a ser submetido para publicação na revista “*Annals of Botany*”.**

RESUMO

• *Introdução e Objetivos:* Os nectários extraflorais são estruturas que secretam uma solução açucarada e não estão envolvidas na polinização, geralmente são relacionados à interação inseto-planta, podendo desempenhar um papel importante na defesa da planta contra herbívoros. O deslocamento deste açúcar até as células secretoras acontece através do fluxo trans-membrana, onde atuam células de transferência, acelerando o processo. A presença destas células distintas são incomuns e indicam que houve uma evolução, causada por pressões de natureza fisiológica. Este detalhe celular, somente pode ser constatado através da microscopia eletrônica de transmissão. Por isso, o presente estudo objetivou investigar o desenvolvimento e analisar aspectos funcionais dos tricomas glandulares pateliformes de *Adenocalymma magnificum*.

• *Métodos:* Deste tipo de tricoma glandular foram coletadas amostras de: perfis da gema axilar, folíolos, cálice da flor em antese e botões florais (região mediana à apical), em diferentes estágios de desenvolvimentos, posteriormente, foram fixados e desidratados, prontos para as análises em MEV, enquanto que, para visualização em ML e MET, foi necessário ainda incluir em paraplast e resina epóxi, respectivamente. A presença de néctar foi identificada pela glicofita.

• *Resultados:* O nectário extrafloral ocorreu tanto nos órgãos vegetativos quanto nos reprodutivos, em todos os estádios de desenvolvimento. Formigas dos gêneros *Cephalotes*, *Camponotus*, *Ectatomma* e *Pseudomyrmex* visitaram frequentemente os nectários, sobretudo no período da manhã. A formação deste nectário inicia a partir de uma única célula protodérmica, que se diferencia e se divide anticlinalmente, formando uma série de células levemente colunares que continuam em divisão anticlinal. As células do pedúnculo podem ser também chamadas de células de transferência, visto

que possuem uma parede anticlinal espessa com projeções irregulares e função de transportar açúcar para as células da cabeça. As células secretoras apresentam vacuoma disperso, com gotas lipídicas na base e no ápice, sendo produzidas por mitocôndrias, leucoplastos e retículo endoplasmático. O nectário possui secreção merócrina, sendo as substâncias hidrofílicas do tipo écrina e as lipofílicas do tipo granulócrina.

- *Conclusão:* A presença de células de transferência nos nectários de *A. magnificum* propõe uma alta especialização, devido esta célula aumentar o fluxo de passagem da secreção, sendo então liberada mais rapidamente. O açúcar secretado sugere uma relação benéfica entre inseto e planta.

Palavras-chave: *Adenocalymma magnificum*, interação inseto-planta, lipídios, néctar, NEFs, ontogenia, tricoma pateliforme, ultraestrutura.

ABSTRACT

- *Background and Aims:* The extrafloral are structures that secrete a sugar solution and are not involved in pollination, usually, are related to insect-plant interactions, may play an important role in plant defense against herbivores. The release of this sugar by secreting cells occurs through the trans membrane flux, where they act like transfer cells, accelerating the process.

The occurrence of transfer cells are unusual and indicate that there was an evolution, caused by selection pressures of a physiological nature. This cellular detail, only, can be seen by transmission electron microscopy. Therefore, the present study aimed to investigate the development of and analyze the functional aspects of *Adenocalymma magnificum*'s nectary.

- *Methods:* Samples from some parts of the plant with this glandular trichomes: prophylls of the axillary buds, leaflets, floral calyx in anthesis and flower buds (middle region to the apical) in different stages of development were collected, fixed and dehydrated, ready for analysis by SEM, while for visualization by LM and TEM was required to include in paraplast and epoxy resin, respectively. The presence of nectar was identified by glucose paper strips.

- *Key Results:* Extrafloral nectaries occurred in both reproductive and vegetative organs in all stages of development. Ants of the genera *Cephalotes*, *Camponotus*, *Ectatomma* and *Pseudomyrmex* was visiting the trichomes, especially in the morning period. The nectary starts its formation from a single protodermic cell, which differentiates and divides in anticlinal form, forming a series of cells in slightly columnar shape that are pushed up and continue dividing in anticlinal form. The peduncle's cells can be called of transfer cells, given that they have a dense anticlinal wall with irregular growths,

which function of transporting sugar into cells head. Secretory cells present dispersed vacuome with lipid droplets at the base and apex, being produced by mitochondria, endoplasmic reticulum and leucoplasts. The nectary has merocrine secretion, which are the hydrophilic substances of the eccrine type and lipophilic substances of the granulocrine type.

- *Conclusions:* The presence of transfer cells in nectaries of *A. magnificum* suggests a high specialization, since there is increase of flow potential and the release of the secretion happens more quickly. The sugar attracts many insects, creating a insect-plant interaction.

Key Words: *Adenocalymma magnificum*, insect-plant interaction, lipids, nectar, NEFs, ontogeny, patelliform trichome, ultrastructure.

INTRODUÇÃO

Os nectários são estruturas que secretam uma solução açucarada (Nicolson *et al.*, 2007). O termo não indica uma estrutura anatômica definida, pode consistir de emergências a pequenas e densas células glandulares (Fahn, 1979; Durkee, 1983; Pacini *et al.*, 2003), sendo geralmente, tricomas glandulares, apêndices epidérmicos especializados na secreção de substâncias (Fahn, 1979). Neste caso, o tecido vascular não entra em contato com as células secretoras, mas é separado por uma ou mais células (Durkee, 1983). Podem ocorrer nas folhas, caules jovens e estruturas reprodutivas (Fahn, 1979; Theobald *et al.*, 1979; Elias, 1983; Rico-Gray, 1993; Rico-Gray *et al.*, 2004; Paiva e Machado, 2006). De acordo com Elias e Gelband (1976), os nectários extraflorais não estão envolvidos com a polinização, independente de sua posição na planta. Eles ocorrem frequentemente nas Angiospermas, incluindo nas espécies de Bignoniaceae (Fahn, 1979; Metcalfe e Chalk, 1979; APG III, 2009), onde são tricomas glandulares pateliformes/cupuliformes (e.g., Elias e Gelband, 1976; Nogueira, 2011).

Os nectários possuem uma intensa relação com insetos, em particular as formigas, que são atraídas pelos recursos secretados pelos NEFs (Koptur, *et al.* 1998; Heil e McKey, 2003; Oliveira e Freitas, 2004). Existem relatos de que os NEFs estão envolvidos na proteção contra a herbivoria de maneira indireta, pela ação das formigas visitantes frente aos herbívoros (Vesprini *et al.*, 2003; Oliveira e Freitas, 2004). A proteção contra a ação de diversos herbívoros depende, geralmente, do tipo de associação entre plantas e formigas, que pode ser negativa, neutra ou positiva para a planta.

Existem diversos trabalhos com nectários em Bignoniaceae, sendo os de maior abrangência os trabalhos de Seibert (1948), Rivera (2000a,b), Gonzalez (2011) e

Nogueira (2011). Apesar da grande quantidade de estudos, pouco se sabe sobre a ontogenia e ultraestrutura desses nectários, informações necessárias aos estudos de funcionalidade e liberação de sua secreção.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi investigar o desenvolvimento e analisar a função do nectário extrafloral ou tricoma pateliforme de *Adenocalymma magnificum* (Bignoniaceae). Para isso, utilizou-se observação em campo, ferramentas de microscopia e testes histoquímicos, que confirmaram a presença de açúcar na secreção e células de transferência na estrutura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico, visitantes e néctar

Espécimes de *Adenocalymma magnificum* Mart. ex DC. foram coletados na beira da estrada da PA – 318 - Marapanim, para herborização e procedimentos em anatomia vegetal. Amostras frescas dos perfis da gema axilar e folíolos (do primeiro ao quinto nó), cálice da flor em antese e botões florais (região mediana à apical), foram coletados e fixados. Formigas visitando os tricomas pateliformes presentes nos perfis, botões florais e no cálice de flores em antese também foram coletadas e preservadas em álcool etílico 70% para posterior identificação. A fim de verificar ausência ou presença de glicose na secreção, foi usada a glicofita Plus, no material fresco, ainda no campo. O material testemunho foi herborizado e incorporado no Herbário João Murça Pires (MG 203513).

Microscopia de luz e testes histoquímicos

Para as análises anatômicas sob microscopia de luz, amostras foram fixadas em FAA₅₀ e FNT, por 24 e 48 horas, respectivamente, desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen, 1940) e incluídas em Paraplast (Leica Microsystems Inc., Heidelberg, Germany). Secções transversais e longitudinais (8 – 13 µm) foram realizadas com auxílio de um micrótomo rotativo e posteriormente corados com Safranina e Azul de Astra (modificado; Gerlach, 1984). Quatro testes histoquímicos foram realizados com cortes feitos à mão no material fresco: reação PAS, para detectar a presença de polissacarídeos totais (McManus, 1948); Sudan Black B, para lipídios totais (Pearse, 1980); Cloreto Férrico, para compostos fenólicos (Johansen, 1940) e NADI, para óleos essenciais (David e Carde, 1964).

Microscopia Eletrônica

O material destinado às análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi fixado em glutaraldeído por 42h, pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2, desidratado sob bateria acetônica, para posterior inclusão em resina epóxi (Roland, 1978). Secções ultrafinas foram feitas e contrastadas com acetato de uranila e lavadas com citrato de chumbo, para posterior análise no microscópio eletrônico Zeiss EM 900.

As amostras destinadas às análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram fixadas em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2, desidratada em série etanólica e secadas sob ponto crítico (Robards, 1978). O material seco foi colocado sobre *stubs* de alumínio, coberto com uma fina camada de ouro, para análise em um microscópio eletrônico modelo LEO 1450 VP.

RESULTADOS

Observações de campo

O tricoma pateliforme ocorreu nos órgãos vegetativos (Fig. 1A-C) e reprodutivos (Fig. 1D-G) das plantas, em todos os estádios de desenvolvimento. Nos perfis da gema axilar (Fig. 1A-B) e no cálice (Fig. 1D-G) o tricoma aumentou em quantidade e tamanho, em relação aos presentes nos folíolos. Essas estruturas foram caracterizadas à vista desarmada, como pontos nos folíolos, perfis da gema axilar dos cinco primeiros nós e cálice.

Formigas dos gêneros *Cephalotes*, *Camponotus*, *Ectatomma* e *Pseudomyrmex* visitaram frequentemente os nectários, sobretudo no período da manhã. Nos folíolos e perfis da gema axilar das regiões mais jovens observou-se uma quantidade maior de formigas, indicando maior quantidade de secreção, em relação aos nós subsequentes.

O teste realizado com glicofita revelou que o material secretado por esses tricomas pateliformes, contém glicose, podendo então ser denominados funcionalmente de nectário.

Estrutura dos tricomas pateliformes

São formados por uma camada de células basais, as quais dão continuidade à epiderme; células do pedúnculo, que compreendem uma camada de células cuboides de paredes espessadas; e por uma epiderme secretora bi ou multiestratificada, apresentando formato colunar com paredes delgadas. Está acima do nível epidérmico, sendo então um tricoma elevado, com células da epiderme ao redor recobrando-o parcialmente (Fig. 2A, B e G).

Ontogênese e secreção

A formação do tricoma glandular inicia a partir de uma única célula protodérmica, identificada por conter núcleo proeminente e coloração densa, que se diferencia-se e se divide anticlinalmente, formando uma série de células levemente colunares (Fig. 2C), que se alongam e que continuam se dividindo anticlinalmente. Simultaneamente, as células epidérmicas estão, através de divisões periclinais, formando uma fileira que corresponde às células do pedúnculo e às células basais. Vale ressaltar que as células do pedúnculo passam por várias divisões anticlinais (Fig. 2D), formando uma haste curta, porém ampla com paredes anticlinais finas. Entretanto, quando passam pela fase pré-secretora, observa-se o espessamento dessas paredes. A célula basal realiza divisões anticlinais simultâneas às do pedúnculo (Fig. 2E), a fim de manter a amplitude constituída neste tricoma, mas não espessa as suas paredes em nenhum momento (Fig. 2F-H).

O tricoma pateliforme, por ter origem unicamente protodérmica, não possui suprimento vascular direto, embora sejam observados feixes floemáticos até duas camadas abaixo da célula basal (Fig. 2G). Na fase secretora, a cutícula se distende na porção central deste tricoma (Fig. 2H) e que as paredes anticlinais das células do pedúnculo se espessam (Fig. 2I). As células do parênquima e os feixes vasculares possuem o citoplasma denso e alongam-se em direção ao nectário, o que indica que esta região está produzindo e conduzindo seiva floemática ao nectário. Neste momento o néctar não está completamente constituído, sendo chamado ainda de pré-néctar. Sua transformação ocorre durante o percurso, via simplasto, para depois ser liberado para fora do nectário.

Reação PAS, Sudan Black B e cloreto férrico deram positivo nas células secretoras (Figura 3A-C). Enquanto que o reagente de NADI, corou apenas cutícula em azul, indicando resultado negativo (Figura 3D).

Aspectos ultraestruturais

A célula basal, que está no nível da epiderme, mostra características ultraestruturais do citoplasma, similares às células epidérmicas adjacentes. Entretanto, plasmodesmos foram vistos entre as células basais e as células do pedúnculo, indicando que existe passagem de substâncias via simplasto.

As células do pedúnculo são peculiares nesta espécie, por apresentarem parede anticlinal espessa (Fig. 4A), com crescimentos irregulares (Fig. 4B), além dos plasmodesmos nas paredes periclinais, que ligam as células do pedunculo às células secretoras (Fig. 4C). Por terem esta morfologia, funcionalmente são chamadas de “células de transferência”, denominação utilizada deste ponto em diante do trabalho, para explicitar que elas são especializadas, pois facilitam o fluxo de açúcar para as células secretoras. Foi visto também que seu vacuoma é disperso, apresentando muitas mitocôndrias e poucas gotas elétron densas (Fig 4A).

Em relação às células secretoras, pode-se falar que o vacuoma é disperso e exhibe gotas lipídicas (Fig.4D), principalmente na base e no ápice das células. Tais substâncias lipídicas estão sendo produzidas nas células secretoras, sem qualquer envolvimento da célula de transferência. Mitocôndria, leucoplastos e retículo endoplasmático (Fig.4E) foram aqui facilmente identificados, ao contrário dos dictiossomos (Fig.4F) que não foram tão representativos nesta fase. Esta organela é comumente encontrada próxima às vesículas e parede celular.

As substâncias hidrofílicas são acumuladas sob a cutícula temporariamente, e posteriormente liberadas por projeções da parede celular (Fig.4G), mas às vezes, causa o rompimento da cutícula nas regiões onde não foram observadas essas projeções, até ocorrer o desprendimento da mesma, sendo então classificada como secreção écrina. Lipídios e compostos fenólicos são envolvidos por membrana, formando vesículas que se fundem com a membrana plasmática (Fig.4H), sendo então do tipo granulócrina. O nectário permanece intacto após a liberação de ambas as secreções, sendo então secreções merócrinas.

DISCUSSÃO

Os tricomas glandulares encontrados neste trabalho são morfologicamente similares aos já descritos para o eixo vegetativo e reprodutivo de Bignoniaceae (e.g. Seibert, 1948, Mehra e Kulkarni, 1989; Rivera, 2000b; Nogueira, 2011). Entretanto, alguns dados em relação à morfologia foram somados e outros de essência funcional foram aqui divulgados, como a presença de células de transferência e propriedades químicas da secreção. Estas células de transferência são as mesmas células do pedúnculo, que por pressões de natureza fisiológica, acabaram assumindo a função de transportar açúcar através do fluxo trans-membrana. Foi visto ainda que, concomitantemente à secreção do néctar, ocorre a de compostos lipofílicos, sendo então classificada como secreção heterogênea, que possui dois tipos de liberação, écrina e granulócrina.

Esses tricomas glandulares cupuliformes/pateliformes são típicos de espécies do gênero *Adenocalymma* (Nogueira, 2011) e, portanto, os resultados confirmam o posicionamento de *A. magnificum* no clado atual. Essas estruturas secretoras também

foram chamadas de glândulas em forma de vulcão por Lohmann (2006), pelo seu formato particular, podendo serem vistas a olho nu ou com a utilização de estereomicroscópio.

No passado, muitos autores propuseram que determinadas estruturas seriam mais especializadas que outras, dada a sua morfologia. No caso particular das estruturas secretoras não foi diferente; estruturas supridas com tecido vascular foram tidas como estruturas mais especializadas que as não supridas por tecido vascular (e.g. Wyssling, 1955). Entretanto, Carlquist (1969), discorda, afirmando que a quantidade de tecido vascular em uma estrutura é diretamente proporcional ao seu tamanho e não está necessariamente relacionada com qualquer estado de especialização. Com o advento da sistemática filogenética já se sabe hoje que, tais estruturas secretoras, com tecido vascular (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* – Paiva e Machado, 2006), e sem tecido vascular (e.g. EFNs em Bignoniaceae), tiveram origens evolutivas diferentes e, portanto contam histórias particulares únicas, deste modo, não podem ser tratadas conjuntamente como especializadas ou não especializadas.

Neste contexto de especialização, encontram-se também as células de transferência, células que facilitam o transporte de solutos a curta distância pelo fluxo trans-membrana (Pate e Gunning, 1972). As células de transferência são, aparentemente, restritas às situações em que a correlação área-volume não são equivalentes, sendo menor a área do que o volume, ou ainda, quando o soluto transportado é acompanhado por um fluxo mínimo de solvente. A presença destas células especializadas sugere que uma seleção de natureza fisiológica agiu e as envolveu, resultando nas células de transferência (Gunning e Pate, 1969).

Morfologicamente, as células de transferência, encontradas neste trabalho, aparecem com paredes anticlinais finas em uns momentos e em outros com parede

espassada, então notou-se que o início do espessamento da parede se dá quando as células estão em fase pré-secretora. Esta informação corrobora com os estudos de Schnepf (1964), onde demonstra que, a proliferação das invaginações nas paredes celulares possui relação com os eventos fisiológicos de secreção do néctar em *Gasteria*, que inicia o espessamento da sua parede celular quando está na fase pré-secretora, e encerra tal espessamento na fase secretora, sendo posteriormente degenerada e reabsorvida na fase pós-secretora. Gunning e Pate (1969), também observaram que as células secretoras do nectário extrafloral de *Vicia faba* L. não formam invaginações até a secreção do açúcar começar. Logo, é possível inferir que há uma relação entre a formação das invaginações com a secreção do néctar em *A. magnificum*, visto que nesta espécie, as invaginações das paredes estavam presente nos nectários somente na fase secretora.

O fato das células de transferência transportarem eficazmente as substâncias é confirmado pelas diversas mitocôndrias encontradas no interior destas células, que possuem função de produzir energia para bombear a secreção para o meio externo. O fato de as células de transferência estarem envolvidas apenas na transferência de solução com açúcares é fortemente apoiada no estudo de Schnepf (1969), que mostram que as invaginações são raramente encontradas em sistemas onde a secreção é por vesículas. Entretanto, frequentemente ocorrem invaginações apoiando secreções écrinas (Schnepf, 1961, 1969).

Em relação à secreção, foi visto que diferentes eventos ocorrem ao mesmo tempo, em *A. magnificum*, devido a produção de uma secreção heterogênea com a presença de substâncias químicas produzidas por diversas vias metabólicas, sendo uma novidade para estruturas secretoras. Os açúcares são, em grande parte, transferidos pelas células do pedúnculo e são liberados por projeções da parede, na qual as moléculas

atravessam a membrana plasmática da célula secretora como resultado de um gradiente de concentração ou por processo ativo (Fahn, 1979), assim como em *Gasteria* e em algumas outras Liliaceae (Schnepf, 1964; Lüttge e Schnepf, 1976). Essa possibilidade de transporte ativo de açúcares dentro do nectário de *Abutilon* foi discutido por Findlay *et al.* (1971). Já as substâncias lipídicas são secretadas por vesículas e saem para o meio externo por exocitose.

Nas células secretoras, algumas organelas estavam bastante evidentes, como as mitocôndrias envolvidas na produção de energia e os leucoplastos e retículo endoplasmático, que são as duas organelas envolvidas na produção de lipídios. Embora o retículo endoplasmático esteja envolvido nesta produção é possível também que ele esteja relacionado ao transporte de néctar, pois Heinrich (1975), afirma que esta organela está atuando ativamente no transporte de néctar em *Aloe*, visto que existe uma alta atividade de ATPase, nucleosídeo difosfatase, e glucose-6-fosfatase no retículo endoplasmático dos nectários, e geralmente não há atividade destas fosfatases na membrana plasmática. O mesmo é apontado por Fahn (2000) 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. Dictiossomo também foi uma organela visualizada, mesmo que em pouca quantidade, indicando que não é produzido muito oligossacarídeo nas células secretoras.

Com a constatação da presença de açúcar na secreção destes tricomas glandulares de *A. magnificum*, tais estruturas foram identificadas como nectários e, devido não estarem envolvidos no processo de polinização, são chamados de nectários extraflorais – NEFs (Elias e Gelband, 1976). Essa liberação de açúcar, geralmente, atrai diversos insetos e acaba gerando então uma interação inseto-planta (Bentley, 1977;

Elias, 1983; Vilhena-Potiguara *et al.*, 2012). Neste caso, as plantas fornecem alimento para as formigas, enquanto estas protegem a planta contra os herbívoros (Bentley, 1977; Rogers, 1985; Heads, 1986; Oliveira *et al.*, 1987; Oliveira e Pie, 1998). À semelhança do observado em *A. magnificum*, Ness (2003), demonstra que *Catalpa bignonioides* usa o néctar para a atração de formigas em resposta ao ataque de herbívoros. Stephenson (1982), acrescenta que em *Catalpa speciosa* a produção de néctar nas folhas é distribuída por vários nectários e em consequência desta distribuição de NEFs, as formigas patrulham uma extensa porção da folha enquanto buscam por néctar, o que pode resultar em maiores taxas de herbívoros descobertos pelas formigas, aumentando as taxas de remoção desses insetos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que as estruturas secretoras encontradas aqui são nectários extraflorais, embora secretem também substâncias lipofílicas. A secreção heterogênea, torna-se um dado importante por ocorrer simultaneamente tanto substâncias lipofílicas quanto hidrofílicas liberadas de formas diferentes e ao mesmo tempo. Células de transferência foram descritas, pela primeira vez, para estruturas secretoras de Bignoniaceae e apesar de não ter sido mostrado detalhadamente o caminho de formação do néctar, especula-se que as invaginações da parede celular presentes em células nectaríferas, podem facilitar a secreção de néctar em *A. magnificum*. A partir dos dados obtidos, novos estudos podem ser idealizados, enfocando a formação da secreção e a respeito interação inseto-planta.

AGRADECIMENTOS

À Emely Siqueira e Marcília Gabriella Tavares, do Laboratório de Entomologia - Coordenação de Zoologia do MPEG, pela identificação das formigas e ao Dr. Alexandre

Bonaldo, do Laboratório de Aracnologia do MPEG, pelo empréstimo do microscópio para a captura das imagens estruturais.

LITERATURA CITADA

- 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.
- Bentley BL. 1977.** Extrafloral Nectaries and protection by pungnancious bodyguards. *Ecology* **8**: 407–427.
- Carlquist SJ. 1969.** *Toward Acceptable Evolutionary Interpretations of Floral Anatomy.*
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Scéances de l'Academie des Sciences Paris* **258**: 1338–1340.
- Durkee LT. 1983.** The ultrastructure of floral and extra-floral nectaries. In: Bentley BL, Elias T S, eds. *The biology of nectaries*. New York: Columbia University Press.
- Elias T. 1983.** Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: Bentley BL, Elias TS, eds. *The biology of nectaries*. Oxford: Oxford University Press, 174–203.
- Elias TS, Gelband H. 1976.** Morphology and Anatomy of Floral and Extrafloral Nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* **63**: 1349–1353.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press Inc.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells (BT-A in B Research, Ed.). *Advances in Botanical Research* **31**: 37–75.
- Findlay N, Reed ML, Mercer FV. 1971.** Nectar Production in *Abutilon*. *Australian Journal of Biology Science* **24**: 665–675.
- Gerlach D. 1984.** *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme.
- Gonzalez AM. 2011.** Domacios y nectarios extraflorales en Bignoniáceas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **46**: 271–288.
- Gunning BES, Pate JS. 1969.** "Transfer Cells" Plant Cells with Wall Ingrowths, Specialized in Relation to Short Distance Transport of Solutes-Their Occurrence, Structure, and Development. *Protoplasma*. **68**: 107–133.
- Heads PA. 1986.** Bracken, Ants and Extrafloral Nectaries. IV. Do Wood Ants (*Formica lugubris*) Protect the Plant Against Insect Herbivores? *Journal of Animal Ecology* **55**: 795–809.

- Heil M, McKey D. 2003.** Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**: 425–553.
- Heinrich G. 1975.** On the localization of different phosphatases in the nectary of *Aloe*. *Cytobiologie* **11**: 247–263.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: Mcgraw-Hill Book.
- Koptur S, Rico-Gray V, Palacios-Rios M. 1998.** Ant protection of the nectaried fern *Polypodium plebeium* in central Mexico. *American Journal of Botany* **85**: 736-739
- Lohmann L. 2006.** Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). *American Journal of Botany* **93**: 304–318.
- Lüttge U, Schnepf E. 1976.** Elimination processes by glands: organic substances. *Transport in plants 11. Part B: Tissues and organs*. Berlin, 244–277.
- McManus JFA. 1948.** Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* **23**: 99–108.
- Mehra K, Kulkarni A. 1989.** Floral trichomes in some members of Bignoniaceae. *Proceedings: Plant Sciences* **99**: 97–105.
- Metcalf CR, Chalk L. 1979.** *Anatomy of the Dicotyledons*. Califórnia: Clarendon Press.
- Ness JH. 2003.** *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia* **134**: 210–218.
- Nicolson S, Nepi M, Pacini E. 2007.** *Nectaries and nectar*. The Netherlands: Springer-Verlag.
- Nogueira A. 2011.** *Evolução e ecologia de tricomas em Bignoniaceae (Bignoniaceae): estruturas morfológicas de defesa anti-herbivoria?* Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Oliveira PS, Freitas AVL. 2004.** Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Die Naturwissenschaften* **91**: 557–570.
- Oliveira PS, Pie MR. 1998.** Interaction Between Ants and Plants Bearing Extrafloral Nectaries in Cerrado Vegetation. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **27**: 161–176.
- Oliveira PS, Silva AF, Martins AB. 1987.** Ant foraging on extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential antiherbivore agents. *Oecologia* **74**: 228–230.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini J L. 2003.** Nectar biodiversity: a short review. *Plant Syst Evol* **238**: 7–21.

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

Pate J, Gunning B. 1972. Transfer cells. *Annual Review of Plant Physiology* **23**: 173–196.

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

Rico-Gray V. 1993. Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. *Biotropica* **25**: 301–315.

Rico-Gray V, Oliveira PS, Parra-Tabla V, Cuautle M, Díaz-Castelazo C. 2004. Ant – Plant Interactions: Their Seasonal Variation and Effects on Plant Fitness. In: Martínez ML, Psuty PN, eds. *Coastal Dunes*, Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 221–239.

Rivera GL. 2000a. Nuptial nectary structure of Bignoniaceae of Argentina. *Darwiniana* **38**: 227–239.

Rivera GL. 2000b. Nectarios extranupciales florales en especies de Bignoniaceae de Argentina. *Darwiniana* **38**: 1–10.

Robards AW. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: J.L. Hall, ed. *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. New York: Elsevier.

Roland JC. 1978. General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL, ed. *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. New York: Elsevier, 1–62.

Rogers CE. 1985. Extrafloral Nectar: Entomological Implications. *Bulletin of the ESA* **31**: 15–20.

Schnepf E. 1961. Licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an Insektivoren-Drüsen über die Sekretion des Fangschleimes. *Flora* **151**: 73–87.

Schnepf E. 1964. Zur Cytologie und Physiologie pflanzlicher Drüsen: 4. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Septalnektarien. *Protoplasma* **58**: 137–171.

Schnepf E. 1969. Sekretion und Exkretion bei Pflanzen. *Protoplasmatol Handb Protoplasmaforsch* **8**: 1–181.

Seibert RJ. 1948. The Use of Glands in a Taxonomic Consideration of the Family Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **35**: 123–137.

Stephenson AG. 1982. The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. *Ecology* **63**: 663–669.

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.

Theobald WL, Krahulik JL, Rollins RC. 1979. Trichome Description and Classification. In: Metcalfe C, Chalk L, eds. *Anatomy of the dicotyledons 1*. Oxford: Oxford University Press.

Vilhena-Potiguara RC, Aguiar-Dias ACA, Kikuchi TYS, Santos ACF, Silva RJF. 2012. Estruturas secretoras em cipó-d'alho (*Mansoa standleyi* (Steerm.) A. H. Gentry, Bignoniaceae): ocorrência e morfologia. *Acta Amazonica* **42**: 321–328.

Vesprini JL, Galetto L, Bernardello G. 2003. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. *Canadian Journal of Botany* **81**: 24–27.

Wyssling F. 1955. The phloem supply to the nectaries. *Acta Botanica Neerlandica* **4**: 358–369.

LISTA DE LEGENDAS

Figura 1. Aspectos morfológicos dos nectários em órgãos vegetativos (A-C) e reprodutivos (D-G) de *Adenocalymma magnificum*. A – Vista geral do tricoma pateliforme no perfil da gema axilar. B – Detalhe do tricoma em fase secretora (seta). C – Vista geral dos pontos translúcidos no folíolo. D-G: Tricoma pateliforme de *A. magnificum* em diferentes estádios de desenvolvimento da flor. D – Vista geral do botão floral (seta no tricoma pateliforme). E-F – Flor. G – Tricoma em fase secretora com hifas de fungos (MEV).

Figura 2. Estrutura das fases de desenvolvimento dos tricomas pateliformes de *Adenocalymma magnificum*. A, B e G: Estrutura. A-B: Vista frontal do perfil da gema axilar (A) e do cálice (B) em fase secretora, notar distensão da cutícula (seta) (MEV). G – Secção longitudinal do tricoma pateliforme demonstrando vascularização pelo floema (seta). C-I: Fases de desenvolvimento. D-E: Fase intermediária, evidenciando divisões anticlinais das células basais e pedunculares. F-H: Tricoma pateliforme desenvolvido. I – Detalhe do espessamento da parede anticlinal da célula do pedúnculo.

Figura 3. Testes histoquímicos no tricoma pateliforme de *Adenocalymma magnificum*. A – Células de transferência e cutícula coraram sob o Sudan black. B – Compostos fenólicos detectados com cloreto férrico. C – Reação PAS. D – Células de transferência e cutícula indicando presença de essências.

Figura 4. Aspectos da ultraestrutura dos tricomas pateliformes de *Adenocalymma magnificum*. A-B: Células de transferência. A – Células com vacuoma disperso e parede anticlinal espessa. B – Crescimentos irregulares na parede celular (seta). C-H: Células da cabeça. C – Detalhe dos plasmodesmos entre a célula de transferência e secretora (seta). D – Células da cabeça secretora em paliçada, evidenciando gotas lipídicas. E – Organelas mais representativas nestas células, mitocôndrias, leucoplastos e retículo endoplasmático. F – Dictiossomos próximos às vesículas. G – Projeções da parede celular, por onde são liberadas as substâncias hidrofílicas (seta). H – Vesículas liberando compostos fenólicos. Abreviações: cf, compostos fenólicos; di, dictiossomos; gl, gotas lipídicas; le, leucoplastos; mi, mitocôndrias; pc, parede celular; re, retículo endoplasmático; va, vacúolo.

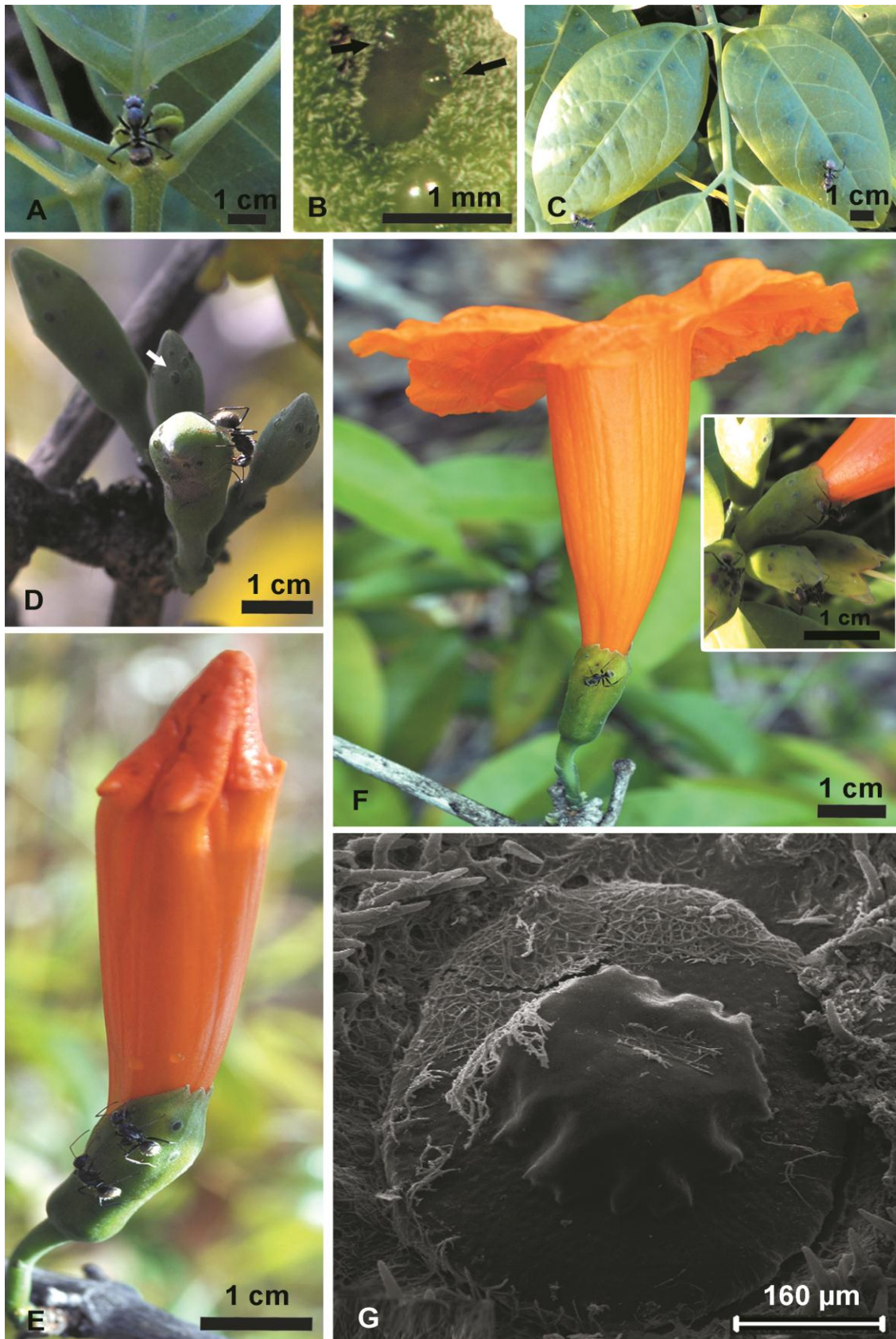


Figura 1

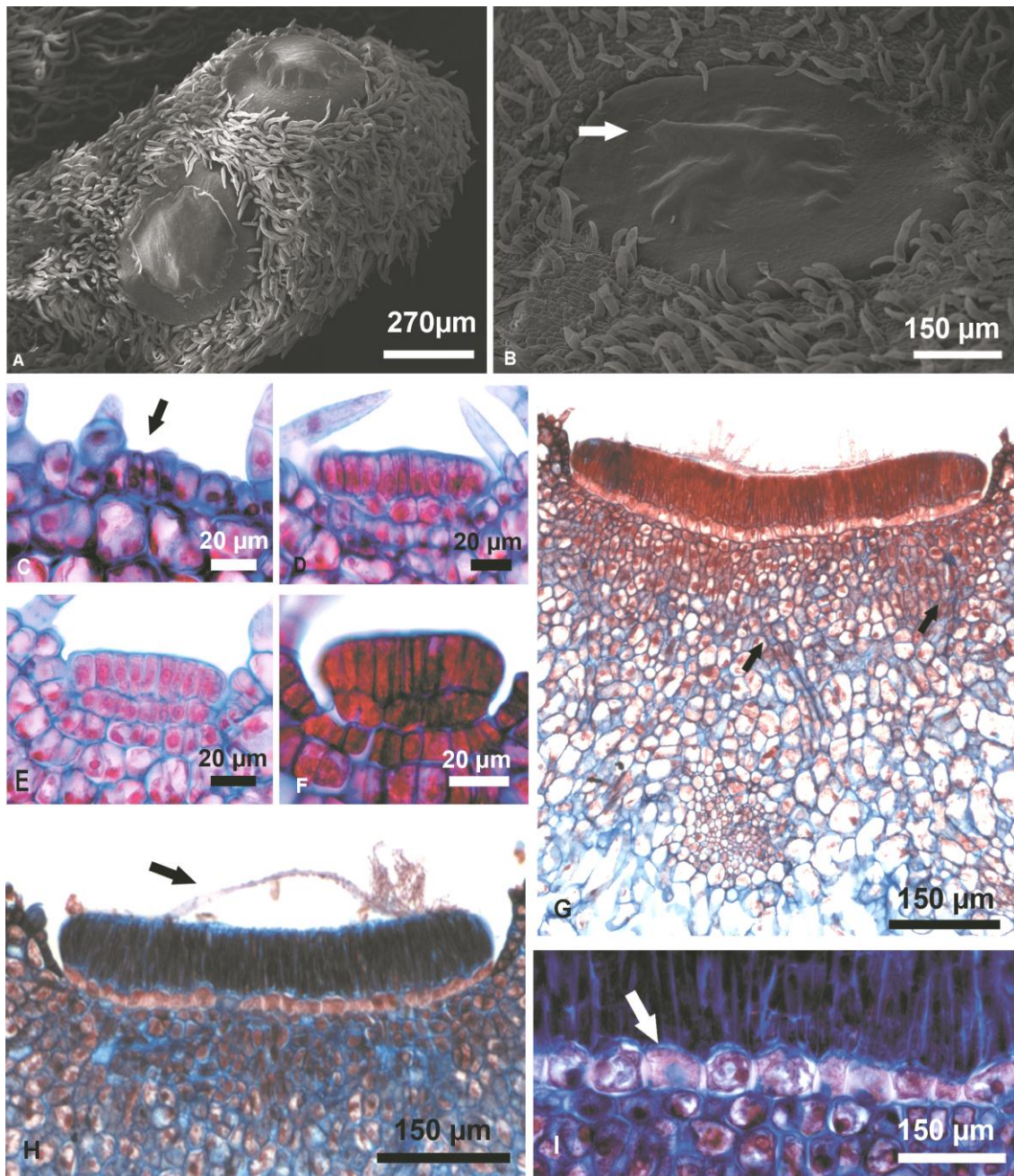


Figura 2

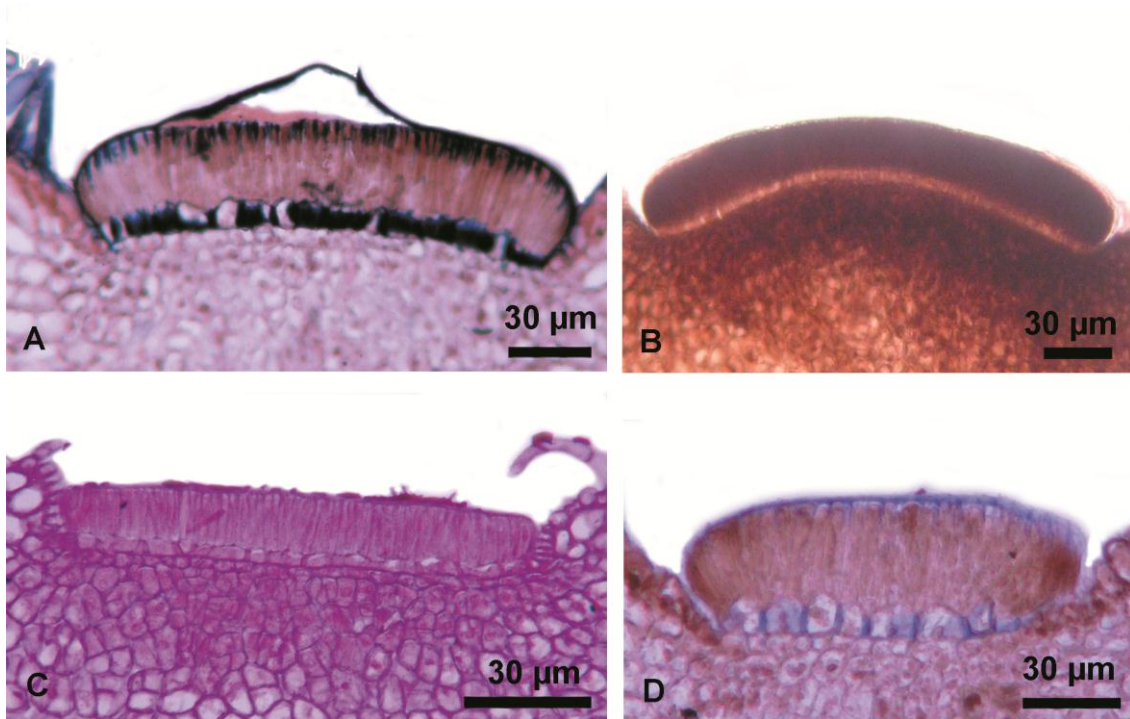


Figura 3

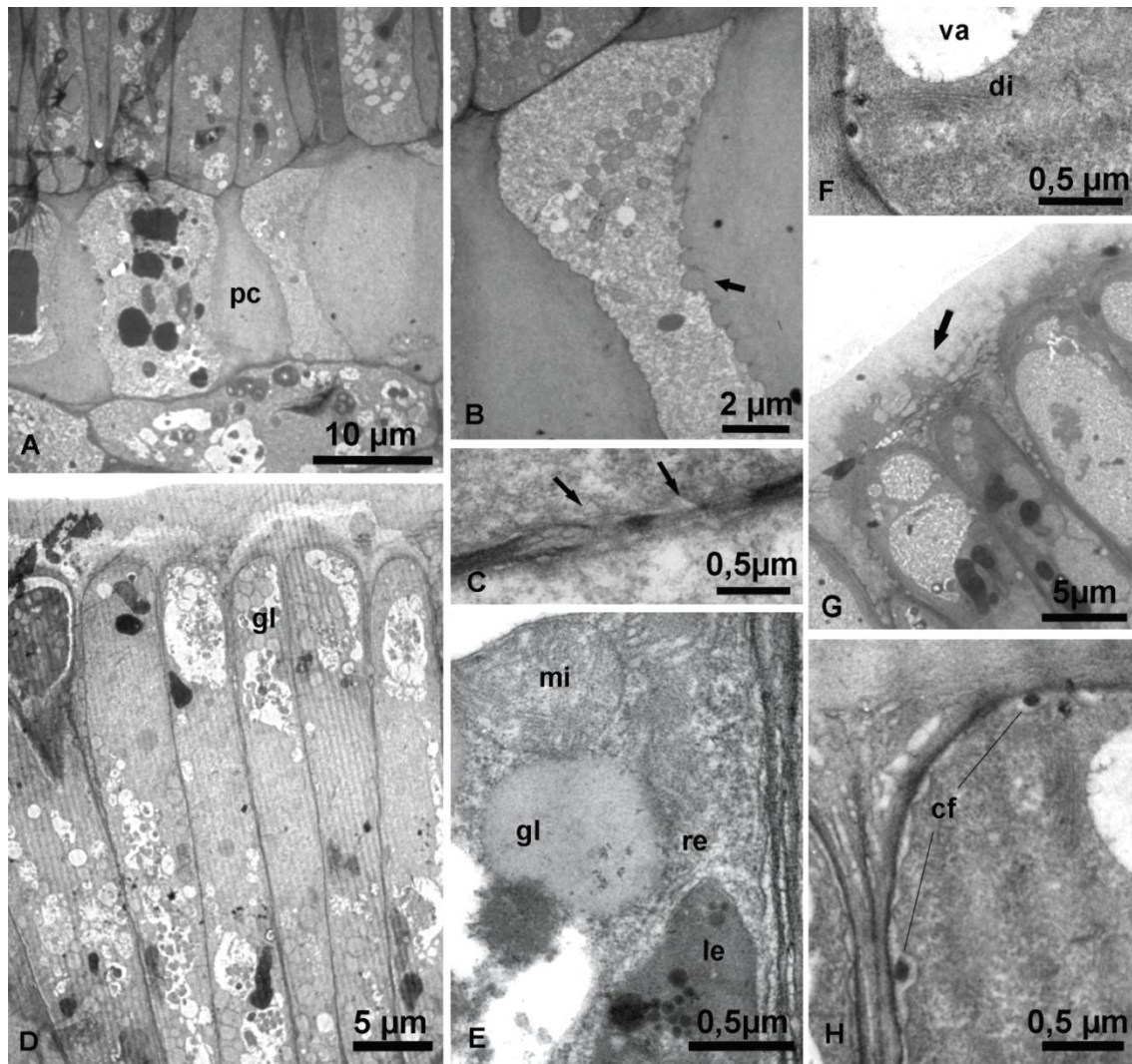


Figura 4

3. CAPÍTULO 2

**Tricoma calicinal em *Adenocalymma magnificum* (Bignoniaceae): Ontogênese,
estrutura e aspectos funcionais**

THÁLIA DO SOCORRO SERRA GAMA¹, DIEGO DEMARCO² e ANA CRISTINA
ANDRADE DE AGUIAR-DIAS³

1. Universidade Federal Rural da Amazônia/ Museu Paraense Emílio Goeldi, Laboratório de Anatomia vegetal. Av. perimetral, 1901. – Terra Firme, 66077-530, Belém – PA (thaliagama@gmail.com).

2. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Rua do Matão, 277. 05508-090, São Paulo – SP (diegodemarco@usp.br).

3. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. Rua Augusto Corrêa. 66075-110, Belém – PA (acaaguiar@yahoo.com.br).

*** Artigo a ser enviado para a revista “*FLORA*”**

RESUMO

Estruturas que secretam lipídios e compostos fenólicos são frequentemente associadas à proteção e desenvolvimento dos órgãos contra dessecação, além da possível interação com animais. Os tricomas glandulares capitados calicinais de *Adenocalymma magnificum* foram estudados neste trabalho. A fim de verificar as atividades glandulares ocorrentes neste tricoma, fez-se necessário o estudo da ontogênese, estrutura, ultraestrutura e aspectos histoquímicos, visto que a interpretação das suas funções ecológicas ou história evolutiva é complicada, pois poucos são os trabalhos que enfocam tricomas calicinais não secretores de néctar. Amostras do cálice floral em antese e botões florais em diferentes estádios de desenvolvimentos foram fixados em FAA₅₀, FNT e glutaraldeído, cortados e corados para análises em microscopia de luz e eletrônicas de varredura e transmissão. Os tricomas de *Adenocalymma magnificum* ocorrem em toda extensão da superfície interna do cálice, uniformemente, sem estarem concentrados em uma região específica dessa superfície. Esses tricomas são glandulares capitados, compostos de uma única célula basal proeminente, um pedúnculo longo, possuindo até oito células e uma cabeça secretora multicelular, com células em formato colunar dispostas em disco. As células do pedúnculo apresentam uma parede anticlinal espessa com presença de substâncias lipídicas e a ultraestrutura evidenciou que as duas células apicais do pedúnculo são células de transferência. Na cabeça secretora o vacuoma está disperso, possuindo muito retículo endoplasmático, leucoplastos e mitocôndrias, essas três organelas estão envolvidas no processo de produção das substâncias osmiofílicas. Dictiosomos foram vistos em associação com vesículas e por meio delas a extrusão é realizada, evidenciando a liberação granulócrica.

Palavras-chave: Células de transferência, compostos fenólicos, estruturas secretoras, lipídios, tricoma glandular capitado.

ABSTRACT

Structures that secrete lipids and phenolic compounds are often associated with the protection and development of organs that protect against desiccation, in addition to the protection they afford from animals. The calicinal capitate trichomes of *Adenocalymma magnificum* are such structures. Understanding the glandular activities that occur in its trichomes required studying their ontogeny, structure, ultrastructure and histochemical aspects; the interpretation of their ecological functions or evolutionary history is complicated by the scarcity of work focused on researching calicinal trichomes that are not nectar-secreting. Samples of floral calyx in anthesis and flower buds at different stages of development were fixed and processed according to the usual methods for light microscopy and scanning transmission electron microscopy. The trichomes of *Adenocalymma magnificum* are randomly distributed throughout the entire inner surface of the calyx. These capitate glandular trichomes are composed of a single, prominent basal cell, a long peduncle having up to eight secretory cells, and a multicellular secretory head with its cells in columnar format and arranged in disc form. The peduncle's cells exhibit a dense anticlinal wall containing lipid substances. The ultrastructure showed that the peduncle's two apical cells are transfer cells. In the secretory head, the vacuome is dispersed and possesses a lot of endoplasmic reticulum, leucoplasts and mitochondria, the three organelles involved in the production of osmophilic substances. Dictyosomes, with vesicles, were observed. The dictyosomes vesicles perform the extrusion that reveals the granulocrine secretion.

Keywords: Cell transfer, phenolic compounds, secretory structures, lipids, capitate trichomes.

INTRODUÇÃO

As estruturas secretoras definem-se como “células únicas especializadas ou estruturas multicelulares de formas variadas que eliminam substâncias específicas” (Fahn, 1979, 2000) e são de extrema importância na delimitação taxonômica de espécies de Bignoniaceae (Seibert, 1948). Estudos ontogenéticos vêm esclarecer o processo de desenvolvimento, além de oferecer informações para evidenciar a síntese e secreção dos compostos produzidos por essas estruturas (Ascensão e Pais, 1987; Ciccarelli et al., 2001; Kalachanis e Psaras, 2005; Liang et al., 2006; Mariani et al., 1989; Monteiro et al., 2001; Moura et al., 2005; Silva e Machado, 1999).

Os tricomas secretores presentes no cálice de espécies de Bignoniaceae têm sido anatomicamente estudados por diversos autores (Laroche, 1974; Mehra e Kulkarni, 1989; Raghavan e Venkatasubban, 1940; Rivera, 2000a, 2000b; Subramanian e Inamdar, 1985; Subramanian e Inamdar, 1989; Treub, 1889). Entretanto, o foco desses trabalhos são os nectários calicinais, pouco se fala sobre a função, organização estrutural e secreção presente nas outras estruturas secretoras.

Essas estruturas secretoras contidas no cálice têm sido relacionadas à atração ou recompensa por polinizadores, à proteção química ou mecânica contra herbívoros ou para a proteção da flor contra dessecação e diversos outros fatores abióticos (Bottega e Corsi, 2000; Castro et al., 2001; Wagner et al., 2004; Simões et al., 2006).

Adenocalymma magnificum Mart. ex DC. é uma liana cujas flores são grandes e com uma corola atrativa, que possui nectários extraflorais, tricomas peltados glandulares e tricomas capitados (Solereider, 1908). Nestes últimos, há uma lacuna de informações, especialmente no que diz respeito aos aspectos anatômicos e ultraestruturais, o que torna a interpretação das funções ecológicas complicada. Diante

disso, este trabalho tratou dos tricomas glandulares da face interior do cálice de *A. magnificum*, a fim de investigar o desenvolvimento e analisar a funcionalidade do tricoma calicinal de *Adenocalymma magnificum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras frescas do cálice da flor em antese e em diferentes estágios de desenvolvimentos (cerca de 50% expandido e completamente expandido) foram coletados de espécimes de *Adenocalymma magnificum* Mart. ex DC. na estrada Marapanim, PA – 318, e o material testemunho foi herborizado e incorporado no Herbário João Murça Pires (MG 203513). Para verificar a presença de glicose na secreção, foi usada a glicofita Plus no material ainda no campo.

Para as análises anatômicas sob microscopia de luz, amostras foram fixadas em FAA₅₀ e FNT, por 24 e 48 horas, respectivamente; desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen, 1940) e incluídas em Paraplast (Leica Microsystems Inc., Heidelberg, Germany). Secções transversais e longitudinais (8 – 13 µm) foram realizadas com auxílio do micrótomo rotativo e posteriormente corados com Safranina e Azul de Astra (modificado; Gerlach, 1984). Os seguintes testes histoquímicos foram realizados: reação PAS, polissacarídeos totais (McManus, 1948); Sudan Black B, para lipídios totais (Pearse, 1980); Cloreto Férrico, para compostos fenólicos (Johansen, 1940) e NADI, para óleos essenciais (David e Carde, 1964).

O material destinado às análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi fixado em glutaraldeído por 42h, pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2, desidratado sob bateria acetônica, para posterior inclusão em resina epóxi (Roland, 1978). Secções ultrafinas foram feitas e contrastadas com

acetato de uranila e citrato de chumbo, para posterior análise no microscópio eletrônico modelo Zeiss EM 900.

As amostras destinadas às análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram fixadas em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2, desidratada em série etanólica, secas sob ponto crítico (Robards, 1978). O material seco foi colocado sobre *stubs* de alumínio, coberto com uma fina camada de ouro e examinados em um microscópio eletrônico modelo LEO 1450 VP.

RESULTADOS

Distribuição e ontogênese

Os tricomas de *Adenocalymma magnificum* são glandulares capitados (Fig. 1a), caracterizados por uma única célula basal proeminente, um pedúnculo longo formado por duas a oito células e uma cabeça secretora multicelular, que apresenta até dez células em formato colunar dispostas em disco. Esses tricomas estão distribuídos aleatoriamente, ocupando uma grande área de superfície interna do cálice, eles ocorrem em toda a sua extensão (Fig. 1b), sendo também visualizados nos botões florais.

O tricoma capitado se origina na protoderme da face adaxial do cálice. A célula precursora deste tricoma é maior do que as adjacentes, cuja projeção é ligeiramente descentralizada com núcleo esférico, de posição central (Fig. 1c). Inicialmente, esta célula aumenta de volume e a seguir, sofre uma divisão periclinal (Fig. 1d), se transformando em uma estrutura bicelular, representada por uma célula basal e uma célula apical cônica, depois, através de sucessivas divisões periclinais simétricas (Fig. 1e), é formada uma fileira unisseriada de até oito células (Fig. 1f) que correspondem a uma célula basal, seis células do pescoço e uma célula inicial da cabeça secretora. Esta

célula apical passa por diversas divisões anticlinais, formando uma cabeça secretora multisseriada, que contém até dez células, com formato colunar que se dispõem em disco. Posterior a essa etapa, a célula do colar, que está abaixo da cabeça secretora, se divide anticamente de forma assimétrica (Fig 1g) e se dispõe lado a lado da célula mãe (Fig. 1h). À medida que eles se desenvolvem, se curvam e alguns ficam adpressos no cálice (Fig. 1b e 1i).

Ultraestrutura e secreção

Testes histoquímicos indicaram que as células do pedúnculo e da cabeça secretora possuem substâncias lipídicas (Fig. 2j), sendo detectada a presença de lipídios ácidos na cabeça secretora (Fig. 2k) e compostos fenólicos em ambas as células (Fig. 2l).

As células do pedúnculo apresentam uma parede anticlinal espessa (Fig. 3m), sendo as duas apicais mais espessas em relação às outras (Fig. 3n). O vacuoma destas células é disperso e apresenta gotas elétricas densas, que através do resultado positivo no cloreto férrico e Sudan Black B, conclui-se que são compostos fenólicos de natureza lipofílica.

Nas células secretoras o vacuoma é disperso (Fig. 3o e 3p) possuindo muito retículo endoplasmático, leucoplastos e mitocôndrias (Fig 3q). Essas três organelas são as predominantes e estão envolvidas no processo de produção das substâncias osmiofílicas, porém as mitocôndrias estão envolvidas em menor abrangência quando comparadas às duas outras organelas.

Os leucoplastos estão em grande quantidade nas células secretoras, possuem formas variadas com poucas membranas internas (Fig 3r). No estroma contém gotas osmiofílicas (Fig. 3s) e, geralmente, estão parcial ou totalmente envoltos pelo retículo

endoplasmático periplastidial (Fig. 3q). Retículo endoplasmático liso estava associado intimamente com tais substâncias lipofílicas, produzindo compostos fenólicos (Fig. 3t).

Durante essa fase, as células secretoras mostraram dictiossomas em associação com a maioria das vesículas, ambos localizados próximos à membrana plasmática, sugerindo então a exocitose. Logo, o processo de secreção é merócrino e a extrusão é realizada por meio dessas vesículas (Fig. 3r), que conduzem esses compostos do interior da célula até a sua periferia, onde a membrana da vesícula se funde à membrana plasmática. Ao ocorrer isso, esse conteúdo extraprotoplástico atravessa a parede (Fig. 3u), chegando à cutícula e depois ao meio externo por liberação granulócrica. Em alguns pontos das células secretoras foi visto o desprendimento da cutícula, entretanto não foi visto o material secretado acumulado neste espaço.

DISCUSSÃO

Foram analisados dados micro-morfológicos do tricoma glandular capitado sob um contexto ontogenético e funcional, a fim de entender melhor as atividades glandulares ocorrentes neste tricoma, que são compostos de uma única célula basal proeminente, um pedúnculo longo com até oito células e uma cabeça secretora multicelular, em formato colunar disposta em disco. Na cabeça secretora o vacuoma está disperso, possuindo muito retículo endoplasmático, leucoplastos e mitocôndrias, essas três organelas estão envolvidas no processo de produção das substâncias osmiofílicas, sendo, posteriormente, secretadas por vesículas, evidenciando a liberação granulócrica

As estruturas secretoras do cálice de *A. magnificum* são classificadas como tricomas glandulares capitados, por causa de sua forma e origem protodérmica

(Solereder, 1908). Foram descritos anteriormente em alguns trabalhos relacionados à Bignoniaceae (Seibert, 1948; Solereder, 1908), entretanto nunca se analisou seu desenvolvimento, secreção e ultraestrutura.

Seibert (1948), comenta que estes tricomas podem estar localizados nos caules, pecíolos, sobre nervura dos folíolos, cálices e estaminódios e que, dependendo do seu tamanho, densidade, distribuição e são importantes na distinção entre espécies. No entanto, tricomas glandulares capitados estão presentes em poucos gêneros (Seibert, 1948).

Uma alta diversidade de tricomas glandulares capitados, com variações no tamanho do pedicelo e na forma e número de células da cabeça secretora tem sido detectada em táxons relacionados da ordem Lamiales, a qual pertence Bignoniaceae (Ascensão et al., 1995, 1999; Combrinck et al., 2007; Jurišić Grubešić et al., 2007; Kamatou et al., 2007; Kaya et al., 2007; Krstic et al., 2006; Marin et al., 2006; Werker, 1993; Werker et al., 1985). Segundo Ascensão et al. (1999), a diversidade morfológica dos tricomas glandulares, associa-se com processos distintos de secreção e composição química distinta do exsudato. No tricoma glandular capitado de *A. magnificum* a análise histoquímica indicou a presença de substâncias lipofílicas na secreção contida na cabeça do tricoma.

Nas análises ultraestruturais é possível notar impregnações por compostos lipídicos, observada nas faces anticlinais da célula do pedúnculo, aparecem prevenindo o transporte apoplástico, bloqueando o refluxo da secreção e, facilitando a extrusão, o mesmo foi descrito para outras estruturas secretoras (Fahn, 2000; Paiva, 2009; Paiva e Martins, 2011).

A presença de retículo endoplasmático liso, plastídios, com estroma fortemente elétron denso, dictiossomas pouco desenvolvidos e abundância de gotas lipídicas

dispersas no citoplasma são indícios de secreção predominantemente lipídica (Fahn, 1979; Machado et al., 2006; Sacchetti et al., 1999), corroborando os resultados observados na ultraestrutura de *A. magnificum* e confirmado pelo teste histoquímico positivos para Sudan Black B.

A presença abundante de retículo endoplasmático e plastídios evidencia a produção de lipídios, entretanto, pouco se sabe a respeito das mitocôndrias também estarem envolvidas nesse processo. No tricoma glandular capitado calicinal de *A. magnificum* visualizada essa organela com pontos elétron densos em seu interior, o que supõem a produção realizada por parte das mitocôndrias também. Essa associação é um tanto surpreendente, mas já foi vista nas glândulas de óleo em *Citrus* por Thomson et al. (1976), e também na biossíntese de terpenóides (Croteau et al., 2000).

De acordo com Schmid e Ohlrogge (2002), as mitocôndrias são, provavelmente, as organelas investigadas com maior detalhe em relação ao metabolismo de lipídios, sua habilidade de sintetizar fosfatidilglicerol e cardiolipina está bem estabelecida e as mitocôndrias também foram demonstradas sintetizando baixos níveis de ácidos graxos advindos do malonato.

A presença de diversas vesículas no citoplasma dos tricomas glandulares capitados, que se fundem à membrana plasmática e liberam a secreção contida nelas para fora do protoplasto, sugere um mecanismo granulócrino de secreção, característico de secreção lipofílica (Fahn, 1979).

A presença desses tricomas glandulares capitados, secretores de óleos, podem estar envolvidos na defesa química da planta contra insetos (Favorito, 2009). Entretanto, estudos que relacionam padrões de densidade de tricomas glandulares capitados da face adaxial do cálice de *A. magnificum* e quantidade de secreção, são necessários para afirmações relacionadas à herbivoria ou outras interações planta-ambiente.

Esse estudo mostrou que a ontogenia, morfologia e ultraestrutura dos tricomas glandulares capitados na face adaxial do cálice de *A. magnificum*, podem ajudar na interpretação das suas funções, bem como garantir futuras investigações na química, taxonomia e ecologia.

REFERÊNCIAS

- Ascensão, L., Marques, N., Pais, M. 1995. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75, 619-626.
- Ascensão, L., Mota, L., Castro, M.M. 1999. Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annals of Botany* 84, 437-447.
- Ascensão, L., Pais, M.S.S. 1987. Glandular Trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *Maritima*): Ontogeny and Histochemistry of the Secretory Product. *Botanical Gazette* 148, 221-227.
- Bottega, S., Corsi, G. 2000. Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132, 325-335.
- Castro, M.A., Vega, A.S., Múlgura, M.E. 2001. Structure and ultrastructure of leaf and calyx glands in *Galphimia brasiliensis* (Malpighiaceae). *American Journal of Botany* 88, 1935-1944.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A.C., Pagni, A.M. 2001. Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and Histochemical Studies During the Course of Ontogenesis. *Annals of Botany* 88, 637-644.
- Combrinck, S., Du Plooy, G.W., McCrindle, R.I., Botha, B.M. 2007. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany* 99, 1111-1119.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, pp.1250-1318.
- David, R., Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* 258:1338-1340.
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.
- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31, 37-75.
- Favorito, S. 2009. Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

Gerlach, D. 1984. Botanische Mikrotechnik. Stuttgart: Georg Thieme.

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, inc.

Jurišić Grubešić, R., Vladimir-Knežević, S., Kremer, D., Kalodera, Z., Vuković, J. 2007. Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia* 62, 148-156.

Kalachanis, D., Psaras, G. 2005. Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves. *Biologia Plantarum* 49, 105-110.

Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., Figueiredo, A.C., Tilney, P.M., Van Zyl, R.L., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Van Vuuren, S.F. 2007. Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany* 73, 102-108.

Kaya, A., Demirci, B., Baser, K.H.C. 2007. Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South African Journal of Botany* 73, 29-34.

Krstic, L., Malencic, D., Anackov, G. 2006. Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata*. *Botanica Helvetica* 116, 159-168.

Laroche, R.C. 1974. Anatomic Considerations of the Calyx of *Adenocalymma comosum* (Cham.) A.P. DC. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61, 530-533.

Liang, S.-J., Wu, H., Lun, X., Lu, D.-W. 2006. Secretory Cavity Development and Its Relationship with the Accumulation of Essential Oil in Fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *Journal of Integrative Plant Biology* 48, 573-583.

Machado, S.R., Gregório, E. A., Guimarães, E. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of botany* 97, 357-69.

Mariani, P., Cappelletti, E.M., Campoccia, D., Baldan, B. 1989. Oil Cell Ultrastructure and Development in *Liriodendron tulipifera* L. *Botanical Gazette* 150, 391-396.

Marin, M., Koko, V., Duleticlavsevic, S., Marin, P., Rancic, D., Dajicstevanovic, Z. 2006. Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany* 72, 378-382.

McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23, 99-108.

Mehra, K., Kulkarni, A. 1989. Floral trichomes in some members of Bignoniaceae. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 99, 97-105.

- Monteiro, W.R., Castro, M.M., Mazzoni-Viveiros, S.C., Mahlberg, P.G. 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. - Asteraceae. *Brazilian Journal of Botany* 24, 349-357.
- Moura, M.Z.D., Isaias, R.M.S., Soares, G.L.G. 2005. Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 148, 427-431.
- Paiva, E., Martins, L. 2011. Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany* 59, 91-98.
- Paiva, E.A.S. 2009. Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* 104, 937-44.
- Pearse AGE. 1980. *Histochemistry, Theoretical and Applied: Preparative and optical technology*. London: Churchill Livingstone.
- Raghavan, T.S., Venkatasubban, K.R. 1940. Cytological studies in Bignoniaceae I Chromosome number and epidermal hydathodes in *Spathodea campanulata* Beauv. *Journal of Indian Botanical Society* 19, 293-298.
- Rivera, G.L. 2000a. Nuptial nectary structure of Bignoniaceae of Argentina. *Darwiniana* 38, 227-239.
- Rivera, G.L. 2000b. Nectarios extranupciales florales en especies de Bignoniaceae de Argentina. *Darwiniana* 38, 1-10.
- Robards, A.W. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In J.L. Hall (Ed.) *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*, Elsevier, New York.
- 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.
- Sacchetti, G., Romagnoli, C., Nicoletti, M., Di Fabio, A., Bruni, A., Poli, F. 1999. Glandular Trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): Histochemistry, Development and Ultrastructure. *Annals of Botany* 83, 87-92.
- Schmid, K.M., Ohlrogge, J.B. 2002. Lipid metabolism in plants. In Vance, D.E., Vance J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier, vol. 36, pp.93-126.
- Seibert, R.J. 1948. The Use of Glands in a Taxonomic Consideration of the Family Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 35, 123-137.
- Silva, E.M.J., Machado, S.R. 1999. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Brazilian Journal of Botany* 22, 117-124.

- Simões, A.O., Castro, M.M., Kinoshita, L.S. 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152,387-398.
- Solereder, H. 1908. *Systematic Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- Subramanian, B., Inamdar, J.A. 1985. Occurrence, Structure, Ontogeny and Biology Of Nectaries in *Kigelia pinnata* DC 98, 67-73.
- Subramanian, R.B., Inamdar, J.A. 1989. The structure, secretion and biology of nectaries in *Tecomaria capensis* Thunb (Bignoniaceae). *Phytomorphology* 39, 69-74.
- Thomson, W.W., Platt-Aloia, K.A., Endress, A.G. 1976. Ultrastructure of Oil Gland Development in the Leaf of *Citrus sinensis* L. *Botanical Gazette* 137, 330-340.
- Treub, M. 1889. Les bourgeons floraux du *Spathodea campanulata* Beauv. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg* 8, 38-46.
- Wagner, G.J., Wang, E., Shepherd, R.W. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93, 3-11.
- Werker, E. 1993. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plans of Lamiaceae— a review. *Flavour and Fragrance Journal* 8, 249-255.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U. 1985. The Essential Oils and Glandular Hairs in Different Chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Ann Bot* 55, 793-801.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Estrutura e desenvolvimento do tricoma glandular capitado de *Adenocalymma magnificum*. (a) Estrutura final do tricoma glandular capitado em MEV (Barra = 50 μm). (b) Distribuição dos tricomas na superfície interna do cálice (Barra = 120 μm). (c-i) Desenvolvimento do tricoma glandular capitado (Barra = 20 μm). (c) Célula precursora com projeção descentralizada. (d) Primeira divisão periclinal. (e) Sucessivas divisões periclinais. (f) Fileira unisseriada. (g) Célula do colar evidenciando divisão anticlinal assimétrica. (h) Células apicais do pedúnculo lado a lado. (i). Tricoma glandular capitado quase paralelo à epiderme.

Fig. 2. Testes histoquímicos nos tricomas glandulares calicinais de *Adenocalymma magnificum*. (j). Substâncias lipídicas identificadas pelo Sudan black B. (k). Lipídios ácidos nas células secretoras. (l). Compostos fenólicos nas células do pedúnculo e cabeça secretora, evidenciados pelo cloreto férrico.

Fig. 3. Ultraestrutura dos tricomas glandulares capitados em *Adenocalymma magnificum*. (m - n) Células do pedúnculo. (m) Vista geral, notar parede espessa (Barra = 5 μm). (n) Parede espessa e gota elétron densa (Barra = 1 μm). (o - u) Células da cabeça secretora. (o) Vista geral das diversas células que compõem a cabeça do tricoma (Barra = 5 μm). (p) Detalhe de uma célula evidenciando o vacuoma disperso (Barra = 2 μm). (q) Detalhe, mostrando as organelas mais ocorrentes neste tricoma: retículo endoplasmático, leucoplastos e mitocôndrias; notar retículo endoplasmático envolvendo o leucoplasto (Barra = 0,5 μm). (r) Vesículas sendo produzidas pelos dictiossomos e leucoplastos com poucas membranas internas (Barra = 0,5 μm). (s) Gotas osmiofílicas no estroma do leucoplasto (Barra = 0,5 μm). (t) Retículo endoplasmático produzindo compostos fenólicos (seta) (Barra = 0,5 μm). (u). Compostos fenólicos atravessando a parede celular para ser liberado; distensão de parte da cutícula (Barra = 0,5 μm).

Abreviações: cf, composto fenólico; cu, cutícula; di, dictiossomos; le, leucoplastos; mi, mitocôndrias; pc, parede celular; re, retículo endoplasmático; va, vacúolo; vs, vesículas.

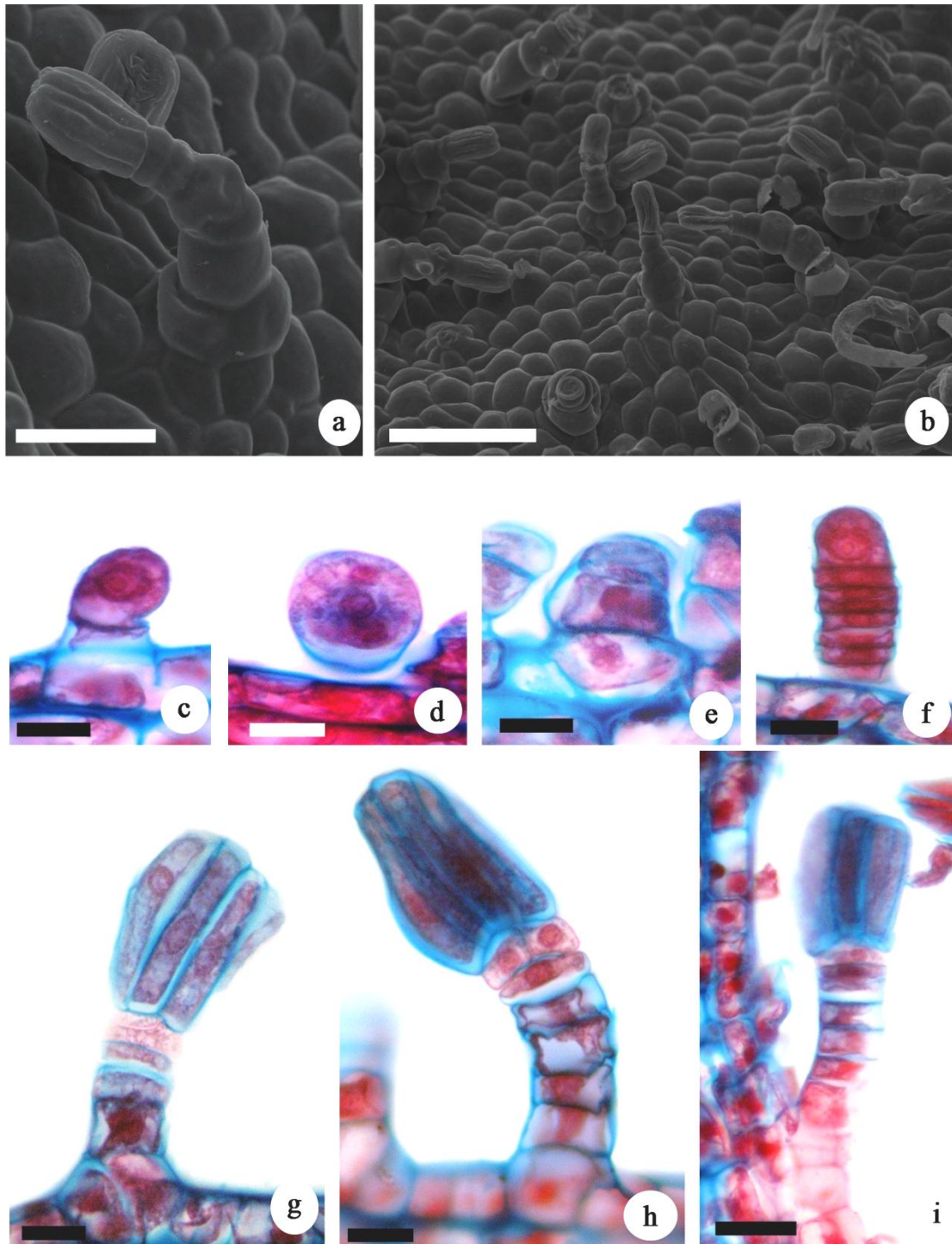


Figura 1

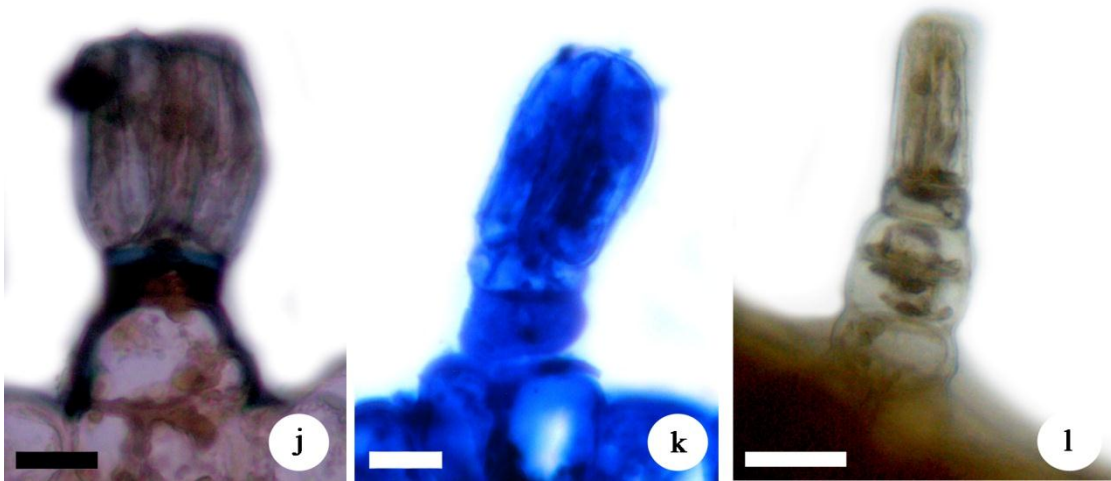
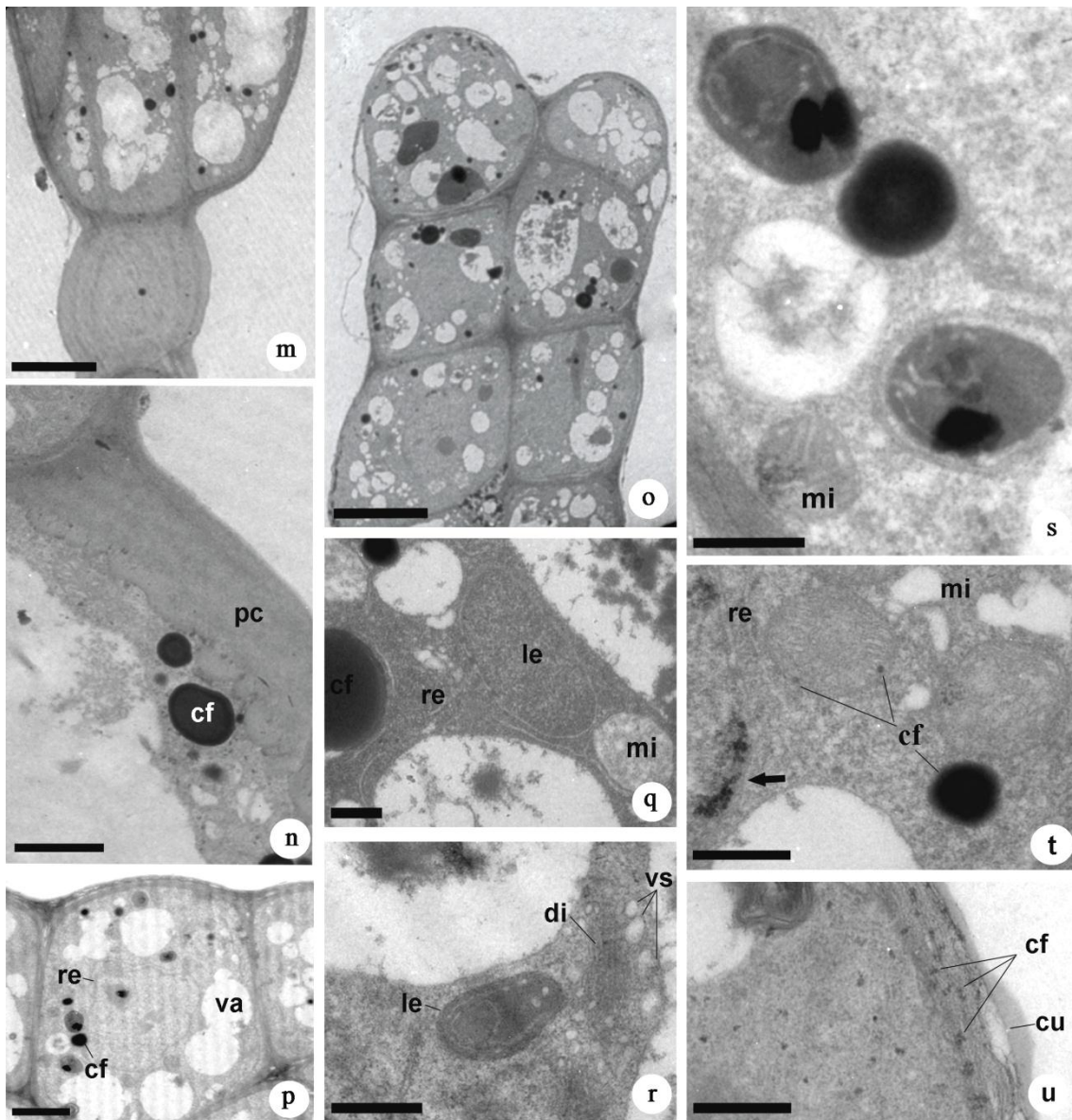


Figura 2



Figura

4. CAPÍTULO 3

Título:

**ONTOGENIA, HISTOQUÍMICA E ESTRUTURA DOS TRICOMAS
GLANDULARES EM *BIGNONIA AEQUINOCTIALIS* (BIGNONIACEAE)**

THÁLIA DO SOCORRO SERRA GAMA¹, DIEGO DEMARCO² e ANA CRISTINA
ANDRADE DE AGUIAR-DIAS³³

Título curto:

Tricomas glandulares em *Bignonia aequinoctialis*.

*** Manuscrito a ser submetido para publicação na revista “*Brazilian Journal of Botany*”.**

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: thaliagama@gmail.com

² Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências Rua do Matão, 277. 05508-090, São Paulo – SP.

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

RESUMO - (Ontogenia, histoquímica e estrutura dos tricomas glandulares em *Bignonia aequinoctialis* (Bignoniaceae)). A ocorrência de tricomas glandulares em Bignoniaceae é comum, entretanto muito ainda tem para se conhecer, por conta da escassez de estudos ontogenéticos, o que dificulta no conhecimento da função dessas estruturas secretoras em espécies da tribo. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou investigar a ocorrência e o desenvolvimento, além de analisar a secreção e funcionalidade, dos tricomas glandulares de *Bignonia aequinoctialis*. Para isso, amostras dos folíolos, perfis da gema axilar, cálice da flor em antese e botões florais, em diferentes estágios de desenvolvimentos, foram coletados, fixados e processados de acordo com os métodos usuais para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Em toda a planta foram vistas diversas formigas, sendo então coletadas às que estavam próximas dos tricomas. *B. aequinoctialis* possui dois tipos de tricomas glandulares, no eixo vegetativo aéreo, e reprodutivo - tricomas glandulares do tipo pateliforme e peltado. Ambos se distribuem em maior quantidade nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta, apresentam desenvolvimento assincrônico e possuem origem protodérmica. O tricoma glandular peltado consiste de uma célula basal, uma célula do pedúnculo e várias células na cabeça, caracterizando-a em porção secretora multicelular em forma de disco. Enquanto que o tricoma glandular pateliforme, é formado por uma camada de células basais, uma única e grande célula do pedúnculo e por uma epiderme secretora uniestratificada, apresentando formato colunar. Os testes histoquímicos identificaram secreção açucarada pelos tricomas glandulares pateliformes, sendo um alimento para as formigas, logo, tais tricomas podem estar mediando uma interação mutualística inseto-planta.

Palavras-chave - interação planta-inseto, nectários, tricoma pateliforme, tricoma peltado.

ABSTRACT – (Ontogeny, histochemistry and structure of glandular trichomes in *Bignonia aequinoctialis* (Bignoniaceae)). Glandular trichomes commonly occur in Bignoniaceae; however, because ontogenetic studies are scarce much still needs to be learned and understood about the function of these secretory structures in the species of the tribe. Therefore, the present study aimed to investigate not only the secretion and function of the glandular trichomes of *Bignonia aequinoctialis* but also their occurrence and development. To do this, samples of leaflets, prophylls of the axillary buds, floral calyx in anthesis and flower buds in different stages of development were collected, fixed and processed according to the usual methods for light microscopy and scanning electron microscopy. Diverse ants were found in all of the plants; ants located near to the trichomes were collected. *B. aequinoctialis* has two types of glandular trichomes on the aerial vegetative axis and the reproductive axis: patelliform and peltate. Both are distributed in large quantities in the early stages of the plant's development, exhibit asynchronous development and have protodermic origin. The peltate glandular trichome consists of a basal cell, one peduncle cell and several cells in the head, which characterize the the head as a multicellular secretory portion in disc shape. The patelliform glandular trichome is formed by a layer of basal cells, one large peduncle cell and a secretory epidermis uniseriate, in columnar form. Histochemical tests identified a sugary secretion from the patelliform glandular trichomes that serves as the ants' reward. Thus, these glandular trichomes have been shown to have an important role in the insect-plant mutualistic relationship.

Key words - insect-plant interactions, nectaries, patelliform glandular trichomes, peltate glandular trichomes.

INTRODUÇÃO

Estruturas secretoras são características de Bignoniaceae, por isso tornam-se importantes caracteres diagnósticos para a tribo em questão. Dentre essa gama de estruturas, que produzem diferentes exsudados, os tricomas são os que se destacam. Os tipos não glandular e glandular peltado e cupuliforme/pateliforme têm sido identificados como estruturas secretoras já presentes no ancestral comum mais recente do clado (Nogueira 2011).

O tricomas glandulares cupuliformes/pateliformes, geralmente, liberam açúcares, sendo então chamados de nectários extraflorais, visto que provavelmente não influem diretamente na polinização. Diversos são os trabalhos que relatam a estrutura desses tricomas, entretanto, poucos descrevem a ontogenia e os tipos de secreção de tais estruturas.

O propósito da maioria dos trabalhos foram os nectários, seguidos dos tricomas peltados. Elias & Gelband (1976), trabalharam a anatomia e a morfologia de nectários florais e extraflorais em *Campsis* Lour.; Elias & Prance (1978), que estudaram os nectários presentes nos frutos de *Crescentia* L. e outras Bignoniaceae; Elias & Newcombe (1979), observaram os nectários foliares e tricomas glandulares em *Catalpa*; Subramanian & Inamdar (1989), visualizaram a estrutura, secreção e biologia dos nectários em *Tecomaria capensis* Thunb; Thomas & Dave (1992), fizeram a estrutura e biologia dos nectários de *Tabebuia serratifolia* Nichols; além dos trabalhos mais recentes publicados por Rivera (2000a, b), que levantou os nectários extranupciais e florais em espécies de Bignoniaceae; Lopes et al. (2002), que trataram sobre os tricomas

secretores como uma fonte substitutiva de néctar floral; Machado et al. (2006), onde foi estudado os tricomas peltados do ovário de *Zeyheria montana* Mart., relacionando a função com seu desenvolvimento, ultraestrutura e secreção; e Vilhena-Potiguara et al. (2012), que estudaram os tricomas peltados e pateliformes de *Mansoa standeleyi* (Steerm.) A. H. Gentry.

Os açúcares presentes na secreção dos nectários extraflorais estabelecem uma importante relação entre insetos e plantas (Vilhena-Potiguara 2012), sendo esta benéfica ou não (Koptur 1992), visto que os nectários são visitados por uma gama de animais, que buscam alimentos, sendo benéfica quando há patrulhamento realizado pelos insetos na superfície da planta e maléfica quando os mesmos desequilibram esse meio, predam ou atraem insetos herbívoros adultos, que podem deixar seus ovos na planta (Koptur 1992).

Diante do exposto objetivou-se investigar o desenvolvimento e analisar a secreção e funcionalidade dos tricomas glandulares de *B. aequinoctialis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico, visitantes e néctar

Bignonia aequinoctialis L., é uma liana cujas flores são campanuladas, de coloração alva a lilás e são encontradas em ecossistemas de restinga. Amostras dos folíolos, perfis da gema axilar, cálice da flor em antese e botões florais (região mediana à apical), em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados de espécimes de *Bignonia aequinoctialis*. As plantas foram coletadas na Ilha de Algodão -

Maiandeuá, Pará, Brasil. Foram estudados botões em diferentes estádios de desenvolvimento, folíolos e perfis da gema axilar do primeiro ao quinto nó. Formigas observadas sobre os perfis, botões o cálice também foram coletadas e estocadas em álcool etílico 70% para identificação. Para verificar a presença de glicose na secreção, foi usada a glicofita Plus no material ainda no campo. Material testemunho foi herborizado e incorporado no Herbário João Murça Pires.

Microscopia de luz e testes histoquímicos

Para as análises anatômicas sob microscopia de luz, amostras foram fixadas em FAA₅₀ e FNT, por 24 e 48 horas, respectivamente, desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), e incluídas em Paraplast (Leica Microsystems Inc., Heidelberg, Germany). Secções transversais e longitudinais (8 – 13 µm) foram realizadas com auxílio do micrótomo rotativo e posteriormente corados com Safranina e Azul de Astra (modificado, Gerlach 1984). Os seguintes testes histoquímicos foram realizados com cortes feitos à mão no material fresco: reação PAS, para detectar a presença de polissacarídeos totais (McManus 1948); Vermelho de rutênio, para mucilagens ácidas (Johansen 1940); Sudan Black B, para lipídios totais (Pearse 1980); Cloreto Férrico, para compostos fenólicos (Johansen 1940) e NADI, para óleos essenciais (David & Carde 1964).

Microscopia Eletrônica

As amostras destinadas às análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foram fixadas em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2, desidratada em série etanólica, secas sob ponto crítico (Robards 1978). O material seco

foi colocado sobre *stubs* de alumínio, coberto com uma fina camada de ouro e examinados em MEV modelo LEO 1450 VP.

RESULTADOS

Bignonia aequinoctilis possui dois tipos de tricomas glandulares no eixo vegetativo aéreo (Figuras 1-2) e reprodutivo (Figura. 3) - tricomas glandulares do tipo pateliforme (Figura 4) e peltado (Fig. 5). Estes se distribuem em maior quantidade no cálice dos botões (Figura 6) florais e nas regiões mais jovens dos cinco primeiros nós visíveis em ambas as superfícies de folíolos jovens e adultos (Figuras 7-8) e perfis da gema axilar, entretanto o tricoma glandular pateliforme ocorre esporadicamente nos folíolos. Foi visto que a secreção é maior nos folíolos mais novos e cálices de botões florais, variando então com a idade da planta.

Esses tricomas apresentam desenvolvimento assincrônico e possuem origem protodérmica. Em todos esses locais de ocorrência foram vistos diversas espécies de formigas visitando os tricomas, principalmente no período da manhã.

Tricomas glandulares peltados da lâmina foliolar e do perfil da gema axilar, são pouco frequentes nos quarto e quinto nós, mas no primeiro nó recobrem a folha e o perfil da gema axilar por completo, sendo similar no segundo e terceiros nós. No cálice dos botões e da flor em antese, esse tipo de tricoma está em pequena quantidade quando comparado ao órgão vegetativo. O mesmo consiste de uma célula basal, uma célula do pedúnculo e várias células na cabeça, caracterizando-a em porção secretora multicelular em forma de disco.

O tricoma glandular peltado presente na espécie estudada se origina de uma célula protodérmica arredondada, do mesmo tamanho que as adjacentes, que sofre divisão periclinal, formando uma célula basal e uma célula apical (Figura 9). Esta célula do primórdio bicelular se divide periclinalmente, dando origem à célula do pedúnculo e inicial da cabeça (Figura 10). Depois do período de alongamento, a célula inicial da cabeça, submete-se a uma divisão anticlinal assimétrica (Figura 11), originando duas células mais largas do que compridas (Figura 12), que posteriormente passam por sucessivas divisões anticlinais (Figuras 13-14) até a formação completa da cabeça e término do desenvolvimento (Figura 15). Após seu desenvolvimento completo inicia-se a fase secretora deste tricoma (Figuras 15-16).

Os tricomas glandulares pateliformes são formados por uma camada de células basais, as quais dão continuidade à epiderme, uma única e grande célula elipsoide do pedúnculo, envolta por uma parede anticlinal espessa e suberizada, e por uma epiderme secretora uniestratificada, apresentando formato colunar com paredes delgadas, com um citoplasma denso e núcleos proeminentes localizados no centro das células.

O tricoma glandular pateliforme pode ser reconhecido primeiramente pelo parênquima que se torna denso em alguns pontos (Figura 17). Posteriormente a esta etapa, surge uma célula epidérmica mais larga e com núcleo proeminente, esta se divide periclinalmente, dando origem a uma célula externa e uma célula basal. A célula externa se divide periclinalmente e dá origem a uma célula do pedúnculo e uma célula da cabeça, depois acontecem diversas divisões anticlinais nas células basal e da cabeça. A célula do pedúnculo não realiza nenhuma divisão, entretanto se expande consideravelmente (Figuras 18-21).

Este tricoma, geralmente, é encontrado sobre uma depressão, abaixo do nível das células epidérmicas (Figura 22), onde estas o circundam, recobrando-o parcialmente, são frequentemente encontrados em pares.

A análise histoquímica dos exsudatos das estruturas secretoras descritas revelou que as mesmas exsudam compostos distintos (Tabela 1). Nos tricomas peltados, há presença de substâncias lipofílicas (Figura 23), entretanto substâncias hidrofílicas não foram identificadas (Figura 24) e nos tricomas pateliformes foi observada uma secreção heterogênea com a presença de carboidratos (Figura 25) e compostos fenólicos (Figura 26). A presença de glicose na secreção destes tricomas foi evidenciada pelo uso da glicofita. Com a constatação da presença deste composto na secreção destes tricomas, através do resultado positivo na reação PAS. Tais estruturas foram identificadas como nectários extraflorais.

DISCUSSÃO

A ontogenia e o estudo histoquímico dos tricomas glandulares contribuem para um melhor entendimento da funcionalidade e significância ecológica dessas estruturas em *Bignonia aequinoctialis*. Em relação à ontogenia, foi visto que os dois tipos de tricomas aqui descritos iniciam sua formação a partir de uma única célula protodérmica, sendo finalizado após sucessivas divisões periclinais e anticlinais. Quando chegam ao estágio final de sua morfologia, os tricomas entram na fase secretora. Os peltados secretam substâncias lipofílicas, enquanto que os pateliformes apresentaram secreção mista, com glicose e compostos fenólicos.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por outros autores em relação à anatomia. O tricoma peltado está presente no mais recente

ancestral comum de Bignoniaceae e foram os primeiros tricomas glandulares registrados em trabalhos taxonômicos da família (Nogueira 2011), sendo descritos como “densamente escamoso” (= “*densius lepidota*”), para *Bignonia aequinoctialis*, na Flora Brasiliensis, Bureau & Schumann (1897).

Acredita-se que existe uma relação entre os tricomas pateliformes e os tricomas peltados em Bignoniaceae. Alguns autores sugerem que os pateliformes originaram-se dos peltados (Elias & Newcombe 1979). Vilhena-Potiguara et al. (2012) também verificaram tal semelhança em *Mansoa standleyi*, entretanto este trabalho evidencia que a origem é similar em uns aspectos, mas difere nas divisões anticlinais das células secretoras, pois, o tricoma glandular peltado forma duas células da cabeça antes de realizar outras divisões anticlinais, enquanto que o tricoma glandular pateliforme realiza diversas divisões anticlinais a partir de uma única célula, além das células basais que também passam por divisões anticlinais a fim de acompanhar a expansão do tricoma.

A existência de nectários na família é um caráter relevante para a taxonomia do grupo, visto que estão presentes em todas as espécies de Bignoniaceae (Elias 1983, Nogueira 2011). São chamados de tricomas glandulares cupuliformes ou pateliformes, designação que, para Elias & Prance (1978), depende da célula peduncular, pois se o tricoma possuir uma camada de células formando o pedúnculo diz-se que ele é cupular, mas se ele for formado por uma única ampla célula elipsoide, como é o caso do nectário extrafloral presente em *Bignonia aequinoctialis*, é denominado pateliforme. Esta distinção é superficial, se considerarmos a morfologia dos dois tipos de tricomas glandulares.

Foi visto que os tricomas pateliformes de Bignoniaceae são similares aos pertencentes em outras famílias dentro de Lamiales, como por exemplo, em *Aphelandra* R. Br., Acanthaceae, (McDade & Turner 1997, Nogueira 2011). Dentro da família, os

nectários extraflorais, vistos neste trabalho, assemelham-se aos de *Anemopaegma* e *Crescentia*.

Elias & Newcombe (1979), afirmam que a abundância de nectários pequenos em relação a um único nectário grande é considerada uma condição avançada para a planta, bem como a ocorrência de campos de nectários. Trabalhos de Elias (1983) e Elias & Prance (1978) afirmam que essa variação encontrada entre os tricomas pateliformes e cupuliformes tem sido utilizadas para diferenciar espécies. Com isso, pode-se levantar hipóteses a respeito dos tipos de tricomas glandulares, afirmando ser o tricoma glandular pateliforme um caráter que indicaria derivação de um grupo em relação a outro, visto que os tricomas pateliformes são menores que os cupuliformes. No entanto, podem ocorrer os dois tipos de tricomas glandulares, tanto cupuliformes quanto pateliformes, em um mesmo indivíduo, tal caráter deve ser utilizado apenas para caracterizar morfologicamente os tricomas glandulares (Rivera 2000b). Recentes resultados obtidos por Nogueira (2011) constataram que os tricomas glandulares encontrados em Bignoniaceae são homólogos e superficialmente diferentes em sua morfologia.

Em *B. aequinoctialis*, tricomas pateliformes apresentaram-se agregados nos perfis da gema axilar e no cálice, corroborando com dados obtidos por Nogueira (2011), que mostra tal característica comum em representantes de *Adenocalymma*, *Bignonia* e *Pleonotoma*.

A presença de lipídios na secreção do tricoma glandular peltado sugere proteção contra perda de água pela transpiração cuticular, cobrindo a superfície do local, o que possibilita a redução da temperatura (Dell 1977). Geralmente, isto ocorre com espécies expostas à radiação solar, como é o caso de *B. aequinoctialis*, que é encontrada em ecossistema de restinga.

A presença de estruturas secretoras que liberam exsudatos como recompensa aos insetos, como nectários e compostos lipídicos possibilita a relação mutualística entre plantas e determinados insetos, especialmente formigas (Vilhena-Potiguara 2011). Logo, é possível inferir que o néctar liberado pelos tricomas pateliformes estabelecem uma importante função: a relação mutualística inseto-planta.

Atualmente, apesar das grandes especulações a respeito da função dos nectários extraflorais, sabe-se que existe atuação das formigas na proteção contra a herbivoria das folhas e afastamento de outros visitantes (Beckmann & Stuckey 1981, Koptur 1979, Nogueira et al. 2011, Subramanian & Inamdar 1989).

De acordo com Heil & McKey (2003), o agrupamento dos nectários extraflorais em regiões específicas da planta, como nos perfis da gema axilar e no cálice de *B. aequinoctialis*, sugere que estes tecidos são os mais dispendiosos para a planta, sendo necessário protegê-los sem que os custos de sua produção superem os benefícios de defesa (Coley & Barone 2001; Heil & McKey 2003).

A presença de tricomas glandulares em *B. aequinoctialis* tem uma série de características comuns a outras espécies de Bignoniaceae. Este estudo indicou que os tricomas glandulares estão envolvidos na produção e secreção de substâncias lipofílicas (peltados), néctar e compostos fenólicos (pateliformes). A presença de formigas próximas aos nectários, indica uma relação entre inseto-planta. Mais estudos tornam-se necessários quanto ao papel dos nectários extraflorais em *B. aequinoctialis*, sua interação com formigas e os fatores que influenciam e determinam esta secreção.

REFERÊNCIAS

- Beckmann RL, Stuckey JM. 1981. Extrafloral nectaries and plant guarding in *Ipomoea pandurata* (L.) G.F.W. Mey. (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 68:72-79.
- Bureau E, Schumann K. 1897. Bignoniaceae. In: *Flora Brasiliensis*. (CFPV Martius, ed.)
- Coley PD., Barone JA. 2001. Ecology of Defenses. In *Encyclopedia of Biodiversity*. (S. Levin, ed.).
- David R, Carde JP. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L' Academie des Sciencies (Paris), Série D* 258:1338-1340.
- Dell B. 1977. Distribution and function of resin and glandular hairs in Western Australian Plants. *Journal of Proceedings of the Royal Society of Western Australia* 59:119-123.
- Elias T. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In *The biology of nectaries*. (BL Bentley, TS Elias, eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Elias TS, Gelband H. 1976. Morphology and Anatomy of Floral and Extrafloral Nectaries in *Campsis* (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 63:1349-1353.
- Elias TS, Newcombe LF. 1979. Foliar nectaries and glandular trichomes in *Catalpa* (Bignoniaceae). *Acta Botanica Sinica* 21:215-228.
- Elias TS, Prance GT. 1978. Nectaries on the fruit of *Crescentia* and other Bignoniaceae. *Brittonia* 30:175-181.
- Gerlach D. 1984. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme.
- Heil M, McKey D. 2003. Protective Ant-Plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:425-553.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, inc.
- Koptur S. 1979. Facultative mutualism between weedy vetches bearing extrafloral nectaries and weedy ants in California. *American Journal of Botany* 66:1016-1020.
- Koptur S. 1992. Interactions between Insects and Plants Mediated by Extrafloral Nectaries. In *Insect/Plant Interactions*. (E Bernays, ed.). CRC series, p.85-132.

- Lopes AV, Vogel S, Machado IS. 2002. Secretory Trichomes, a Substitutive Floral Nectar Source in *Lundia* A. DC. (Bignoniaceae), a Genus Lacking a Functional Disc. *Annals of Botany* 90:169-174.
- Machado SR, Gregório EA, Guimarães E. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of botany* 97:357-69.
- McDade L, Turner M. 1997. Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). *American journal of Botany* 84:1-15.
- McManus JFA. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23:99-108.
- Nogueira A. 2011. Evolução e ecologia de tricomas em Bignoniaceae (Bignoniaceae): estruturas morfológicas de defesa anti-herbivoria? Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pearse AGE. 1980. *Histochemistry, Theoretical and Applied: Preparative and optical technology*. London: Churchill Livingstone.
- Rivera GL. 2000a. Nuptial nectary structure of Bignoniaceae of Argentina. *Darwiniana* 38:227-239.
- Rivera GL. 2000b. Nectarios extranupciales florales en especies de Bignoniaceae de Argentina. *Darwiniana* 38:1-10.
- Robards AW. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. (JL Hall, ed.). Elsevier, New York.
- Subramanian RB, Inamdar, JA. 1989. The structure, secretion and biology of nectaries in *Tecomaria capensis* Thunb (Bignoniaceae). *Phytomorphology* 39:69-74.
- Thomas V, Dave Y. 1992. Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 109:395-400.
- Vilhena-Potiguara RC, Aguiar-Dias ACA, Kikuchi TYS, Santos ACF, Silva RJF. 2012. Estruturas secretoras em cipó-d'alho (*Mansoa standleyi* (Steud.) A. H. Gentry, Bignoniaceae): ocorrência e morfologia. *Acta Amazonica*.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figuras 1- 8. Indivíduos de *Bignonia aequinocatialis*. 1. Flor e botão floral. 2. Detalhe dos perfis da gema axilar com formigas. 3. Detalhe da região abaxial do folíolo. 4 – 8. Eletromicrografias de varredura. Tricomas glandulares pateliforme. 5. Tricoma glandular peltado. 6. Tricomas pateliformes agregados na superfície abaxial do cálice. 7. Vista geral da superfície abaxial do folíolo. 8. Detalhe do folíolo identificando diversos tricomas glandulares peltados.

Figuras 9-22. Ontogenia dos tricomas glandulares de *Bignonia aequinocatialis*. 9 – 16. Tricoma glandular peltado. 9. Início do desenvolvimento. 10. Divisão periclinal dando origem a célula inicial da cabeça. 11. Divisão anticlinal assimétrica. 12. Tricoma com duas células na cabeça. 13 – 14. Divisões anticlinais na cabeça. 15. Tricoma em fase final de desenvolvimento e início da fase secretora. 16. Tricoma em fase secretora. 17 – 22. Tricoma glandular pateliforme. 17. Parênquima formado por células com citoplasma denso. 18 – 21. Expansão da célula basal. 22. Tricomas aglomerados no perfis da gema axilar, evidenciando a ocorrência sobre depressões.

Figuras 23- 26. Resultados dos testes histoquímicos em *Bignonia aequinocatialis*. 23 – 24. Tricoma glandular peltado. 23. Resultado positivo para lipídios totais. 24. Mucilagens ácidas detectadas com vermelho de rutênio. 25 – 26. Tricomas glandulares pateliformes. 25. Detecção de carboidratos com PAS. 26. Resultado positivo para compostos fenólicos.

Tabela 1 - Resultado dos testes histoquímicos aplicados nas estruturas secretoras do eixo vegetativo aéreo e reprodutivo de *Bignonia aequinotialis*.

Testes	Metabólitos evidenciados	Tricomas pateliformes	Tricomas peltados
Vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	-	+
Sudan Black B	lipídios totais	-	+
Dragendorf	alcaloides	-	-
Cloreto férrico	compostos fenólicos	+	-
PAS	carboidratos	+	-

Notas: (+) reação positiva; (-) reação negativa

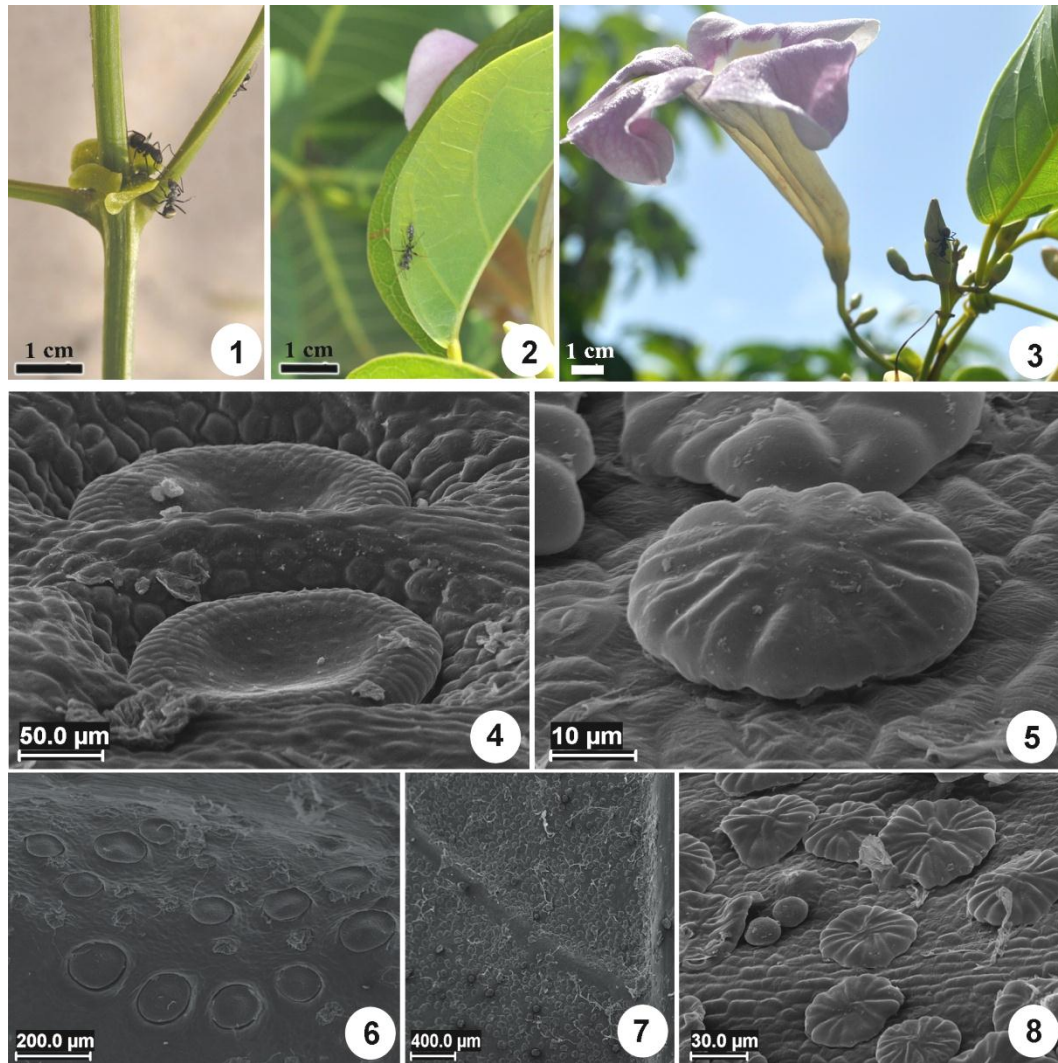


Figura 1

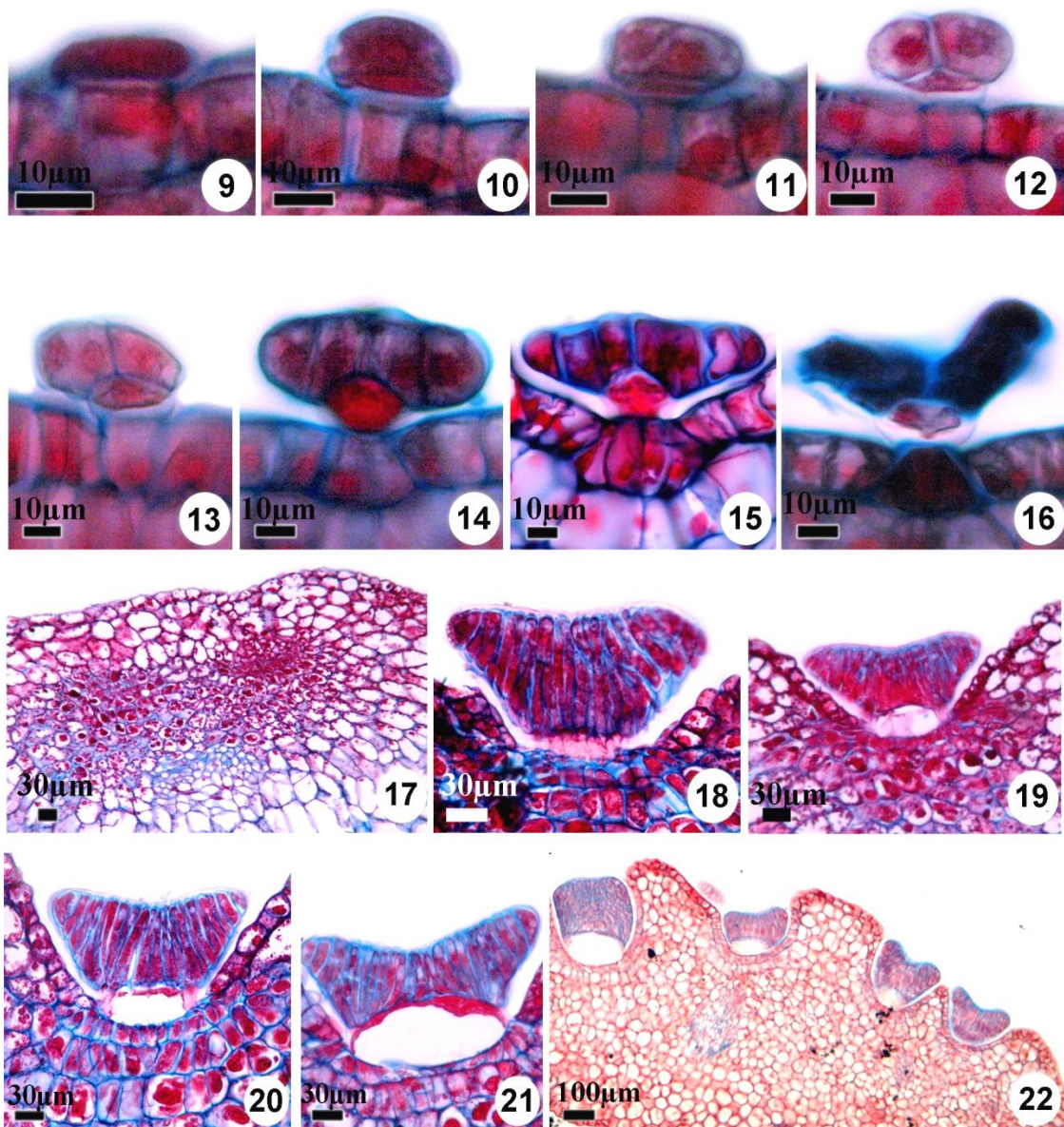


Figura 2

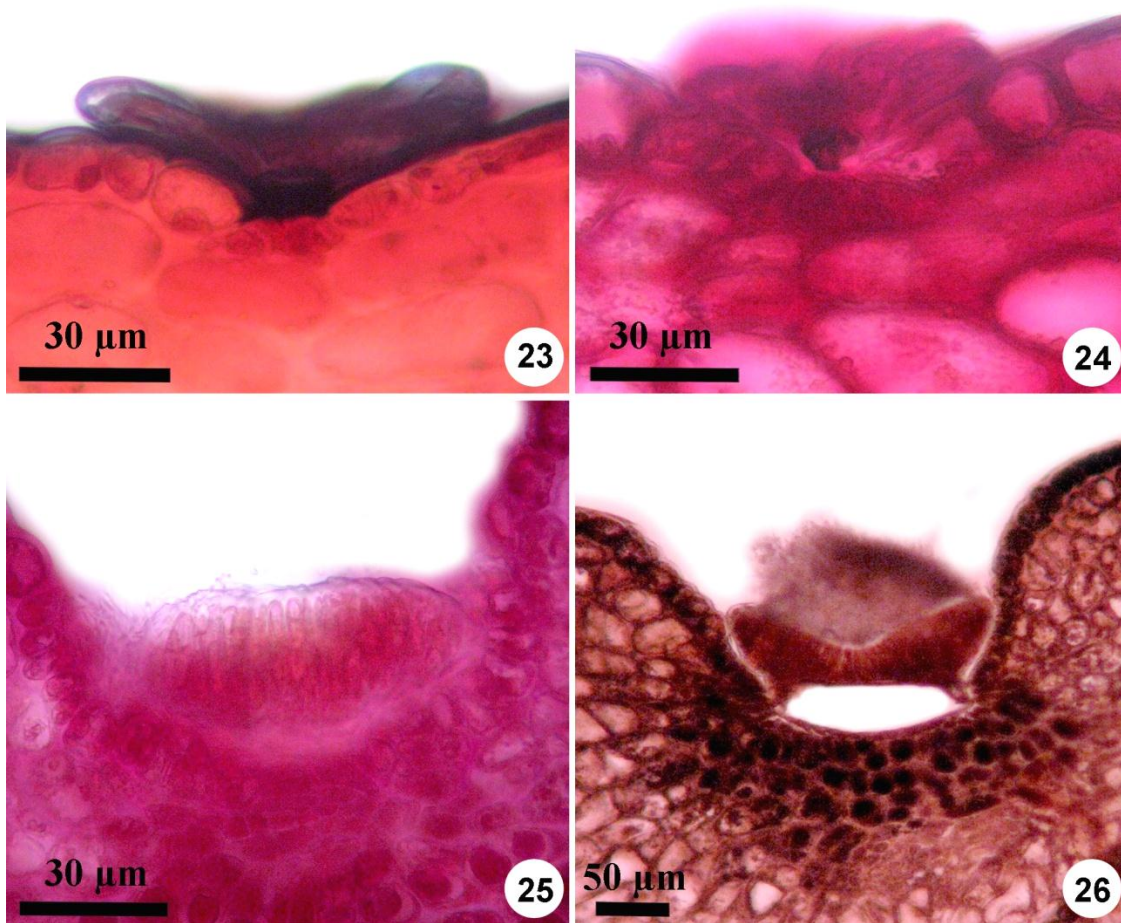


Figura 3

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho procurou-se investigar o desenvolvimento e analisar a funcionalidade dos tricomas glandulares presentes no eixo vegetativo o reprodutivo de duas espécies da tribo Bignonieae: *Adenocalymma magnificum* e *Bignonia aequinoctialis*. Foram vistos tricomas glandulares do tipo pateliforme e capitado em *A. magnificum* e pateliforme e peltado em *B. aequinoctialis*.

Os tricomas glandulares pateliformes de ambas as espécies secretam néctar, sendo então nectários não vascularizados, visto que são originados unicamente da protoderme. A respeito dessas estruturas secretoras, vários trabalhos descritivos foram realizados, logo a ocorrência nessas espécies na tribo e na família era conhecida. Entretanto, poucos foram os estudos onde o foco era o desenvolvimento e a funcionalidade destas estruturas secretoras.

As células do pedúnculo também foram descritas aqui como células de transferência nos dois tricomas estudados de *A. magnificum*, sendo este um dado inédito para a família. Esta células, portanto, possuem influência direta no processo de secreção de substâncias. Além disso, a secreção açucarada dos tricomas pateliformes estabeleceram uma importante função nas interações entre a planta e os insetos, principalmente formigas, visto que diversas espécies de formigas estiveram sobre as plantas provavelmente agindo de forma benéfica frente aos herbívoros.

Nos nectários de *A. magnificum*, também foram liberadas substâncias lipídicas. Foi visto que duas formas de secreção ocorre ao mesmo tempo, a hidrofílica do tipo écrina e a lipofílica do tipo granulócrina. No tricoma capitado em *A. magnificum*, a produção de compostos fenólicos aconteceu por três diferentes organelas, e dentre elas, mitocôndrias. Fato incomum em estruturas secretoras.

Em *Bignonia aequinoctialis* há também presença de formigas por todos os órgãos, com maior concentração próximo aos nectários, que também secretam lipídios e são diferentes dos de *A. magnificum*, por conter apenas uma célula de pedúnculo e por ser menor em comprimento.

Elias & Newcombe (1979) citam que a abundância de nectários pequeno em relação a um único nectário grande é considerada uma condição avançada para a planta, no entanto, esta afirmação não é válida, por ocorrerem os dois tipos de tricomas glandulares, tanto cupuliformes quanto pateliformes, em um mesmo indivíduo (Rivera 2000), além de serem homólogos e superficialmente diferentes em sua morfologia

(Nogueira 2011). Todos esses resultados obtidos corresponderam ao objetivo inicial do trabalho e contribuirão para futuros estudos sobre as espécies e a tribo em questão.