## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

**Diego Demarco** 

"GLÂNDULAS DE ÓRGÃOS VEGETATIVOS AÉREOS E FLORAIS DE ESPÉCIES DE ASCLEPIADEAE (R.BR.) DUBY (ASCLEPIADOIDEAE, APOCYNACEAE) DE MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DE SÃO PAULO"

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese a ser apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal

i

Orientadora: Profa. Dra. Marilia de Moraes Castro

Campinas, 2008

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D391g	Demarco, Diego Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécies de Asclepiadeae (R.Br.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de mata atlântica do estado de São Paulo / Diego Demarco. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadora: Marilia de Moraes Castro. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia
	<ol> <li>Glândulas. 2. Órgãos vegetativos. 3. Flores. 4.</li> <li>Anatomia. 5. Asclepiadeae. I. Castro, Marilia de Moraes, 1953 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</li> </ol>
	(scs/ib)

Título em inglês: Glands of aerial vegetative and floral organs of species of Asclepiadeae from Atlantic rainforest of São Paulo State.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal. Banca examinadora: Marilia de Moraes Castro, Jane Elizabeth Kraus, Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, Luiza Sumiko Kinoshita, Sandra Maria Carmello-Guerreiro.

Data da defesa: 17/11/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Palavras-chave em inglês: Glands; Vegetative organs; Flowers, Anatomy; Asclepiadeae.

Campinas, 17 de novembro de 2008

#### **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Marilia de Moraes Castro

Profa. Dra. Jane Elizabeth Kraus

Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros

Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro

Profa. Dra. Ingrid Koch

Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio

Prof. Dr. André Olmos Simões

ssinatura

Assinatura Assinatura IUI Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

"Exigua haec à tam vasto Naturae penu selecta, dum, Amice Lector, disquiris, ex Sophoclis praecepto, aliena discam; & Reliqua à Superis optanda precibus obtinere contendam."

Anatome Plantarum - Marcello Malpighi (1679)

"If men should stay for an example in everything, nothing extraordinary would ever be done."

The Anatomy of plants – Nehemiah Grew (1682)

"Plant anatomy is interesting for its own sake. It is a gratifying experience to follow the ontogenetic and evolutionary development of structural features and gain the realization of the high degree of complexity and the remarkable orderliness in the organization of the plant."

Anatomy of seed plants – Katherine Esau (1960)

Para minha mãe, Maria Aparecida Trentin Demarco, por sua força, carinho, zelo e dedicação, além de todos os valores e bons exemplos transmitidos e pelo amor incondicional.

#### Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilia de Moraes Castro, por ter me guiado em mais esta etapa e pelos nove anos que tem dedicado à minha formação acadêmica, desde a minha apresentação à Anatomia Vegetal, durante a Iniciação Científica, até a conclusão desta tese de doutorado, além de todo o esforço dispendido para que eu conseguisse os auxílios financeiros tão necessários para a continuidade dos meus estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, por meio do qual realizei o doutorado. À FAPESP pela bolsa concedida durante 39 meses (proc. nº 04/09729-4; vinculado ao temático Biota/FAPESP proc. nº 03/12595-7) e à CAPES, nos primeiros três meses de minha pesquisa. Ao laboratório de Anatomia vegetal e ao Sebastião, por terem fornecido os subsídios necessários para que eu desenvolvesse meu trabalho, ao laboratório de Taxonomia, pelo uso do microscópio estereoscópico SMZ-U (adquirido no projeto proc. nº 96/12345-5) e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, onde as análises micromorfológicas foram realizadas.

Aos membros da pré-banca e banca, Profa. Dra. Jane Elizabeth Kraus, Profa. Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita, Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro e Profa. Dra. Milene Faria Vieira, pelas sugestões para melhorar esta tese e a todos os professores do Depto. de Botânica que participaram da minha formação e foram fundamentais para o meu desenvolvimento intelectual e científico. Ao Prof. Dr. Marco Antonio de Assis pelas valiosas indicações dos locais de coleta e à Profa. Dra. Ingrid Koch por toda a ajuda no meu início de carreira profissional.

À minha mãe, Maria Aparecida, e à minha irmã, Daniela, por sempre terem me dado apoio em tudo o que fiz, por me ajudarem nos momentos em que precisei com o pouco que tinham e pelas orações para que eu alcançasse os meus objetivos.

Aos meus bons amigos e colegas de laboratório, Ana Cristina, Ana Paula, Luciana, Nazareth, Poliana, Renata, Rosina, Sandra e Shesterson, que partilharam os bons e maus momentos dentro do laboratório e fora dele; aos demais amigos e colegas de departamento, pela amizade e companheirismo nestes anos de trabalho.

À minha namorada, Tamara, por todo o amor que tem dedicado a mim nesta fase final e de transição tão importante, fazendo com que os percalços sejam superados com maior tranqüilidade e perseverança; além de seu exemplo de superação, dedicação inabalável e pelo incentivo em todos os momentos.

## ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	3
Introdução geral	5
Laticíferos e coléteres	6
Estrutura floral	8
Gênereros investigados	10
Objetivos	11
Capítulo 1. Coléteres foliares em espécies de	Asclepiadeae
Introdução	15
Material & métodos	16
Resultados	17
Ilustrações	23
Discussão	42
Conclusões	48
Referências bibliográficas	48

# Capítulo 2. Histoquímica da secreção dos coléteres foliares de espécies de Asclepiadeae

Introdução	55
Material & métodos	56
Resultados	57
Ilustrações	59
Discussão	70
Conclusões	73
Referências bibliográficas	74

## Capítulo 3. Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas

Introdução	79
Material & métodos	80
Resultados	81

viii	
Ilustrações	83
Discussão	96
Conclusões	101
Referências bibliográficas	101

# Capítulo 4. Micromorfologia e histoquímica dos laticíferos de órgãos vegetativos de espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)

Introdução	105
Material & métodos	107
Resultados	108
Ilustrações	111
Discussão	120
Conclusões	125
Referências bibliográficas	125

## Capítulo 5. Tricomas glandulares em órgãos vegetativos de Fischeria stellata

### E.Fourn. e Matelea denticulata (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz

Introdução	129
Material & métodos	130
Resultados	131
Ilustrações	133
Discussão	144
Conclusões	145
Referências bibliográficas	146

#### Capítulo 6: Estruturas secretoras externas de defesa das flores de Asclepiadeae:

coléteres e tri	icomas
-----------------	--------

Introdução	151
Material & métodos	153
Resultados	154
Coléteres	154
Tricomas glandulares	156
Ilustrações	157

Discussão	172
Conclusões	176
Referências bibliográficas	177

## Capítulo 7: Estruturas secretoras internas de defesa das flores de Asclepiadeae: laticíferos e idioblastos

Introdução	185
Material & métodos	186
Resultados	188
Laticíferos	188
Idioblastos	190
Ilustrações	193
Discussão	206
Conclusões	210
Referências bibliográficas	210

# Capítulo 8: Ontogênese, estrutura e histoquímica da ala estaminal e nectários florais em espécies de Asclepiadeae

Introdução	217
Material & métodos	219
Resultados	220
Ala estaminal	220
Câmara estigmática-nectarífera	222
Corona	223
Ilustrações	225
Discussão	248
Conclusões	255
Referências bibliográficas	255

## Capítulo 9: Sistema transmissor carpelar em flores de espécies de Asclepiadeae: estigma, tecido transmissor sólido, canal estilar e obturador

Introdução	261
Material & métodos	262
Resultados	264

X	
Estigma	264
Tecido transmissor sólido	265
Canal estilar	265
Obturador	266
Ilustrações	267
Discussão	284
Conclusões	290
Referências bibliográficas	291

## Capítulo 10. Morfogênese, estrutura e microquímica do polinário em espécies de

Asclepiadeae	
Introdução	297
Material & métodos	299
Resultados	300
Cabeça dos estiletes	301
Polínia	303
Ilustrações	305
Discussão	328
Conclusões	334
Referências bibliográficas	335
Discussão geral	345
Estruturas secretoras em Asclepiadeae	345
Importância ecológica das estruturas secretoras de Asclepiadeae	360
Importância taxonômica das estruturas secretoras de Asclepiadeae	366
Perspectivas futuras	368
Anexo I. Terminologia adotada para as flores de Asclepiadoideae	369
Anexo II. Aceite de publicação de artigo	371
Referências bibliográficas	373

#### Resumo

O presente trabalho tem o propósito de caracterizar morfologicamente as estruturas secretoras dos órgãos vegetativos aéreos e florais de *Asclepias curassavica, Fischeria stellata, Gonioanthela axillaris, Matelea denticulata* e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* de mata atlântica, analisando suas funções, semelhanças e diferenças em relação às demais Asclepiadeae, e de verificar a ocorrência de padrões estruturais comuns às espécies de Apocynaceae.

As cinco espécies possuem coléteres foliares interpeciolares e calicinais alternisépalos. *Asclepias curassavica* e *Gonioanthela axillaris* também apresentam coléteres peciolares, *Matelea denticulata* e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*, laminares e *Fischeria stellata*, ambos. Os coléteres possuem epiderme em paliçada que secreta mucilagem e lipídios que evitam o dessecamento das gemas e a proliferação de fungos em *A. curassavica*, *F. stellata*, *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*. Os coléteres de *G. axillaris* secretam exclusivamente mucilagem. O ápice da bractéola de *O. banksii* subsp. *banksii* subsp. *banksii* é modificado em coléter.

Laticíferos articulados anastomosados ocorrem nos tecidos fundamental e vascular dos órgãos vegetativos e florais de todas as espécies. O látex dos órgãos vegetativos é constituído por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides. Lipídios neutros estão presentes apenas em *F. stellata* e *G. axillaris*. O látex floral é constituído por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios e compostos fenólicos. O látex está associado à proteção destas plantas contra herbivoria e microorganismos, além de selar ferimentos.

*Fischeria stellata* e *Matelea denticulata* possuem tricomas glandulares no caule e na folha. Tricomas semelhantes estão presentes no pedicelo e nas sépalas de *M. denticulata*. Eles são multicelulares unisseriados com uma célula secretora apical que produz aminoácidos e/ou proteínas. *G. axillaris* têm idioblastos oleíferos, com paredes trilamelares, registrados no pedicelo, cálice e na corola.

As flores das espécies estudadas possuem ala estaminal com epiderme secretora de mucilagem e lipídios provavelmente relacionados à retenção da polínia na fenda. As câmaras estigmáticas-nectaríferas apresentam epiderme secretora de carboidratos (incluindo glicose e mucilagem) e lipídios. Nectários secundários estão localizados na

corona de *G. axillaris*, cuja epiderme exsuda carboidratos (incluindo glicose e mucilagem) e lipídios, e na corona de *M. denticulata*, onde epiderme e parênquima secretam apenas carboidratos (incluindo glicose e mucilagem).

O sistema transmissor das flores é semelhante nas cinco espécies. O estigma é composto por células alongadas não secretoras. O tecido transmissor sólido constitui-se de células parenquimáticas não secretoras, que formam dois cordões isolados abaixo da região estigmática, exceto em *M. denticulata*. Na porção livre dos estiletes, há canais compostos por células epidérmicas secretoras que são contínuas com a epiderme do obturador placentário-funicular e secretam mucilagem e lipídios que preenchem os canais estilares e a cavidade ovariana.

A epiderme secretora da cabeça dos estiletes é responsável pela secreção do translador, formado por corpúsculo e caudículas. O corpúsculo é constituído por mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas e as caudículas, por lipídios neutros e mucilagem. As células do tapete secretam lipídios e polissacarídeos que formam uma película ao redor da polínia das quatro espécies e produzem a crista hialina em *M. denticulata*. As polínias desta espécie também apresentam margem pelúcida.

2

#### Abstract

The current study aims to carry out a morphological characterization of the secretory structures of aerial vegetative and floral organs of *Asclepias curassavica, Fischeria stellata, Gonioanthela axillaris, Matelea denticulata* and *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* from Atlantic rainforest, analyzing their functions, similarities and dissimilarities in relation to other Asclepiadeae, besides verifying the occurrence of common structural patterns between Apocynacean species.

The five species possess interpetiolar foliar and alternisepal calicyne colleters. *Asclepias curassavica* and *Gonioanthela axillaris* also present petiolar colleters, *Matelea denticulata* and *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*, laminar ones, and *Fischeria stellata*, has both. Colleters have palisade epidermis secreting mucilage and lipids that avoid dehydration of buds and fungal proliferation in *A. curassavica*, *F. stellata*, *M. denticulata* and *O. banksii* subsp. *banksii*. Colleters of *G. axillaris* secrete mucilage exclusively. The bracteolar tip of *O. banksii* subsp. *banksii* becomes colleter.

Articulated anastomosing laticifers occur in ground and vascular tissues of vegetative and floral organs in those species. The latex of vegetative organs is composed of polysaccharides, including mucilage, proteins, fat acids, phenolic compounds, and alkaloids. Neutral lipids are present only in *F. stellata* and *G. axillaris*. The floral latex is constituted of polysaccharides, including mucilage, proteins, lipids, and phenolic compounds. The latex is related to the protection of those plants against herbivory and microorganisms, besides sealing wounds.

*F. stellata* and *M. denticulata* have glandular trichomes on stem and leaf. Similar trichomes are present on the pedicel and sepals of *M. denticulata*. They are uniseriate multicellular with an apical secretory cell that produces aminoacids and/or proteins. *G. axillaris* has oil idioblasts with trilamellar walls registered in pedicel, calyx, and corolla.

The flowers of studied species possess staminal wing with epidermis secreting mucilage and lipids related possibly to pollinium retention in the guide rail. The nectariferous-stigmatic chambers present epidermis secreting carbohydrate (including glucose and mucilage) and lipids. Secondary nectaries are found in the corona of *G. axillaris*, whose epidermis exudes carbohydrates (including glucose and mucilage) and

lipids, and in the corona of *M. denticulata*, where epidermis and parenchyma secrete only carbohydrates (including glucose and mucilage).

The floral transmitting system is similar in all the five species. The stigma is composed of non-secretory elongated cells. The solid transmitting tissue is constituted of nonsecretory parenchyma cells that form two isolated bundles below the stigmatic region, except in *M. denticulata*. In the free styles region, there are canals composed of secretory epidermal cells that are continuous with the placentary-funicular obturator epidermis and secrete mucilage and lipids that fill the stylar canals and ovary locule.

The secretory epidermis of style head is responsible for secretion of the translator, formed by corpusculum and caudicles. The corpusculum is composed of mucilage, fat acids, phenolic compounds, and proteins, whereas caudicles are constituted of neutral lipids and mucilage. The tapetal cells secrete lipids and polysaccharides that form a pellicle around the pollinium in all the four species and a hyaline crest in *M. denticulata*. The pollinia of this species also present pellucid margin.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Dentre as Apocynaceae, as Asclepiadoideae destacam-se por possuírem as flores mais complexas e elaboradas de todas as dicotiledôneas e apenas com a avaliação conjunta das demais subfamílias é possível entender como elas chegaram a este grau de complexidade. Elas apresentam uma sinorganização não usual de partes e órgãos de diferentes categorias que conduziram à origem de novos órgãos, que não são encontrados em nenhuma outra família de dicotiledônea. Da corola e do androceu surgiu a corona e um complicado sistema de canais para deposição do néctar; do androceu e gineceu formou-se o ginostégio através de adnação posgênita da antera na base da cabeça dos estiletes, e o polinário formado pelas polínias mais o translador que é secretado pela epiderme da cabeça dos estiletes (Endress 1994).

Os representantes desta subfamília podem ser distinguidos pela presença de polinários que portam apenas duas polínias (Kunze 1994; Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000). Este grupo é formado por cerca de 3700 espécies (Judd *et al.* 2002) que ocorrem desde desertos e regiões abertas até locais paludosos e sombreados, estão presentes em regiões tropicais e subtropicais, com centros de diversidade na África (cerca de 35% das espécies) e América do Sul (cerca de 20% das espécies), sendo menos diversos e abundantes nas regiões temperadas (Rapini 2001).

Os membros de Asclepiadoideae têm atraído a atenção dos pesquisadores há séculos, devido ao seu complexo sistema de polinização, embora poucos sejam os estudos anatômicos que tentaram desvendar a complexa morfologia floral do grupo, podendo-se destacar como os primeiros, o estudo realizado por Brown (1810), que descreveu a formação do translador de *Asclepias syriaca* L. e de Corry (1883), Gager (1902) e Frye (1902) que descreveram anatomicamente diversas características das flores de espécies de *Asclepias*, especialmente do ginostégio. Apesar da grande diversidade de espécies e do longo tempo de estudo, há pequena quantidade de informações anatômicas sobre as espécies deste grupo. Contudo, os estudos filogenéticos que culminaram na inclusão deste grupo na família Apocynaceae (Endress & Bruyns 2000) têm despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas e recentemente produziu diversos estudos na subfamília, tais como análises filogenéticas, trabalhos taxonômicos, de morfologia floral, polinização,

diversidade e distribuição (Rapini *et al.* 2006; Endress *et al.* 2007; Ezcurra & Belgrano 2007; Goyder *et al.* 2007; Juarez-Jaimes *et al.* 2007; Liede-Schumann 2007; Meve & Liede-Schumann 2007; Rapini *et al.* 2007; Silva *et al.* 2007; Theiss *et al.* 2007; Wanntorp 2007; Wanntorp & Forster 2007; Wyatt & Lipow 2007; Kunze & Wanntorp 2008; Wolff *et al.* 2008; Yamashiro *et al.* 2008).

Dentre os caracteres anatômicos registrados para Apocynaceae, apenas três estão presentes em Asclepiadoideae e em todos os demais membros da família: sifonostelo anfiflóico, laticíferos e epiderme secretora da cabeca dos estiletes. Metcalfe e Chalk (1950) consideraram a ocorrência de laticíferos uma das características mais importantes que demonstram a próxima relação entre Apocynaceae e Asclepiadaceae. Além disso, diversas estruturas secretoras ocorrem em órgãos vegetativos e reprodutivos dos membros da família e estão envolvidas na produção de diferentes compostos do metabolismo secundário que desempenham função de defesa ou estão associados aos mecanismos de polinização, tais como tricomas, idioblastos taníferos, cavidades mucilaginosas, laticíferos, coléteres, cabeça dos estiletes, nectários e osmóforos (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1983; Fallen 1986; Vogel 1990; Kunze 1991, 1995, 1997, 1999; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, 2000; Galetto 1997; Torres & Galetto 1998; Sennblad et al. 1998; Vieira 1998; Lin & Bernardello 1999; Rio 2001, 2006; Rio et al. 2002, 2005; Vieira & Shepherd 2002a; Aguiar 2003; Simões 2004; Demarco 2005; Rio & Kinoshita 2005; Demarco et al. 2006; Gomes 2006; Simões et al. 2006, 2007; Gomes et al. 2008; Castro & Demarco 2008; Marasca 2008).

#### Laticíferos e coléteres

Dentre todas as glândulas presentes na família, laticíferos e coléteres destacam-se pela ampla ocorrência, importância taxonômica e ecológica.

O **laticífero** é uma célula especializada ou uma fileira de células que contêm látex (Fahn 1979), que pode ser composto por hidrocarbonetos poliisoprénicos, terpenos, ácidos graxos, ácidos aromáticos, carotenos, fosfolipídios e proteínas (Van Die 1955). Os laticíferos são classificados como articulados ou não articulados (De Bary 1884) e embora existam muitos estudos anatômicos desta estrutura em espécies da família, incongruências com relação ao seu tipo e formação podem ser encontradas na literatura como, por

exemplo, em *Cryptostegia grandiflora* R.Br. e *Nerium oleander* L. (Blaser 1945; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Mahlberg 1961, 1963; Stockstill & Nessler 1986). Tanto laticíferos não articulados quanto articulados já foram descritos para as Apocynaceae (Mahlberg 1961, 1963; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murugan & Inamdar 1987a,b; Wilson & Maxam 1987; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Demarco *et al.* 2006). Eles estão presentes no caule, nas folhas e no córtex das raízes de todos os seus representantes (Metcalfe & Chalk 1950); além de ocorrerem também nos órgãos reprodutivos, como flores (Murugan & Inamdar 1987a,b; Demarco *et al.* 2006; Marasca 2008) e frutos (Thomas & Dave 1994; Aguiar 2003). A cor do conteúdo varia de acordo com o gênero ou espécie, podendo ser branco, avermelhado, amarelado ou esverdeado (Solereder 1908). A função dos laticíferos é a de proteção (Fahn 1979; Farrell *et al.* 1991; Castro & Demarco 2008; Pickard 2008), embora alguns insetos tenham desenvolvido estratégias para se alimentarem de plantas latescentes (Lewinsohn & Vasconcelos-Neto 1980, 1985; Compton 1987; Dussourd & Eisner 1987; Dussourd 1990; Dussourd & Denno 1991; Farrell *et al.* 1991).

Os **coléteres** também se destacam por sua função e importância taxonômica em diferentes níveis hierárquicos (Woodson & Moore 1938, Barroso 1986; Thomas 1991; Rio & Kinoshita 2005; Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006). Eles possuem ampla ocorrência, porém, não universal para a família (Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005). Os coléteres são estruturas secretoras que produzem uma secreção que protege os meristemas e órgãos em desenvolvimento (Thomas 1991) contra o dessecamento e, às vezes, contra fitófagos e proliferação de fungos (Demarco 2005). A secreção pode ser constituída apenas por mucilagem (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991) ou por uma mistura de mucilagem e compostos lipofílicos (Fahn 1979, 1990; Demarco 2005; Castro & Demarco 2008), tais como ácidos graxos e compostos fenólicos (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008); em algumas espécies, os compostos lipofílicos são produzidos em uma segunda fase de secreção dos coléteres, após o término da exsudação de mucilagem (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2006).

Os coléteres podem ser tricomas ou emergências e são encontrados nos órgãos vegetativos e/ou reprodutivos de diversas famílias de dicotiledôneas (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991). Para as Apocynaceae, os coléteres são emergências que podem estar

presentes na base da lâmina foliar, pecíolo, brácteas, bractéolas e sépalas (Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998). Eles foram registrados em cerca de 70 dos 355 gêneros (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963a,b; Ramayya & Bahadur 1968; Fjell 1983; Hansen 1985; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c, 1990, 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Judd *et al.* 2002; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Demarco 2005; Rio & Kinoshita 2005; Gomes 2006; Simões *et al.* 2006; Marasca 2008) e mencionados nas descrições taxonômicas de membros das cinco subfamílias (Endress & Bruyns 2000).

Os coléteres das Apocynaceae são do tipo padrão (Thomas 1991; Rio *et al.* 2002); recentemente, tipos inéditos de coléteres foram descritos para espécies de Apocynoideae (Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006) e Asclepiadoideae (Demarco 2005).

#### Estrutura floral

Um dos trabalhos mais abrangentes envolvendo a estrutura floral de espécies de Apocynaceae foi realizado por Woodson e Moore (1938), com o estudo da vascularização e morfologia de flores de 39 gêneros e 59 espécies. Trabalhos posteriores também se destacaram, como os de Rao e Ganguli (1963a,b), Fallen (1986), Kunze (1991, 1995, 1997); Swarupanandan *et al.* (1996), Galetto (1997), Torres e Galetto (1998), Vieira (1998), Lin e Bernardello (1999), Rio (2001, 2006), Vieira e Shepherd (2002a), Simões (2004), Demarco (2005), Gomes (2006), Simões *et al.* (2006, 2007) e Marasca (2008). As Asclepiadoideae possuem o mais complexo mecanismo floral de polinização das dicotiledôneas (Kunze 1991) e trabalhos sobre biologia reprodutiva das espécies desta subfamília são conhecidos desde o século XIX (Brown 1833; Corry 1883; Robertson 1886).

Algumas estruturas florais das Asclepiadoideae já foram designadas por diversos termos distintos e alguns foram alterados ao longo das décadas de estudo das espécies do grupo. Devido a isso, os termos utilizados neste trabalho, cujo conceito varia dependendo do autor, estão sumarizados no anexo I (p. 321-322).

Os tipos de estruturas secretoras florais relatados são: laticíferos, coléteres, epiderme da cabeça dos estiletes, nectários e osmóforos.

A **cabeça dos estiletes** possui epiderme secretora (Fallen 1986; Kunze 1993, 1994; Galetto 1997; Lin & Bernardello 1999; Demarco 2005; Gomes 2006; Rio 2006; Simões *et* 

*al.* 2007; Marasca 2008). Em Asclepiadoideae, a epiderme das regiões alternas às anteras é responsável pela produção do translador (corpúsculo e caudículas) que se fixará ao corpo do polinizador, carregando consigo duas polínias provenientes de anteras distintas (Endress 1994; Demarco 2005; Gomes 2006). Fallen (1986) estudou a estrutura floral de 72 gêneros das diferentes subfamílias; aspectos funcionais e evolutivos também foram analisados. Uma progressão na estrutura da cabeça dos estiletes foi definida com base na morfologia e complexidade funcional.

Os **nectários** nas Rauvolfioideae e Apocynoideae formam um anel basal contínuo ao redor do ovário, freqüentemente lobado (dois a cinco lobos) na porção apical (Woodson & Moore 1938) e pode estar ausente em algumas espécies, como em Aspidosperma australe Müll.Arg. (Demarco 2005). Nas Asclepiadoideae, a posição dos nectários é controversa. A localização primária dos tecidos nectaríferos é no tubo dos filetes na região interestaminal (Kunze 1991, 1997) e o néctar pode ser acumulado na corona (Galil & Zeroni 1965; Eisikowitch 1986) ou na base da corola (Kunze 1991). O tecido nectarífero pode ocorrer nas câmaras estigmáticas, corona ou na região onde o tubo da corola está conectado ao ginostégio (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Kunze 1991, 1995, 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002a; Demarco 2005; Gomes 2006). O néctar tem dupla função: recurso para o polinizador e propiciar a germinação dos grãos de pólen. Dentro da câmara estigmática, o néctar funciona como indutor de germinação e o néctar que flui dos nectários para contentores formados pela corona ou base do tubo da corola, torna-se acessível ao polinizador (Kunze 1995). Em geral, assume-se que apenas o nectário primário é secretor e o néctar flui através de um intrincado sistema capilar até o local onde ele é acumulado (Galil & Zeroni 1965; Kunze 1997); todavia, já foi descrito tecido nectarífero na corona estaminal (Rao & Ganguli 1963b; Valente & Silva 1984; Bruyns 1993; Kunze 1995,1999; Demarco 2005). A secreção dos nectários já foi considerada como sendo de natureza mista (Christ & Schnepf 1985).

Em grande parte das Apocynaceae, houve uma transferência da área de captura do pólen do gineceu para o androceu; isto parece ter iniciado nas Apocynoideae. Em *Mandevilla* e *Peltastes*, o pólen da probóscide do inseto polinizador é retirado por tricomas da face ventral da antera (Fallen 1986); nas Asclepiadoideae, esta função é exercida pela fenda estaminal que guia o inseto polinizador e retém a polínia em seu interior ou junto à

câmara estigmática, cuja secreção induz a germinação do pólen (Bookman 1981; Kunze 1991; Endress 1994; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002a; Demarco 2005). Além disso, *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. possui uma característica única entre as Asclepiadoideae, um cômpito extracarpelar formado pela secreção das células epidérmicas da superfície interna do tubo dos filetes ao redor dos estiletes unidos, possibilitando a fertilização dos dois ovários a partir de uma única polínia, originando folículos gêmeos (Vieira & Shepherd 2002a).

**Osmóforos** são citados para diversas espécies de Apocynaceae (Endress 1994; Torres & Galetto 1998; Demarco 2005; Rio 2006; Marasca 2008) e o estímulo olfativo é uma das adaptações das flores das Asclepiadoideae da tribo Ceropegieae à miiofilia (Meve & Liede 1994; Jürgens *et al.* 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre esta glândula e o trabalho realizado por Vogel (1990) em *Ceropegia elegans* Wall. destaca-se como o único estudo anatômico desta estrutura em espécies da família.

#### Gêneros de Asclepiadeae investigados

Todas as espécies de Asclepiadoideae ocorrentes no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba foram investigadas no presente estudo. Elas pertencem aos gêneros *Asclepias, Fischeria, Gonioanthela, Matelea* e *Oxypetalum* (Farinaccio & Assis 1998) da tribo Asclepiadeae (Liede 1997; Endress & Bruyns 2000). Esta grande tribo é cosmopolita, mas com especial concentração de espécies na África e no Novo Mundo (Endress & Bruyns 2000). Segundo Rapini *et al.* (2003), as relações entre os grupos americanos são pouco conhecidas e consideram uma boa avaliação dos componentes das subtribos como sendo o primeiro passo para o seu entendimento.

Os cinco gêneros analisados estão agrupados em diferentes subtribos. *Asclepias* pertence à subtribo Asclepiadinae, *Fischeria* e *Matelea* estão incluídos em Gonolobinae, *Gonioanthela*, em Metastelmatinae e *Oxypetalum*, em Oxypetalinae (Liede 1997). *Asclepias* possui cerca de 180 espécies de distribuição tipicamente neotropical (Arraes 1960), destacando-se *A. curassavica* L. como uma espécie cosmopolita, que segundo Woodson (1954) é proveniente da América do Sul. *Fischeria* é composta por 16 espécies (Mabberley 1997), mas Murphy (1986) reconheceu apenas seis, que se distribuem do México até o Brasil e norte da Argentina. *Matelea* apresenta 180 espécies (Mabberley 1997) que podem

ser encontradas desde o México até a América do Sul (Stevens 1975, 1988; Mabberley 1997), *Gonioanthela*, 6 espécies que ocorrem apenas no sudeste e sul do Brasil (Silva *et al.* 1975; Mabberley 1997) e *Oxypetalum*, 170 espécies de distribuição exclusivamente neotropical, das quais 115 são encontradas no Brasil (Occhioni 1953). Estudos anatômicos de espécies de Asclepiadoideae são escassos, especialmente com relação às espécies de *Fischeria, Gonioanthela* e *Matelea*, restringindo-se a apenas alguns poucos dados morfológicos provenientes de descrições taxonômicas (Murphy 1986; Stevens 1975, 1988; Pereira 1989; Morillo 1995) e alguns poucos trabalhos anatômicos (Silva *et al.* 1975; Kunze 1995, 1996; Valente 1995; 1996).

Este estudo está vinculado ao temático intitulado "Composição florística, estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa dos núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar" (Biota/FAPESP proc. n.º 03/12595-7) e faz parte de uma ampla pesquisa realizada pelo grupo composto por professores e alunos do Departamento de Botânica/IB/UNICAMP, cujo objetivo é estudar os aspectos morfológicos e histoquímicos das estruturas secretoras de espécies brasileiras de Apocynaceae.

#### **OBJETIVOS**

O presente trabalho se propõe a caracterizar morfologicamente as estruturas secretoras dos órgãos vegetativos aéreos e florais de *Asclepias curassavica* L. (Fig. A-B), *Fischeria stellata* E.Fourn. (Fig. C-D), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (Fig. E-F), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (Fig. G-H) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (Fig. I-J), analisando suas funções, suas semelhanças e diferenças em relação às demais Asclepiadeae, aumentar o conhecimento sobre espécies brasileiras de mata atlântica e verificar a ocorrência de padrões estruturais comuns às espécies de Apocynaceae. A identificação do material botânico foi realizada com uso da chave de identificação de Farinaccio e Assis (1998), consulta à obra "Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo" (Wanderley *et al.* 2005) e análise do material depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) e do Herbário da Universidade Estadual Paulista *campus* Rio Claro (HRCB).

O local de coleta dos indivíduos e o tipo vegetacional ao qual pertencem encontramse sumarizados na tabela 1.

Espécies	Nº de	Floresta de restinga	Floresta ombrófila densa de terras baixas			
(nº de indivíduos)	órgãos seccionados	praia da Fazenda	estrada para a Casa de Farinha	Casa de Farinha	trilha do Noelo	
Asclepias curassavica (6)	23	23°21'33,7''S/44°51'0,37''W	-	23°20'24,2''S/44°50'14,6''W; 23°20'23,2''S/44°50'14,3''W; 23°20'22,9''S/44°50'14,2''W	-	
Fischeria stellata (4)	8	-	-	-	23°21'14,6''S/44°49'59,8''W; 23°21'14,8''S/44°50'00,3''W; 23°21'14,0''S/44°50'00,5''W; 23°21'13,8''S/44°50'00,1''W	
Gonioanthela axillaris (6)	23	23°21'35,0''S/ 44°50'58,9''W; 23°21'26,3''S/44°51'01,8''W; 23°21'26,4''S/44°51'03,7''W; 23°21'26,1''S/44°51'03,6''W	23°20'53,1''S/44°51'00,9''W	-	23°20'53,1''S/44°51'00,9''W	
Matelea denticulata (4)	23	-	23°21'02,4''S/44°51'05,4''W; 23°20'55,3''S/44°51'01,5''W; 23°21'02,4''S/44°51'05,4''W	-	-	
Oxypetalum banksii (3)	23	23°21'24,0''S/44°50'14,7''W; 23°21'34,5''S/ 44°51'02,1''W; 23°21'34,4''S/44°51'04,3''W	-	-	-	

**Tabela 1.** Formações vegetacionais e georeferenciamento dos indivíduos de Apocynaceae do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba utilizados nos estudos das estruturas secretoras de órgãos vegetativos e florais.

## ILUSTRAÇÕES



Figuras A-J. Espécies de Asclepiadeae estudadas. A-B,F-H,J. Flores. C-E,I. Folhas. A-B. Asclepias curassavica L. C-D. Fischeria stellata E.Fourn. E-F. Gonioanthela axillaris (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. G-H. Matelea denticulata (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. I-J. Oxypetalum banksii subsp. banksii Roem. & Schult.

#### **Objetivos específicos**

Este traballho propõe-se a:

- investigar a ontogênese, estrutura e distribuição dos coléteres e laticíferos de órgãos vegetativos das cinco espécies e dos tricomas glandulares de *F. stellata* e *M. denticulata*, além de determinar a natureza química do exsudato produzido por estas estruturas através de testes histoquímicos convencionais;
- caracterizar as glândulas florais de *A. curassavica*, *G. axillaris*, *M. denticulata* e
   *O. banksii* subsp. *banksii* em termos anatômicos e histoquímicos;
- analisar a micromorfologia das estruturas secretoras de órgãos vegetativos e florais;
- avaliar a possível função dos diferentes exsudatos produzidos pelas glândulas investigadas;
- comparar as espécies de floresta estudadas neste projeto com as de cerrado que estão sendo pesquisadas pelo grupo composto por professores e alunos do Depto. de Botânica (IB/UNICAMP), para verificar a ocorrência de padrões estruturais comuns às espécies de Asclepiadoideae de florestas do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba (Ubatuba, SP) e de fragmentos de cerrado do estado de São Paulo.

14

### Capítulo 1

#### Coléteres foliares em espécies de Asclepiadeae

#### Introdução

Coléteres são estruturas secretoras presentes em órgãos vegetativos e/ou reprodutivos, que produzem uma secreção viscosa constituída apenas por mucilagem ou por uma mistura de mucilagem e compostos lipofílicos que protege e lubrifica os meristemas e órgãos em desenvolvimento (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991; Castro & Demarco 2008).

Estas estruturas têm ampla ocorrência e já foram registradas em 60 famílias de dicotiledôneas (Thomas 1991; Rezende & Morretes 2003; Lacchia 2006). Elas são particularmente bem representadas nas Gentianales (Thomas 1991). Dentre as famílias desta ordem, destaca-se Apocynaceae, com registro de coléteres para cerca de 70 dos 355 gêneros (Woodson 1935; Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963a,b; Ramayya & Bahadur 1968; Pereira & Silva 1974; Silva *et al.* 1975; Arekal & Ramakrishna 1980; Fjell 1983; Mohan & Inamdar 1986; Dave *et al.* 1987; Subramanian *et al.* 1989; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c, 1991; Thomas 1991; Morillo 1995; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Judd *et al.* 2002; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Demarco 2005; Rio & Kinoshita 2005; Gomes 2006; Simões *et al.* 2006; Marasca 2008) distribuídos nas cinco subfamílias (Endress & Bruyns 2000).

Em Apocynaceae, os coléteres são emergências (Thomas 1991) que podem estar presentes na margem da lâmina foliar (Sennblad *et al.* 1998), pecíolo, brácteas, bractéolas e sépalas (Thomas 1991). Eles estão presentes nas três tribos de Asclepiadoideae, localizados na face adaxial da região de junção do pecíolo com a lâmina foliar (Endress & Bruyns 2000). As Asclepiadoideae do Novo Mundo são constituídas principalmente por membros de Asclepiadeae e o primeiro passo para o entendimento das relações entre os grupos americanos é uma avaliação das subtribos que a compõem (Rapini *et al.* 2003).

No presente estudo, os coléteres foliares de espécies de cinco gêneros de Asclepiadeae foram investigados: *Asclepias* (Asclepiadinae), *Fischeria* e *Matelea* 

(Gonolobinae), *Gonioanthela* (Metastelmatinae) e *Oxypetalum* (Oxypetalinae; Rapini *et al.* 2003).

Há poucos trabalhos anatômicos de órgãos vegetativos de espécies de Asclepiadeae e apenas quatro sobre coléteres, realizados em espécies de *Calotropis* (Arekal & Ramakrishna 1980; Kuriachen & Dave 1989), *Dregea* (sob *Wattakaka*; Arekal & Ramakrishna 1980), *Oxypetalum* (Schwarz & Furlan 2002) e *Blepharodon* (Demarco 2005). Estas glândulas foram apenas citadas para *Asclepias, Fischeria, Gonioanthela, Matelea* e nunca analisadas morfologicamente (Arraes 1960; Pereira *et al.* 1971; Valente *et al.* 1971, 1973; Silva *et al.* 1975; Stevens 1975, 1988; Pereira & Schwarz 1983; Murphy 1986).

Diante da falta de informações anatômicas sobre estas estruturas secretoras em Asclepiadeae e as relações ainda não totalmente compreendidas entre as subtribos, o objetivo da presente investigação é estudar a ontogênese, estrutura e distribuição dos coléteres foliares de *Asclepias curassavica* L., *Fischeria stellata* E.Fourn., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. de floresta de restinga e de floresta ombrófila densa de terras baixas, avaliar sua função e seu potencial taxonômico.

#### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha, trilha do Noelo e trilha da Sede. As coletas foram realizadas nos meses de março, agosto a dezembro de 2005 e fevereiro de 2006. Cinco indivíduos de *A. curassavica* foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50'14,2"W) e na praia da Fazenda (23°21'33,7"S/ 44°51'0,37"W); quatro de *F. stellata* na trilha do Noelo (23°21'14,6"S/44°49'59,8"W; 23° 21'14,8"S/44°50'00,3"W; 23°21'14,0"S/44°50'00,5"W; 23°21'13,8"S/44°50'00,1"W); cinco de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W; 23°21'26,4"S/44°51'03,7"W; 23°21'26,1"S/44°51'03,6"W) e na estrada para a Casa de Farinha (23°20'53,1"S/44°51'00,9"W); quatro de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23°21'02,4"S/44°51'05,4"W; 23°20'55,3"S/44°51'01,5"W; 23°21'02,4"S/44°51'05,4"W) e três de *O. banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°21'24,0"S/

44°50′14,7″W; 23°21′34,5″S/44°51′02,1″W; 23°21′34,4″S/44°51′04,3″W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos vegetativos de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* foram coletados, com prévia análise do número de nós que possuíam coléteres, fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940) e em FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Para a análise micromorfológica, ramos vegetativos fixados em FAA e FNT foram utilizados. Os ápices caulinares e os dois nós subseqüententes foram isolados, desidratados em série etílica, secos pelo método de ponto crítico, montados e metalizados com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada.

Para o estudo anatômico, ápices vegetativos (constituídos por cerca de seis nós) e os nós subseqüentes com as respectivas folhas que apresentavam coléteres foram isolados, desidratados em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 10 a 18 μm. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética. No estudo ontogenético, a contagem dos nós foi feita a partir do ápice dos ramos.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

#### Morfologia (Fig. 1-16, tabela 1)

Coléteres são facilmente observados em posição interpeciolar nas cinco espécies estudadas (Fig. 1-2, 8), peciolar em *A. curassavica, F. stellata* e *G. axillaris* (Fig. 9) e laminar em *F. stellata, M. denticulata* (Fig. 11, 14-16) e *O. banksii* subsp. *banksii*. Eles são

cônicos e podem ser inteiros (Fig. 3, 5-7, 9-10, 12-13), bífidos (Fig. 4, 11, 16), trífidos ou ramificados (Fig. 8). São verdes na fase pré-secretora e início da secretora (Fig. 14), amarelos durante a fase secretora (Fig. 16) e tornam-se castanhos conforme senescem. *M. denticulata* distingui-se das demais espécies por apresentar coléteres enegrecidos (Fig. 15). Todos os coléteres estudados são caducos e podem ser encontrados em folhas por até 12 nós, sendo facilmente observados nas porções mais jovens dos ramos vegetativos.

#### Ontogênese (Fig. 17-31)

Os coléteres interpeciolares das cinco espécies estudadas são estipulares. No início do desenvolvimento dos primórdios foliares, grupos de células meristemáticas da base do pecíolo (estípulas) dividem-se, crescem lateralmente (Fig. 20) e fundem-se, formando um arco estipular (Fig. 21-22) do qual se originam os coléteres interpeciolares (Fig. 8). Estes coléteres são sempre os primeiros a surgir nos primórdios foliares e já podem ser observados em fase pré-secretora em primórdios do segundo (Fig. 17-18) ou terceiro nó (Fig. 23). Eles são inteiros em *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*. Em *G. axillaris*, o arco estipular dá origem a um único coléter que é contínuo entre os dois pecíolos (Fig. 8, 46); ele se ramifica em duas partes principais (Fig. 45-46) e cada uma pode se ramificar novamente na porção apical (Fig. 8, 45).

Os coléteres laminares de *F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* surgem logo em seguida aos interpeciolares. Em primórdios do terceiro ou quarto nó, grupos de células protodérmicas e do meristema fundamental apresentam intensa atividade mitótica (Fig. 19, 27, 30). As células protodérmicas dividem-se anticlinalmente, aumentando a superfície do coléter e as células do meristema fundamental, dividem-se em diversos planos, propiciando o seu crescimento em altura e largura. O início da formação destes coléteres é sempre em dois grupos de células meristemáticas da porção central da face adaxial da base da lâmina foliar junto à inserção do pecíolo em *F. stellata* (Fig. 27), *M. denticulata* (Fig. 30) e *O. banksii* subsp. *banksii.* Em *F. stellata* e *M. denticulata* esses coléteres são bífidos (Fig. 11, 16, 56-57); a altura em que ocorre a bifurcação pode variar (Fig. 7, 11, 16), mas geralmente é próxima à base (Fig. 30). *F. stellata* e *O. banksii* subsp. *banksii* apresentam coléteres laminares adicionais. Eles são formados em primórdios do sexto nó (Fig. 31), são sempre inteiros e localizam-se lateralmente aos dois coléteres iniciais, que se tornam centrais (Fig. 7, 13, 31, 64, 66).

Asclepias curassavica, *F. stellata* e *G. axillaris* possuem coléteres peciolares. Em *A. curassavica* e *G. axillaris* eles são formados após a origem dos interpeciolares e em *F. stellata*, após a dos laminares. Os coléteres de *G. axillaris* originam-se na porção distal do pecíolo junto à lâmina foliar em primórdios do terceiro nó (Fig. 17, 19, 29). Esta espécie pode ter um terceiro coléter peciolar; neste caso, ele terá posição central e tamanho reduzido (Fig. 9, 45). Os peciolares de *A. curassavica* e *F. stellata* situam-se na base do pecíolo próximo à sua inserção ao caule (Fig. 3, 6). Eles são formados em primórdios do quarto nó em *A. curassavica* (Fig. 24) e quinto nó em *F. stellata* (Fig. 28). Os coléteres peciolares de *F. stellata* e *G. axillaris* são sempre inteiros (Fig. 6, 9, 43-45), os de *A. curassavica* podem ser inteiros ou se ramificar em duas a três partes (Fig. 3-4, 25-26).

#### Estrutura (Fig. 32-66, tabela 1)

Os coléteres interpeciolares são os primeiros a serem formados e os primeiros a iniciar a atividade secretora. A partir do quarto nó, todos os coléteres interpeciolares já estão secretando e o exsudato foi preservado no meio extracelular permeando as regiões meristemáticas em materiais fixados em FNT (Fig. 2). Os coléteres laminares de *F. stellata*, *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* e os peciolares de *G. axillaris* formam-se em seguida e já apresentam secreção a partir do quinto nó e os peciolares de *A. curassavica* e *F. stellata*, a partir do sexto nó.

Embora alguns coléteres sejam facilmente reconhecidos como inteiros ou ramificados em microscópio estereoscópico (Fig. 16) e em microscópio eletrônico de varredura (Fig. 1-13), outros são ramificados na base e só podem ser identificados através de cortes anatômicos seriados (Fig. 7-8, 11, 14-15).

Os coléteres interpeciolares são sempre inteiros, com exceção de *G. axillaris*, onde praticamente todo o arco estipular se torna secretor. Ele forma um único coléter, identificado pela porção basal que apresenta epiderme secretora em toda a sua extensão (Fig. 46), formando um coléter contínuo entre os dois pecíolos. Poucas camadas de células acima, este coléter bifurca formando duas partes principais (Fig. 45-46) que, ao microscópio estereoscópico ou eletrônico de varredura, parecem dois ou mais coléteres isolados (Fig. 8). Estas partes ainda podem se ramificar no ápice mais uma ou duas vezes (Fig. 8, 45, 47).

Os coléteres peciolares de *A. curassavica* podem ser inteiros, bífidos ou trífidos. A altura em que ocorrem as ramificações varia, mas geralmente são na base do coléter e podem originar um coléter bífido ou trífido (Fig. 25-26). Os coléteres laminares centrais de *F. stellata* e *M. denticulata* são semelhantes, bifurcando-se logo no início de sua formação (Fig. 30) e, às vezes, são dificilmente reconhecidos em microscópio estereoscópico (Fig. 14-15). Através de cortes seriados pode se verificar o ponto de ramificação mesmo em coléteres maduros (Fig. 56-57). Os demais coléteres estudados são inteiros (Tabela 1).

Os coléteres variam com relação ao número entre as espécies ou até em um mesmo indivíduo (Tabela 1). *A. curassavica* apresenta dois coléteres interpeciolares inteiros, laterais ao pecíolo (Fig. 3, 24, 32) e dois a quatro coléteres peciolares, inteiros, bífidos ou trífidos na base do pecíolo (Fig. 25-26, 32). *F. stellata* possui dois coléteres interpeciolares inteiros, laterais ao pecíolo (Fig. 5), cinco a seis coléteres na base da lâmina, sendo os dois centrais bífidos e os demais inteiros (Fig. 16), e quatro a seis coléteres peciolares na base do pecíolo (Fig. 6, 43-44). *G. axillaris* tem dois a três coléteres peciolares na porção distal do pecíolo (Fig. 9, 45-46) e um coléter interpeciolar contínuo (Fig. 8, 45-46). *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* não apresentam variação na estrutura nem no número de coléteres; em *M. denticulata*, há dois coléteres interpeciolares inteiros, laterais ao pecíolo (Fig. 10) e dois coléteres bífidos na base da lâmina foliar (Fig. 11, 56-57) e em *O. banksii* subsp. *banksii*, dois coléteres interpeciolares inteiros, laterais ao pecíolo (Fig. 12) e quatro coléteres interpeciolares na base da lâmina foliar (Fig. 13, 31, 66).

Coléteres pedunculados e sésseis foram observados (Tabela 1). Os coléteres interpeciolares das cinco espécies são pedunculados. O pedúnculo é sempre curto, composto por poucas camadas de células não secretoras (Fig. 28, 33, 37, 48, 52-53, 63-64, 66-67). Os coléteres laminares são sésseis em *F. stellata* (Fig. 39) e *M. denticulata* (Fig. 54) e pedunculados em *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 31, 64, 66). Os coléteres peciolares são pedunculados em *A. curassavica* (Fig. 36) e *F. stellata* (Fig. 41) e sésseis em *G. axillaris* (Fig. 50, 68).

A porção secretora de todos os coléteres é semelhante, sendo constituída por epiderme composta por células retangulares dispostas em paliçada; o eixo parenquimático, cujas células são alongadas longitudinalmente em relação ao coléter, não é secretor (Fig. 23, 31-33, 35-41, 43-50, 52-54, 56-58, 60-69). Entretanto, há algumas diferenças. Os

coléteres interpeciolares de *A. curassavica*, *F. stellata* e *M. denticulata* podem ter tricomas no pedúnculo ou na porção secretora (Fig. 5, 10, 37, 53) e os coléteres de *M. denticulata* apresentam hipoderme secretora após o início da fase secretora do coléter (Fig. 53, 58-60).

As células epidérmicas secretoras de todos os coléteres são semelhantes, mas há diferença quanto ao aspecto da secreção entre as espécies. As células são sempre retangulares, de paredes finas, citoplasma de aspecto denso, fortemente corado pela safranina (Fig. 32-66) com núcleo em posição mediana ou basal (Fig. 51, 69) e nucléolo evidente (Fig. 51). Espaço extraprotoplástico (espaço intracelular externo ao protoplasto) foi observado na porção distal de todas as células epidérmicas em atividade secretora (Fig. 34-35, 38, 40, 42, 49, 51, 55, 59, 65). A secreção no interior das células dos coléteres de *G. axillaris* apresenta aspecto homogêneo (Fig. 49, 51). Nas demais espécies estudadas, a secreção tem aspecto heterogêneo, com a presença de diversos vacúolos de diferentes tamanhos (Fig. 34, 38, 55, 59, 65). Estes vacúolos estão presentes desde o início da atividade secretora dos coléteres; o seu conteúdo não se cora e é preservado apenas pelo FNT, não sendo observados em materiais fixados em FAA, cujas células secretoras também apresentaram sinais de plasmólise (Fig. 61).

Todos os coléteres são desprovidos de tecido vascular (Fig. 20, 23-26, 28, 31-33, 35-41, 43-48, 50, 52-54, 56-58, 60, 62-69). Outros tipos celulares podem ser encontrados no interior do coléter. Laticíferos são freqüentemente observados em todos os coléteres (Fig. 28, 50), assim como idioblastos portando drusas; entretanto, estes idioblastos cristalíferos são particularmente abundantes nos coléteres de *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 64-65). **Tabela 1.** Comparação entre os coléteres de *Asclepias curassavica* L., *Fischeria stellata* E.Fourn., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (+ = presente; - = ausente).

Espécies	Localização		Pedúnculo	Тіро	<b>Número</b> (por primórdio/folha)
A. curassavica	interpeciolares	laterais ao pecíolo	+	inteiros	2
	peciolares	base do pecíolo	+	inteiros, bífidos ou trífidos	2 a 4
	interpeciolares	laterais ao pecíolo	+	inteiros	2
	peciolares	base do pecíolo	+	inteiros	4 a 6
F. stellata	laminares	base da lâmina	-	bífidos (centrais)/ inteiros (laterais)	5-6
G. axillaris	interpeciolares	contínuos entre os pecíolos	+	ramificados	1
	peciolares	porção distal do pecíolo	-	inteiros	2 a 3
M. denticulata	interpeciolares	laterais ao pecíolo	+	inteiros	2
	laminares	base da lâmina	-	bífidos	2
<i>O. banksii</i> subsp.	interpeciolares	laterais ao pecíolo	+	inteiros	2
banksii	laminares	base da lâmina	+	inteiros	4

#### Senescência (Fig. 67-70)

Todos os coléteres das cinco espécies são caducos e, em geral, podem ser encontrados até o décimo segundo nó, quando, em média, as folhas completam seu desenvolvimento e estão totalmente expandidas. Ao contrário das demais espécies, os coléteres de *G. axillaris* começam a apresentar sinais de senescência no sexto nó, pouco depois de iniciarem sua atividade secretora e é a única espécie que apresenta proliferação de fungos. Eles podem ser observados junto aos coléteres em todo o ápice vegetativo (Fig. 1-2, 17, 45).

Os coléteres não apresentam fase pós-secretora ou esta é muito breve (Fig. 69). Os coléteres senescem do ápice para a base, conforme as células vão cessando sua atividade secretora (Fig. 33, 67-68). Este processo é acompanhado pelo acúmulo de glóbulos que se coram fortemente pela safranina nas células da epiderme e do eixo parenquimático (Fig. 70), seguido pela necrose dos tecidos dos coléteres (Fig. 67-68) até que estes se desconectem das respectivas folhas.

#### 23

## ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-7.** Eletromicrografias de varredura dos coléteres foliares de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**1-2**), *Asclepias curassavica* L. (**3-4**) e *Fischeria stellata* E.Fourn. (**5-7**). **1-2.** Ápices caulinares; notar hifas (**seta** = coléter). **1,3-7.** Materiais fixados em FAA. **2.** Material fixado em FNT. **3.** Coléteres peciolares com os interpeciolares nas extremidades. **4.** Coléter peciolar bífido. **5.** Coléteres interpeciolares com tricoma tector no pedúnculo. **6.** Coléteres peciolares. **7.** Coléteres laminares.



**Figuras 8-13.** Eletromicrografias de varredura dos coléteres foliares de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**8-9**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**10-11**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**12-13**). **8.** Coléter interpeciolar contínuo. **9.** Coléteres peciolares. **10.** Coléter interpeciolar com tricoma tector. **11.** Coléteres laminares bífidos. **12.** Coléteres interpeciolares. **13.** Coléteres laminares inteiros.


**Figuras 14-23.** Variação de cor (**14-16**) e ontogênese dos coléteres de Asclepiadeae (**17-23**). **14-15.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **16.** *Fischeria stellata* E.Fourn. **17-19,22.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **20-21,23.** *Asclepias curassavica* L. **17-19.** Secções longitudinais. **20-23.** Secções transversais. **14.** Coléteres em fase pré-secretora. **15-16.** Coléteres em fase secretora. **17.** Vista geral do ápice vegetativo. **18-19.** Pormenores da figura 17. **18.** Coléter interpeciolar meristemático do segundo nó. **19.** Coléter peciolar meristemático do terceiro nó. **20.** Origem do arco estipular no segundo nó (**seta**). **21-22.** Arco estipular (**As**). **23.** Coléteres interpeciolares meristemáticos do terceiro nó. **Co** = coléter; **Pe** = pecíolo; **S** = caule. **Barras: 14.** 500 µm; **15-16.** 300 µm; **17,20-23.** 150 µm; **18-19.** 30 µm.



**Figuras 24-31.** Ontogênese dos coléteres de *Asclepias curassavica* L. (**24-26**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**27-28**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**29**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**30**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**31**). **24-27,29-31.** Secções transversais. **24.** Formação dos coléteres peciolares no quarto nó. **25-26.** Diferentes níveis de coléteres peciolares do sexto nó (**Pe** = pecíolo; **S** = caule). **27.** Folha do terceiro nó. **28.** Origem de coléter peciolar. Secção longitudinal de folha do quinto nó. **29.** Formação dos coléteres na região distal do pecíolo. **30.** Origem dos coléteres laminares bífidos em folha do terceiro nó. **31.** Coléteres laminares do sexto nó. **seta** = coléter. **Barras: 24-26.** 150 μm; **27-28,31.** 75 μm; **29.** 30 μm; **30.** 50 μm.



**Figuras 32-38.** Estrutura dos coléteres foliares de *Asclepias curassavica* L. (**32-36**) e *Fischeria stellata* E.Fourn. (**37-38**). **32,35,38.** Secções transversais. **33-34,36-37.** Secções longitudinais. **32.** Coléteres peciolares e interpeciolares do quinto nó. **33.** Vista geral do coléter interpeciolar. **34.** Pormenor da figura 33 (**cabeça de seta** = espaço extraprotoplástico). **35.** Coléter interpeciolar; notar vacúolos na porção distal das células secretoras. **36.** Vista geral do coléter peciolar. **37.** Coléter interpeciolar com tricoma tector. **38.** Coléter interpeciolar. **Barras: 32.** 150 μm; **33,36-37.** 75 μm; **34,38.** 15 μm; **35.** 30 μm.



**Figuras 39-46.** Estrutura dos coléteres foliares de *Fischeria stellata* E.Fourn. (**39-44**) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**45-46**). **39-42.** Secções longitudinais. **43-46.** Secções transversais. **39.** Coléter laminar. **40.** Pormenor da figura 39. **41.** Coléter peciolar. **42.** Pormenor da figura 41. **43-44.** Variação de número de coléteres peciolares. **45-46.** Secções em diferentes níveis dos coléteres interpeciolares contínuos. **Pe** = pecíolo; **S** = caule.. **Barras: 39,41,45-46.** 150 µm; **40,42.** 30 µm; **43-44.** 300 µm.



**Figuras 47-55.** Estrutura dos coléteres foliares de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**47-51**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**52-55**). **47.** Coléter interpeciolar ramificado. Secção transversal. **48-55.** Secções longitudinais. **48.** Vista geral do coléter interpeciolar. **49.** Pormenor da figura 48. **50.** Vista geral do coléter peciolar. **51.** Pormenor da figura 50. **52-53.** Vista geral dos coléteres interpeciolares. **54.** Vista geral do coléter laminar. **55.** Pormenor da figura 54; notar vacúolos no citoplasma (**cabeça de seta** = espaço extraprotoplástico). **Barras: 47,50,52.** 75 μm; **48.** 30 μm; **49,51,55.** 15 μm; **53-54.** 150 μm.



**Figuras 56-63.** Estrutura dos coléteres foliares de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**56-61**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**62-63**). **56-57,60-61.** Secções transversais. **58-59,62-63.** Secções longitudinais. **56-57.** Diferentes níveis dos mesmos coléteres laminares. **58,60.** Coléter interpeciolar com hipoderme secretora. **59.** Pormenor da figura 58; notar vacúolos no citoplasma. **61.** Material fixado em FAA; notar células secretoras plasmolisadas sem vacúolos e ausência de hipoderme secretora. **62-63.** Coléteres interpeciolares. **62.** Coléter do quarto nó em fase secretora (**seta** = cristal). **63.** Coléter do oitavo nó em início de senescência. **Barras: 56-57.** 150 μm; **58,63.** 75 μm; **59.** 15 μm; **60-62.** 30 μm.



**Figuras 64-70.** Estrutura e senescência dos coléteres foliares de Asclepiadeae. **64-66.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **67,69.** *Asclepias curassavica* L. **68,70.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **64-65,67-68.** Secções longitudinais. **66,69-70.** Secções transversais. **64-66.** Coléteres laminares. **64.** Vista geral; notar presença abundante de cristais. **65.** Pormenor da figura 64; notar vacúolos no citoplasma das células secretoras (**seta** = cristal). **66.** Coléteres laminares do oitavo nó. **67-68.** Coléteres senescendo do ápice para a base. **67.** Coléter interpeciolar. **68.** Coléter peciolar; notar necrose dos tecidos. **69.** Porção de coléter interpeciolar senescente sem secreção. **70.** Coléter do sétimo nó com glóbulos derivados do processo de senescência. **Barras: 64,66,68-69.** 75 μm; **65.** 15 μm; **67.** 150 μm; **70.** 30 μm.



### Discussão

Os coléteres estão presentes em muitos gêneros de Apocynaceae e já foram registrados em membros das cinco subfamílias (Thomas 1991; Endress & Bruyns 2000); entretanto, muitos dados taxonômicos a respeito da ocorrência de coléteres carecem de confirmação anatômica. Alguns gêneros caracterizados pela ausência de coléteres (Endress & Bruyns 2000) já tiveram esta estrutura registrada em trabalhos anatômicos (Thomas 1991; Koch & Kinoshita 1999). A única confirmação anatômica da ausência de coléteres em Apocynaceae é registrada em duas espécies de *Aspidosperma* (Demarco 2005), que juntamente com diversos outros caracteres, indicam a ancestralidade deste táxon na família.

Coléteres já foram registrados em 26 gêneros de Asclepiadoideae (Endress & Bruyns 2000): Acerates (=Asclepias), Blepharodon, Asclepias, Calotropis, Ceropegia, Cosmostiqma, Cynanchum, Daemia (= Pergularia), Dischidia, Ditassa, Dregea, Fischeria, Gonioanthela, Grisebachiella (= Astephanus), Holostemma, Marsdenia, Matelea, Oianthus Oxystelma, (=*Heterostemma*), Oxypetalum, Pentatropis, Peplonia, Pergularia, Sarcostemma, Schubertia, Stapelia, Stephanotis (= Marsdenia), Telosma e Tylophora (Woodson 1935; Metcalfe & Chalk 1950; Arraes 1960; Rao & Ganguli 1963b; Pereira et al. 1971; Valente et al. 1971, 1973; Silva et al. 1975; Stevens 1975, 1988; Valente 1983,1984; Arekal & Ramakrishna 1980; Pereira & Schwarz 1983, 1984; Murphy 1986; Kuriachen & Dave 1989; Thomas 1991; Farinaccio 2000; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006; Castro & Demarco 2008).

Os coléteres das cinco espécies estudadas são facilmente observados em posição interpeciolar, peciolar e/ou laminar. Segundo Woodson e Moore (1938), os coléteres dos nós vegetativos podem ser alternos, opostos ou indefinidamente distribuídos entre os pecíolos. Coléteres foram encontrados nestas três posições nas espécies de Asclepiadeae: as cinco espécies têm coléteres peciolares e/ou laminares; *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possuem coléteres interpeciolares laterais ao pecíolo; *G. axillaris* apresenta um coléter contínuo cuja base ocupa toda a região interpeciolar.

As espécies estudadas apresentam diferenças quanto à posição que os coléteres opostos ocupam. Em *A. curassavica* eles estão localizados na base do pecíolo; em *G.* 

#### 42

*axillaris*, na porção distal do pecíolo junto à inserção com a lâmina foliar; em *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*, eles se inserem na base da lâmina foliar junto à inserção do pecíolo; e *F. stellata* possui coléteres na base da lâmina e pecíolo. Segundo Woodson e Moore (1938) e Thomas e Dave (1991), os coléteres foliares ocorrem na parte adaxial basal do pecíolo e lâmina. Os registros da posição dos coléteres de *A. curassavica* (Arraes 1960), *Fischeria* (Murphy 1986) e de várias espécies de *Oxypetalum* (Valente *et al.* 1971, 1973; Pereira & Schwarz 1984; Schwarz & Furlan 2002), inclusive *O. banksii* (Pereira *et al.* 1971), são condizentes com os encontrados nas espécies estudadas; porém, a falta de análise anatômica dos coléteres pode levar a uma descrição errada da posição destas estruturas. Os coléteres de *Gonioanthela* foram descritos como estando na base da lâmina (Silva *et al.* 1975; Pereira & Schwarz 1983) e os de *Matelea*, como acropeciolares (Stevens 1975, 1988), ao contrário do observado em *G. axillaris* e *M. denticulata*.

Os coléteres são verdes durante a fase pré-secretora e início da secretora, tornam-se amarelados durante a fase secretora e castanhos conforme senescem do ápice para a base. Esta seqüência de coloração relacionada à ontogênese e senescência dos coléteres foi igualmente encontrada em outras espécies de Apocynaceae (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas & Dave 1989a,b; Subramanian *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005). A única exceção encontrada é o coléter de *M. denticulata* que se apresenta enegrecido durante a fase secretora devido à presença da hipoderme secretora.

Embora Apocynaceae seja considerada uma família desprovida de estípulas (Woodson & Moore 1938; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991), os coléteres já foram considerados como sendo de natureza estipular (Woodson 1936; Woodson & Moore 1938; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002). Embora a origem estipular tenha sido combatida por Thomas (1991) e Thomas e Dave (1991), o presente estudo e a investigação realizada em *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. (Demarco 2005) provaram que os coléteres interpeciolares em seis gêneros de Asclepiadeae de diferentes subtribos têm origem estipular. Com base nestes dados, sugere-se que as espécies de Asclepiadeae possuam estípulas fundidas formando um arco entre os pecíolos que dá origem a coléteres, confirmando a origem estipular proposta por Woodson e Moore (1938) para os coléteres interpeciolares desta tribo.

Os coléteres foliares são formados assincronicamente, mas há um padrão na seqüência de origem. Os primeiros são sempre os interpeciolares, logo nos primeiros nós; seguidos pelos laminares, nas espécies que os possuem e, posteriormente, pelos peciolares. Esta mesma seqüência foi encontrada em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005). Estruturalmente, os coléteres de Apocynaceae descritos até o momento são emergências (Thomas 1991), originados, portanto, por tecidos protodérmico e subprotodérmico, como observado no presente estudo e em estudos ontogenéticos anteriores (Ramayya & Bahadur 1968; Mohan & Inamdar 1986; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005). Nas cinco espécies estudadas, todos os coléteres já se encontram em atividade secretora nos primeiros seis nós, que é a média de nós que compõe o ápice dos ramos vegetativos. A secreção produzida por estes coléteres envolve todo o ápice e os órgãos em desenvolvimento. Ela é sempre viscosa e pode ser incolor, branca ou amarelada (Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Demarco 2005; Marasca 2008).

Os coléteres podem variar em tipo e número. Nas espécies estudadas, apenas os coléteres peciolares de *A. curassavica* variam quanto ao tipo, podendo ser inteiros, bífidos ou trífidos. Os mais constantes são os interpeciolares, que não apresentam qualquer variação. Entretanto, tipo e número distintos de coléteres interpeciolares foram observados até em um mesmo indivíduo de *B. bicuspidatum* (Demarco 2005). Os peciolares de *A. curassavica, F. stellata* e *G. axillaris* e os laminares de *F. stellata* também variam em número em um mesmo indivíduo, assim como em *G. odorata* (Decne.) Malme (Silva *et al.* 1975) e *G. bradeana* Fontella & Schwarz (Pereira & Schwarz 1983). Variação no número e no tipo dos coléteres laminares de *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* não foram observadas, mas o número de coléteres não é constante em diversas espécies de *Matelea* (Stevens 1975, 1988). Schwarz e Furlan (2002) registraram variação no número de coléteres de *O. banksii* subsp. *banksii*; contudo, isto não foi verificado por Pereira *et al.* (1971), Valente *et al.* (1971) e nem no presente estudo. *O. pilosum* Gardn. possui de dois a quatro coléteres laminares (Valente *et al.* 1973).

Após a descrição e categorização de diversos tipos de coléteres em Rubiaceae (Lersten 1974), a maioria dos trabalhos identifica os coléteres vegetativos das Apocynaceae como do tipo padrão (digitiforme pedunculado; Thomas 1991; Thomas &

44

Dave 1989a,b,c, 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002; Schwarz & Furlan 2002); porém, os coléteres das cinco espécies estudadas são cônicos pedunculados ou sésseis, não podendo ser identificados como do tipo padrão. Coléteres foliares cônicos também foram registrados em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005).

A porção secretora dos coléteres é composta por epiderme unisseriada em paliçada. Os coléteres, em geral, possuem epiderme unisseriada (Thomas 1991), mas em *Allamanda cathartica* L. e *Roupelia grata* Wall., algumas células se dividem periclinalmente (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas *et al.* 1989). Idioblastos secretores foram registrados no eixo central de coléteres de *Aganosma caryophyllata* G.Don., *Carissa congesta* Wt.Ieon., *Himatanthus lancifolius* (Muell.Arg.) Woodson, *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*; Barros 1986/88; Subramanian *et al.* 1989; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

As células epidérmicas secretoras possuem citoplasma com aspecto denso e heterogêneo, com grande quantidade de material hidrofílico fortemente corado pela safranina e vacúolos de diversos tamanhos fracamente corados com conteúdo de natureza provavelmente lipofílica, preservados apenas em materiais fixados em FNT. As células de *G. axillaris* não apresentam estes vacúolos e o citoplasma tem aspecto homogêneo.

A secreção liberada pelos coléteres envolve o ápice caulinar e tem a função de proteger os meristemas (Thomas 1991). Esta proteção pode ser contra o dessecamento, devido à capacidade de retenção de água da mucilagem (Fahn 1979; Simões *et al.* 2004) e contra fitófagos, imobilizando-os (Demarco 2005).

Asclepias curassavica, F. stellata, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii não apresentam fungos em todo o ramo vegetativo onde os coléteres ainda estão secretando; entretanto, a presença de fungos é constante no ápice de G. axillaris. Aparentemente, o material lipofílico produzido pelas células secretoras é o responsável por inibir a proliferação de fungos nas regiões meristemáticas, que ocorrem neste local devido à presença de mucilagem na secreção.

A secreção dos coléteres é acumulada em um espaço extraprotoplástico antes de ser liberada para o meio externo através da parede e da cutícula, sem rompê-las. Segundo Fahn (1990), a secreção normalmente é liberada por ruptura da cutícula, que não foi observada nas espécies analisadas nem em *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio *et al.*  2002), *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005) e *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Marasca 2008). Alguns trabalhos registraram o acúmulo de secreção em um espaço subcuticular (Fjell 1983; Kuriachen & Dave 1989; Schwarz & Furlan 2002) e outros relatam a presença de fendas formadas pela dissolução da lamela média das paredes anticlinais das células epidérmicas relacionadas ao processo de secreção (Mohan & Inamdar 1986; Thomas & Dave 1989a; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

Nenhum dos coléteres das cinco espécies estudadas possui vascularização. Coléteres vascularizados foram registrados apenas em uma espécie de Asclepiadoideae: *Wattakaka volubilis* Stapf (hoje *Dregea*, tribo Marsdenieae; Arekal & Ramakrishna 1980). Os coléteres geralmente não apresentam tecido vascular (Woodson & Moore 1938) e a sua presença pode variar entre os diferentes coléteres de órgãos vegetativos, como ocorre em *Mandevilla illustris, M. velutina* (hoje *M. pohliana*) e *Prestonia coalita* (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002).

Idioblastos portando cristais do tipo drusa foram encontrados no parênquima dos coléteres de todas as espécies investigadas e são particularmente abundantes em *O. banksii* subsp. *banksii*. Cristais também já foram registrados em coléteres de *Aganosma, Allamanda, Alstonia, Blepharodon, Calotropis, Oxypetalum, Rauvolfia, Roupelia, Thevetia* (Ramayya & Bahadur 1968; Arekal & Ramakrishna 1980; Fjell 1983; Thomas & Dave 1989a,b; Subramanian *et al.* 1989; Thomas *et al.* 1989; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005; Marasca 2008).

Laticíferos estão presentes no parênquima de todos os coléteres analisados. Eles também já foram registrados em coléteres de *Allamanda cathartica, A. violacea* Gard., *Blepharodon bicuspidatum, Mandevilla illustris, M. velutina* (hoje *M. pohliana*), *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*), *Plumeria alba* Linn., *Vallaris solanacea* (Roth) O.Ktze. (Murugan & Inamdar 1987a,b; Thomas & Dave 1989a; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, 2000; Demarco 2005; Rio *et al.* 2005; Marasca 2008).

Os coléteres interpeciolares de *A. curassavica, F. stellata* e *M. denticulata* apresentam tricomas multicelulares unisseriados. A presença de tricomas em coléteres é rara e só foi observada em *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987) e *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002). Células subepidérmicas alongadas radialmente também já foram registradas em

coléteres de *Nerium indicum* Mill. (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1989c) e *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989).

Os coléteres senescem do ápice para a base, tornando-se castanhos. Esta fase inicia com o acúmulo de glóbulos fortemente corados pela safranina nas células epidérmicas e parenquimáticas. Estas características do processo de senescência são semelhantes nas Apocynaceae descritas até o momento (Dave *et al.* 1987; Kuriachen & Dave 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Demarco 2005; Castro & Demarco 2008) e presença de glóbulos fortemente corados foi registrada em coléteres senescentes de outras Apocynaceae (Thomas & Dave 1989a,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991). Lignificação tem sido comumente descrita como parte do processo de senescência dos coléteres de espécies de Apocynaceae (Fjell 1983; Thomas & Dave 1989a,b,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Schwarz & Furlan 2002), mas não foi observada em coléter de espécies de Asclepiadoideae (Kuriachen & Dave 1989; Demarco 2005), incluindo este estudo.

Segundo Thomas (1991), os coléteres retêm sua forma após a senescência e os foliares são descritos como persistentes (Thomas & Dave 1989a,b,c;Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Schwarz & Furlan 2002; Marasca 2008). Porém, em *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), os coléteres se contraem do ápice para a base e nas espécies analisadas neste trabalho, assim como em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008), eles são caducos. Os coléteres observados em Asclepiadeae, assim como os registrados por Esau (1977), desenvolvem-se em primórdios foliares e caem em folhas totalmente expandidas.

Asclepias curassavica tem coléteres na base do pecíolo e encontra-se na subtribo Asclepiadinae. Em *G. axillaris* e *B. bicuspidatum* (Metastelmatinae; Demarco 2005), eles estão inseridos na sua porção distal junto à lâmina foliar. *F. stellata* e *M. denticulata* têm coléteres na base da lâmina foliar e os interpeciolares apresentam tricomas; ambas estão agrupadas em Gonolobinae. *O. banksii* subsp. *banksii* foi a única das espécies estudadas, onde todos os coléteres são inteiros e pedunculados e pertence à subtribo Oxypetalinae. Além disso, os coléteres de *M. denticulata* são enegrecidos durante a fase secretora e os interpeciolares de *A. curassavica* também apresentam tricomas. Com base nestes dados, os coléteres podem ser utilizados com finalidade taxonômica para as cinco espécies estudadas com base em sua posição e algumas características estruturais. Embora o número de coléteres não tenha variado em duas das cinco espécies investigadas, variação já foi observada em outras espécies dos respectivos gêneros e não deve ser utilizada como caráter taxonômico. As características mais constantes dos coléteres são a posição, ocorrência de pedúnculo e hipoderme secretora.

### Conclusões

Asclepias curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii possuem diversos coléteres nas folhas com diferentes origens, estruturas e posições. Eles apresentam um padrão na seqüência de desenvolvimento. Todas as folhas têm coléteres interpeciolares de origem estipular, que são sempre os primeiros a serem formados. Eles são laterais ao pecíolo em A. curassavica, F. stellata, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii e contínuos em G. axillaris. A. curassavica e G. axillaris possuem coléteres peciolares, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii, laminares e F. stellata apresenta ambos.

Os coléteres são cônicos pedunculados ou sésseis, com porção secretora formada por epiderme unisseriada em paliçada. Eles não possuem vascularização e são caducos, senescendo do ápice para a base em folhas totalmente expandidas. A posição e algumas características estruturais dos coléteres das cinco espécies investigadas são constantes e podem ser utilizadas com finalidade taxonômica.

A secreção é acumulada em um espaço extraprotoplástico antes de ser liberada para o meio externo através da parede e da cutícula, sem rompê-las, e envolve o ápice caulinar e os órgãos em desenvolvimento. As células epidérmicas secretoras dos coléteres de *G. axillaris* possuem secreção de aspecto homogêneo, que é efetiva em proteger estas regiões meristemáticas contra o dessecamento, mas permitem a proliferação de fungos; nas demais espécies, a secreção tem aspecto heterogêneo, que impede o dessecamento e a proliferação de fungos.

### **Referências bibliográficas**

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.

48

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. Phytomorphology 30:303-306.
- ARRAES, MAB 1960 Contribuição ao conhecimento de *Asclepias curassavica* L. Fortaleza, Tese de doutorado, Faculdade de Farmácia e Odontologia, Universidade do Ceará.
- BARROS, CF 1986/1988 *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae). Anatomia foliar. Rodriguésia 64/66:25-31.
- CASTRO, M de M & DEMARCO, D 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.
- ESAU, K 1977 Anatomy of seed plants. 2<sup>nd</sup> ed., New York, John Wiley & Sons.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FARINACCIO, MA 2000 Asclepiadoideae (Apocynaceae) do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. São Paulo, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- FJELL, I 1983 Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.

- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GOMES, SM 2006 Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae *s.l.* Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- JUDD, WS; CAMPBELL, CS; KELLOGG, EA; STEVENS, PF & DONOGHUE, MJ 2002 Plant systematics: a phylogenetic approach. 2<sup>nd</sup> ed., Sunderland, Sinauer Associates.
- KOCH, I & KINOSHITA, LS 1999 A família Apocynaceae na região de Bauru, SP-Brasil. Acta Botanica Brasilica 13:61-86.
- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.
- LACCHIA, APS 2006 Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de espécies de Anacardiaceae: anatomia, histoquímica e ultra-estrutura. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- LERSTEN, NR 1974 Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). American Journal of Botany 61:973-981.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.

- MORILLO, G 1995 Tres nuevas especies en las Asclepiadaceae sudamericanas. Caldasia 17:413-418.
- MURPHY, H 1986 A revision of the genus *Fischeria* (Asclepiadaceae). Systematic Botany 11:229-241.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 97:25-31.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.
- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1983 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. XX. Uma nova espécie de *Gonioanthela* Malme. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:71-74.
- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1984 Estudos em Asclepiadaceae. XX. Novos táxons em *Ditassa* R.Br. e *Oxypetalum* R.Br. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:145-148.
- PEREIRA, JF & SILVA, NMF 1974 Estudos em Asclepiadaceae. V. Uma nova espécie de *Blepharodon* Decne. Boletim do Museu Botânico Municipal 18:1-3.
- PEREIRA, JF; VALENTE, M da C ALENCASTRO, FMMR de 1971 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. V. Estudo taxonômico e anatômico de *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. Rodriguésia 26:261-281.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963a Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963b The floral anatomy of some Asclepiadaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (B) 57:15-44.
- RAPINI, A; CHASE, MW; GOYDER, DJ & GRIFFITHS, J 2003 Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). Taxon 52:33-50.

- REZENDE, MH & MORRETES, BL de 2003 Ocorrência e anatomia de estruturas secretoras em *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). I. Coléteres. Bradea 9:37-44.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom.
  cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia,
  Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.
- RIO, MCS do & KINOSHITA, LS 2005 *Prestonia* (Apocynaceae) no sul e sudeste do Brasil. Hoehnea 32:233-258.
- RIO, MCS do; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2005 Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.
- SCHWARZ, E de A & FURLAN, A 2002 Coléteres foliares de Oxypetalum R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) — aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). Acta Biológica Paranaense 31:79-97.
- SENNBLAD, B; ENDRESS, ME & BREMER, B 1998 Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. American Journal of Botany 85:1143-1158.
- SILVA, NMF; VALENTE, M da C; ALENCASTRO, FMMR de; PEREIRA, JF & SUCRE, BD 1975 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. - X. Estudos taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35:745-756.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- SIMÕES, AO; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2006 Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152:387-398.
- SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP de; MENTZ, LA & PETROVICK, PR 2004 Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5<sup>a</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- STEVENS, WD 1975 Notes on the genus *Matelea* (Apocynaceae s.l.). Phytologia 32:387-406.
- STEVENS, WD 1988 A synopsis of *Matelea* subg. *Dictyanthus* (Apocynaceae: Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 75:1533-1564.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:*2*01-203.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989c Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1991 Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Repertorium 102:23-28.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.
- VALENTE, M da C 1983 Vascularização floral em *Peplonia nitida* Decaisne (Asclepiadaceae). Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:55-62.

- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1971 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. VII Estudos taxonômico e anatômico de *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. *et* Val., comb. nov. Anais da Academia Brasileira de Ciências 43:177-189.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1973 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. IX Estudos taxonômico e anatômico de: *Oxypetalum appendiculatum* Mart., *Oxypetalum pilosum* Gardn. e *Oxypetalum sublanatum* Malme. Anais da Academia Brasileira de Ciências 45:121-149.
- WILLIAMS, RF; METCALF, RA & GUST, LW 1982 The genesis of form in oleander (*Nerium oleander* L.). Australian Journal of Botany 30:677-687.
- WOODSON, RE Jr 1935 The floral anatomy and probable affinities of the genus *Grisebachiella*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 62:471-478.
- WOODSON, RE Jr 1936 Observations on the floral fibres of certain Gentianaceae. Annals of Botany 50:759-766.
- WOODSON, RE Jr & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.

### **Capítulo 2**

## Histoquímica da secreção dos coléteres foliares de espécies de Asclepiadeae

### Introdução

Os tecidos secretores ocorrem na maioria das plantas vasculares e diferem em estrutura, posição e material secretado (Fahn 1979, 1988a,b, 2000). Eles podem ser classificados segundo as substâncias que secretam ou por sua morfologia e anatomia (Lüttge 1971); em geral, eles são classificados de acordo com as substâncias que produzem, as quais podem ter as mais diversas funções (Fahn 1979,1988b,2000).

O conceito de coléter é funcional e não está relacionado à sua estrutura. Thomas (1991) considerou-os como estruturas secretoras cuja secreção protege os meristemas em desenvolvimento. Devido a este conceito e à semelhança estrutural entre coléteres e outras estruturas secretoras, alguns autores já os descreveram como nectários extraflorais e glândulas de resina (Arekal & Ramakrishna 1980; Inamdar *et al.* 1985; Mohan & Inamdar 1986; Subramanian *et al.* 1989; Thomas 1991).

A secreção dos coléteres pode ser constituída apenas por mucilagem ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991; Castro & Demarco 2008). Os compostos já detectados no exsudato produzido pelos coléteres de espécies de Apocynaceae são carboidratos, lipídios e proteínas (Ramayya & Bahadur 1968; Arekal & Ramakrishna 1980; Mohan & Inamdar 1986; Dave *et al.* 1987; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c, 1990; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Castro & Demarco 2008; Marasca 2008). Apenas os coléteres de *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989) e *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008) foram estudados histoquimicamente para Asclepiadoideae e os coléteres foliares de *B. bicuspidatum* possuem uma maior amplitude funcional em relação aos demais coléteres descritos até o momento, protegendo os órgãos em desenvolvimento contra o dessecamento, além de imobilizarem afídeos (Demarco 2005).

Dada a escassez de informações sobre a composição da secreção dos coléteres de Apocynaceae, especialmente em Asclepiadoideae, o presente estudo tem por objetivo analisar histoquimicamente a secreção dos coléteres foliares de *Asclepias curassavica* L., *Fischeria stellata* E.Fourn., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult., evidenciando as principais classes químicas dos metabólitos que a compõem e sua função.

### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de agosto de 2005 a fevereiro de 2006. Três indivíduos de *A. curassavica* foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50'14,2"W); dois de *F. stellata* na trilha do Noelo (23°21'14,6"S/44°49'59,8"W; 23°21'14,8"S/44°50' 00,3"W); três indivíduos de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W; 23°21'26,3"S/44°51'01,8"W) e na estrada para a Casa de Farinha (23°20'53,1"S/44°51' 00,9"W); dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23°21'02,4"S/44°51' 05,4"W; 23°20'55,3"S/44°51'01,5"W) e dois de *O. banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°21'34,5"S/44°51'02,1"W; 23°21'34,4"S/44°51'04,3"W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos vegetativos foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%. Ápices vegetativos foram isolados, desidratados em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente com 10 a 14  $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo Microm HM340E.

Para a análise micromorfológica, ramos vegetativos fixados em FAA foram utilizados. Os ápices caulinares e os dois nós subseqüentes foram isolados, desidratados em série etílica, secos pelo método de ponto crítico, montados e metalizados com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada.

Os ápices fixados em FAA foram utilizados para os testes histoquímicos que evidenciam mucilagem, amido e compostos fenólicos hidrossolúveis; os fixados em FNT para os testes que evidenciam lipídios (incluindo ácidos graxos), compostos fenólicos lipossolúveis e alcalóides, e materiais fixados em SFF para confirmar os resultados dos compostos fenólicos.

Os tratamentos realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes da secreção dos coléteres foram: vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), reagente de Lugol para amido (Johansen 1940), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), reagentes de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas do material fixado em SFF foram montadas em resina sintética e as demais, em gelatina glicerinada.

Ápices caulinares foram mantidos em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) por 48 h à temperatura ambiente para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e receberam o mesmo tratamento das demais peças. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

### Resultados

Os coléteres foliares (Fig. 1-2, 5-6) possuem epiderme secretora com células retangulares dispostas em paliçada (Fig 3-4), que em *A. curassavica*, *F. stellata*, *M.* 

*denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* produzem uma secreção heterogênea composta por mucilagem e lipídios totais, e nos coléteres de *G. axillaris*, secretam exclusivamente mucilagem (Tabela 1). A mucilagem foi detectada no citoplasma das células secretoras (Fig. 7-16,19-21) e no meio extracelular recobrindo o ápice vegetativo, as folhas jovens, os coléteres (Fig. 11, 17-18) e tricomas (Fig. 14) e os lipídios, no citoplasma (Fig. 26-31) e no interior de vacúolos de diferentes tamanhos (Fig. 28). Em todas as espécies analisadas, o exsudato é acumulado num espaço extraprotoplástico (Fig. 8, 28, 31) antes de ser liberado para o meio extracelular através da parede e cutícula. A cutícula não se distende (Fig. 3-4) nem rompe durante o processo secretor.

Pequenos grãos de amido são observados em algumas células da epiderme secretora, enquanto grãos maiores ocorrem em abundância em todas as células parenquimáticas não secretoras durante todas as fases de desenvolvimento do coléter (Fig. 22). Os coléteres de *M. denticulata*, ao contrário dos das demais espécies, apresentam uma hipoderme secretora de conteúdo fenólico lipossolúvel (Fig. 23). Compostos fenólicos estão presentes nas demais espécies estudadas apenas nos coléteres em senescência e são derivados do processo de autólise celular (Fig. 24-25). A presença de compostos fenólicos e ausência de citoplasma denso é o primeiro indício da senescência do coléter (Fig. 24); logo após a observação dos fenóis, os tecidos necrosam (Fig. 6, 25).

Não foi observada proliferação de fungos nos ramos vegetativos de *A. curassavica, F. stellata, O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 1-3) e *M. denticulata*, enquanto os ápices de *G. axillaris* são cobertos por grande quantidade de hifas, especialmente sobre os coléteres e em meio à sua secreção (Fig. 5).

58

**Tabela 1.** Resultados da aplicação dos testes histoquímicos em coléteres foliares em fase secretora de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**Fs**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**; **ep** = epiderme; **hp** = hipoderme) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**; **+** = presente; **-** = ausente).

Tratamento histoquímico	Substância a ser detectada	Coléteres (Figuras)					
		Ac	Fs	Ga	Md		Oh
					ер	hp	00
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+ (7-8)	+ (9)	+ (10-11)	+ (12)	-	+
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	+ (13)	+	-	+ (14)	-	+
reação PAS	polissacarídeos totais	+ (15)	+ (16)	+ (17-18)	+ (19-20)	-	+ (21)
reagente de Lugol	amido	+	+	+ (22)	+	-	+
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	-	-	-	-	+	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	-	-	-	-	+ (23)	-
preto de Sudão B	lipídios totais	+ (26)	+	-	+ (27-28)	+ (27-28)	+
Sudão IV	lipídios totais	+	+	-	+ (29)	-	+
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	+ (30-31)	+	-	+	+	+
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-	-	-	-	-
reagente de Dragendorff	alcalóides	-	-	-	-	-	-
reagente de Wagner	alcalóides	-	-	-	-	-	-

# ILUSTRAÇÕES

Figuras 1-6. Eletromicrografias de varredura dos coléteres foliares de *Fischeria stellata* E.Fourn. (1), *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (2), *Asclepias curassavica* L. (3-4) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (5-6). 1,5-6. Coléteres interpeciolares (seta). 2. Coléteres laminares. 3-4. Coléteres peciolares seccionados transversalmente. 5. Coléteres em fase secretora recobertos por hifas de fungos. 6. Coléteres senescentes.



**Figuras 7-12.** Coléteres foliares tratados com vermelho de rutênio. Secções longitudinais. **7-8.** *Asclepias curassavica* L. (**cabeça de seta** = espaço extraprotoplástico). **9.** *Fischeria stellata* E.Fourn. **10-11.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **11.** Notar a presença de secreção no meio extracelular. **12.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **Barras: 7,9,12.** 75 μm; **8,11.** 30 μm; **10.** 50 μm.


**Figuras 13-18.** Testes histoquímicos realizados em coléteres foliares de *Asclepias curassavica* L. (**13,15**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**14**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**16**) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**17-18**). **13-18.** Secções longitudinais. **13-14.** Ácido tânico e cloreto férrico. **15-18.** Reação PAS. **14,17-18.** Notar secreção no meio extracelular. **Barras: 13-16.** 75 μm; **17.** 50 μm; **18.** 15 μm.



**Figuras 19-25.** Testes histoquímicos realizados em coléteres foliares de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**19-20,23**), *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**21**) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**22,24-25**). **19-20,23.** Secções longitudinais. **21-22,24-25.** Secções transversais. **19-21.** Reação PAS. **22.** Reagente de Lugol. **23.** Sulfato ferroso em formalina. **24-25.** Cloreto férrico; secções em diferentes níveis de um coléter em senescência. **Barras: 19,21,23,25.** 75 μm; **20,22,24.** 30 μm.



**Figuras 26-31.** Testes histoquímicos realizados em coléteres foliares de *Asclepias curassavica* L. (**26,30-31**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**27-29**). **26-31.** Secções longitudinais. Lipídios evidenciados no interior das células epidérmicas em paliçada; notar cutícula fina. **26-28.** Preto de Sudão B. **29.** Sudão IV. **30-31.** Sulfato azul do Nilo (**cabeça de seta** = espaço extraprotoplástico). **Barras: 26-27,30.** 75 μm; **28,31.** 30 μm; **29.** 150 μm.



#### Discussão

Coléteres são glândulas cuja secreção envolve e protege os órgãos em desenvolvimento (Thomas 1991). Eles têm sido tradicionalmente descritos como estruturas que produzem uma secreção viscosa, composta por mucilagem, resina (Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990; Castro & Demarco 2008). No presente estudo, os coléteres estão sendo considerados glândulas presentes no ápice dos ramos que secretam predominantemente mucilagem, que envolve o ápice e os órgãos em desenvolvimento protegendo-os contra o dessecamento e/ou fungos e fitófagos.

Os coléteres de *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* produzem uma secreção composta por mucilagem e lipídios totais, enquanto os de *G. axillaris* secretam exclusivamente mucilagem. Este exsudato é acumulado num espaço extraprotoplástico, formado pela retração do protoplasto, antes de ser liberado para o exterior através da parede e da cutícula, sem rompê-las.

A mucilagem ácida detectada pelo vermelho de rutênio e reação PAS nos coléteres de *G. axillaris* aparentemente não possui amina em sua estrutura, já que não apresentou resultado positivo para ácido tânico e cloreto férrico, ao contrário da mucilagem detectada nos coléteres das demais espécies. Segundo Pizzolato e Lillie (1973), o ácido tânico tem mecanismo de ligação complexo e múltiplo, incluindo forças de van der Waal, adsorção e ligação à hidroxila, amina e carboxila.

Mucilagem também foi detectada em coléteres foliares de *Allamanda cathartica* L., *Blepharodon bicuspidatum, Forsteronia, Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*), *Plumeria rubra* L., *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson, *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. e *Roupelia grata* Wall. (Mohan & Inamdar 1986; Thomas & Dave 1989a;Thomas *et al.* 1989; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Marasca 2008). Alguns açúcares foram identificados através de cromatografia e variam nos diferentes gêneros: ramnose ocorre na secreção dos coléteres de *Aganosma caryophyllata* G.Don. (Dave *et al.* 1987), *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989) e *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1990), glicose e ramnose em *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), além de arabinose em *Nerium indicum* Mill. (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1989c).

Grãos de amido ocorrem nas células epidérmicas dos coléteres das espécies estudadas, mas são mais abundantes nas células parenquimáticas. Amido já foi detectado no interior das células secretoras em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana;* Appezzato-de-Glória & Estelita 2000) e nas células parenquimáticas em *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989b). Proteína foi registrada na secreção dos coléteres em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Allamanda cathartica, Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989b). Proteína foi registrada na secreção dos coléteres em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Allamanda cathartica, Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989a,b) e *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989). Os coléteres de *M. denticulata* diferenciam-se dos demais por apresentarem uma hipoderme com conteúdo fenólico lipossolúvel. Esta hipoderme confere uma aparência enegrecida aos coléteres desta espécie (capítulo 1). Idioblastos taníferos foram registrados no eixo central de coléteres de *Aganosma caryophyllata, Carissa congesta* Wt.Ieon., *Himatanthus lancifolius* (Muell.Arg.) Woodson, *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*; Barros 1986/88; Subramanian *et al.* 1989; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

A presença de compostos lipofílicos na secreção das células epidérmicas dos coléteres de *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* também foi verificada em espécies de *Allamanda, Alstonia, Blepharodon, Calotropis, Mandevilla* e *Plumeria* (Mohan & Inamdar 1986; Kuriachen & Dave 1989; Thomas & Dave 1989a,b; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Demarco 2005). Os lipídios foram observados no citoplasma e no interior dos vacúolos de diferentes tamanhos registrados na análise estrutural (capítulo 1). Não foi possível identificar a classe química destes lipídios através dos testes histoquímicos realizados no presente estudo; o resultado do teste para ácidos graxos foi negativo, assim como para compostos fenólicos, e a sua constituição pode ser terpênica. Em *B. bicuspidatum*, os lipídios encontrados nos coléteres foliares foram identificados como compostos fenólicos (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008). Secreção composta exclusivamente por resina anteriormente descrita para nove espécies de Apocynaceae (Subramanian *et al.* 1989) não foi confirmada para *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987), *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Nerium oleander* L. (Thomas & Dave 1989c) e os resultados obtidos em *Plumeria rubra* (Mohan &

Inamdar 1986) foram distintos dos obtidos em *Plumeria alba* Linn. (Subramanian *et al.* 1989).

A produção de compostos lipofílicos por coléteres de órgãos vegetativos varia em diferentes espécies. Nas quatro espécies estudadas, eles são continuamente produzidos do estádio inicial ao final, assim como registrado para *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986) e *B. bicuspidatum* (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008); entretanto, em *Allamanda cathartica*, a secreção da fração lipofílica é máxima em coléteres jovens e cessa nos adultos (Thomas & Dave 1989a) e em *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*), eles são exsudados em uma segunda fase de secreção, quando os coléteres param de produzir mucilagem (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Esta segunda fase de secreção também foi observada em *Forsteronia glabrescens* Müll.Arg., onde as células passam a acumular compostos fenólicos (Rio 2006). Ao contrário desta espécie, os coléteres de *B. bicuspidatum* secretam compostos fenólicos juntamente com a mucilagem durante toda a fase secretora (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008).

Como a secreção é observada no meio externo, infere-se que ela é liberada através da parede e da cutícula sem danificá-las. Em *Allamanda neriifolia* Hook. (hoje *A. shottii* Pohl), *Thevetia peruviana* (Pers.) K.Schum. (Fjell 1983) e *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), o local de acúmulo da secreção foi descrito como subcuticular e o modo de liberação da secreção, como ruptura de cutícula (Thomas & Dave 1989b,c; Fahn 1990); entretanto, espaço extraprotoplástico e liberação do exsudato através da parede e da cutícula sem rompê-las também têm sido observados em outras espécies de Apocynaceae (Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Rio 2006; Simões *et al.* 2006; Marasca 2008).

Após o término da fase secretora dos coléteres, as células passam a apresentar glóbulos de compostos fenólicos derivados do processo de senescência, assim como registrado por Castro e Demarco (2008). Glóbulos fortemente corados foram observados em coléteres senescentes de *Aganosma caryophyllata, Allamanda cathartica, Nerium indicum* (hoje *N. oleander*) e *Roupelia grata* (Dave *et al.* 1987; Thomas & Dave 1989b,c; Thomas *et al.* 1989), além de corpos lipídicos em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986). O processo de lignificação dos coléteres durante sua senescência registrado em diversas espécies de Apocynaceae (Fjell 1983; Thomas & Dave 1989a,b,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991) não foi observado nas cinco espécies investigadas.

A secreção dos coléteres permeia e envolve o ápice dos ramos e os órgãos em desenvolvimento. Sua função é de proteger essas regiões meristemáticas (Thomas 1991). Esta proteção pode ser contra o dessecamento, devido à capacidade de retenção de água da mucilagem (Fahn 1979; Simões *et al.* 2004), contra a proliferação de fungos e até contra fitófagos, imobilizando-os (Demarco 2005). A distinta composição da secreção das espécies analisadas confere diferentes funções aos respectivos coléteres.

O exsudato de *G. axillaris* é exclusivamente mucilaginoso e, portanto, sua função é apenas de evitar o dessecamento dos órgãos. Por outro lado, a secreção heterogênea dos coléteres de *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* é eficiente na proteção contra o dessecamento e contra a proliferação de fungos. A ausência de fungos nos ápices caulinares e em todas as regiões onde os coléteres estão em atividade secretora demonstra que os responsáveis pela inibição do seu crescimento são os lipídios detectados na secreção dos coléteres destas quatro espécies e que estão ausentes na secreção dos coléteres de *G. axillaris*. Esta função é corroborada pela presença constante de fungos junto aos coléteres desta espécie, em meio à sua secreção e em todo o ápice caulinar. Nos coléteres de *B. bicuspidatum*, a fração da secreção responsável por evitar a proliferação destes organismos também é lipofílica (Demarco 2005).

# Conclusões

Os coléteres foliares das espécies de Asclepiadeae estudadas produzem secreções de diferente composição. Os de *G. axillaris* secretam exclusivamente mucilagem, enquanto os de *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* secretam mucilagem e lipídios totais. Em todas as espécies, o exsudato é acumulado num espaço extraprotoplástico antes de ser liberado para o exterior através da parede e da cutícula, sem rompê-las.

A secreção dos coléteres permeia e envolve o ápice dos ramos e os órgãos em desenvolvimento e tem como principal função proteger essas regiões meristemáticas. Sua função básica é proteger contra o dessecamento, devido à capacidade de retenção de água da mucilagem, mas também pode evitar a proliferação de fungos. A secreção dos coléteres de *G. axillaris* é eficiente em evitar o dessecamento dos órgãos, mas propicia a proliferação de fungos, que estão presentes junto aos coléteres, em meio à sua secreção e

em todo o ápice caulinar. A secreção heterogênea dos coléteres de *A. curassavica*, *F. stellata*, *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* protege as regiões meristemáticas contra o dessecamento e inibe o crescimento de fungos, provavelmente devido à presença dos lipídios.

## Referências bibliográficas

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. Phytomorphology 30:303-306.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CASTRO, M de M & DEMARCO, D 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ESAU, K 1977 Anatomy of seed plants. 2<sup>nd</sup> ed., New York, John Wiley & Sons.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- FAHN, A 1988a Secretory tissues and factors influencing their development. Phyton (Annales Rei Botanicae) 28:13-26.
- FAHN, A 1988b Secretory tissues in vascular plants. New Phytologist 108:229-257.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FAHN, A 2000 Structure and function of secretory cells. Advances in Botanical Research 31:37-75.

- FJELL, I 1983 Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- INAMDAR, JA; MOHAN, JSS & SUBRAMANIAN, RB 1985 Extrafloral nectaries of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall *ex* G. Don. Development, ultrastructure and secretion. Trends in Plant Research. 137-148.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- LÜTTGE, U 1971 Structure and function of plant glands. Annual Review of Plant Physiology 22:23-44.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- PIZZOLATO, TD & LILLIE, RD 1973 Mayer's tannic acid- ferric cholride stain for mucins. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21: 56-64.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom.
  cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia,
  Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.
- SIMÕES, AO; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2006 Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152:387-398.
- SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP de; MENTZ, LA & PETROVICK, PR 2004 Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5<sup>a</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.

- SVENDSEN, AB & VERPOORTE, R 1983 Chromatography of alkaloids. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:*2*01-203.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989c Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). Phyton (Annales Rei Botanicae) 30:209-212.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.

# Capítulo 3

# Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas<sup>1</sup>

# Introdução

Os laticíferos ocorrem em todos os representantes de Apocynaceae e foram considerados não articulados nas obras de revisão (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Metcalfe 1967). Esta classificação foi criada por De Bary (1884) e este tipo de laticífero é descrito como uma única célula de crescimento autônomo intrusivo ilimitado através dos espaços intercelulares nos diversos tecidos (Mahlberg 1993). Entretanto, incongruências quanto à identificação de seu tipo e sua formação podem ser encontradas na literatura, como em *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e *Nerium oleander* L. (Blaser 1945; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Mahlberg 1961, 1963); além disso, laticíferos articulados têm sido registrados para outras espécies da família (Wilson & Maxam 1987; Sacchetti *et al.* 1999; Demarco *et al.* 2006).

O látex é o próprio protoplasto do laticífero (Demarco *et al.* 2006) e possui pequenas partículas em suspensão (Fahn 1979) compostas predominantemente por lipídios, especialmente terpenos (van Die 1955; Giordani 1996). O látex protege as plantas contra herbivoria e microorganismos, além de selar ferimentos (Farrell *et al.* 1991; Pickard 2008) e as linhagens de plantas latescentes têm maior diversidade que seus grupos irmãos não latescentes em diversos habitat (Farrell *et al.* 1991).

As características morfológicas e químicas dos laticíferos podem ser utilizadas como caráter taxonômico devido à provável origem polifilética dos articulados e não articulados (Mahlberg 1993). A presença de laticíferos articulados em quatro das cinco subfamílias de Apocynaceae corrobora a sua atual circunscrição (Demarco *et al.* 2006) e, em alguns casos, a composição da fração particulada do látex também pode servir como uma indicação das relações sistemáticas de espécies que são difíceis de distinguir morfologicamente, como ocorre em *Plumeria* (van Die 1955).

<sup>1.</sup> Artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Botânica (anexo II).

Os laticíferos estão presentes em todos os órgãos vegetativos de todas as espécies de Apocynaceae (Metcalfe & Chalk 1950) e embora muitos sejam os trabalhos sobre esta estrutura, as divergências encontradas na literatura ressaltam a importância do estudo de sua ontogênese para a identificação do seu tipo (Demarco *et al.* 2006).

Laticíferos foram citados para espécies de *Fischeria*, *Gonioanthela*, *Matelea* e *Oxypetalum* (Pereira *et al.* 1971; Silva *et al.* 1975; Murphy 1986; Valente 1996), mas nunca pesquisados anatomicamente. Os laticíferos de *Asclepias curassavica* já foram muito estudados com relação à sua estrutura, distribuição e composição do látex (Groom 1889; Arraes 1960; Giordani 1996), enquanto que apenas a distribuição dos de *Oxypetalum banksii* Roem. & Schult. foi investigada.

O objetivo do presente trabalho é descrever a ontogênese e o tipo dos laticíferos foliares e caulinares, analisar sua estrutura e distribuição em órgãos vegetativos aéreos de *Fischeria stellata* E.Fourn., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. e reavaliar a ontogênese e o tipo de laticífero de *Asclepias curassavica* L. Através de análise comparativa, pretende-se verificar a ocorrência de padrões estruturais comuns às espécies de Asclepiadeae de floresta de restinga, floresta ombrófila densa de terras baixas e cerrado (*s.l.*) do estado de São Paulo.

### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba no município de Ubatuba (SP): praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas nos meses de março, agosto, outubro, novembro e dezembro de 2005 e fevereiro de 2006. Cinco indivíduos de *A. curassavica* foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50' 14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50'14,2"W) e na praia da Fazenda (23°21'33,7"S/44°51'0,37"W); quatro de *F. stellata* na trilha do Noelo (23°21'14,6"S/44° 49'59,8"W; 23°21'14,8"S/44°50'00,3"W; 23°21'14,0"S/44°50'00,5"W; 23°21'13,8"S/44°50' 00,1"W); cinco de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°51'03,6"W) e na estrada para a Casa de Farinha (23°20'53,1"S/44°51'00,9"W); quatro de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23°21'26,4"S/44°51'02,4"S/44°51'05,4"W; 23°20'55,3"S/44°51'

01,5"W; 23°21'02,4"S/44°51'05,4"W) e três de *O. banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°20'24,0"S/44°50'14,7"W; 23°21'34,5"S/44°51'02,1"W; 23°21'34,4"S/44°51' 04,3"W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos vegetativos de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* foram coletados, fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940) e em FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Ápices vegetativos e entrenós em estrutura secundária foram isolados, desidratados em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. Secções, com 10 a 18 μm de espessura, foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100 e as escalas das figuras, através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações. As mensurações dos laticíferos foram realizadas a partir das fotomicrografias e desenhos em câmara clara com a utilização de paquímetro digital.

#### Resultados

Os laticíferos presentes nos órgãos vegetativos de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* distinguem-se dos demais tecidos, devido ao seu calibre, conteúdo, espessura das paredes e ramificações do sistema (Fig. 1-36). As cinco espécies possuem laticíferos primários, no caule e na folha (Fig. 1-32), e laticíferos secundários no tecido vascular caulinar (Fig. 33-36).

#### Ontogênese e estrutura

O laticífero diferencia-se precocemente na ontogênese dos órgãos e, enquanto a maioria dos tecidos ainda é meristemática ou está em processo de diferenciação, ele já se encontra diferenciado (Fig. 1-17).

Os laticíferos das cinco espécies são articulados anastomosados. Eles são formados pela adição de células, cujas paredes transversais ou oblíquas podem ser observadas em suas porções apicais (Fig. 2-4, 6-7, 9-10, 12-13, 15-17); pouco abaixo dos ápices dos

laticíferos, estas paredes são dissolvidas e as células unem-se sem deixar vestígios de seus limites (Fig. 4, 10, 15-17,19, 21-22, 26, 34-35).

A primeira característica que permite distinguir a célula apical de um laticífero das meristemáticas adjacentes é a sua parede. Logo no início de sua diferenciação, a parede desta célula torna-se mais espessa que a parede das demais células (Fig. 6-7, 9-10, 12, 15-17, 19).

Os sistemas laticíferos primários originam-se no início do desenvolvimento dos órgãos e já podem ser distinguidos às margens do promeristema (Fig. 1, 5, 8, 11, 14). Eles são derivados de células do meristema fundamental e/ou procâmbio (Fig. 1-17). Os secundários (Fig. 33-36) são provenientes das iniciais fusiformes e/ou radiais do câmbio. Os laticíferos só crescem em comprimento em regiões meristemáticas por adição de novas células e alongamento celular. A anastomose lateral gera um sistema ramificado (Fig. 4, 17); estas ramificações ocorrem no início do desenvolvimento dos laticíferos e são observadas principalmente nas regiões nodais, no córtex caulinar e na lâmina foliar (Fig. 1, 4-5, 8, 11, 14, 17-18, 21, 34). Alguns laticíferos possuem forma de "H" (Fig. 18; \*), evidenciando a existência de anastomose entre dois laticíferos próximos (Fig. 17).

O diâmetro dos laticíferos varia de 3 a 30  $\mu$ m dependendo da porção analisada e do tecido em que estão presentes. Os mais calibrosos são observados na medula e no floema (Fig. 27-33).

Há continuidade entre o sistema laticífero caulinar e foliar e, embora a maioria dos laticíferos medulares do caule seja contínua com os do primórdio foliar através da lacuna foliar, muitos podem ser observados atravessando o procâmbio (Fig. 1, 4) e a faixa cambial (Fig. 34) através da anastomose das respectivas células meristemáticas.

Após a anastomose das paredes de contato, os protoplastos das células unem-se formando um único protoplasto em toda a extensão do laticífero (Fig. 21-22, 26, 34).

As células que compõem o laticífero iniciam sua atividade secretora logo após a diferenciação de suas paredes e alguns laticíferos podem ser encontrados com secreção desde sua porção apical. A secreção ocupa todo lume celular (Fig. 20-22, 26-27, 30-34) e, aparentemente, as diversas vesículas de secreção (Fig. 19-20, 22, 25) fundem-se ao vacúolo central, liberando o conteúdo em seu interior; com o aumento de volume do vacúolo central, os núcleos e o citoplasma ficam restritos a uma fina camada parietal.

Durante o desenvolvimento do laticífero, há lise de parte de seu citoplasma e ocorre degeneração de diversos núcleos, os quais apresentam intensa coloração; poucos estão presentes nos laticíferos maduros (Fig. 24-26). Os núcleos de cada laticífero são provenientes de diferentes células e nenhum indício de fusão ou divisão nuclear foi observado. Eles possuem cromatina pouco corada e um a dois nucléolos evidentes (Fig. 23-24, 26); inicialmente são esféricos (Fig. 23) e, com a pressão exercida pela ampliação do vacúolo, tornam-se alongados e fusiformes (Fig. 24). Diversos núcleos são deslocados pelo extravasamento do látex durante a coleta e são observados em grande quantidade próximos à região de secção do material (Fig. 26).

Os laticíferos permanecem vivos e com a secreção em seu interior (Fig. 18-36). O látex é o próprio protoplasto do laticífero e apresenta aspecto leitoso e cor branca nas cinco espécies. Durante as coletas dos espécimens, notou-se que o látex é imediatamente liberado e que, em pouco tempo, coagula e sela o órgão injuriado. Não foram observados sinais de predação nos indivíduos das espécies estudadas.

#### <u>Distribuição</u>

Os laticíferos estão presentes permeando os tecidos fundamental e vascular do caule e da folha (Fig. 1-36) e formam um sistema ramificado (Fig. 1, 5, 8, 11, 14, 21, 34) que interconecta grande parte dos laticíferos nestes órgãos da planta adulta.

Os laticíferos primários ocorrem em maior concentração junto ao floema (Fig. 27-30, 32-33) e nas regiões nodais, devido ao grande número de ramificações neste local (Fig. 1, 5, 8, 11, 14). Seu trajeto pode ser sinuoso ou retilíneo; normalmente, os laticíferos vasculares e medulares são retilíneos e raramente ramificados na região do entrenó (Fig. 1, 4, 11, 14, 22).

Os laticíferos secundários são facilmente observados tanto no floema quanto no xilema secundários (Fig. 33-36). Eles ocorrem principalmente no sistema axial (Fig. 33-35), mas são também comuns no sistema radial de *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 36). As cinco espécies possuem laticíferos secundários no floema e xilema, exceto *A. curassavica* que não os possui no xilema secundário.

# ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-7.** Ontogênese dos laticíferos articulados anastomosados de *Asclepias curassavica* L. (**1-4**) e *Fischeria stellata* E.Fourn. (**5-7**). **1,5.** Vista geral do ápice vegetativo. **2,4,7.** Primórdios foliares. **3,6.** Primórdio caulinar. **4.** Ramo transestelar formado por anastomose lateral. **seta larga** = laticífero; **seta estreita** = parede transversal/oblíqua. **Barras: 1.** 75 µm; **2-3,6-7.** 15 µm; **4.** 30 µm; **5.** 150 µm.



**Figuras 8-13.** Ontogênese dos laticíferos articulados anastomosados de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & F.A. Schwarz (**8-10**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & F.A. Schwarz (**11-13**). **8,11.** Vista geral do ápice vegetativo. **9.** Primórdio foliar. **10,13.** Caule jovem. **12.** Primórdios caulinares. **seta larga** = laticífero; **seta estreita** = parede transversal/oblíqua. **Barras: 8,11.** 75 μm; **9-10,12-13.** 15 μm.



**Figuras 14-18.** Ontogênese e estrutura dos laticíferos articulados anastomosados. **14-16.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **17-18.** *Asclepias curassavica* L. **14.** Vista geral do ápice vegetativo com laticíferos (**seta larga**). **15-16.** Formação dos laticíferos na região nodal. **17.** Anastomose entre laticíferos no primórdio foliar (**seta**). **18.** Córtex caulinar. Notar laticífero em forma de "H" (\*). **seta estreita** = parede transversal/oblíqua. **Barras: 14.** 75 μm; **15-17.** 15 μm; **18.** 150 μm.



**Figuras 19-26.** Estrutura dos laticíferos articulados anastomosados de *Asclepias curassavica* L. (**19**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**20-21,25**) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & F.A. Schwarz (**22-24,26**). **19-20.** Vesículas no látex. **21-22,24-26.** Laticíferos maduros. **23.** Laticífero jovem com núcleos esféricos. **24.** Núcleo alongado e fusiforme. **25.** Núcleo em degeneração. **26.** Núcleos próximos à região de secção do material coletado. **Barras: 19.** 30 μm; **20-26.** 15 μm.



**Figuras 27-32.** Distribuição dos laticíferos articulados anastomosados primários em *Fischeria stellata* E.Fourn. (**27,30-31**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & F.A. Schwarz (**28**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & F.A. Schwarz (**29**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**32**). **27-28.** Folha. **29-32.** Caule. **32.** Laticíferos junto aos cordões medulares de floema. **seta** = laticífero. **Barras: 27,30.** 50 μm; **28-29,31- 32.** 75 μm.



**Figuras 33-36.** Distribuição dos laticíferos articulados anastomosados secundários no caule de *Asclepias curassavica* L. (**33**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**34**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & F.A. Schwarz (**35**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**36**). **33.** Laticíferos apenas no floema. **34.** Laticífero no floema e xilema, atravessando a faixa cambial. **35-36.** Laticíferos no xilema secundário. **seta** = laticífero. **Barras: 33,35-36.** 75 μm; **34.** 150 μm.



#### Discussão

Diferentes classificações e terminologias foram sugeridas ao longo do estudo dos laticíferos (De Bary 1884; Chauveaud 1891; Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Metcalfe 1967; Milanez 1978; Fahn 1979; Mahlberg 1993), mas a classificação mais aceita é a de De Bary (1884), que propôs dois tipos de laticíferos: os articulados e os não articulados. Esta classificação é baseada na sua ontogênese e alguns autores discordaram quanto à maneira de crescimento dos laticíferos não articulados.

Os laticíferos de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* são articulados, mas, de modo geral, os laticíferos da grande maioria das espécies de Apocynaceae, Euphorbiaceae e Moraceae são considerados não articulados, que se alongam por crescimento apical intrusivo através dos espaços intercelulares nos diversos tecidos da planta (Chauveaud 1891; Metcalfe 1967; Mahlberg 1993). Entretanto, Milanez (1978) relatou a origem destes mesmos laticíferos por fusão rápida e completa de células. Embora Milanez tenha identificado estes laticíferos como contínuos, eles deveriam ser classificados como articulados anastomosados com base em sua ontogênese, pois as paredes transversais dissolvem-se rapidamente sem deixar vestígios, à semelhança do que ocorre em *Aspidosperma australe* Müll. Arg. e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. (Demarco *et al.* 2006).

Os laticíferos das cinco espécies estudadas não têm crescimento intrusivo e o ápice agudo, observado muitas vezes, é resultado de uma secção oblíqua à célula apical. Wilson e Mahlberg (1977) investigaram a diferenciação de laticíferos em embrióides e ápices caulinares induzidos em cultura de tecidos de *Asclepias syriaca* L., mas formação de laticíferos foi encontrada apenas nos meristemas caulinares da superfície do calo em meio aos meristemas primários. Dhir *et al.* (1984) registraram a diferenciação de laticíferos em calos de 40 dias obtidos de ramos jovens de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.; embora tenham considerado os laticíferos como células laticíferas (não articulados) ramificadas, observaram dissolução de paredes terminais em culturas com seis semanas.

Laticíferos atravessando o procâmbio e a faixa cambial, sem causar qualquer deformidade nestas células intimamente relacionadas, são comuns e ocorrem nas espécies analisadas. Ramos transestelares também foram registrados em *Cryptostegia grandiflora* (Blaser 1945; Milanez 1960/1961, 1966), *Nerium oleander* (Mahlberg 1963) e *Blepharodon* 

*bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006). Segundo Blaser (1945), os laticíferos não atravessaram o câmbio, mas foram envolvidos por este; entretanto, não soube explicar como o crescimento secundário não rompeu estes laticíferos. Por outro lado, no presente estudo, este fato é facilmente explicado pela observação de anastomose do laticífero com células derivadas do procâmbio ou câmbio, assim como mencionado para *C. grandiflora* (Milanez 1960/1961, 1966) e *B. bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006).

Embora a grande maioria dos laticíferos das espécies de Apocynaceae seja descrita como do tipo não articulado (Groom 1889; Chauveaud 1891; Solereder 1908; Mahlberg 1959, 1963, 1993; Arraes 1960; Metcalfe 1967; Wilson et al. 1976; Wilson & Mahlberg 1977; Giordani 1996; Allen & Nessler 1984; Dhir et al. 1984; Murugan & Inamdar 1987; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Serpe et al. 2001), a análise das terminações dos laticíferos de A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata e O. banksii subsp. *banksii* evidenciou que eles são articulados anastomosados, cujas paredes transversais ou oblíguas das células que o constituem dissolvem-se rapida e integralmente; não sendo encontradas, logo abaixo de seu ápice. Estes registros discordam da interpretação geral dos laticíferos atribuída à família (Chauveaud 1891; Solereder 1908; Metcalfe 1967; Mahlberg 1993), incluindo os gêneros Asclepias e Oxypetalum (Chauveaud 1891; Solereder 1908; Wilson et al. 1976; Wilson & Mahlberg 1977; Serpe et al. 2001). Divergência semelhante ocorre em relação aos laticíferos articulados de Asclepias curassavica, Aspidosperma australe, Cryptostegia grandiflora, Nerium oleander L., Stapelia bella A. Berger e Vinca sardoa (Stearn) Pign. (Groom 1889; Blaser 1945; Arraes 1960; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Mahlberg 1961, 1963; Wilson & Maxam 1987; Giordani 1996; Sacchetti et al. 1999; Demarco et al. 2006). A rápida dissolução das paredes transversais ou oblíguas observada nos laticíferos das espécies analisadas dificulta a sua identificação e pode explicar a ocorrência de imprecisões na sua descrição em espécies de Apocynaceae. A presença de laticíferos articulados em espécies desta família pode ser mais comum do que se tem descrito na literatura; recomenda-se evitar o uso de órgãos adultos para a sua tipificação.

Nas cinco espécies estudadas, os laticíferos são constantemente formados, não havendo um número pré-determinado de células iniciais laticíferas, como proposto inicialmente para *Nerium oleander* (Mahlberg 1961) e, posteriormente, refutado por

Milanez (1977). As anastomoses ocorrem nas regiões meristemáticas próximo aos seus ápices e os laticíferos ramificam-se por fusão lateral de outras células do meristema fundamental, procâmbio ou câmbio. A constante adição de novas células e conseqüente alongamento faz com que os laticíferos cresçam em comprimento. Fusões laterais geram ramificações, formando um sistema que interconecta a maior parte dos laticíferos da planta adulta. Laticíferos são continuamente produzidos no ápice caulinar de *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. (Murugan & Inamdar 1987), nos tecidos primário e secundário de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. pohliana* (Stadelm.) A. H. Gentry (sob *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), no sistema axial do floema secundário e radial do floema e xilema secundários de *Cryptostegia grandiflora* (Milanez 1966) e no caule e na folha de *Aspidosperma australe* e *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006).

As ramificações do sistema laticífero ocorrem em maior quantidade nas regiões nodais, no córtex caulinar e na lâmina foliar. O diâmetro dos laticíferos pode variar bastante em um mesmo órgão; os mais calibrosos são sempre os floemáticos e medulares.

As paredes dos laticíferos são exclusivamente primárias, mas sua espessura permite distinguir os laticíferos das demais células adjacentes desde sua porção apical em meio aos meristemas primários. Segundo Fahn (1979), elas podem ser tão finas quanto as paredes das células parenquimáticas ou mais espessas, são muito hidratadas e contêm uma grande proporção de substâncias pécticas e hemiceluloses. As paredes dos laticíferos têm composição diferente das paredes das demais células, que também pode variar ao longo de seu desenvolvimento (Serpe et al. 2001; Demarco et al. 2006). Algumas enzimas relacionadas com a degradação da parede celular já foram identificadas no látex. Em Asclepias syriaca, pectinase foi associada ao afrouxamento da parede celular, aumentando a sua plasticidade, e degradação das substâncias pécticas da lamela média, facilitando o crescimento intrusivo do laticífero entre as outras células (Wilson et al. 1976). Em Nerium oleander, atividade pectinase foi localizada no vacúolo e em menor quantidade nas paredes do laticífero e das células adjacentes e na lamela média, sendo associada ao crescimento intrusivo dos laticíferos (Allen & Nessler 1984). Entretanto, esta atividade enzimática pode estar relacionada à degradação das paredes transversais dos laticíferos articulados, como ocorre em Papaver somniferum L. (Nessler & Mahlberg 1981), e a maior
presença da enzima no vacúolo provavelmente se deva ao produto da reação de lise parcial da parede que é translocado para o vacúolo por vesículas formadas a partir da membrana plasmática (Giordani 1980).

O látex é observado desde a porção mais jovem do laticífero, sendo considerado o seu protoplasto (Demarco *et al.* 2006). Vesículas com secreção ocorrem em todos os laticíferos jovens e aparentemente fundem-se ao vacúolo central, transferindo o conteúdo para o seu interior e fazendo com que este aumente em volume, restringindo os núcleos e o citoplasma a uma fina camada parietal.

Os laticíferos presentes nas cinco espécies estudadas são multinucleados, assim como nas demais espécies de Apocynaceae (Mahlberg 1959, 1993; Milanez 1960/1961, 1977; Demarco *et al.* 2006). Eles foram considerados estruturas cenocíticas por Mahlberg (1959, 1993), mas poucos pesquisadores detectaram a ocorrência de divisão nuclear (Mahlberg 1993). O protoplasto multinucleado das Asclepiadeae analisadas é resultante da fusão de células que são constantemente adicionadas ao sistema laticífero. Os núcleos inicialmente são esféricos e, com o aumento de volume do vacúolo, são comprimidos e tornam-se alongados e fusiformes. Parte dos núcleos degenera durante o desenvolvimento dos laticíferos e poucos são encontrados nos laticíferos maduros. Núcleos alongados e fusiformes foram registrados também em *C. grandiflora* e *N. oleander* (Mahlberg 1959; Milanez 1960/1961). Mahlberg (1959) sugeriu a cariocinese como um dos processos que permite o crescimento dos laticíferos, como uma estrutura cenocítica; entretanto, só observou divisões nucleares na região meristemática do ápice caulinar, não havendo qualquer divisão nos ápices dos ramos dos laticíferos nem em tecidos em maturação ou maduros.

Os laticíferos primários são encontrados em todas as regiões dos tecidos fundamental e vascular do caule e da folha das espécies estudadas, assim como nos demais membros da família (Groom 1889; Solereder 1908; Blaser 1945; Metcalfe & Chalk 1950; Arraes 1960; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Mahlberg 1963; Pereira *et al.* 1971; Silva *et al.* 1975; Murugan & Inamdar 1987; Valente 1996; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Demarco *et al.* 2006). A única exceção é *Aspidosperma australe*, que não possui laticíferos medulares (Demarco *et al.* 2006). Os laticíferos também estão presentes no tecido vascular secundário das cinco espécies analisadas, estando ausentes

apenas no xilema secundário de *A. curassavica*. Eles ocorrem nos sistemas axial e radial, mas são mais comuns no axial de *A. curassavica*, *F. stellata*, *G. axillaris* e *M. denticulata*, e no radial de *O. banksii* subsp. *banksii*. Laticíferos já foram registrados em tecidos vasculares secundários de *Mandevilla illustris*, *M. velutina* (hoje *M. pohliana*) e *Matelea maritima* subsp. g*anglinosa* (Vell.) Font. (Valente 1996; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997) e especialmente nos raios secundários de diversos gêneros de Apocynaceae (Solereder 1908; Blaser 1945; Metcalfe & Chalk 1950; Milanez 1966).

A ontogênese e o tipo de laticífero encontrados nas espécies estudadas de Asclepiadeae são semelhantes e não variam com o tipo de vegetação. As cinco espécies de floresta de restinga e floresta ombrófila densa de terras baixas investigadas apresentam o mesmo tipo de formação dos laticíferos de *B. bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006), que ocorre no cerrado. A continuidade deste sistema secretor gerada pela dissolução das paredes transversais ou oblíquas e pela anastomose lateral entre diferentes laticíferos faz com que haja um maior afluxo de látex no local seccionado ou injuriado, pois o látex de grande parte das regiões interconectadas do sistema é liberado simultaneamente, o que não ocorre em plantas cujos laticíferos são articulados não anastomosados.

O látex das cinco espécies é branco leitoso, como observado também em órgãos aéreos de espécies de cerrado (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Demarco *et al.* 2006), mas látex avermelhado, amarelado e esverdeado já foram registrados para a família (Solereder 1908; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Sua função é proteger a planta contra herbívoros, microorganismos e selar ferimentos (Farrell *et al.* 1991; Demarco *et al.* 2006; Pickard 2008). As observações de campo confirmam estas funções, não tendo sido observado qualquer sinal de predação nos indivíduos das espécies estudadas. Durante as coletas, a sua rápida coagulação também demonstra a eficiência desta secreção em selar ferimentos, impedindo a entrada de microorganismos. Farrell *et al.* (1991) consideraram a presença de laticíferos como uma síndrome de defesa que propiciou uma maior diversidade das linhagens que os possuem em relação aos seus grupos irmãos.

As semelhanças quanto à ontogênese, estrutura e distribuição dos laticíferos das espécies de Asclepiadeae estudadas indicam que as características desta estrutura estão relacionadas filogeneticamente e correspondem a um mesmo comportamento e/ou estratégia de defesa nas diferentes formações vegetacionais.

#### Conclusões

Os laticíferos das cinco espécies são articulados anastomosados, cujas paredes transversais ou oblíquas são dissolvidas rapida e integralmente. Os laticíferos ramificam-se através de anastomose lateral e formam um sistema contínuo por todos os órgãos da planta adulta. Eles são observados em todos os tecidos primários do caule e da folha, excetuando-se a epiderme, e no tecido vascular secundário, exceto no xilema secundário de *A. curassavica*. A ontogênese destes laticíferos pode explicar a divergência entre os nossos dados e aqueles publicados para a grande maioria das espécies desta família. A ontogênese, estrutura e distribuição dos laticíferos das espécies de Asclepiadeae de floresta de restinga, floresta ombrófila densa de terras baixas e cerrado são semelhantes e o látex coagula rapidamente, selando ferimentos.

#### Referências bibliográficas

- ALLEN, R.D. & NESSLER, C.L. 1984. Cytochemical localization of pectinase activity in laticifers of *Nerium oleander* L. Protoplasma 119:74-78.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.
- ARRAES, M.A.B. 1960. Contribuição ao conhecimento de *Asclepias curassavica* L. Tese de doutorado, Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade do Ceará, Fortaleza.
- BLASER, H.W. 1945. Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. American Journal of Botany 32:135-141.
- CHAUVEAUD, M.L.G. 1891. Recherches embryogèniques sur l'appareil laticifère des Euphorbiacèes, Apocynées et Asclépiadées. Annales des Sciences Naturelles. Botanique et Biologie Vegetale (ser. 7) 14:1-161.
- DE BARY, A. 1884. Comparative anatomy of the vegetative organs of the phanerogams and ferns. English translation by F.O. Bower and D.H. Scott, Clarendon Press, Oxford.

102

- DEMARCO, D., KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.
- DHIR, S.K., SHEKHAWAT, N.S., PUROHIT, S.D. & ARYA, H.C. 1984. Development of laticifer cells in callus cultures of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. Plant Cell Reports 3:206-209.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.
- GERLACH, D. 1984. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Georg Thieme, Stuttgart.
- GIORDANI, R. 1980. Dislocation du plasmalemme et libération de vésicules pariétales lors de la dégradation des parois terminales durant la différenciation des laticifères articulés. Biologie Cellulaire 38:231-236.
- GIORDANI, R. 1996. Les lipids du latex chez *Asclepias curassavica* et *Lactuca sativa*: nature, origine, localisation subcellulaire et rôle. Oleagineux Corps Gras Lipides 3:89-94.
- GROOM, P. 1889. On the function of laticiferous tubes. Annals of Botany 3:157-169.

JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill., New York.

- LILLIE, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., McGraw-Hill, New York.
- MAHLBERG, P.G. 1959. Kariokinesis in the non-articulated laticifers of *Nerium oleander* L. Phytomorphology 9:110-118.
- MAHLBERG, P.G. 1961. Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. American Journal of Botany 48:90-99.
- MAHLBERG, P.G. 1963. Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. Botanical Gazette 124:224-231.

MAHLBERG, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. The Botanical Review 59:1-23.

- METCALFE, C.R. 1967. Distribution of latex in the plant kingdom. Economic Botany 21:115-127.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- MILANEZ, F.R. 1960/1961. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae). Rodriguésia 35/36:99-128.
- MILANEZ, F.R. 1966. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – III. Nota sobre a estrutura secundária. Rodriguésia 25:335-350.
- MILANEZ, F.R. 1977. Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium (Nerium) oleander* L. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975:343-379.
- MILANEZ, F.R. 1978. Ontogênese dos laticíferos contínuos. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 23:47-114.
- MURPHY, H. 1986. A revision of the genus *Fischeria* (Asclepiadaceae). Systematic Botany 11:229-241.
- MURUGAN, V. & INAMDAR, J.A. 1987. Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.
- NESSLER, C.L. & MAHLBERG, P.G. 1981. Cytochemical localization of cellulase activity in articulated, anastomosing laticifers of *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae). American Journal of Botany 68:730-732.
- PEREIRA, J.F., VALENTE, M. da C. & ALENCASTRO, F.M.M.R. de. 1971. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. V. Estudo taxonômico e anatômico de *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. Rodriguésia 26:261-281.
- PICKARD, W.F. 2008. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. New Phytologist 177:877-888.
- SACCHETTI, G., BALLERO, M., SERAFINI, M., ROMAGNOLI, C., BRUNI, A. & POLI, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign.

104

(Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). Phyton (Annales Rei Botanicae) 39:265-275.

- SERPE, M.D., MUIR, A.J. & KEIDEL, A.M. 2001. Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. Protoplasma 216:215-226.
- SILVA, N.M.F., VALENTE, M. da C., ALENCASTRO, F.M.M.R. de, PEREIRA, J.F. & SUCRE,
   B.D. 1975. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. X. Estudos taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35:745-756.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. English translation by L.A. Boodle and F.E. Fritsch, Clarendon Press, Oxford.
- VALENTE, M.C. 1996. *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. Anatomia vegetal (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 34:145-176.
- VAN DIE, J. 1955. A comparative study of the particle fractions from Apocynaceae latices. Annales Bogorienses 2:1-124.
- WILSON, K.J. & MAHLBERG, P.G. 1977. Investigation of laticifer differentiation in tissue cultures derived from *Asclepias syriaca* L. Annals of Botany 41:1049-1054.
- WILSON, K.J. & MAXAM, T.E. 1987. Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 74:628-628.
- WILSON, K.J., NESSLER, C.L. & MAHLBERG, P.G. 1976. Pectinase in *Asclepias* latex and its possible role in laticifer growth and development. American Journal of Botany 63:1140-1144.

## **Capítulo 4**

# Micromorfologia e histoquímica dos laticíferos de órgãos vegetativos de espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae)

#### Introdução

Os laticíferos estão presentes em todos os representantes de Apocynaceae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950) e a sua ocorrência foi considerada por Metcalfe e Chalk (1950) uma das principais características que demonstram a próxima relação entre as famílias, até então separadas, Apocynaceae e Asclepiadaceae.

As paredes dos laticíferos podem ser tão finas quanto as das células parenquimáticas ou mais espessas, são altamente hidratadas e contêm uma grande proporção de substâncias pécticas e hemiceluloses (Fahn 1979). A composição, o arranjo das moléculas e o metabolismo da parede celular estão relacionados às características de crescimento das células vegetais (Carpita & McCann 2000) e, embora haja discordância em relação ao modo de crescimento dos laticíferos nas espécies desta família (Demarco *et al.* 2006), pouco se sabe sobre suas paredes (Serpe *et al.* 2001, 2002; Demarco *et al.* 2006).

O látex contém uma suspensão ou emulsão de pequenas partículas em um líquido (Fahn 1979) e geralmente é referido como o conteúdo vacuolar (Warnaar 1982; Giordani & Lafon 1993); entretanto, atualmente ele é considerado o protoplasto do laticífero (Demarco *et al.* 2006; Castro & Demarco 2008). Em alguns casos, a composição da fração particulada do látex pode servir como auxiliar na distinção de espécies morfologicamente semelhantes, como ocorre em *Hoya* e *Plumeria* (van Die 1955; Baas *et al.* 1981).

Diversas substâncias podem ser encontradas no látex, como hidrocarbonetos poliisoprênicos, triterpenos e esteróides, ácidos graxos e aromáticos, carotenos, fosfolipídios, proteínas, constituintes inorgânicos, açúcares, grãos de amido, taninos e alcalóides (van Die 1955; Fahn 1979). Em Apocynaceae, o látex pode conter terpenos, tais como hidrocarbonetos poliisoprênicos (borracha) e triterpenos, ácidos graxos e aromáticos, fitoesteróis, polissacarídeos, cardenolídeos, compostos fenólicos, alcalóides e enzimas (van Die 1955; Yoder & Mahlberg 1976; Groeneveld & van der Made 1982; Warnaar 1982;

Giordani & Lafon 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Giordani *et al.* 2000; Rio 2006; Castro & Demarco 2008); algumas destas substâncias, como borracha e alcalóides, possuem importância econômica e/ou medicinal em certas espécies (Metcalfe & Chalk 1950; Yoder & Mahlberg 1976). O látex possui diferentes funções como proteger contra herbivoria e microorganismos e selar ferimentos (Fahn 1979; Farrell *et al.* 1991; Castro & Demarco 2008; Pickard 2008), conferindo maior sucesso evolutivo às plantas latescentes em relação às não latescentes nos diversos ambientes (Farrell *et al.* 1991).

Embora algumas técnicas histoquímicas sejam amplamente difundidas e atualmente haja diversos métodos para detecção das mais variadas substâncias, poucos pesquisadores fizeram estudos histoquímicos abrangentes das estruturas secretoras das plantas que contemplassem diversas classes químicas de substâncias. A despeito da grande quantidade de estudos químicos sobre os compostos presentes em espécies de Apocynaceae de importância medicinal, poucos trabalhos identificaram o sítio de produção destas substâncias. A maior parte dos estudos restringe-se a uma ou poucas classes de substâncias do látex (Wilson *et al.* 1976; Yoder & Mahlberg 1976; Baas *et al.* 1981; Groeneveld & van der Made 1982; Warnaar 1982; Giordani & Lafon 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Giordani *et al.* 2000). Por outro lado, destaca-se o estudo abrangente efetuado por van Die (1955), no qual foi investigada a fração particulada do látex de espécies de 46 gêneros pertencentes a Rauvolfioideae e Apocynoideae. Não há pesquisas que tenham investigado ocorrência de variação na composição geral do látex em diferentes ambientes.

Tendo em vista a falta de dados sobre a composição da parede do laticífero e a restrita informação sobre o látex de espécies de Apocynaceae, o presente trabalho propõese a analisar a micromorfologia dos laticíferos e identificar as principais classes químicas das substâncias que compõem as paredes e o látex de *Asclepias curassavica* L., *Fischeria stellata* E.Fourn., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult.; além de comparar os resultados obtidos a partir destas espécies de florestas de restinga e ombrófila densa de terras baixas com os dados disponíveis sobre laticíferos de espécies de Apocynaceae de cerrado.

#### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba (SP): praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de agosto de 2005 a fevereiro de 2006. curassavica Três indivíduos de Α. foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50'14,2"W); dois de F. stellata na trilha do Noelo (23°21'14,6"S/44°49'59,8"W; 23°21'14,8"S/44°50' 00,3"W); Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W; três de G. *axillaris* na praia da 23°21' 26,3"S/44°51'01,8"W; 23°21'26,4"S/44°51'03,7"W); dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23º21'02,4"S/44º51'05,4"W; 23º20'55,3"S/44º51'01,5"W) e dois de O. *banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°21'34,5"S/44°51'02,1"W; 23°21' 34,4"S/44°51'04,3"W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos vegetativos foram cortados com lâmina aquecida para manter o látex no interior dos laticíferos, fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%. Caules e folhas fixados em FAA foram seccionados transversalmente para análise micromorfológica dos laticíferos. Os fragmentos foram desidratados em série etílica, secos pelo método de ponto crítico, montados e metalizados com ouro. As observações e o registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada.

Para a análise histoquímica, ápices vegetativos foram isolados, desidratados em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente com 10 µm de espessura em micrótomo rotativo Microm HM340E. Algumas secções foram coradas com a tripla coloração de Flemming (Johansen 1940) e as lâminas montadas em resina sintética para análise da composição da parede dos laticíferos. Os materiais fixados em FAA foram utilizados para evidenciar as substâncias hidrofílicas, os fixados em FNT para as lipofílicas e os fixados em SFF para confirmar os resultados dos compostos fenólicos.

Os tratamentos realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes das paredes dos laticíferos e do látex foram: vermelho de rutênio para pectinas

(Johansen 1940) e mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), reagente de Lugol para amido (Johansen 1940), azul de anilina (C.I. 42755) para calose (Smith & McCully 1978), preto de amido B (C.I. 20470) para proteínas (Fisher 1968), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), floroglucina acidificada para lignina (Johansen 1940), reagentes de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas do material fixado em SFF e as do teste com preto de amido B foram montadas em resina sintética e as demais, em gelatina glicerinada.

Ápices caulinares foram mantidos por 48 h à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e SFF e receberam o mesmo tratamento das demais peças. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

Os laticíferos caulinares e foliares (Fig. 1-7) de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possuem características semelhantes em relação ao seu desenvolvimento. As células dos meristemas primários, entre as quais se encontram os ápices dos laticíferos, possuem paredes que coram em laranja pela tripla coloração de Flemming (Fig. 8-9). Ao serem adicionadas aos laticíferos, as células começam a acumular secreção em seu interior (Fig. 9) e, após a dissolução das paredes transversais, a composição das paredes é alterada e elas passam a corar em roxo (Fig. 8, 10). Esta afinidade diferenciada das paredes pelo corante violeta cristal no início do desenvolvimento dos laticíferos persiste até que eles atinjam o diâmetro máximo e cessem o crescimento

por alongamento. Nestas porções maduras dos laticíferos, as paredes retornam à sua maior afinidade pelo laranja G.

As paredes dos laticíferos são primárias, altamente hidratadas, mais espessas que as paredes das células parenquimáticas adjacentes e, aparentemente, com uma alta concentração de pectinas (Fig. 11, 14). Em materiais processados para microscopia eletrônica de varredura, as paredes dos laticíferos possuem espessura semelhante às das células parenquimáticas adjacentes (Fig. 2-4, 6-7) e têm superfície levemente irregular (Fig. 7). Este espessamento irregular pode ser observado em algumas secções transversais dos laticíferos (Fig. 11).

A lamela média é especialmente espessa e rica em pectina na região de adesão entre o laticífero e as células adjacentes desde suas porções mais jovens (Fig. 14), não havendo espaços intercelulares nestas regiões (Fig. 2, 6, 14, 16). Espaços intercelulares são observados raramente entre o laticífero e as células adjacentes e quando presentes, eles ocorrem apenas em órgãos adultos (Fig. 3, 7). Os resultados dos testes para detecção dos compostos das paredes dos laticíferos estão mencionados na tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados dos testes para análise da composição da parede dos laticíferos de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**Fs**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**; **+** = presente; **-** = ausente).

Tratamento histoquímico	Substância a ser detectada -	<b>Laticíferos</b> (Figuras)				
		Ac	Fs	Ga	Md	Ob
vermelho de rutênio	pectina	+	+ (14)	+ (11-12)	+ (13)	+
reação PAS	polissacarídeos totais	+ (17)	+	+	+ (18)	+ (15-16)
azul de anilina	calose	-	-	-	-	-
preto de amido B	proteínas	+	+ (22)	+	+	+ (21)
Sudão IV	lipídios totais	-	-	-	-	-
floroglucina acidificada	lignina	-	-	-	-	-

O látex é o próprio protoplasto do laticífero e, em materais bem fixados, preenche o lume celular (Fig. 3-4, 8-10, 12-13, 15-32). Ele é composto por um vacúolo único e central que ocupa a maior parte do lume celular, enquanto o restante do citoplasma e os núcleos estão restritos a uma fina camada parietal, que pode ser distinguida pela coloração mais intensa (Fig. 8, 10). O látex das cinco espécies analisadas é branco leitoso *in vivo*. As diferentes substâncias que o compõem estão presentes tanto no vacúolo central quanto no citoplasma parietal e os testes histoquímicos evidenciaram os diferentes metabólitos em todo o protoplasto (Fig. 12-13, 15-33).

O látex é composto por diversas classes químicas de substâncias (tabela 2) e esta heterogeneidade pode ser percebida até mesmo pela tripla coloração de Flemming (Fig. 8-10). O látex de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possui as mesmas principais classes de metabólitos secundários, sendo compostos por polissacarídeos (Fig. 15-18), incluindo mucilagem (Fig. 12-13, 19-20), proteínas (Fig. 21-22), lipídios totais (Fig. 23-26), incluindo ácidos graxos (Fig. 29-30), compostos fenólicos (Fig. 31-32) e alcalóides (Fig. 33-34). A única exceção refere-se aos lipídios. No tratamento com sulfato azul do Nilo, apenas lipídios ácidos foram detectados no látex de *A. curassavica, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 28; tabela 2), enquanto lipídios neutros estão presentes em *F. stellata* e *G. axillaris* (Fig. 27; tabela 2). Ao contrário das demais substâncias comumente observadas em abundância, os alcalóides foram localizados sempre em quantidade muito reduzida nas cinco espécies (Fig. 33-34).

Não foi observado qualquer sinal de predação nos indivíduos das espécies investigadas e logo após a coleta, o látex imediatamente extravasa pela região seccionada e alguns segundos depois, diminui o seu fluxo e coagula, selando o ferimento.

**Tabela 2.** Resultados dos testes histoquímicos para identificação das principais classes de metabólitos que compõem o látex de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**Fs**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**; **+** = presente; **-** = ausente).

Tratamento	Substância a ser detectada	Látex (Figuras)				
histoquímico		Ac	Fs	Ga	Md	Ob
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+	+	+ (12)	+ (13)	+
reação PAS	polissacarídeos totais	+ (17)	+	+	+ (18)	+ (15-16)
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	+ (20)	+	+ (19)	+	+
reagente de Lugol	amido	-	-	-	-	-
preto de amido B	proteínas	+	+ (22)	+	+	+ (21)
preto de Sudão B	lipídios totais	+	+ (24)	+ (23)	+	+
Sudão IV	lipídios totais	+	+	+ (26)	+ (25)	+
sulfato azul do Nilo	lipídios neutros	-	+	+ (27)	-	-
	lipídios ácidos	+	+	+	+	+ (28)
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	+	+	+ (30)	+	+ (29)
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	+	+ (32)	+ (31)	+	+
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	+	+	+	+	+
reagente de Wagner	alcalóides	+ (33)	+	+	+	+
reagente de Dragendorff	alcalóides	+	+	+ (34)	+	+

# ILUSTRAÇÕES

Figuras 1-7. Eletromicrografias de varredura dos laticíferos de *Asclepias curassavica* L.
(1-2), *Fischeria stellata* E.Fourn. (3), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz
(4), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (5-6) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (7). 1-3. Folha. 4-7. Caule. seta = laticífero.



**Figuras 8-14.** Estrutura e histoquímica dos laticíferos de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**8-12**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**13**) e *Fischeria stellata* E.Fourn. (**14**). **8-9,13.** Secções longitudinais. **10-12,14.** Secções transversais. **8-10.** Tripla coloração de Flemming. **11-14.** Vermelho de rutênio. **seta** = citoplasma parietal; **v** = vacúolo. **Barras: 8,10,14.** 30 μm; **9,11-12.** 15 μm; **13.** 75 μm.



**Figuras 15-24.** Testes histoquímicos realizados em laticíferos de *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**15-16, 21**), *Asclepias curassavica* L. (**17, 20**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**18**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**19, 23**) e *Fischeria stellata* E.Fourn. (**22, 24**). **15-16,19-21,24.** Secções transversais. **17-18,22-23.** Secções longitudinais. **15-18.** Reação PAS. **19-20.** Ácido tânico e cloreto férrico. **21-22.** Preto de amido B. **23-24.** Preto de Sudão B. **Barras: 15,17,19-21,23.** 30 μm; **18,22.** 75 μm; **16.** 15 μm; **24.** 50 μm.



**Figuras 25-34.** Testes histoquímicos realizados em laticíferos de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**25**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**26-27**, **30-31**, **34**), *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**28-29**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**32**) e *Asclepias curassavica* L. (**33**). **25,28,31-33.** Secções longitudinais. **26-27,29-30,34.** Secções transversais. **25-26.** Sudão IV. **27-28.** Sulfato azul do Nilo. **29-30.** Acetato de cobre e ácido rubeânico. **31-32.** Cloreto férrico. **33.** Reagente de Wagner. **34.** Reagente de Dragendorff. **Barras: 25,28,31.** 75 μm; **26,33-34.** 30 μm; **27,32.** 35 μm; **29-30.** 15 μm.



#### Discussão

As paredes dos laticíferos de *A. curassavica*, *F. stellata*, *G. axillaris*, *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* são primárias, altamente hidratadas e mais espessas que as das células parenquimáticas adjacentes. De modo geral, elas podem ser tão finas quanto as paredes das células parenquimáticas ou mais espessas (Fahn 1979) e muitas vezes é espessada irregularmente (Mahlberg 1993), como observado no presente estudo.

As paredes também podem ser seladas por substâncias incrustante ou adcrustante (Fineran *et al.* 1988); contudo, os laticíferos das espécies estudadas não reagiram positivamente aos testes para calose, suberina e lignina; portanto, suas paredes são exclusivamente pecto-celulósicas, assim como em *Aspidosperma australe* Müll.Arg. e *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. (Demarco *et al.* 2006). Elas apresentam características químicas distintas das paredes das demais células e variam ao longo do desenvolvimento do laticífero. Com a utilização da tripla coloração de Flemming, percebeu-se que as paredes das porções jovens dos laticíferos coram em roxo e após estes atingirem o diâmetro máximo e cessarem o crescimento, as paredes passam a corar em laranja. Estas diferenças não ocorrem nas demais células dos tecidos adjacentes e demonstram que os laticíferos possuem paredes com composição distinta das paredes das demais células. Este mesmo tipo de variação foi observado em *A. australe* (Demarco *et al.* 2006).

A coloração arroxeada das paredes das porções jovens dos laticíferos se deve ao caráter ácido destas e pode ser dado por uma maior proporção de pectinas, uma vez que estas são polissacarídeos heterogêneos, ramificados e altamente hidratados, ricos em ácido galacturônico (Carpita & McCann 2000). Em meristemas e células em alongamento, onde as concentrações de íons Ca<sup>2+</sup> são mantidas muito baixas, pode haver significativa deesterificação dos homogalacturonanos sem que ocorra ligação com íons Ca<sup>2+</sup>, alterando a densidade de cargas e o pH local (Carpita & McCann 2000). Isso pode explicar a coloração das paredes e indicar que estas permanecem mais flexíveis enquanto coram em roxo, auxiliando no aumento do diâmetro celular e também acentuando seu caráter higroscópico, devido à presença de grande quantidade de ânions, explicando a variação de espessura observada em materiais hidratados e desidratados. Embora os laticíferos de espécies de Convolvulaceae sejam selados por uma lamela de suberina (Fineran *et al.* 1988), os de Apocynaceae aparentemente não apresentam nenhum tipo de substância

hidrofóbica nas paredes e são permeáveis à água. Quando um órgão é cortado, há uma diminuição da pressão de turgor nos laticíferos e a água dos tecidos adjacentes atravessa a parede contribuindo para a exsudação do látex (Downton 1981; Pickard 2008).

Serpe *et al.* (2001, 2002) investigaram imunocitoquimicamente as paredes dos laticíferos de *Asclepias speciosa* Torr. em relação à ocorrência de substâncias que as diferenciem das paredes das demais células; calose, lignina e compostos fenólicos não foram encontrados, mas constatou-se que a porção madura dos laticíferos tem propriedades citoquímicas diferentes das paredes da porção mais jovem em relação a epitopos de pectina e que os diferentes componentes da parede exibem padrão de distribuição distinta.

A adesão entre as células é uma característica fundamental dos organismos multicelulares e um aspecto central da morfogênese. Ela é estabelecida durante a citocinese e geralmente é mantida, mas uma exceção a esta regra é o crescimento intrusivo, que é um caso de formação de novas ligações célula-célula que não são formadas na citocinese (Jarvis et al. 2003). Em todas as espécies analisadas, os laticíferos estão fortemente aderidos às células adjacentes por regiões ricas em pectina desde suas porções mais jovens e raramente são observados espaços intercelulares ao seu redor e, quando presentes, eles ocorrem apenas em órgãos adultos, após o término do crescimento do laticífero. Desta forma, demonstra-se que é improvável a ocorrência de crescimento intrusivo e atuação de pectinases que facilitem o crescimento do laticífero entre as células dos demais tecidos, como geralmente referida para as espécies de Apocynaceae (Wilson et al. 1976). Lamela média rica em homogalacturonano também foi observada entre os laticíferos e as células adjacentes de A. speciosa (Serpe et al. 2002). O estudo ontogenético dos laticíferos das cinco espécies investigadas neste trabalho provou que eles são articulados anastomosados, cuja dissolução das paredes transversais ocorre próximo aos seus ápices ainda em meio aos meristemas primários (capítulo 3).

O látex está presente desde a porção mais jovem do laticífero e o preenche, correspondendo ao seu próprio protoplasto. Através da técnica de coleta utilizada no presente estudo, ele permanece bem preservado, com o vacúolo central preenchendo quase todo o lume celular e o restante do citoplasma com os núcleos ocupando posição periférica. Embora haja degeneração parcial do protoplasto dos laticíferos durante o seu

desenvolvimento, ele permanece vivo nos laticíferos maduros. Segundo alguns autores, o protoplasto pode permanecer intacto ou degenerar na maturidade (Fahn 1979); entretanto, o seu desarranjo aparentemente se deve a um artefato durante a coleta e fixação do material devido a uma desestabilização de sua pressão de turgor, alterando todo o seu conteúdo. Em materiais fixados com os devidos cuidados, isto não ocorre.

O látex das cinco espécies é branco leitoso, mas látex avermelhado, amarelado e esverdeado já foram registrados para outras espécies da família (Solereder 1908; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Ele possui diversas classes químicas de substâncias que ocorrem em todo o protoplasto e é composto por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios, incluindo ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides. O látex de F. stellata e G. axillaris diferencia-se dos das demais espécies pela presença também de lipídios neutros. Diversas substâncias já foram detectadas no látex de espécies de Apocynaceae como lipídios (Yoder & Mahlberg 1976; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Rio 2006), incluindo terpenos (van Die 1955; Baas et al. 1981; Groeneveld & van der Made 1982; Warnaar 1982; Giordani et al. 2000; Rio 2006), esteróides (van Die 1955), ácidos graxos e aromáticos (Warnaar 1982; Rio 2006), polissacarídeos (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), cardenolídeos (Groeneveld & van der Made 1982) proteínas, incluindo enzimas (Wilson et al. 1976; Giordani & Lafon 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), compostos fenólicos (Rio 2006; Castro & Demarco 2008) e alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976; Sacchetti et al. 1999; Rio 2006). O látex geralmente é descrito como tendo predominantemente lipídios, especialmente terpenos (van Die 1955; Warnaar 1982). Os alcalóides foram detectados em pequena quantidade no presente estudo e segundo Yoder & Mahlberg (1976), há diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos alcalóides dependendo da idade e do órgão analisado.

O látex, em geral, é associado à proteção da planta contra herbivoria, devido à presença de compostos tóxicos ou dissuasivos alimentares e compostos que inibem o crescimento de microorganismos, além de selar ferimentos através de sua coagulação (Farrell *et al.* 1991; Castro & Demarco 2008; Pickard 2008). Alguns compostos detectados no látex das espécies estudadas possuem estas propriedades, como os lipídios, compostos fenólicos e alcalóides que podem ser tóxicos e inibir a proliferação de microorganismos, além dos lipídios terem a capacidade de coagular, selando ferimentos e funcionando como

uma barreira física à entrada de patógenos. A ausência de predação em todos os indivíduos das espécies investigadas e a rápida coagulação do látex após a coleta do material corroboram estas prováveis funções. Diversas outras funções já foram atribuídas ao látex de *A. curassavica*, como antifúngica, bactericida, atividades enzimáticas de glicosidases envolvidas na degradação da parede celular de fungos, proteases, Rnases, peroxidases e ácido fosfatases (Giordani *et al.* 2000), além de ser tóxico para larvas de insetos herbívoros generalistas (Dussourd & Hoyle 2000). O látex também representa uma defesa física, pois as mandíbulas do inseto podem ficar aderidas entre si ou à planta (Dussourd 1990).

Contudo, alguns herbívoros desenvolveram estratégias coevolutivamente para conseguir se alimentar de plantas latescentes. Muitos insetos mandibulados cortam a nervura principal ou o pecíolo para que o látex escoe e depois se alimentam da parte distal ao corte, onde a quantidade de látex é mínima. Em geral, estes insetos rompem apenas uma nervura, mas em plantas com sistema ramificado de laticíferos, eles fazem um sulco através da folha, danificando diversas nervuras e todas as regiões do sistema, e assim interrompem o fluxo de látex (Dussourd 1990). Outros insetos são capazes de seqüestrar substâncias tóxicas da planta hospedeira durante seu estágio larval para usá-las em sua própria defesa contra os inimigos naturais (Trigo 2000). Além disso, alguns parasitas estão perfeitamente adaptados a viver no látex. Espécies de *Phytomonas* (Trypanosomatidae) são parasitas intralaticíferos ou floemáticos de transmissão obrigatória por picadas de hemípteros fitófagos e já foram registrados em espécies de *Asclepias*. As plantas infectadas e não infectadas têm a mesma aparência, não sendo patogênicas ao hospedeiro (Solarte *et al.* 1995).

Segundo Farrell *et al.* (1991), as linhagens de plantas latescentes têm maior diversidade que seus grupos irmãos em diversos habitat. Segundo estes autores, os sistemas de canais e laticíferos promovem diversificação diretamente (correlação genética) ou indiretamente (aumentando o "fitness" individual). Desta forma, a inovação adaptativa, especialmente de defesa, confere sucesso evolutivo.

Os laticíferos das espécies estudadas são semelhantes quanto à composição e características de suas paredes, as quais se alteram ao longo do seu desenvolvimento. Este fato também foi observado em laticíferos de espécies de cerrado (Demarco *et al.* 

2006) e aparentemente está relacionado ao tipo de desenvolvimento desta estrutura secretora.

O látex das cinco espécies estudadas é branco leitoso, assim como observado em caules e folhas de outras espécies de cerrado (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Demarco *et al.* 2006; Rio 2006); entretanto, sua coloração pode variar até em uma mesma espécie quando diferentes órgãos são comparados. Em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*), o látex da parte aérea é branco leitoso, enquanto o da raiz é amarelo (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997).

A composição do látex das espécies estudadas é semelhante e apresenta as mesmas principais classes químicas de substâncias, diferindo apenas quanto à presença de lipídios neutros em F. stellata e G. axillaris. Embora os componentes do látex possam ser utilizados para diferenciar espécies, como no caso de Hoya (Baas et al. 1981) e Plumeria (van Die 1955), o látex das espécies investigadas possui composição muito semelhante em relação às classes de metabólitos, o que aparentemente está relacionado à proximidade filogenética entre estes cinco gêneros que pertencem à mesma tribo - Asclepiadeae. As secreções podem variar dependendo do ambiente em que a planta se encontra; entretanto, não há diferenças significativas entre a constituição do látex nas diferentes formações vegetacionais. F. stellata foi coletada em floresta ombrófila densa de terras baixas e G. axillaris em floresta de restinga e ambas possuem látex de composição semelhante (incluindo os lipídios neutros), assim como observado entre A. curassavica e M. denticulata (terras baixas) e O. banksii subsp. banksii (restinga). Em espécies de Apocynaceae ocorrentes no cerrado, lipídios, polissacarídeos e proteínas foram detectados em M. illustris e M. velutina (hoje M. pohliana; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997) e lipídios, incluindo terpenos e ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides em Forsteronia glabrescens Müll.Arg. (Rio 2006), além de compostos fenólicos em Blepharodon bicuspidatum (Castro & Demarco 2008). Esta similaridade encontrada indica que o mecanismo de defesa selecionado evolutivamente é semelhante nas espécies da família e demonstra a eficiência desta secreção na proteção da planta, evitando a predação; além disso, sua rápida coagulação, sela ferimentos, impedindo a entrada e proliferação de microorganismos.

#### Conclusões

As paredes dos laticíferos de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* são primárias, altamente hidratadas, pecto-celulósicas e fortemente aderidas às paredes das células adjacentes. O látex é branco leitoso, constituído por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios, incluindo ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides; entretanto, *F. stellata* e *G. axillaris* diferem das demais espécies por produzirem também lipídios neutros. O látex das espécies investigadas está associado à proteção da planta contra herbivoria, podendo ser tóxico e inibir a proliferação de microorganismos, além de coagular, selando ferimentos e funcionando como barreira física.

#### Referências bibliográficas

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.
- BAAS, W.J., WARNAAR, F. & NIEMANN, G.J. 1981. Investigations on *Hoya* species. VI. Latex composition and leaf phenolics and their taxonomic significance. Acta Botanica Neerlandica 30:257-263.
- CAIN, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88:383-392.
- CARPITA, N. & McCANN, M. 2000. The cell wall. *In* Biochemistry and molecular biology of plants (B.B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones, eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville, p.52-108.
- CASTRO, M. de M. & DEMARCO, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- DEMARCO, D., KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.
- DOWNTON, W.J.S. 1981. Water relations of laticifers in *Nerium oleander*. Australian Journal of Plant Physiology 8:329-334.

- DUSSOURD, D.E. 1990. The vein drain; or, how insects outsmart plants. Natural History 90:44-49.
- DUSSOURD, D.E. & HOYLE, A.M. 2000. Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars. Chemoecology 10:11-16.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.
- FINERAN, B.A., CONDON, J.M. & INGERFELD, M. 1988. An impregnated suberized wall layer in laticifers of the Convolvulaceae and its resemblance to that in walls of oil cells. Protoplasma 147:42-54.
- FISHER, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- FURR, M. & MAHLBERG, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GIORDANI, R. & LAFON, L. 1993. A β-D-fucosidase from *Asclepias curassavica* latex. Phytochemistry 33:1327-1331.
- GIORDANI, R., TOLLA, D., REGLI, P. & BUC, J. 2000. Role of terpenes from *Asclepias curassavica* latex for antifungal activity. Journal de Mycologie Medicale 10:34-38.
- GREGORY, M. & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38:125-174.
- GROENEVELD, H.W. & VAN DER MADE, L.A. 1982. Cardenolide and triterpene synthesis in the laticifers of *Asclepias curassavica* L. Acta Botanica Neerlandica 31:5-10.
- HIGH, O.B. 1984. Lipid histochemistry. Oxford University Press, New York.

- JARVIS, M.C., BRIGGS, S.P.H. & KNOX, J.P. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. Plant, Cell and Environment 26:977-989.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- LILLIE, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., McGraw Hill, New York.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v. 2. Clarendon Press, Oxford.
- PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry: theoretical and applied. v. 2, 4<sup>th</sup> ed., C. Livingstone, Edinburgh.
- PICKARD, W.F. 2008. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. New Phytologist 177:877-888.
- PIZZOLATO, T.D. 1977. Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- RIO, M.C.S. do 2006. Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SACCHETTI, G., BALLERO, M., SERAFINI, M., ROMAGNOLI, C., BRUNI, A. & POLI, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). Phyton (Annales Rei Botanicae) 39:265-275.
- SERPE, M.D., MUIR, A.J. & KEIDEL, A.M. 2001. Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. Protoplasma 216:215-226.
- SERPE, M.D., MUIR, A.J. & DRIOUICH, A. 2002. Immunolocalization of β-D-glucans, pectins, and arabinogalactan-proteins during intrusive growth and elongation of nonarticulated laticifers in *Asclepias speciosa* Torr. Planta 215:357-370.

- SMITH, M.M. & McCULLY, M.E. 1978. A critical evaluation of the specificity of aniline blue induce fluorescence. Protoplasma 95:229-254.
- SOLARTE, R.Y., MORENO, E.A. & SCORZA, J.V. 1995. Flageliasis de plantas: comentarios sobre una revision bibliografica. Revista de Ecologia Latino Americana 3:57-68.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. v. 1 e 2. Clarendon Press, Oxford.
- SVENDSEN, A.B. & VERPOORTE, R. 1983. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- TRIGO, J.R. 2000. The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. Journal of the Brazilian Chemical Society 6:551-561.
- VAN DIE, J. 1955. A comparative study of the particle fractions from Apocynaceae latices. Annales Bogorienses 2:1-124.
- WARNAAR, F. 1982. Investigation on *Hoya* species. V. Determination of the amount of latex present in *Hoya australis* R. Br. ex Traill. and *Hoya bella* Hook. and its relation with shoot development. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 105:307-314.
- WILSON, K.J., NESSLER, C.L. & MAHLBERG, P.G. 1976. Pectinase in *Asclepias* latex and its possible role in laticifer growth and development. American Journal of Botany 63:1140-1144.
- YODER, L.R. & MAHLBERG, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). American Journal of Botany 63:1167-1173.

## **Capítulo 5**

## Tricomas glandulares em órgãos vegetativos de *Fischeria stellata* E.Fourn. e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz

#### Introdução

Diversos tipos de estruturas secretoras estão presentes em Apocynaceae, tais como tricomas, idioblastos taníferos, cavidades mucilaginosas, laticíferos, coléteres, cabeça dos estiletes, nectários e osmóforos (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1983; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Demarco 2005; Rio & Kinoshita 2005; Demarco *et al.* 2006; Castro & Demarco 2008; Marasca 2008). Dentre estas, os tricomas glandulares têm ocorrência restrita e estão presentes em poucos gêneros (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950). Solereder (1908) destacou a ausência de tricomas glandulares como uma das características das Apocynaceae (hoje Rauvolfioideae e Apocynoideae; Endress & Bruyns 2000).

Os tricomas presentes em Apocynaceae geralmente são simples, unicelulares ou unisseriados (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950). Tricomas glandulares são raros e foram registrados em apenas alguns gêneros de Asclepiadoideae: *Araujia, Dischidia; Fischeria, Gongronema, Gonolobus, Marsdenia, Matelea* e *Sarcostemma* (Solereder 1908; Woodson 1941; Metcalfe & Chalk 1950; Stevens 1975, 1988; Murphy 1986; Morillo 1998).

As espécies de *Fischeria* e *Matelea* são as únicas dentre as Asclepiadoideae que possuem um indumento misto, composto por tricomas tectores curtos e longos e glandulares curtos (Woodson 1941; Stevens 1975, 1988; Murphy 1986; Morillo 1998) e é uma das características que evidencia a afinidade dos dois gêneros (Woodson 1941), que estão agrupados na mesma subtribo (Gonolobinae; Rapini *et al.* 2003).

Os tricomas glandulares de Apocynaceae nunca foram estudados anatomicamente antes e o presente trabalho tem o objetivo de investigar a ontogênese, estrutura, distribuição, composição da secreção e possível função destes tricomas presentes em órgãos vegetativos de *Fischeria stellata* E.Fourn. e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz.

#### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, entre agosto de 2005 e fevereiro de 2006. Quatro indivíduos de *F. stellata* foram coletados na trilha do Noelo (23°21'14,6"S/44°49'59,8"W; 23°21'14,8"S/44°50'00,3"W; 23°21'14,0"S/44°50'00,5"W; 23°21'13,8"S/44°50'00,1"W) e quatro de *M. denticulata*, na estrada para a Casa de Farinha (23°21'02,4"S/44°51'05,4"W; 23°20'55,3"S/44°51'01,5"W; 23°21'02,4"S/44°51'05,4"W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos vegetativos foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Para a análise micromorfológica, ápices vegetativos e folhas adultas fixados em FAA foram isolados, desidratados em série etílica, secos pelo método de ponto crítico, montados e metalizados com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada. Para o estudo anatômico, ápices e dois nós subseqüentes foram isolados, desidratados em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente com 12 a 18  $\mu$ m em micrótomo rotativo Microm HM340E. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética.

Ápices fixados em FAA foram utilizados para os testes histoquímicos que evidenciam compostos hidrofílicos, os fixados em FNT para os testes que evidenciam compostos lipofílicos e os fixados em SFF para confirmar os resultados dos compostos fenólicos. Os tratamentos realizados foram: vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS

(Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), preto de amido B (C.I. 20470) para proteínas (Fisher 1968), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970) e cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940). As lâminas do material fixado em SFF foram montadas em resina sintética e as demais, em gelatina glicerinada.

Ápices caulinares foram mantidos por 48 h à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e SFF e receberam o mesmo tratamento das demais peças. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

*Fischeria stellata* e *Matelea denticulata* possuem indumento composto por tricomas tectores longos, multicelulares, unisseriados e tricomas glandulares curtos sobre toda a superfície do caule e das folhas. Os tricomas glandulares são multicelulares, unisseriados, com uma célula secretora apical (Fig. 1-7, 10-13, 15-16, 18-20, 22-24, 26-28, 30-32) e acastanhados *in vivo*, sendo facilmente distinguíveis dos demais.

Eles são formados a partir do segundo nó nos primórdios caulinar e foliar (Fig. 8, 21). Os tricomas continuam a ser produzidos ao longo do desenvolvimento dos órgãos (Fig. 2, 9) e o indumento é denso tanto em caules (Fig. 1, 4, 7) e folhas jovens (Fig. 2-3, 5-6, 19-20) quanto nos órgãos adultos. Os tricomas glandulares podem ser reconhecidos desde o início de sua formação, pois a célula secretora é a primeira a se diferenciar e é cônica na fase meristemática (Fig. 2, 8-9, 21).

O pedúnculo é composto por três a oito células nos tricomas de *F. stellata* (Fig. 1-3, 10-13, 15-16, 18) e por quatro nos de *M. denticulata* (Fig. 4-5, 19-20, 22, 26, 28, 30). As

células do pedúnculo dos tricomas de *F. stellata* geralmente apresentam um aumento gradativo de diâmetro em direção à sua porção distal (Fig. 1-2, 10-13, 15-16, 18); nos tricomas de *M. denticulata*, a célula basal é a que tem maior diâmetro, seguido por uma célula pequena e duas células alongadas que apresentam glóbulos intensamente corados (Fig. 19-20, 22-24, 26-28, 30).

Os tricomas de ambas as espécies já estão totalmente formados e em fase secretora em primórdios foliares do terceiro nó e na região do terceiro entrenó. A célula secretora possui uma base dilatada e uma porção superior acuminada bastante alongada (Fig. 1-7, 10-13, 15-16, 18-20, 22-28, 30-32). No início da atividade secretora, todo o citoplasma da célula apical é intensamente corado (Fig. 7, 10, 19-20). Posteriormente, diversas vesículas são observadas (Fig. 11, 22) e um vacúolo se desenvolve na base da célula deslocando a maior parte do conteúdo do citoplasma para a porção superior afilada (Fig. 12-13, 15-16, 23-28, 31-32). A célula secretora também produz cristais que são transferidos para a uma posição subapical (Fig. 14, 17, 29). Na maturidade, o pedúnculo lignifica, mas a célula secretora mantém a parede não lignificada (Fig. 17, 29).

Os tricomas das duas espécies têm mecanismos semelhantes para liberação da secreção. Ambos produzem cristais que ocupam posição subapical, região preferencial de ruptura. Os tricomas de *F. stellata* possuem ápice agudo (Fig. 1-3, 10-13, 15-16) e os de *M. denticulata* têm uma constrição sob um ápice arredondado (Fig. 4-6, 23-27), tornando este local mais frágil e susceptível à ruptura. Eventualmente, alguns tricomas de *F. stellata* também apresentam uma leve constrição abaixo do ápice (Fig. 2).

Os tricomas observados somente liberam a secreção por ação mecânica. Grande número de tricomas com a porção apical rompida e desprovido de parte de seu conteúdo é encontrado nas duas espécies (Fig. 5, 13, 18, 30).

A secreção dos tricomas de *F. stellata* e *M. denticulata* reage positivamente apenas no teste para detecção de proteínas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados da aplicação dos testes histoquímicos para identificação das principais classes de metabólitos que compõem a secreção dos tricomas vegetativos de *Fischeria stellata* E.Fourn. (**Fs**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**; + = presente; - = ausente).

Tratamento histoquímico	Substância a ser	<b>Secreção</b> (Figuras)		
•	detectada	Fs	Md	
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	-	-	
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	-	-	
reação PAS	polissacarídeos totais	-	-	
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	-	-	
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	-	-	
preto de amido B	proteínas	+ (31)	+ (32)	
preto de Sudão B	lipídios totais	-	-	
Sudão IV	lipídios totais	-	-	
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos e neutros	-	-	
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-	

## ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-6.** Eletromicrografias de varredura dos tricomas glandulares de *Fischeria stellata* E.Fourn. (**1-3**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**4-6**). **1,4.** Caule. **2-3,5-6.** Folha.


**Figuras 7-12.** Ontogênese dos tricomas glandulares de *Fischeria stellata* E.Fourn. **7-8,10-12.** Secções longitudinais. **7.** Tricomas em caule jovem. **8-9.** Formação de tricomas glandulares. **8.** Primórdio foliar do terceiro nó. **9.** Secção transversal do sexto entrenó. **10-12.** Tricomas glandulares em fase secretora. **10.** Início da atividade secretora; notar citoplasma de aspecto denso. **11.** Presença de vesículas de secreção no citoplasma. **12.** Tricoma maduro com vacúolo na região basal e a maior parte do conteúdo citoplasmático na região superior da célula secretora. **Barras: 7.** 250 μm; **8,10-12.** 30 μm; **9.** 75 μm.



**Figuras 13-18.** Estrutura dos tricomas glandulares de *Fischeria stellata* E.Fourn. **13-15.** Secções transversais. **16-18.** Secções longitudinais. **13.** Tricoma glandular. **14.** Cristais evidenciados por luz polarizada. **15-16.** Tricomas glandulares maduros. **17.** Cristais e pedúnculo lignificado evidenciados por luz polarizada. **18.** Tricoma glandular com o ápice rompido. **Barras: 13-15.** 30 μm; **16-18.** 75 μm.



**Figuras 19-25.** Ontogênese dos tricomas glandulares de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. Secções longitudinais. **19-20.** Tricomas em folhas jovens. **21.** Formação de tricoma glandular em primórdio foliar do segundo nó. **22.** Vista geral do tricoma glandular. **23.** Tricoma com vacúolo na porção basal da célula secretora e a maior parte do conteúdo citoplasmático na porção apical. **24.** Célula secretora com ápice arredondado. **25.** Pormenor da figura 24. **Barras: 19.** 150 μm; **20,24.** 75 μm; **21-23,25.** 30 μm.



**Figuras 26-32.** Estrutura e histoquímica dos tricomas glandulares de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**26-30,32**) e *Fischeria stellata* E.Fourn. (**31**). **26-32.** Secções longitudinais. **26.** Vista geral do tricoma. **27.** Pormenor da figura 26; notar constrição (**seta**) abaixo do ápice arredondado. **28.** Tricoma glandular maduro. **29.** Cristais e pedúnculo lignificado evidenciados por luz polarizada. **30.** Célula secretora com a ponta rompida, desprovida de grande parte de seu conteúdo. **31-32.** Preto de amido B. **Barras: 26,31-32.** 30 μm; **27.** 15 μm; **28-30.** 75 μm.



#### Discussão

Tricomas glandulares têm ocorrência restrita em Apocynaceae (Solereder 1908; Woodson 1941; Metcalfe & Chalk 1950; Stevens 1975, 1988; Murphy 1986; Morillo 1998). Os tricomas tectores de *F. stellata* e *M. denticulata* são multicelulares unisseriados, como os descritos para as demais espécies destes gêneros (Stevens 1975; Murphy 1986; Valente 1996) e para a maioria das espécies de Asclepiadoideae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950). Tricomas ramificados foram descritos apenas em *Oncinotis* (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950).

A presença de indumento misto composto por tricomas tectores longos e glandulares curtos, que podem ser brancos, marrom-escuros ou pretos, em *Fischeria* e *Matelea* é uma das características que evidencia a afinidade dos dois gêneros, que estão posicionados em Gonolobinae, e é única em Asclepiadoideae (Woodson 1941; Rapini *et al.* 2003).

Os tricomas glandulares de *F. stellata* e *M. denticulata* estão presentes em toda a superfície do caule e da folha e também já foram relatados para estes órgãos em diversas espécies dos respectivos gêneros (Stevens 1975, 1988; Murphy 1986; Morillo 1998).

Estes tricomas são multicelulares unisseriados com uma célula secretora apical que possui uma base dilatada e uma porção superior acuminada bastante alongada. O pedúnculo lignifica na maturidade e a célula secretora apresenta um vacúolo na porção basal e a secreção na porção afilada. Cristais produzidos por estas células estão localizados numa posição subapical e proporcionam um local de ruptura preferencial por ação mecânica. Além disso, os tricomas de *M. denticulata* têm uma constrição sob um ápice arredondado, tornando o local mais frágil e susceptível à ruptura, ao contrário dos tricomas de *F. stellata* que possuem ápice agudo, geralmente sem constrição.

Os únicos relatos de tricomas glandulares em Apocynaceae são de Solereder (1908), que mencionou os tricomas de *Dischidia* como unicelulares mucilaginosos, e de Stevens (1975) que descreveu os tricomas glandulares de *Matelea* como sendo menores que os tectores, com pedúnculo curto, porção mediana dilatada e um apículo curto.

A morfologia dos tricomas glandulares de *F. stellata* e *M. denticulata* assemelha-se à das células secretoras das emergências urticantes (Thurston 1974, 1976). Estas estruturas urticantes estão presentes apenas em Euphorbiaceae, Hydrophyllaceae, Loasaceae e Urticaceae (Thurston & Lersten 1969; Fahn 1979) e sua morfologia e seu mecanismo de

liberação da secreção são semelhantes em todas as espécies, exceto em *Dalechampia* e *Tragia* (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1976). Estas glândulas possuem uma célula secretora alongada em forma de espinho, com uma constrição logo abaixo do ápice e uma base bulbosa. O ápice rompe com o contato e a célula secretora penetra a pele injetando seu conteúdo (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1974). A capacidade de perfurar aparentemente está ligada à presença de sílica em *Urtica* (Barber & Shone 1966).

O ápice do tricoma de *F. stellata* é agudo, mas o de *M. denticulata* possui uma constrição sob um ápice arredondado, como observado nas emergências de *Urtica* e *Cnidoscolus* (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1974).

Na análise histoquímica dos tricomas de ambas as espécies estudadas, a secreção reage apenas com o preto de amido B. Deste modo, a secreção dos tricomas de *F. stellata* e *M. denticulata* é composta por aminoácidos e/ou proteínas e sua provável função é de defesa contra herbivoria.

Embora a morfologia do tricoma, mecanismo de liberação e composição da secreção se assemelhem aos das estruturas urticantes, nenhuma reação alérgica ocorreu durante as coletas e mais estudos são necessários para se averiguar a sua função. As emergências urticantes sempre são relacionadas à função de defesa (Pollard & Briggs 1984), causando desde uma irritação na pele até a morte, dependendo da espécie de planta e do animal que entrou em contato com ela (Thurston & Lersten 1969; Fahn 1979). A ação irritante da secreção deve-se, principalmente, à presença de acetilcolina, histamina e serotonina (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1974; Lookadoo & Pollard 1991). Serotonina já foi encontrada em caules e folhas de *Araujia sericifera* Brot. (Federici *et al.* 1988), que é uma das espécies de Apocynaceae que possui tricomas glandulares (Solereder 1908), embora seja desprovida de ação irritante (Federici *et al.* 1988).

#### Conclusões

Os tricomas glandulares de *F. stellata* e *M. denticulata* estão presentes em toda a superfície do caule e da folha. Eles originam-se nos primórdios caulinar e foliar, mas novos tricomas são formados ao longo do desenvolvimento dos órgãos.

Eles são multicelulares unisseriados com uma célula secretora apical com base dilatada e ápice acuminado bastante alongado. O pedúnculo lignifica na maturidade e a

célula secretora apresenta um vacúolo na porção basal, secreção na porção afilada e cristais em posição subapical, proporcionando um local de ruptura preferencial. Os tricomas de *F. stellata* possuem ápice agudo e os de *M. denticulata* têm uma constrição sob um ápice arredondado. A secreção só é liberada sob ação mecânica. Ela é composta por aminoácidos e/ou proteínas em ambas as espécies e sua provável função é de defesa contra herbivoria.

#### Referências bibliográficas

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.
- BARBER, DA & SHONE, MGT 1966 The absorption of silica from aqueous solution by plants. Journal of Experimental Botany 17:569-578.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CASTRO, M de M & DEMARCO, D 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DEMARCO, D; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2006 Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.

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

- FEDERICI, E; GALEF, C & NICOLETTI, M 1988 Constituents of *Araujia sericifera*. Journal of Natural Products 51:189-190.
- FISHER, DB 1968 Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- LOOKADOO, SE & POLLARD, AJ 1991 Chemical contents of stinging trichomes of *Cnidoscolus texanus*. Journal of Chemical Ecology 17:1909-1916.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2 v., Oxford, Clarendon Press.

- METCALFE, CR & CHALK, L 1979 Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2<sup>nd</sup> ed., v. 1, Oxford, Clarendon Press.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1983 Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction. 2<sup>nd</sup> ed., v. 2, Oxford, Clarendon Press.
- MORILLO, G 1998 *Matelea gracieae* Morillo, a new species from French Guiana, and *Cynanchum gortsianum* Morillo, a new record for Suriname. Brittonia 50:296-300.
- MURPHY, H 1986 A revision of the genus *Fischeria* (Asclepiadaceae). Systematic Botany 11:229-241.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- POLLARD, AJ & BRIGGS, D 1984 Genecological studies of *Urtica dioica* L. III. Stinging hairs and plant-herbivore interactions. New Phytologist 97:507-522.
- RAPINI, A; CHASE, MW; GOYDER, DJ & GRIFFITHS, J 2003 Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). Taxon 52:33-50.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom. cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.

- RIO, MCS do & KINOSHITA, LS 2005 *Prestonia* (Apocynaceae) no sul e sudeste do Brasil. Hoehnea 32:233-258.
- RIO, MCS do; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2005 Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- SOLEREDER, H 1908 Systematic anatomy of the dicotyledons. English translation by L.A. Boodle and F.E. Fritsch, 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- STEVENS, WD 1975 Notes on the genus *Matelea* (Apocynaceae s.l.). Phytologia 32:387-406.
- STEVENS, WD 1988 A synopsis of *Matelea* subg. *Dictyanthus* (Apocynaceae: Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 75:1533-1564.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- THURSTON, EL 1974 Morphology, fine structure, and ontogeny of the stinging emergence of *Urtica dioica*. American Journal of Botany 61:809-817.
- THURSTON, EL 1976 Morphology, fine structure, and ontogeny of the stinging emergence of *Tragia ramosa* and *T. saxicola* (Euphorbiaceae). American Journal of Botany 63:710-718.
- THURSTON, EL & LERSTEN, NR 1969 The morphology and toxicology of plant stinging hairs. The Botanical Review 35:393-412.
- VALENTE, M da C 1996 *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. Anatomia vegetal (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 34:145-176.
- WOODSON, RE Jr. 1941 The North American Asclepiadaceae. I. Perspective of the genera. Annals of the Missouri Botanical Garden 28:193-244.

### **Capítulo 6**

# Estruturas secretoras externas de defesa das flores de Asclepiadeae: coléteres e tricomas

#### Introdução

As Asclepiadoideae são conhecidas por possuírem as flores mais complexas e elaboradas de todas as dicotiledôneas e por apresentarem algumas estruturas que não são encontradas em outras famílias (Endress 1994). Embora haja muitos trabalhos sobre a morfologia floral (Frye 1902; Tiagi & Dixit 1965; Serbanescu-Jitariu & Tarnavschi 1976; Valente 1977,1980,1983,1984,1995; Schnepf *et al.* 1979; Valente & Silva 1983,1984; Fallen 1986; Hofmann & Specht 1986; Konta *et al.* 1986; Konta & Kitagawa 1989; Kunze 1991,1995,1997,1998,2005; Kunze & Liede 1991; Liede & Kunze 1993; Swarupanandan *et al.* 1996; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Valente & Costa 2005; Demarco 2005; Demarco *et al.* 2006; Gomes 2006), poucos trataram das estruturas secretoras de defesa das flores deste grupo.

As plantas utilizam um amplo conjunto de características de defesa contra os herbívoros, que podem ser compartilhadas devido a um ancestral comum ou por convergência adaptativa (Agrawal & Fishbein 2006). Em Asclepiadeae, as estruturas secretoras florais de defesa conhecidas são laticíferos e coléteres (Demarco 2005; Demarco *et al.* 2006).

Os coléteres são estruturas que produzem uma secreção viscosa que protege os meristemas (Thomas 1991) contra o dessecamento e podem inibir a proliferação de fungos e até imobilizar fitófagos (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008; capítulos 1 e 2). Eles estão presentes no cálice de diversos gêneros de Apocynaceae (Woodson 1935, 1954; Metcalfe & Chalk 1950; Rao & Ganguli 1963a,b; Tiagi & Dixit 1965; Ramayya & Bahadur 1968; Valente *et al.* 1973; Silva *et al.* 1975; Valente 1977, 1980, 1983, 1984, 1995; Konta *et al.* 1986; Murphy 1986; Konta & Kitagawa 1989; Kuriachen & Dave 1989; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,1991; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Rio 2001,

2006; Simões 2004; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Simões *et al.* 2006; Gomes 2006; Gomes *et al.* 2008). Embora diversos estudos anatômicos tenham descrito a estrutura dos coléteres de espécies desta família, poucos analisaram a composição química de sua secreção (Ramayya & Bahadur 1968; Arekal & Ramakrishna 1980; Mohan & Inamdar 1986; Dave *et al.* 1987; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b, 1990; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Simões 2004; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006; capítulo 2). Dentre as espécies selecionadas para o presente trabalho, a estrutura dos coléteres calicinais de *O. banksii* subsp. *banksii* foi descrita em termos gerais (Valente 1977) e é reavaliada; coléteres calicinais foram apenas citados para *A. curassavica* (Tiagi & Dixit 1965).

Os tricomas glandulares têm ocorrência restrita em Apocynaceae e estão presentes em poucos gêneros (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950). Solereder (1908) destacou a ausência de tricomas glandulares como uma das características das Apocynaceae (hoje Rauvolfioideae e Apocynoideae; Endress & Bruyns 2000). Eles foram registrados em apenas alguns gêneros de Asclepiadoideae (Solereder 1908; Woodson 1941; Metcalfe & Chalk 1950; Stevens 1975, 1988; Morillo 1998; capítulo 5) e em *Matelea*, ocorrem em órgãos vegetativos e florais (Stevens 1975, 1988; capítulo 5).

Embora haja referência a tricomas glandulares plumosos ("glandular shaggy hairs") em grande parte das Apocynaceae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950), eles se referem a coléteres e todos os coléteres de espécies de Apocynaceae descritos até o momento são emergências e não tricomas (Woodson & Moore 1938; Ramayya & Bahadur 1968; Arekal & Ramakrishna 1980; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b, 1990, 1991; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Marasca 2008).

O presente estudo tem o objetivo de analisar as estruturas secretoras externas envolvidas na defesa das flores de quatro espécies de diferentes subtribos de Asclepiadeae. Esta investigação abrange a ontogênese, estrutura e histoquímica de coléteres e tricomas glandulares em flores de *Asclepias curassavica* L., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult.

#### Material & métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de setembro de 2006 a fevereiro de 2007. Três indivíduos de *A. curassavica* foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50' 14,2"W) e na praia da Fazenda (23°21'33,7"S/44°51'0,37"W); três de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W) e na Trilha do Noelo (23°20'53,1"S/44°51' 00,9"W); dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23°21'02,4"S/44°51'0,57"W) e dois de *O. banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°21'24,0"S/44°50'14,7"W; 23°21'34,5"S/44°51'02,1"W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos florais foram fixados em FAA(formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Para a análise micromorfológica, flores adultas fixadas em FAA foram isoladas, desidratadas em série etílica, secas pelo método de ponto crítico, montadas e metalizadas com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada.

Diversos estádios do desenvolvimento floral foram selecionados para o estudo da ontogênese das glândulas florais, desde o início da formação do botão, junto aos ápices dos ramos, até a flor adulta em pós-antese. Os diversos botões e flores foram isolados, desidratados em série butílica (Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 10 a 18 µm. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética.

Para o estudo histoquímico, diferentes tratamentos foram realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes da secreção dos coléteres e tricomas em botões florais; são eles: vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), reagente de Lugol para amido (Johansen 1940), preto de amido B (C.I. 20470) para proteínas (Fisher 1968), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), reagentes de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas do teste com preto de amido B foram montadas em resina sintética e as demais, em gelatina glicerinada.

Botões florais foram mantidos por 48 h à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e receberam o mesmo tratamento das demais flores. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

Apenas duas estruturas secretoras externas estão presentes nas flores das espécies investigadas: coléteres e tricomas (Fig. 1-6).

#### <u>Coléteres (Fig. 1-5, 7-35)</u>

Os coléteres de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* ocupam posição alterna em relação às sépalas (Fig. 1-2, 4-5, 13-19) e são amarelos. Em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, eles se inserem nas margens das sépalas, próximo às suas bases (Fig. 1-2, 5, 17). Em *M. denticulata*, eles inserem-se na base do cálice (Fig. 4, 18). Nas quatro espécies estudadas, os coléteres formam-se durante o início do desenvolvimento floral, a partir de grupos de células do meristema fundamental localizadas na face adaxial da base das sépalas e de divisões anticlinais das células

protodérmicas, que ampliam a superfície da emergência que se forma (Fig. 7-10). Alguns coléteres já se encontram bastante desenvolvidos em botões jovens ainda envoltos pelo cálice, apresentando células epidérmicas quadradas, citoplasma de aspecto denso e núcleo volumoso em posição central (Fig. 11). Logo em seguida, as células epidérmicas alongamse e iniciam a atividade secretora (Fig. 12). A diferenciação das células secretoras é basípeta.

O número de coléteres em cada região do cálice é variável até em uma mesma flor. *A. curassavica* pode ter de um a dois coléteres (Fig. 3, 13) e *O. banksii* subsp. *banksii*, de um a três (Fig. 5, 19). *G. axillaris* e *M. denticulata* possuem apenas um coléter em cada uma das cinco regiões alternas às sépalas (Fig. 1-2, 4, 16-18).

Os coléteres são persistentes, achatados dorso-ventralmente e íntegros, mas os de *A. curassavica* podem ser íntegros ou bífidos (Fig. 14-15); nesta espécie, estes dois tipos de coléteres podem ser encontrados em uma mesma flor. Os coléteres de *A. curassavica* (fig. 3, 20), *G. axillaris* (Fig 2, 21) e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 5, 23-24) são pedunculados e os de *M. denticulata* são sésseis (Fig. 4, 22). O pedúnculo é curto e composto por células epidérmicas e parenquimáticas não secretoras (Fig. 20-21, 23-24). A porção secretora é composta por uma camada de células epidérmicas alongadas dispostas em paliçada (Fig. 20-24) e por parênquima de células não secretoras alongadas longitudinalmente em relação ao coléter (Fig. 20-24).

As células secretoras são recobertas por cutícula fina (Fig. 24, 35), têm paredes finas e citoplasma de aspecto denso, que se cora fortemente pela safranina (Fig. 12, 20, 22-24). O núcleo ocupa preferencialmente posição mediana na célula (Fig. 21) e espaços extraprotoplásticos formados pela retração do protoplasto são observados na porção distal da maioria das células (Fig. 24); neste local, a secreção é acumulada antes de ser liberada para o exterior através da parede e da cutícula, sem rompê-las. Os coléteres calicinais não possuem vascularização (Fig. 20-26).

Os coléteres apresentam atividade secretora durante todo o desenvolvimento floral e poucos atingem a fase pós-secretora em flores em pós-antese. Os de *G. axillaris* são exceção e secretam apenas durante os primeiros estádios do desenvolvimento do botão floral, sendo observados em fase pós-secretora nas flores adultas (Fig. 21). Todos os coléteres analisados são persistentes e matêm sua forma. Na fase pós-secretora, o

citoplasma das células epidérmicas não se cora pela safranina e os núcleos são observados em posição basal ou mediana (Fig. 21, 25-26).

Em *O. banksii* subsp. *banksii*, além dos coléteres calicinais, o ápice das bractéolas é modificado em coléter (Fig. 27-28). Este ápice secretor possui características semelhantes a dos coléteres calicinais. A epiderme secretora é composta por uma camada de células em paliçada e o seu protoplasto possui as mesmas características do das demais células dos coléteres descritos. Entretanto, a superfície secretora é maior na face adaxial da bractéola e alguns tricomas tectores são observados na face oposta. O parênquima deste coléter não é secretor e o feixe vascular da bractéola não se prolonga no coléter (Fig. 27-28).

Os coléteres calicinais de *A. curassavica*, *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* produzem uma secreção heterogênea composta por mucilagem e lipídios, enquanto os de *G. axillaris* exsudam apenas mucilagem (Tabela 1). Grãos de amido são observados nas células epidérmicas, mas são mais abundantes no parênquima dos coléteres das quatro espécies (Fig. 33). Hifas de fungos estão presentes em grande quantidade no cálice das flores adultas de *G. axillaris* (Fig. 2) e ausentes nas flores das demais espécies (Fig. 3-5).

#### Tricomas glandulares (Fig. 6, 36-43)

As flores de *M. denticulata* também possuem tricomas glandulares (Fig. 6). Estes tricomas formam-se no início da diferenciação dos ramos florais (Fig. 36) e podem ser distinguidos dos não glandulares pelo formato cônico da célula apical ainda em fase meristemática (Fig. 37). Eles ocorrem apenas no pedicelo e superfície abaxial do cálice (Fig. 6, 38).

Eles são multicelulares, unisseriados, com uma célula secretora apical (Fig. 6, 39, 41, 43). O pedúnculo é composto por quatro células (Fig. 39, 41), cujas paredes lignificam-se na maturidade (Fig. 40). A célula secretora possui uma base dilatada e um ápice acuminado (Fig. 6, 39, 41, 43). O citoplasma tem aspecto denso e a secreção está presente em toda a célula (Fig. 39, 41). Cristais (Fig. 42) são produzidos na porção dilatada da célula secretora e ocupam uma posição subapical na porção afilada sob o ápice que é arredondado (Fig. 41), região preferencial de ruptura. A secreção é composta por aminoácidos e/ou proteínas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados da aplicação dos testes histoquímicos em coléteres calicinais de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**) e tricomas glandulares de *M. denticulata* (+ = presente; - = ausente; **NR** = não realizado).

Tratamento histoquímico	Substância a ser detectada	Coléteres de Ac, Md e Ob (Figuras)	Coléteres de Ga (Figuras)	Tricomas de Md (Figuras)
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+ (29)	+	-
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	(30-31)	+	-
reação PAS	polissacarídeos totais	+ (32)	+	-
reagente de Lugol	amido	+ (33)	+	-
preto de amido B	proteínas	NR	NR	+ (43)
preto de Sudão B	lipídios totais	+ (34)	-	-
Sudão IV	lipídios totais	+	-	-
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	+ (35)	-	-
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-	-
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	-	-	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	-	-	-
reagente de Dragendorff	alcalóides	-	-	NR
reagente de Wagner	alcalóides	-	-	NR

## ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-6.** Eletromicrografias de varredura dos coléteres calicinais e tricomas glandulares de espécies de Asclepiadeae. Flores adultas. **1-2.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **1.** Vista geral do cálice. **2.** Pormenor da figura 1. Notar presença de hifas de fungos **3.** *Asclepias curassavica* L. Flor seccionada longitudinalmente. **4,6.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **5.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **4-5.** Coléteres. **6.** Tricomas glandulares no pedicelo.



Figuras 7-12. Ontogênese dos coléteres calicinais de espécies de Asclepiadeae. Botões florais envoltos pelo cálice seccionados longitudinalmente. 7,11. *Asclepias curassavica* L.
8-9. *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (Pt = pétala; Se = sépala). 10. *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. 12. *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. Barras: 7. 25 μm; 8. 75 μm; 9-12. 30 μm.



**Figuras 13-19.** Distribuição e número dos coléteres calicinais de espécies de Asclepiadeae. **13-15.** *Asclepias curassavica* L. **16-17**. *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **18**. *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **19**. *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **13-19**. Secções transversais. **14-15**. Porções mediana e apical de um coléter bífido. **16**. Inserção dos coléteres alternos próximo à base das sépalas. **Se** = sépala; **Tc** = tubo da corola. **Barras: 13,18-19**. 300  $\mu$ m; **14-15**. 150  $\mu$ m; **16**. 250  $\mu$ m; **17**. 75  $\mu$ m.



**Figuras 20-24.** Estrutura dos coléteres calicinais de espécies de Asclepiadeae. Flores adultas seccionadas longitudinalmente. **20**. *Asclepias curassavica* L. **21**. *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **22**. *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **23-24**. *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **20,22-24**. Coléteres em fase secretora. **21**. Coléter em fase pós-secretora. **24**. Pormenor da figura 23. Notar espaços extraprotoplásticos (**cabeça de seta**) na porção distal das células epidérmicas secretoras. **Barras: 20-21.** 50 μm; **22-23**. 75 μm; **24**. 30 μm.



**Figuras 25-28.** Coléteres calicinais e bracteolar de espécies de Asclepiadeae. **25.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **26-28.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **25-28.** Secções longitudinais. **25-26.** Senescência dos coléteres calicinais. **27-28.** Ápice da bractéola modificado em coléter. **28.** Pormenor da figura 27. **Barras: 25,28.** 50 μm; **26-27.** 75 μm.



**Figuras 29-35.** Testes histoquímicos realizados em coléteres calicinais de espécies de Asclepiadeae. **29,34-35**. *Asclepias curassavica* L. **30-31**. *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **32-33**. *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **29-31,34-35**. Secções longitudinais. **32-33**. Secções transversais. **29**. Vermelho de rutênio. **30-31**. Ácido tânico e cloreto férrico. **32**. Reação PAS. **33**. Azul de astra, safranina e reagente de Lugol. **34**. Preto de Sudão B. **35**. Sulfato azul do Nilo. **Barras: 29-30,32**. 75 μm; **31,34**. 50 μm; **33,35**. 30 μm.



**Figuras 36-43.** Ontogênese, estrutura e histoquímica dos tricomas glandulares florais de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. Secções longitudinais. **36-37.** Formação dos tricomas próximo ao ápice do ramo floral. **37.** Pormenor da figura 36. **38.** Distribuição dos tricomas no pedicelo e face abaxial da sépala. **39,41.** Detalhe dos tricomas glandulares. **40,42.** Tricomas observados sob luz polarizada. **43.** Preto de amido B. **Barras: 36.** 75 μm; **37,39-43.** 30 μm; **38.** 250 μm.


#### Discussão

Coléteres calicinais estão presentes em espécies das cinco subfamílias de Apocynaceae: Rauvolfioideae Kostel., Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R.Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R.Br. ex Burnett (Endress & Bruyns 2000). Na subfamília Asclepiadoideae, esses coléteres já foram observados em 26 gêneros das três tribos (Endress & Bruyns 2000): *Acerates* (*= Asclepias*), *Asclepias, Blepharodon, Calotropis, Ceropegia, Cosmostigma, Cynanchum, Daemia* (*= Pergularia*), *Dischidia, Ditassa, Dregea, Fischeria, Gonioanthela, Grisebachiella* (*= Astephanus*), *Holostemma, Marsdenia, Matelea, Oianthus* (*= Heterostemma*), *Oxypetalum, Oxystelma, Pentatropis, Peplonia, Pergularia, Sarcostemma, Schubertia, Stapelia, Stephanotis* (*= Marsdenia*), *Telosma* e *Tylophora* (Frye 1902; Woodson 1935, 1954; Metcalfe & Chalk 1950; Rao & Ganguli 1963b; Tiagi & Dixit 1965; Valente *et al.* 1973; Silva *et al.* 1975; Valente 1977, 1980, 1983, 1984, 1995; Arekal & Ramakrishna 1980; Pereira & Schwarz 1983; Konta *et al.* 1986; Murphy 1986; Konta & Kitagawa 1989; Kuriachen & Dave 1989; Thomas 1991; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006).

Os coléteres calicinais de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* formam-se precocemente em botões ainda envoltos pelo cálice. Coléteres em atividade secretora já são encontrados em alguns destes botões. Coléteres calicinais formados no início do desenvolvimento floral e em atividade secretora também foram descritos em *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio 2001) e *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. (Demarco 2005).

Os coléteres ocorrem alternos às sépalas, solitários em *G. axillaris* e *M. denticulata* e agrupados de um a dois em *A. curassavica* e de um a três em *O. banksii* subsp. *banksii*. Segundo Woodson e Moore (1938), os coléteres calicinais podem ser alternos, opostos ou contínuos às sépalas. Em Asclepiadoideae, todos os coléteres calicinais descritos até o momento são alternos (Endress & Bruyns 2000), exceto em *Oxystelma esculentum* R.Br., onde eles são opostos (Rao & Ganguli 1963b). Em todas as espécies de *Asclepias* estudadas por Frye (1902), há de um a seis coléteres alternos às sépalas, que variam em número e tamanho até em uma mesma flor; a presença de coléteres alternos já havia sido registrada em *A. curassavica* (sob "squamellae"; Tiagi & Dixit 1965) e *Oxypetalum banksii* (sob "emergências glandulares"; Valente 1977, 1980), mas não foi observada variação de

número destes coléteres, como no presente estudo. Todas as espécies de *Gonioanthela* descritas até o momento e a maioria das de *Matelea* possuem apenas um coléter alterno às sépalas (Silva *et al.* 1975; Stevens 1975,1988; Pereira & Schwarz 1983; Valente 1995), da mesma forma que *G. axillaris* e *M. denticulata*.

A ocorrência de coléteres na base de brácteas e bractéolas é comum em espécies de Apocynaceae (Frye 1902; Ramayya & Bahadur 1968; Valente *et al.* 1973; Thomas & Dave 1989b, 1991; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Rio 2006; Marasca 2008). *O. banksii* possui, além destes coléteres que ocupam posição basal (Valente *et al.* 1971), o ápice da bractéola transformado em coléter. As características das células epidérmicas secretoras e parenquimáticas não secretoras são as mesmas das dos coléteres calicinais; entretanto, a superfície secretora é menor e com alguns tricomas tectores na face abaxial. O feixe vascular da bractéola é interrompido na base do coléter, não estando presente na região secretora. Registro deste tipo de modificação do ápice da bractéola em coléter é inédito para a família.

Embora os coléteres calicinais tenham sido considerados de importância taxonômica por terem posição, forma e número suficientemente constantes (Woodson & Moore 1938), os coléteres de *A. curassavica* podem ser íntegros ou bífidos e variar em número em uma mesma flor, assim como o número de coléteres de *O. banksii* subsp. *banksii*. Variação de número já foi registrada em flores de outras espécies de Apocynaceae (Rao & Ganguli 1963b; Demarco 2005; Rio 2006; Simões *et al.* 2006).

Os coléteres de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* são amarelos, achatados dorso-ventralmente, não vascularizados e persistentes. Os de *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* são pedunculados e os de *M. denticulata* são sésseis. De acordo com a descrição geral dos coléteres da família, eles são do tipo padrão (pedunculados; Thomas 1991); entretanto, coléteres calicinais sésseis já foram registrados anteriormente em *Tabernaemontana* (Ramayya & Bahadur 1968), *Prestonia* (Rio 2001), *Blepharodon* (Demarco 2005), *Forsteronia* (Rio 2006) e *Mesechites* (Simões *et al.* 2006) e coléteres ramificados foram descritos em *Blepharodon*, *Ceropegia, Cryptolepis, Forsteronia, Holarrhena, Mandevilla* e *Prestonia* (Rao & Ganguli 1963a,b; Rio 2001; Demarco 2005; Rio 2006; Simões *et al.* 2006). Embora os coléteres calicinais de Apocynaceae normalmente sejam desprovidos de vascularização (Woodson & Moore 1938), coléteres vascularizados já foram observados em *Funtumia, Strophanthus* (Woodson & Moore 1938), *Holarrhena, Vallaris, Wrightia* (Rao & Ganguli 1963a), *Aganosma* (Dave *et al.* 1987) e *Nerium* (Thomas & Dave 1989b). Em Asclepiadoideae, todos os coléteres descritos são avascularizados (Rao & Ganguli 1963b; Tiagi & Dixit 1965; Valente 1977,1984,1995; Demarco 2005; Valente & Costa 2005).

Os coléteres permanecem em atividade secretora durante todo o desenvolvimento floral, excetuando *G. axillaris*, e mantêm sua forma durante a fase pós-secretora em flores em pós-antese. A secreção é acumulada em um espaço extraprotoplástico antes de ser liberada para o exterior através da parede e cutícula, sem rompê-las; ao contrário do modo comumente descrito de liberação desta secreção (Kuriachen & Dave 1989; Fahn 1990). Os coléteres calicinais das Apocynaceae são persistentes e são encontrados no cálice na base dos frutos das espécies da família (Thomas 1991; Thomas & Dave 1981,1994).

A secreção dos coléteres de *G. axillaris* é composta exclusivamente por mucilagem, enquanto a dos coléteres de *A. curassavica, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*, é composta por mucilagem e lipídios totais. Há pouca informação sobre a composição da secreção dos coléteres de Apocynaceae e a grande maioria refere-se à secreção dos coléteres vegetativos. Dentre os diferentes compostos detectados, destaca-se a mucilagem como a principal (Mohan & Inamdar 1986; Thomas *et al.* 1989; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Marasca 2008; capítulo 2), além de lipídios (Mohan & Inamdar 1986; Kuriachen & Dave 1989; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b; capítulo 2), incluindo ácidos graxos, compostos fenólicos (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008), alguns açúcares (Dave *et al.* 1987; Thomas & Dave 1989b, 1990; Thomas *et al.* 1989) e proteínas (Mohan & Inamdar 1986; Thomas (Mohan & Inamdar 1986; Contex (Dave *et al.* 1987; Thomas & Dave 1989b, 1990; Thomas *et al.* 1989). As "emergências glandulares" de *O. banksii* subsp. *banksii* foram identificadas como nectários por Valente (1977); entretanto, o presente trabalho provou que estas estruturas são coléteres e que exsudam mucilagem e lipídios totais.

A composição da secreção dos coléteres calicinais das quatro espécies estudadas é semelhante à dos foliares nas respectivas espécies (capítulo 2), mas em *Blepharodon* 

*bicuspidatum*, os coléteres foliares secretam mucilagem e compostos fenólicos lipossolúveis, enquanto os calicinais secretam mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos lipossolúveis (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008). Não foi possível identificar a classe química dos lipídios detectados no presente estudo; o resultado do teste para ácidos graxos foi negativo, assim como para compostos fenólicos, e a sua constituição pode ser terpênica.

Grãos de amido foram encontrados na epiderme e no parênquima dos coléteres, assim como observado nos coléteres vegetativos destas espécies (capítulo 2). Amido também foi detectado no interior das células secretoras em *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986), *Alstonia scholaris* L. e *Nerium indicum* Mill. (hoje *N. oleander* L.; Thomas & Dave 1989a,b); *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*; Appezzato-de-Glória & Estelita 2000), e no parênquima em *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989a).

A função dos coléteres é proteger os meristemas (Thomas 1991). A presença de mucilagem na secreção impede o dessecamento das regiões meristemáticas florais e a presença de lipídios impede a proliferação de fungos. Aparentemente, a secreção dos coléteres no início do desenvolvimento dos botões florais tem como principal função evitar o dessecamento; posteriormente, sua função é a de evitar a proliferação de microorganismos, uma vez que os coléteres estão confinados entre o cálice e a corola e sua atividade secretora permanece durante todo o desenvolvimento floral. Esta função é exclusivamente mucilaginoso, e pela presença de fungos nas flores adultas.

Tricomas glandulares têm ocorrência restrita em Apocynaceae e foram registrados apenas em oito gêneros de Asclepiadoideae (Solereder 1908; Woodson 1941; Metcalfe & Chalk 1950; Stevens 1975, 1988; Morillo 1998). Em *Matelea*, eles estão presentes nos órgãos vegetativos e florais (Stevens 1975, 1988) e foram localizados no pedicelo e na face abaxial das sépalas de *M. denticulata*. A distribuição restrita destes tricomas é a mesma observada em diversas espécies deste gênero (Stevens 1975, 1988).

Os tricomas de *M. denticulata* são multicelulares unisseriados com uma célula secretora apical que possui uma base dilatada e um ápice acuminado. Estes tricomas secretam exclusivamente aminoácidos e/ou proteínas e são semelhantes em estrutura e

secreção aos tricomas dos órgãos vegetativos desta mesma espécie (capítulo 5). Stevens (1975) descreveu os tricomas glandulares de *Matelea* como sendo menores que os tectores, com pedúnculo curto, porção mediana dilatada e um apículo curto.

Estes tricomas assemelham-se em alguns aspectos às células secretoras das emergências urticantes, as quais são alongadas com uma constrição logo abaixo do ápice e uma base bulbosa. O ápice rompe com o contato e a célula em forma de espinho penetra a pele injetando seu conteúdo (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1974). O ápice do tricoma de *M. denticulata* possui uma constrição sob um ápice arredondado, como observado em *Urtica dioica* L. e *Cnidoscolus* (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1974). Nenhuma reação alérgica ou irritante ocorreu durante as coletas.

As estruturas urticantes sempre são relacionadas à função de defesa (Pollard & Briggs 1984), causando desde uma irritação na pele até a morte, dependendo da espécie de planta e do animal (Thurston & Lersten 1969; Fahn 1979). Estas reações são causadas por diversos compostos presentes na secreção, dentre eles destacam-se como principais: acetilcolina, histamina e serotonina (Thurston & Lersten 1969; Lookadoo & Pollard 1991).

#### Conclusões

As flores de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possuem coléteres calicinais alternos às sépalas, que se formam no início do desenvolvimento floral. Eles são pedunculados em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* e sésseis em *M. denticulata*. Os coléteres são achatados dorsoventralmente, persistentes e avascularizados em todas as espécies, mas coléteres bífidos também são encontrados em flores de *A. curassavica*. O número de coléteres é constante em *G. axillaris* e *M. denticulata*, mas variável em *A. curassavica* e *O. banksii* subsp. *banksii*. A porção secretora é composta por epiderme secretora unisseriada em paliçada e parênquima não secretor. A secreção é composta por mucilagem nos coléteres de *G. axillaris* e por mucilagem e lipídios em *A. curassavica, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* 

formados no ápice do ramo floral, são multicelulares, com uma célula secretora apical com base dilatada e um ápice acuminado. O pedúnculo lignifica na maturidade e pequenos cristais são encontrados próximo ao ápice da célula secretora, formando um local preferencial de ruptura sob ação mecânica. A secreção é composta por aminoácidos e/ou proteínas com provável função de defesa contra herbivoria.

#### Referências bibliográficas

AGRAWAL, AA & FISHBEIN, M 2006 Plant defense syndromes. Ecology 87:S132-S149.

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. Phytomorphology 30:303-306.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CASTRO, M de M & DEMARCO, D 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s./.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DEMARCO, D; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2006 Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.

- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanishe Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FEDERICI, E; GALEF, C & NICOLETTI, M 1988 Constituents of *Araujia sericifera*. Journal of Natural Products 51:189-190.
- FISHER, DB 1968 Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- FRYE, TC 1902 A morphological study of certain Asclepiadaceae. Botanical Gazette 34:389-413.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GOMES, SM 2006 Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae *s.l.* Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- GOMES, SM; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2008 Hemisincarpia e nectário apendicular enfocados através de ontogênese floral em *Mandevilla velame* (A. St.-Hil.)
   Pichon, Apocynoideae. Revista Brasileira de Botânica 31:81-93.

GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.

HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.

- HOFMANN, U & SPECHT, AK 1986 Der morphologische Charakter der Asclepiadaceencorona. Beiträge zür Biologie der Pflanzen 61:79-85.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.

JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.

- KONTA, F & KITAGAWA, J 1989 Taxonomic notes of Asclepiadaceae in Thailand. I. The floral morphology of *Dischidia raffresiana* Wall., *Marsdenia glabra* Cost. and *Secamone ferruginea* Pierre ex Cost. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 40:125-132.
- KONTA, F; SUDA, T & KOBAYASHI, C 1986 A preliminary study on the floral morphology of *Cynanchum* (Asclepiadaceae). Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 37:59-68.
- KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. Plant Systematics and Evolution 176:227-253.
- KUNZE, H 1995 Floral morphology of some Gonolobeae (Asclepiadaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik 117:211-238.
- KUNZE, H 1997 Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). Flora 192:175-183.
- KUNZE, H 1998 Floral structure and pollination biology in *Matelea lanata* (Asclepiadaceae). Asklepios 75:23-27.
- KUNZE, H 2005 Morphology and evolution of the corolla and corona in the Apocynaceae *s.l.* Botanische Jahrbücher für Systematik 126:347-383.
- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (Asclepiadaceae). Plant Systematics and Evolution 178:95-105.
- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.

- LIEDE, S & KUNZE, H 1993 A descriptive system for corona analysis in Asclepiadaceae and Periplocaceae. Plant Systematics and Evolution 185:275-284.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- LOOKADOO, SE & POLLARD, AJ 1991 Chemical contents of stinging trichomes of *Cnidoscolus texanus*. Journal of Chemical Ecology 17:1909-1916.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- MORILLO, G 1998 *Matelea gracieae* Morillo, a new species from French Guiana, and *Cynanchum gortsianum* Morillo, a new record for Suriname. Brittonia 50:296-300.
- MURPHY, H 1986 A revision of the genus *Fischeria* (Asclepiadaceae). Systematic Botany 11:229-241.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.
- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1983 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. XX. Uma nova espécie de *Gonioanthela* Malme. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:71-74.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- POLLARD, AJ & BRIGGS, D 1984 Genecological studies of *Urtica dioica* L. III. Stinging hairs and plant-herbivore interactions. New Phytologist 97:507-522.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.

- RAO, VS & GANGULI, A 1963a Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963b The floral anatomy of some Asclepiadaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (B) 57:15-44.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom.
  cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia,
  Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.
- SCHNEPF, E; WITZIG, F & SCHILL, R 1979 Über Bildung und Feinstruktur des Translators der Pollinarien von *Asclepias curassavica* und *Gomphocarpus fruticosus* (*Asclepiadaceae*). Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 25:1-33.
- SENNBLAD, B; ENDRESS, ME & BREMER, B 1998 Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. American Journal of Botany 85:1143-1158.
- SERBANESCU-JITARIU, G & TARNAVSCHI, IT 1976 Observations regarding the structure of the pollinaria of some representatives of the family Asclepidaceae. Bulletin de la Société d'Historie Naturelle de l'Afrique du Nord 67:19-41.
- SILVA, NMF; VALENTE, M da C; ALENCASTRO, FMMR; PEREIRA, JF & SUCRE, BD 1975 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. X. Estudos taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35:745-756.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- SIMÕES, AO; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 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. English translation by L.A. Boodle and F.E. Fritsch, 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- STEVENS, WD 1975 Notes on the genus *Matelea* (Apocynaceae s.l.). Phytologia 32:387-406.
- STEVENS, WD 1988 A synopsis of *Matelea* subg. *Dictyanthus* (Apocynaceae: Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 75:1533-1564.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.
- SVENDSEN, AB & VERPOORTE, R 1983 Chromatography of alkaloids. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- SWARUPANANDAN, K; MANGALY, JK; SONNY, TK; KISHOREKUMAR, K & CHAND BASHA, S 1996 The subfamilial and tribal classification of the family Asclepiadaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 120:327-369.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). Phyton (Annales Rei Botanicae) 30:209-212.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1991 Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Repertorium 102:23-28.

- THOMAS, V & DAVE, Y 1994 Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 63:9-20.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.
- THURSTON, EL 1974 Morphology, fine structure, and ontogeny of the stinging emergence of *Urtica dioica*. American Journal of Botany 61:809-817.
- THURSTON, EL & LERSTEN, NR 1969 The morphology and toxicology of plant stinging hairs. The Botanical Review 35:393-412.
- TIAGI, B & DIXIT, G 1965 Studies in the floral anatomy of some Asclepiadaceae. Bulletin of the Botanical Society of Bengal 19:111-123.
- VALENTE, M da C 1977 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Estudo da anatomia e vascularização (Asclepiadaceae). Rodriguésia 29:161-283.
- VALENTE, M da C 1980 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. et Val., comb. nov. – vascularização floral. Rodriguésia 32:81-98.
- VALENTE, M da C 1983 Vascularização floral em *Peplonia nitida* Decaisne (Asclepiadaceae). Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:55-62.
- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C 1995 Matelea maritima subsp. ganglinosa (Vell.) Font. Anatomia e vascularização floral (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 33:75-98.
- VALENTE, M da C & COSTA, CG 2005 Estudo anatômico da flor de *Marsdenia loniceroides* E. Fournier (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Rodriguésia 56:51-66.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1971 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. VII. Estudos taxonômico e anatômico de: *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. et Val., comb. nov. Anais da Academia Brasileira de Ciências 43:177-189.

- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1973 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. IX Estudos taxonômico e anatômico de: *Oxypetalum appendiculatum* Mart., *Oxypetalum pilosum* Gardn. e *Oxypetalum sublanatum* Malme. Anais da Academia Brasileira de Ciências 45:121-149.
- VALENTE, M da C & SILVA, NMF da 1983 Vascularização floral em *Barjonia erecta* (Vell.) Schum. (Asclepiadaceae). Boletim do Museu Botânico Municipal 59:1-14.
- VALENTE, M da C & SILVA, NMF da 1984 Anatomia floral de *Barjonia erecta* (Vell.) Schum. (Asclepiadaceae). Rodriguésia 36:95-106.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae), na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002 *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*: a taxon of Asclepiadaceae with an extragynoecial compitum. Plant Systematics and Evolution 233:199-206.
- VOGEL, S 1990 The role of scent glands in pollination. On the structure and function of osmophores. Washington, Smithsonian Institution Libraries.
- WOODSON, RE Jr 1935 The floral anatomy and probable affinities of the genus *Grisebachiella*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 62:471-478.
- WOODSON, RE Jr 1941 The North American Asclepiadaceae. I. Perspective of the genera. Annals of the Missouri Botanical Garden 28:193-244.
- WOODSON, RE Jr 1954 The North American species of *Asclepias* L. Annals of the Missouri Botanical Garden 41:1-211.
- WOODSON, RE Jr & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.

### Capítulo 7

## Estruturas secretoras internas de defesa das flores de Asclepiadeae: laticíferos e idioblastos

#### Introdução

Os laticíferos são estruturas características das Apocynaceae, ocorrendo em todos os representantes da família tanto em órgãos vegetativos (Metcalfe & Chalk 1950) quanto em reprodutivos (Rao & Malaviya 1966; Valente 1977, 1984, 1995; Eilert *et al.* 1985; Murugan & Inamdar 1987a,b; Kuriachen & Dave 1989; Dave & Kuriachen 1991; Kuriachen *et al.* 1990, 1991, 1992; Thomas & Dave 1991, 1994; Aguiar 2003; Valente & Costa 2005; Demarco *et al.* 2006; Rio 2006; Marasca 2008; capítulos 3 e 4). Embora existam muitos estudos anatômicos sobre laticíferos de órgãos vegetativos de espécies de Apocynaceae, poucos investigaram os órgãos reprodutivos. A maioria destes trabalhos apenas cita a sua ocorrência e distribuição e os identifica como não articulados sem analisar a sua ontogênese (Rao & Malaviya 1966; Valente 1977, 1995; Murugan & Inamdar 1987a,b; Kuriachen & Dave 1989; Dave & Kuriachen 1991; Kuriachen *et al.* 1990, 1991, 1992; Thomas & Dave 1966; Valente 1977, 1995; Murugan & Inamdar 1987a,b; Kuriachen & Dave 1989; Dave & Kuriachen 1991; Kuriachen *et al.* 1990, 1991, 1992; Thomas & Dave 1989; Dave & Kuriachen 1991; Kuriachen *et al.* 2006, 1991, 1992; Thomas & Dave 1989; Dave & Kuriachen 1991; Kuriachen *et al.* 2006).

As paredes dos laticíferos têm características particulares que as distinguem das demais células vegetais. Diferenças quanto à sua composição em relação às células adjacentes e ao longo do seu desenvolvimento já foram detectadas em estudos anatômicos e imunocitoquímicos (Fahn 1979; Serpe *et al.* 2001, 2002; Demarco *et al.* 2006). O látex é o próprio protoplasto do laticífero (Demarco *et al.* 2006) e geralmente é branco leitoso nas espécies de Apocynaceae, mas látex avermelhado, amarelado e esverdeado também já foram registrados (Solereder 1908; Endress & Bruyns 2000). O látex presente nos órgãos reprodutivos tem as mesmas funções de proteção que nos órgãos vegetativos, mas sua composição foi pouco estudada até o momento (Rao & Malaviya 1966; Eilert *et al.* 1985; Murugan & Inamdar 1987b; Kuriachen *et al.* 1992).

Os laticíferos do ovário de *A. curassavica* e das flores de *O. banksii* subsp. *banksii* foram anteriormente identificados como não articulados (Valente 1977; Kuriachen *et al.* 1991); a ontogênese e identificação do seu tipo são reavaliadas. Embora os laticíferos estejam presentes em todas as Apocynaceae, alguns gêneros também possuem outras estruturas internas de defesa. Idioblastos secretores já foram registrados em gêneros de Apocynaceae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Baas & Gregory 1985; Demarco 2005; Rio 2006). Quase todos os registros referem-se a órgãos vegetativos, havendo pouca informação sobre os idioblastos florais das espécies da família, podendo-se citar como um dos únicos, o estudo desenvolvido por Rio (2006) em flores de espécies de *Forsteronia*.

O objetivo do presente estudo é descrever a estrutura e distribuição dos laticíferos e idioblastos presentes em flores de *Asclepias curassavica* L., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. A ontogênese e composição das paredes e secreção de ambas as estruturas são analisadas e diversos testes histoquímicos, realizados.

#### Material & métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de setembro de 2006 a fevereiro de 2007. Três indivíduos de *A. curassavica* foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50' 14,2"W) e na praia da Fazenda (23°21'33,7"S/44°51'0,37"W); três de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W) e na trilha do Noelo (23°20'53,1"S/44°51' 00,9"W); dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23°21'02,4"S/44°51'05,4"W; 23°20'55,3"S/44°51'01,5"W) e dois de *O. banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°21'24,0"S/44°50'14,7"W; 23°21'34,5"S/44°51'02,1"W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos florais de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* foram cortados com lâmina aquecida para manter o látex no interior dos laticíferos

(Milanez 1960/1961), fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Diversos estádios do desenvolvimento floral foram selecionados para o estudo da ontogênese das glândulas florais, desde o início da formação do botão junto aos ápices dos ramos até a flor adulta em pós-antese. Os diversos botões e flores foram isolados, desidratados em série butílica (Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 10 a 18  $\mu$ m.

Para o estudo estrutural e ontogenético, as secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética. Algumas secções foram coradas com a tripla coloração de Flemming (Johansen 1940) e outras, observadas sob luz polarizada para auxiliar na análise da composição das paredes dos laticíferos e idioblastos. Para o estudo histoquímico, diferentes tratamentos foram realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes das paredes dos laticíferos e idioblastos, do látex e da secreção dos idioblastos; são eles: vermelho de rutênio para pectinas e mucilagens ácidas (Johansen 1940; Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), reagente de Lugol para amido (Johansen 1940), azul de anilina (C.I. 42755) para calose (Smith & McCully 1975), Calcofluor white (C.I. 40621) para celulose (Hughes & McCully 1975), preto de amido B (C.I. 20470) para proteínas (Fisher 1968), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), reagente de Nadi para óleos essenciais e oleoresinas (David & Carde 1964), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), floroglucina acidificada para lignina (Johansen 1940), reagentes de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas do teste com preto de amido B foram montadas em resina sintética e as demais, em gelatina glicerinada.

Botões florais foram mantidos por 48 h à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e receberam o mesmo tratamento das demais flores. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

Duas estruturas secretoras internas de defesa estão presentes nas flores das espécies investigadas: laticíferos e idioblastos (Fig. 1-45).

#### Laticíferos (Fig. 1-32)

A ontogênese e estrutura dos laticíferos das flores são semelhantes em *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*. O laticífero se diferencia no início da formação dos botões florais e, enquanto a maioria dos tecidos ainda é meristemática, eles já estão diferenciados e em estádio secretor (Fig. 1-8).

Eles são articulados anastomosados, formados pela constante adição de células (Fig. 1-8). A dissolução das paredes terminais é rápida e não é mais possível vê-las a poucas células de seu ápice, formando um sistema contínuo (Fig. 7). Mesmo em meio aos meristemas primários, as paredes dos laticíferos já estão espessadas (Fig. 1-8). O sistema laticífero pode ter origem a partir de células do meristema fundamental (Fig. 1-6, 8) e/ou do procâmbio (Fig. 1, 7-8). Eles só crescem em comprimento em regiões meristemáticas, por adição de novas células e, posteriormente, por alongamento celular. A anastomose lateral de células origina um sistema laticífero ramificado (Fig. 2, 7, 11); estas ramificações ocorrem no início do seu desenvolvimento e são observadas em todas as partes da flor. Eles atingem seu diâmetro máximo nos estádios iniciais do desenvolvimento dos botões florais.

Os laticíferos já apresentam secreção durante as fases iniciais de diferenciação (Fig. 1, 8). Os diferentes compostos produzidos pelos laticíferos são primeiramente observados sob a forma de pequenas vesículas (Fig. 9) que se fundem ao vacúolo central, que aumenta em volume, ocupando quase todo o lume celular e mantendo o citoplasma em posição parietal (Fig. 10). O látex corresponde ao próprio protoplasto do laticífero. As substâncias produzidas ocorrem tanto no vacúolo central quanto no citoplasma parietal e todo o seu conteúdo cora fortemente pela safranina (Fig. 10-12, 15). Os laticíferos são multinucleados devido à dissolução das paredes terminais (Fig. 13) e fusão dos protoplastos de diferentes células. Os núcleos inicialmente são esféricos (Fig. 13) e, posteriormente, tornam-se fusiformes (Fig. 14) pela compressão do citoplasma parietal. Cada núcleo possui de um a dois nucléolos (Fig. 13-14).

Os laticíferos permanecem vivos na maturidade e com a secreção em seu interior (Fig. 10-12, 15) que somente será liberada para o meio extracelular se o tecido for danificado; quando isto ocorre, o látex de todos os laticíferos interconectados extravasa. Eles estão presentes no parênquima e tecido vascular de todos os verticilos florais (Fig. 9-22) e foram observados no pedicelo (Fig. 15), sépala (Fig. 16), pétala (Fig. 17), estame (Fig. 18), corona (Fig. 19), estilete (Fig. 20) e demais partes do gineceu, exceto nos óvulos. No tecido vascular, eles ocorrem preferencialmente junto ao floema (Fig. 15). Ramificações foram encontradas em todos os verticilos; a maior concentração ocorre no receptáculo (Fig. 5) e provavelmente interconecta a maior parte dos laticíferos da flor.

O diâmetro dos laticíferos varia dependendo da região analisada. Em todas as espécies estudadas, os mais calibrosos são encontrados na medula do pedicelo (Fig. 15, 22).

A composição das paredes e do látex é semelhante em *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* (Tabelas 1 e 2). As paredes dos laticíferos são primárias, mais espessas que as paredes das demais células (Fig. 10, 15, 22) e possuem composição distinta. Nas porções jovens, coram em roxo pela tripla coloração de Flemming, enquanto as paredes das demais células coram em laranja (Fig. 21). Nas porções maduras, a composição das paredes dos laticíferos altera-se e passa a corar em laranja. Elas apresentam maior birrefringência que as paredes das células ao seu redor (Fig. 23) e fluorescem mais fortemente no teste para celulose (Fig. 24). Aparentemente, a

concentração de pectinas também é maior, especialmente nas regiões de adesão entre o laticífero e as células adjacentes (Fig. 25).

O látex de todas as espécies estudadas é branco leitoso *in vivo*. Os testes histoquímicos detectaram a presença de polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, compostos fenólicos e lipídios (Tabela 2).

Sinais de herbivoria não foram observados nos indivíduos estudados. Ao seccionar um órgão, imediatamente inicia o extravasamento do látex que, pouco tempo depois, coagula e sela o órgão injuriado.

#### Idioblastos (Fig. 33-45)

Idioblastos secretores estão presentes apenas nas flores de *G. axillaris*. Assim como os laticíferos, eles diferenciam-se no início do desenvolvimento dos botões florais e já possuem secreção nesta fase (Fig. 33).

Os idioblastos variam de quadrados a alongados (Fig. 35-37) e têm distribuição restrita. Eles foram encontrados apenas no pedicelo (Fig. 33-35), sépala (Fig. 36) e pétala (Fig. 34, 37). No pedicelo, eles ocupam a maior parte do córtex, cerca de quatro a cinco camadas de células abaixo da epiderme (Fig. 35). Na sépala, eles estão presentes junto à epiderme adaxial e abaxial por uma a três camadas de células (Fig. 36) e na pétala, sob à epiderme abaxial por duas a três camadas (Fig. 34, 37-38). Os idioblastos possuem um grande vacúolo central e a secreção ocorre sob a forma de gotas preferencialmente junto à parede (Fig. 35-37, 41, 43-45).

A parede dos idioblastos tem características particulares (Tabela 1). O teste para detecção de celulose mostra que suas paredes fluorescem mais fracamente que as paredes das demais células. Este teste também permitiu observar que as paredes dos idioblastos são trilamelares, tendo uma camada externa e uma interna celulósicas e uma mediana que não fluoresce (Fig. 39). A microscopia de polarização não permitiu observar esta peculiaridade e a birrefringência está ausente apenas na lamela média (Fig. 40). Com a utilização do Sudão IV, observou-se que a camada mediana que não fluoresce no teste para celulose tem composição lipídica (Fig. 42).

Na análise histoquímica, a secreção reagiu positivamente apenas nos testes para identificação de lipídios, que o reagente de NADI detectou como óleos essenciais (Tabela 2).

**Tabela 1.** Resultados dos testes para análise da composição da parede dos laticíferos de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**) e dos idioblastos de *G. axillaris* (+ = presente; - = ausente).

Tratamento histoquímico	Substância a ser _ detectada	Laticíferos (Figuras)				Idioblastos
		Ac	Ga	Md	Ob	(Figuras)
vermelho de rutênio	pectina	+	+	+	+ (25)	+
reação PAS	polissacarídeos totais	+	+	+	+ (27)	+
Calcofluor white	celulose	+ (24)	+	+	+	+ (38-39)
azul de anilina	calose	-	-	-	-	-
preto de amido B	proteínas	+	+	+ (28)	+	+
Sudão IV	lipídios totais	-	-	-	-	+ (42)
floroglucina acidificada	lignina	-	-	-	-	-

**Tabela 2.** Resultados da aplicação dos testes histoquímicos para identificação das principais classes de metabólitos que compõem o látex de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**) e a secreção dos idioblastos de *G. axillaris* (**+** = presente; **-** = ausente; **NR** = não realizado).

Tratamento	Substância a	<b>Látex</b> (Figuras)				Secreção dos
histoquímico	ser detectada	Ac	Ga	Md	Ob	<b>idioblastos</b> (Figuras)
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+	+	+	+ (25)	-
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	+	+	+ (26)	+	-
reação PAS	polissacarídeos totais	+	+	+	+ (27)	-
reagente de Lugol	amido	-	-	-	-	-
preto de amido B	proteínas	+	+	+ (28)	+	-
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	+	+	+	+ (29)	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	+	+	+	+	-
preto de Sudão B	lipídios totais	+	+ (30)	+	+	+ (43)
Sudão IV	lipídios totais	+	+	+ (31)	+	+ (41)
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	+	+ (32)	+	+	+ (44)
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-	-	-	-
Reagente de Nadi	óleos essenciais	NR	NR	MR	NR	+ (45)
reagente de Dragendorff	alcalóides	-	-	-	-	-
reagente de Wagner	alcalóides	-	-	-	-	-

# ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-8.** Ontogênese dos laticíferos de flores de espécies de Asclepiadeae. Botões em início de formação seccionados longitudinalmente. **1-2.** *Asclepias curassavica* L. **3-4.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **5-6.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **7-8.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **7.** Notar ramificação lateral formada por células procambiais. **seta** = parede terminal do laticífero. **Barras: 1-5,7-8.** 30 μm; **6.** 15 μm.



**Figuras 9-17.** Estrutura e distribuição dos laticíferos em flores de espécies de Asclepiadeae. **9,13.** *Asclepias curassavica* L. **12,17.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **16.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **10-11,14-15.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **9-10,14-15.** Secções transversais. **11-13,16-17.** Secções longitudinais. **9.** Laticífero jovem com pequenas vesículas com secreção. **10-12,14-17.** Laticíferos maduros. **10.** Laticífero com vacúolo central (**v**) e citoplasma parietal (**seta**). **11-12.** Látex preenchendo o lume dos laticíferos. **13.** Porção apical do laticífero com núcleo esférico. Notar parede terminal (**seta**). **14.** Núcleo fusiforme. **15.** Pedicelo. **16.** Sépala. **17.** Pétala. **Barras: 9-10,13.** 15 μm; **11-12.** 30 μm; **14.** 8 μm; **15.** 50 μm; **16.** 150 μm; **17.** 75 μm.



**Figuras 18-24.** Distribuição e características das paredes dos laticíferos de flores de espécies de Asclepiadeae. **21,24**. *Asclepias curassavica* L. **18,22-23**. *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **19**. *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **20**. *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **18**. Secção longitudinal. **19-24**. Secções transversais. **18**. Estame. **19**. Corona. **20**. Estilete. **21-24**. Pedicelo. **21**. Tripla coloração de Flemming. **22**. Azul de astra e safranina. **23**. Microscopia de polarização. **24**. Calcofluor white. **Barras: 18-20,24**. 75 μm; **21**. 15 μm; **22-23**. 30 μm.



**Figuras 25-32.** Testes histoquímicos realizados em laticíferos de flores de espécies de Asclepiadeae. **25,27,29.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **26,28,31**. *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **30,32**. *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **25-30,32**. Secções transversais. **25**. Vermelho de rutênio. **26**. Ácido tânico e cloreto férrico. **27**. Reação PAS. **28**. Preto de amido B. **29**. Cloreto férrico. **30**. Preto de Sudão B. **31**. Sudão IV. Secção longitudinal. **32**. Sulfato azul do Nilo. **Barras: 25,32**. 30 μm; **26-27,29-30**. 25 μm; **28,31**. 50 μm.



**Figuras 33-37.** Distribuição dos idioblastos florais de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **33-34,37.** Secções longitudinais. **35-36.** Secções transversais. **33.** Botão jovem. **34-37.** Flores adultas. **34.** Vista geral da flor em pré-antese. **35.** Pedicelo. **36.** Sépala. **37.** Pétala. **Barras: 33.** 250 μm; **34.** 300 μm; **35-37.** 75 μm.



**Figuras 38-45.** Características das paredes e histoquímica da secreção dos idioblastos de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. Secções transversais. **38-39.** Calcofluor white. Notar parede trilamelar (**seta**) **40.** Microscopia de polarização. **41-42.** Sudão IV. **42.** Notar lamela lipídica na parede dos idioblastos (**seta**). **43.** Preto de Sudão B. **44.** Sulfato azul do Nilo. **45.** Reagente de Nadi. **Barras: 38.** 150 μm; **39,42,45.** 10 μm; **40.** 15 μm; **41,43-44.** 25 μm.



#### Discussão

Os laticíferos das flores de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* são articulados anastomosados ramificados. Os laticíferos estão presentes em diversas famílias (Metcalfe 1967; Fahn 1979; Lewinsohn 1991) e ocorrem em todos os representantes de Apocynaceae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Metcalfe 1967). Eles têm sido descritos como não articulados nesta família (Rao & Malaviya 1966; Valente 1977, 1995; Murugan & Inamdar 1987a,b; Kuriachen & Dave 1989; Dave & Kuriachen 1991; Kuriachen *et al.* 1990, 1991, 1992; Thomas & Dave 1991, 1994; Valente & Costa 2005), embora a sua ontogênese não tenha sido estudada e haja relatos de fusão entre o laticífero e células adjacentes para formar ramificações (Rao & Malaviya 1966). Os laticíferos das flores de *Aspidosperma australe* Müll.Arg. e *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. são articulados anastomosados e formam um sistema ramificado (Demarco *et al.* 2006). Estudos anteriores dos laticíferos de flores de *A. curassavica* e de *O. banksii* subsp. *banksii* registraram-nos como não articulados (Valente 1977; Kuriachen *et al.* 1991); todavia, o estudo da ontogênese comprovou que eles são articulados anastomosados, assim como os laticíferos dos órgãos vegetativos (capítulo 3).

Os laticíferos só crescem em regiões meristemáticas por adição de novas células; a célula adicionada pode estar em posição apical ou lateral formando as ramificações dos laticíferos e do sistema laticífero como um todo. Este fato também foi observado em flores de outras espécies (Demarco *et al.* 2006).

O diâmetro dos laticíferos varia dependendo da região analisada e os da medula do pedicelo são os mais calibrosos. Variação de diâmetro já foi referida para laticíferos florais de outras espécies de Apocynaceae, como *A. australe, B. bicuspidatum, Plumeria alba* Linn., *Tabernaemontana coronaria* Willd., *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. (Rao & Malaviya 1966; Murugan & Inamdar 1987a,b; Demarco *et al.* 2006). Em *B. bicuspidatum, P. alba, V. solanacea*, os laticíferos mais calibrosos também são os medulares do pedicelo (Murugan & Inamdar 1987a,b; Demarco *et al.* 2006).

O látex está presente desde as porções jovens dos laticíferos dos botões florais de *A. curassavica*, *G. axillaris*, *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* e é constituído por todo o seu protoplasto; as diferentes substâncias produzidas pelo laticífero são encontradas tanto no citoplasma quanto no vacúolo. Inicialmente, pequenas vesículas com secreção
são observados no citoplasma que depois fundem-se ao vacúolo central, fazendo com que este aumente em volume e restrinja o citoplasma à uma fina camada parietal. A pressão exercida pelo aumento do vacúolo central faz com que os núcleos do laticífero tornem-se fusiformes. Da mesma forma, o citoplasma dos laticíferos de *Catharanthus roseus* (L.) G.Don possui abundantes vacúolos com gotas de secreção (Eilert *et al.* 1985) e núcleos alongados e fusiformes já foram registrados em outras espécies da família (Murugan & Inamdar 1987a,b; Demarco *et al.* 2006). O protoplasto multinucleado encontrado nos laticíferos, geralmente é considerado uma condição cenocítica resultante de repetidas divisões nucleares sem a formação de parede terminal (Murugan & Inamdar 1987a; Mahlberg 1993); entretanto, nas espécies estudadas e em *A. australe* e *B. bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006), o protoplasto multinucleado da fusão de células que são adicionadas ao sistema (condição sincicial).

Os laticíferos ocorrem no parênquima e tecido vascular de todos os verticilos florais das quatro espécies, estando ausentes apenas nos óvulos. Eles também foram observados no pedicelo, perianto e ovário de *Tabernaemontana coronaria* (Rao & Malaviya 1966), em praticamente todas as regiões da flor de *Plumeria alba* e *Vallaris solanacea* (Murugan & Inamdar 1987a,b) e no receptáculo, cálice, corola e ovário em *Forsteronia* (Rio 2006). Em flores de Asclepiadeae, laticíferos já foram registrados no ovário, placenta, estiletes e corona de *Ditassa eximia* Decne (Valente 1984), pedicelo, receptáculo, ovário, placenta, estilete, corola, corona de *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. e *O. banksii* subsp. *banksii* (Valente 1977,1995), receptáculo e carpelo de *Marsdenia loniceroides* E. Fournier (Valente & Costa 2005) e em todos os verticilos florais de *B. bicuspidatum* e *A. australe*, exceto nos óvulos de ambas as espécies e parênquima medular do pedicelo de *A. australe* (Demarco *et al.* 2006). Valente (1977) descreveu os laticíferos como raros na medula do pedicelo de *O. banksii* subsp. *banksii*, mas o presente estudo identificou abundantes laticíferos nesta região.

As paredes dos laticíferos podem ser tão finas ou mais espessas que a parede das células parenquimáticas (Mahlberg 1993). Em geral, elas são mais espessas, como observado no presente estudo e em outras espécies de Apocynaceae (Rao & Malaviya 1966; Murugan & Inamdar 1987a; Demarco *et al.* 2006; Rio 2006). Assim como registrado anteriormente por Demarco *et al.* (2006), a tripla coloração de Flemming permitiu verificar

uma mudança na composição da parede das porções jovens dos laticíferos em relação às porções maduras. Maior quantidade de pectinas e celulose também foi observada nas paredes dos laticíferos em relação às paredes das demais células. As paredes dos laticíferos geralmente são referidas como ricas em pectina (Fahn 1979).

O látex das espécies estudadas é branco leitoso *in vivo* e composto por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, compostos fenólicos e lipídios, possivelmente terpenos. Poucos estudos analisaram a composição do látex de órgãos reprodutivos. Carboidratos, aminoácidos, enzimas proteolíticas e bacteriolíticas e partículas orgânicas foram detectadas no látex de *Tabernaemontana coronaria* (Rao & Malaviya 1966), alcalóides em *Catharanthus roseus* (Eilert *et al.* 1985), proteínas e lipídios em *Vallaris solanacea* (Murugan & Inamdar 1987b), lipídios neutros em *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. e proteínas em *Prestonia riedelii* (Müll.Arg.) Markgr (Aguiar 2003). A composição da secreção de uma determinada glândula vegetativa não é necessariamente igual a da mesma glândula no órgão reprodutivo, como já observado em *Anacardium humile* St.Hil. e *Mangifera indica* L. (Joel & Fahn 1980a,b; Lacchia 2006) e os laticíferos das flores das espécies estudadas não produzem lipídios neutros, ácidos graxos e alcalóides, como detectado nos laticíferos dos órgãos vegetativos destas mesmas espécies (capítulo 4).

O látex pode desempenhar diversas funções, tais como proteção contra herbívoros, microorganismos e selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrell *et al.* 1991; Demarco *et al.* 2006; Castro & Demarco 2008; Pickard 2008). Alguns compostos detectados possuem estas propriedades, como os lipídios e compostos fenólicos que podem ser tóxicos e inibir a proliferação de microorganismos, além dos lipídios terem a capacidade de coagular, selando ferimentos ou funcionando como defesa física, pois as mandíbulas do inseto podem ficar aderidas entre si ou à planta (Dussourd 1990).

Idioblastos secretores foram registrados em órgãos vegetativos de espécies de Apocynaceae (Solereder 1908; Baas & Gregory 1985; Demarco 2005; Rio 2006). As diferentes secreções foram descritas como "semelhante à látex", óleo ou mucilagem e compostos fenólicos (Metcalfe & Chalk 1950; Baas & Gregory 1985). Embora os idioblastos possam estar presentes em diversos gêneros desta família, há pouca informação sobre esta estrutura secretora e ainda não é possível avaliar a sua real distribuição. Um dos

únicos trabalhos a estudar a distribuição e conteúdo dos idioblastos florais foi realizado em espécies de *Forsteronia* (Rio 2006). Nesse estudo, idioblastos foram encontrados em quase todas as peças florais e compostos fenólicos e ácidos graxos detectados em sua secreção.

Em Asclepiadoideae, idioblastos secretores foram registrados em *Leptadenia*, que pertence à tribo Ceropegieae, e em *Glossonema*, *Pentatropis* e *Solenostemma* posicionados em Asclepiadeae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Endress & Bruyns 2000). Nesta tribo, talvez haja um padrão de distribuição de idioblastos em órgãos vegetativos em nível de subtribo, pois *Glossonema* e *Solenostemma* são Glossonematinae e *Pentatropis* é Astephaninae, enquanto *Blepharodon* (Demarco 2005) e *Gonioanthela*, que não os possuem, são Metastelmatinae (Rapini *et al.* 2003). Entretanto, isto é válido apenas para órgãos vegetativos, pois *Blepharodon* também não possui idioblastos secretores florais (Demarco 2005) e, no presente estudo, idioblastos foram encontrados em flores de *Gonioanthela axillaris*.

Os idioblastos florais de *G. axillaris* variam de quadrados a alongados, têm paredes trilamelares, sendo a externa e a interna celulósicas e a mediana suberizada; a secreção ocorre sob a forma de gotas e é composta por óleos essenciais.

Idioblastos oleíferos foram registrados em 38 famílias de dicotiledôneas (Baas & Gregory 1985; Judd *et al.* 2002), incluindo 12 gêneros de Apocynaceae, nenhum deles pertencente à subfamília Asclepiadoideae. Os idioblastos encontrados no mesofilo de *Solenostemma argel* Hayne foram descritos como arredondados ou alongados, com paredes suberizadas e secreção amarela (Solereder 1908).

Idioblastos oleíferos "típicos" possuem paredes trilamelares, sendo a externa e a interna celulósicas e a mediana suberizada. Entretanto, nem sempre a lamela de suberina está presente (Postek & Tucker 1983). As gotas de óleo muitas vezes são armazenadas junto a protuberâncias da parede chamadas cúpulas, envoltas pela plasmalema (Fahn 1979; Baas & Gregory 1985).

Ao contrário dos osmóforos que são glândulas compostas por células epidérmicas ou subepidérmicas, histologicamente localizadas, multicelulares, que utilizam os materiais de reserva num curto período para produzir secreções voláteis e atrair polinizadores (Vogel 1990; Endress 1994), os idioblastos oleíferos de *G. axillaris* têm origem do meristema fundamental no início do desenvolvimento floral e apresentam secreção do botão à flor em

pós-antese, que não é liberada para o meio externo. Estes idioblastos ocupam a maior parte do córtex do pedicelo e são encontrados por uma a três camadas sob a epiderme das faces adaxial e abaxial das sépalas e abaxial das pétalas. Portanto, o óleo só será liberado caso as células sejam rompidas e sua provável função é de defesa. Até o momento, óleos voláteis com função de defesa foram estudados apenas em folhas (Paré & Tumlinson 1999).

#### Conclusões

As flores de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possuem como principal estrutura secretora interna de defesa o laticífero; entretanto, as flores de *G. axillaris* também possuem idioblastos secretores. Ambas as estruturas formamse no início do desenvolvimento floral. O estudo da ontogênese dos laticíferos das quatro espécies estudadas provou que eles são articulados anastomosados ramificados, formados a partir de células do meristema fundamental e/ou procâmbio, cujas paredes terminais dissolvem-se rapida e integralmente, não sendo observadas pouco abaixo de seus ápices. Eles estão presentes no pedicelo e em todos os verticilos florais e ausentes apenas nos óvulos. A composição de suas paredes altera-se durante o seu desenvolvimento e têm maior concentração de pectinas e celulose que as paredes das demais células. O látex apresenta polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, compostos fenólicos e lipídios. Os idioblastos de *G. axillaris* contêm óleos essenciais e estão presentes no pedicelo, cálice e corola. Suas paredes são trilamelares; as camadas externa e interna são celulósicas e a mediana suberizada. A secreção é produzida ao longo de todo o desenvolvimento floral e armazenada sob a forma de gotas principalmente junto às paredes.

#### Referências bibliográficas

AGUIAR, S 2003 Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- BAAS, P & GREGORY, M 1985 A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. Israel Journal of Botany 34:167-186.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CASTRO, M de M & DEMARCO, D 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- DAVE, Y & KURIACHEN, PM 1991 Comparative anatomical characters of Periplocaceae follicles and their taxonomic significance. Feddes Repertorium 102:63-68.
- DAVID, R & CARDE, JP 1964 Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du réactif nadi. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 258:1338-1340.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DEMARCO, D; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2006 Laticíferos articulados anastomosados novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.
- DUSSOURD, DE 1990 The vein drain; or, how insects outsmart plants. Natural History 90:44-49.
- EILERT, U; NESBITT, LR & CONSTABEL, F 1985 Laticifers and latex in fruits of periwinkle, *Catharanthus roseus*. Canadian Journal of Botany 63:1540-1546.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.

- FARRELL, BD; DUSSOURD, DE & MITTER, C 1991 Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.
- FISHER, DB 1968 Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- HUGHES, J & McCULLY, ME 1975 The use of an optical brightener in the study of plant structure. Stain Technology 50:319-329.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- JOEL, DM & FAHN, A 1980a Ultrastructure of resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). II. Resin secretion in the primary stem ducts. Annals of Botany 46:779-783.
- JOEL, DM & FAHN, A 1980b Ultrastructure of resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). III. Secretion of protein- polysaccharide mucilage in fruit. Annals of Botany 46:785-790.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.

JUDD, WS; CAMPBELL, CS; KELLOGG, EA; STEVENS, PF & DONOGHUE, MJ 2002 Plant

systematics: a phylogenetic approach. 2<sup>nd</sup> ed., Sunderland, Sinauer Associates.

- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structure and development of fruit wall ornamentations in *Pergularia daemia* (Forsk.) Chiov (Asclepiadaceae). Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences) 99:15-20.
- KURIACHEN, PM; DAVE, Y & THOMAS, V 1991 Development, structure and dehiscence of follicles of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. (Asclepiadaceae). Korean Journal of Botany 34:107-112.
- KURIACHEN, PM; THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Morpho-histogenic studies in the follicle of *Tylophora dalzellii* HK.F. Phytomorphology 40:349-357.
- KURIACHEN, PM; THOMAS, V & DAVE, Y 1992 Taxonomic and phylogenetic significance of fruit walls in Asclepiadaceae. Feddes Repertorium 103:179-193.
- LACCHIA, APS 2006 Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de espécies de Anacardiaceae: anatomia, histoquímica e ultra-estrutura. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- LEWINSOHN, TM 1991 The geographical distribution of plant latex. Chemoecology 2:64-68.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- MAHLBERG, PG 1993 Laticifers: an historical perspective. The Botanical Review 59:1-23.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- METCALFE, CR 1967 Distribution of latex in the plant kingdom. Economic Botany 21:115-127.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2 v., Oxford, Clarendon Press.

214

- MILANEZ, FR 1960/1961 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia* grandiflora - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae). Rodriguésia 35/36:99-128.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences) 97:25-31.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.
- PARÉ, PW & TUMLINSON, JH 1999 Plant volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiology 121:325-331.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.
- PICKARD, WF 2008 Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. New Phytologist 177:877-888.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- POSTEK, MT & TUCKER, SC 1983 Ontogeny and ultrastructure of secretory oil cells in *Magnolia grandiflora* L. Botanical Gazette 144:501-512.
- RAO, AR & MALAVIYA, M 1966 The non-articulated laticifers and latex of *Tabernaemontana coronaria* Willd. Proceedings of the National Institute of Sciences of India 32:233-242.
- RAPINI, A; CHASE, MW; GOYDER, DJ & GRIFFITHS, J 2003 Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). Taxon 52:33-50.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

SERPE, MD; MUIR, AJ & KEIDEL, AM 2001 Localization of cell wall polysaccharides in

nonarticulated laticifers of Asclepias speciosa Torr. Protoplasma 216:215-226.

- SERPE, MD; MUIR, AJ & DRIOUICH, A 2002 Immunolocalization of β-D-glucans, pectins, and arabinogalactan-proteins during intrusive growth and elongation of nonarticulated laticifers in *Asclepias speciosa* Torr. Planta 215:357-370.
- SMITH, MM & MCCULLY, ME 1978 A critical evaluation of the specificity of aniline blue induce fluorescence. Protoplasma 95:229-254.
- SOLEREDER, H 1908 Systematic anatomy of the dicotyledons. English translation by L.A. Boodle and F.E. Fritsch, 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- SVENDSEN, AB & VERPOORTE, R 1983 Chromatography of alkaloids. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1991 Structure and development of follicles of *Nerium indicum* Mill. (Apocynaceae). Feddes Repertorium 102:399-407.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1994 Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 63:9-20.
- VALENTE, M da C 1977 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Estudo da anatomia e vascularização (Asclepiadaceae). Rodriguésia 29:161-283.
- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C 1995 *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. Anatomia e vascularização floral (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 33:75-98.
- VALENTE, M da C & COSTA, CG 2005 Estudo anatômico da flor de *Marsdenia loniceroides* E. Fournier (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Rodriguésia 56:51-66.
- VOGEL, S 1990 The role of scent glands in pollination. On the structure and function of osmophores. Washington, Smithsonian Institution Libraries.

### **Capítulo 8**

# Ontogênese, estrutura e histoquímica da ala estaminal e nectários florais em espécies de Asclepiadeae

#### Introdução

As espécies de Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae formam um clado de Apocynaceae notável pela extrema complexidade floral derivada de diversas características exclusivas ou com distribuição limitada entre as angiospermas (Fishbein 2001). Se por um lado, possuem um número extremamente estável de peças por verticilo, por outro, apresentam uma sinorganização não usual das peças com fusões e adnações posgênitas que resultou na origem de novos órgãos (Endress 1994).

O mecanismo floral para polinização em Asclepiadoideae é um dos mais complexos das angiospermas (Kunze 1991). Diversas estruturas estão envolvidas para guiar o inseto durante a polinização, como a fenda estaminal, a corona e o contentor de néctar (Kunze 1991,1995,1999). Em espécies que não possuem corona, esta função foi transferida para a corola (Kunze 1991).

A fenda estaminal é formada por projeções lignificadas e está presente em Rauvolfioideae, Apocynoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000). Em Asclepiadoideae, ela é formada pela ala de duas anteras adjacentes, que são consideradas alongamentos basais dos sacos polínicos dorsais (Kunze 1996; Omlor 1996; Endress & Bruyns 2000). Entretanto, não há estudos ontogenéticos desta estrutura, que comprovem sua origem. Apenas dois trabalhos detectaram a presença de tecido secretor na ala estaminal (Valente 1977; Demarco 2005) e este novo tipo de glândula encontrado em flores de espécies de Asclepiadeae foi identificado e descrito pela primeira vez em *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. (Demarco 2005).

A complexidade da morfologia floral das Asclepiadoideae é devido, em grande parte, às diferentes formas e estruturas da corona. A despeito do seu considerável valor sistemático em Apocynaceae, a corona tem sido objeto de poucos estudos (Schumann 1895; Fallen 1986; Hofmann & Specht 1986; Kunze 1990; Liede & Kunze 1993; Endress & Bruyns 2000; Fishbein 2001; Kunze & Wanntorp 2008). Ela forma-se na região entre as bases da corola gamopétala e do tubo dos filetes (Endress 1994; Endress & Bruyns 2000), após os estádios iniciais de desenvolvimento destes dois verticilos (Hoffmann & Specht 1986; Kunze 1990) e, na flor madura, não se pode distinguir entre as partes de origem corolina e estaminal (Endress & Bruyns 2000). A terminologia para as estruturas da corona varia de grupo para grupo e até mesmo de autor para autor (Woodson 1941; Rao & Ganguli 1963; Liede & Kunze 1993).

A localização primária dos tecidos nectaríferos nesta subfamília é nas regiões interestaminais do tubo dos filetes (câmara estigmática) e o néctar pode ser acumulado (contentor de néctar) na corona estaminal ou na região onde o tubo da corola está conectado ao ginostégio (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Eisikowitch 1986; Kunze 1991, 1995, 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; Gomes 2006). Entretanto, a posição dos nectários é controversa. Néctar pode ser encontrado na câmara estigmática (nectário primário) e em estruturas cupuliformes formadas pela corona. Alguns autores assumem que apenas a câmara estigmática-nectarífera é secretora e o néctar flui através de um intrincado sistema capilar até o contentor de néctar (Galil & Zeroni 1965; Bookman 1981; Kunze 1997); todavia, tecido secretor já foi descrito na corona estaminal (nectário secundário; Rao & Ganguli 1963; Valente & Silva 1984; Bruyns 1993; Kunze 1995,1999; Demarco 2005). A natureza da secreção destes nectários já foi considerada mista (Christ & Schnepf 1985; Vieira & Shepherd 2002). A estrutura da câmara estigmática-nectarífera de *A. curassavica* já foi descrita por Galil e Zeroni (1965) e a de *O. banksii*, por Valente (1977).

O objetivo do presente trabalho é verificar a ocorrência de estruturas secretoras na ala estaminal e a posição dos nectários em espécies de Asclepiadeae. Esta investigação compreende o estudo da ontogênese, descrição da estrutura e avaliação histoquímica da secreção destas glândulas florais de *Asclepias curassavica* L., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult.

#### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de setembro de 2006 a fevereiro de 2007. Três indivíduos de A. curassavica foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50' 14,2"W) e praia da Fazenda (23º21'33,7"S/44º51'0,37"W); três de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W) e trilha do Noelo (23°20'53,1"S/44°51'00,9"W); dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23º21'02,4"S/44º51'05,4"W; 23°20′55,3"S/44°51′01,5"W) e dois de O. banksii subsp. banksii na praia da Fazenda (23° 21'24,0"S/44°50'14,7"W; 23°21′34,5″S/44°51′02,1″W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos florais de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* foram fixados em FAA(formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Para a análise micromorfológica, flores adultas fixadas em FAA foram isoladas, desidratadas em série etílica, secas pelo método de ponto crítico, montadas e metalizadas com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada.

Diversos estádios do desenvolvimento floral foram selecionados para o estudo da ontogênese das glândulas florais desde o início da formação do botão junto aos ápices dos ramos até a flor adulta em pós-antese. Os diversos botões e flores foram isolados, desidratados em série butílica (Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 10 a 18 µm. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética.

Para o estudo histoquímico, diferentes tratamentos foram realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes das secreções: vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para carboidratos (McManus 1948), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), reagentes de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada. A presença de glicose na secreção dos nectários foi detectada pela aplicação de glicofita nos contentores de néctar e contato com a câmara estigmática-nectarífera.

Botões florais foram mantidos por 48 h à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e receberam o mesmo tratamento das demais flores. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

As flores de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possuem cinco estames, cujos filetes são unidos, formando o tubo dos filetes (Fig. 1-2, 13-16). Cada estame apresenta duas projeções laterais, denominadas alas, que delimitam uma fenda (Fig. 2-4, 13-16) à frente da câmara estigmática-nectarífera e alterna às anteras (Fig. 2-3, 13-16). Todas as flores têm corona (Fig. 1-4, 9-14, 16).

#### Ala estaminal (Fig. 3-4, 17-33)

As alas estaminais originam-se no início da formação dos estames em botões ainda envoltos pelo cálice. Elas são formadas, em grande parte, por tecidos da margem da antera (Fig. 17), mas sua porção basal é formada por tecidos do filete (Fig. 18). Em

secções longitudinais, é possível observar a extensão da ala ao nível da antera e a porção basal ao nível do filete em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 19, 21). A ala é formada exclusivamente por tecidos da antera apenas em *M. denticulata*, (Fig. 20). Em *A. curassavica* (Fig. 6), *G. axillaris* (Fig. 19) e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 21), elas são longas e estendem-se verticalmente, paralelas ao eixo da flor, enquanto em *M. denticulata*, elas são curtas e horizontais (Fig. 27), perpendiculares ao eixo da flor. As alas de dois estames adjacentes delimitam a fenda estaminal (Fig. 3-4, 13-14, 16-18, 20, 22-26, 28-29, 31-33). Elas não são vascularizadas.

As porções secretoras da ala estaminal originam-se, iniciam sua atividade secretora e degeneram nos estádios intermediários do desenvolvimento dos botões florais (Fig. 22-23, 25, 27, 30-31). Nas flores adultas, as alas das anteras e os tricomas da câmara externa estão completamente lignificados (Fig. 24, 26, 28-29, 32-33) eas câmaras externa e interna das flores de *A. curassavica* e *O. banksii* subsp. *banksii* formam uma única câmara contínua com a CEN (Fig. 13, 24).

O tecido secretor encontra-se na região interna da ala, voltado para a fenda (Fig. 22-23, 25, 27-28, 31). Ele ocorre em duas regiões: uma externa, na margem da ala, e outra interna, em uma protuberância (Fig. 23, 25, 28, 31) formada pela proliferação de meristema fundamental. O tecido secretor está presente ao longo de quase todo o comprimento da ala (Fig. 27, 30) e ausente apenas nas extremidades superior e inferior.

Apenas a epiderme é secretora na ala estaminal e é composta por uma única camada de células (Fig. 23, 25, 27, 30-31). As células secretoras da região externa variam de quadradas, em *G. axillaris* (Fig. 25) e levemente alongadas em *A. curassavica* (Fig. 23) a retangulares em *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 31). As células da porção interna são retangulares e dispostas em paliçada em *A. curassavica* (Fig. 23), *G. axillaris* (Fig. 25) e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 31) e quadradas em *M. denticulata* (Fig. 27). As paredes são finas, o citoplasma tem aspecto denso (Fig. 23, 25, 27, 30-31) e o núcleo ocupa posição central na célula (Fig. 23, 25, 30-31). A secreção é composta por mucilagem e lipídios totais (Tabela 1) e é liberada no interior da fenda, podendo ser encontrada também na corona interestaminal (Fig. 5).

As fendas das quatro espécies estudadas possuem duas câmaras distintas. A câmara externa está localizada entre as porções secretoras das alas estaminais (Fig. 22, 26, 28,

31); nesta região, formam-se tricomas tectores (Fig. 24-26, 31-32), que se alongam em direção à base da flor (Fig. 32). A câmara interna é delimitada externamente pelas protuberâncias secretoras e internamente, pela câmara estigmática-nectarífera (CEN). Em *A. curassavica, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*, a câmara interna da fenda é contínua com a CEN e pode ser diferenciada desta pela ausência de epiderme secretora (Fig. 22, 24, 31); em *G. axillaris*, esta câmara é isolada da CEN por projeções dos estames (Fig. 26). Apenas a câmara externa está livre na sua porção superior, pois a cabeça dos estiletes recobre a CEN e a câmara interna da fenda (Fig. 25, 28, 32).

#### Nectários

#### Câmara estigmática-nectarífera (Fig. 2-3, 6-8, 13-16, 34-38)

Em cada flor, cinco câmaras estigmática-nectaríferas são encontradas nas regiões interestaminais do tubo dos filetes (Fig. 2-3, 13-16). Elas são longas em *A. curassavica* (Fig. 6), *G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* e muito curtas em *M. denticulata* (Fig. 38). Todas são recobertas na sua porção superior pela cabeça dos estiletes (Fig. 36). O tecido secretor corresponde apenas à epiderme (Fig. 34-38) nas quatro espécies e se prolonga até a base das anteras em *M. denticulata* (Fig. 15, 38) e pouco abaixo da câmara estigmática em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* subsp. *banksii* subsp. *banksii* context (Fig. 15, 38) e pouco abaixo da câmara estigmática em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* subsp. *banksii* context (Fig. 15, 38) e pouco abaixo da câmara estigmática em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* subsp. *banksii* context (Fig. 2000) e tector corresponde apenas (Fig. 2000) e tector correspo

A epiderme secretora é composta por uma única camada de células quadradas a levemente alongadas, com paredes finas, citoplasma de aspecto denso (Fig. 34-38) e núcleo volumoso em relação às suas dimensões (Fig. 37); as células são recobertas por cutícula fina e espaço extraprotoplástico é observado junto à parede periclinal externa (Fig. 34, 37, 61-62). Esta epiderme é contínua até a base da cabeça dos estiletes (Fig. 34, 37), onde se encontra o estigma; nesta região do androceu, que corresponde à porção terminal dos filetes (Fig. 36), as anteras são livres entre si em *G. axillaris* e o espaço entre as anteras forma uma abertura na câmara (Fig. 35). Em *M. denticulata*, não há uma região de abertura, pois as anteras são unidas na base (Fig. 15).

As células iniciam sua atividade secretora nos estádios intermediários do desenvolvimento floral e continuam secretando até a pós-antese. A secreção tem aspecto denso e se acumula no interior da câmara (Fig. 7, 35-36, 38). Os nectários primários de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* correspondem às

câmaras estigmática-nectaríferas e produzem um exsudato heterogêneo composto por carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais (Tabela 1).

#### Corona (Fig. 1-5, 8-16, 39-50)

A corona presente em *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* tem origem no androceu (Fig. 1-5, 8-16, 44-50). Ela começa a ser formada nos estádios intermediários do desenvolvimento floral, na base do tubo dos filetes (Fig. 39-43). Inicialmente, a atividade meristemática é observada nas regiões opostas ao feixe dos filetes (Fig. 40) em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* e irá originar a porção estaminal da corona ( $C_s$ ; fig. 2, 9, 12, 13-14, 16). A formação da corona interestaminal ( $C_i$ ; fig. 4, 9, 44) inicia posteriormente. Em *M. denticulata*, a atividade meristemática inicia-se simultaneamente em toda a base do tubo dos filetes e irá formar um anel [ $C_{(is)}$ ] ao redor do androceu (Fig. 11, 48). Embora haja adnação da corona ao tubo corolino em *G. axillaris* (Fig. 9, 47), ela é secundária e a origem da corona que é formada por um espessamento anelar na base do tubo da corola ( $C_a$ ; fig. 10-11, 42, 50).

A corona está diretamente envolvida com o local onde o néctar se acumula e está disponível para o polinizador, formando contentores de néctar de diferentes formatos e posições. Em *A. curassavica*, o contentor é uma estrutura cupuliforme formada pela corona estaminal; em *G. axillaris* (Fig. 9, 47) e *O. banksii* subsp. *banksii*, o néctar é acumulado em cavidades interestaminais formadas pela adnação da corona ao tubo da corola; em *M. denticulata*, a corona  $C_{(is)}$  é mais desenvolvida na região interestaminal, projetando-se entre as bases das anteras (Fig. 11), e parte do néctar é acumulado nesta região entre o anel e o tubo dos filetes, mas há também acúmulo entre os anéis das coronas  $C_{(is)}$  e  $C_a$  (Fig. 10-11, 50). O néctar presente em cada contentor tem diferentes origens nas espécies estudadas. As coronas de *A. curassavica* (Fig. 13) e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 12, 16) não possuem tecido secretor e o néctar presente nos contentores é proveniente das câmaras estigmática-nectaríferas (nectários primários). Por outro lado, a corona de *G. axillaris* (Fig. 44-46) e a de *M. denticulata* (Fig. 48-50) apresentam regiões secretoras e o néctar presente em seus contentores é produzido por estes nectários secundários.

Apenas a corona estaminal ( $C_s$ ) é secretora em *G. axillaris* (Fig. 44). A porção secretora estende-se por toda a superfície da corona estaminal abaixo do nível da base das

anteras (Fig. 45) e é composta por uma camada de células epidérmicas retangulares, junto ao tubo dos filetes, e quadradas nas porções livres da corona (Fig. 44-46). As células são recobertas por cutícula fina (Fig. 64), possuem paredes delgadas, conteúdo de aspecto denso e espaço extraprotoplástico na porção distal (Fig. 46), onde a secreção é acumulada antes de ser liberada para o meio externo. Uma camada de células não secretoras com citoplasma levemente corado está presente logo abaixo das células retangulares (Fig. 45-46). A corona estaminal (C<sub>s</sub>) de *G. axillaris* tem base plana (Fig. 9) e não forma uma estrutura cupuliforme como em *A. curassavica*; por isso, a secreção exsudada flui para as cavidades interestaminais (Fig. 9, 47), localizadas abaixo da fenda estaminal e câmara estigmática. A corona secreta carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais (Tabela 1).

A corona  $C_{(is)}$  de *M. denticulata* é secretora na metade inferior do anel (Fig. 50). A região secretora é lobada e composta por epiderme e parênquima secretores (Fig. 48-50). Ela possui uma camada de células epidérmicas alongadas dispostas em paliçada e diversas camadas de células parenquimáticas secretoras; até 15 camadas de células podem ser encontradas na região dos lobos e cerca de cinco, nas regiões entre os lobos. Todas as células secretoras possuem paredes finas e citoplasma de aspecto denso (Fig. 49); as epidérmicas são recobertas por cutícula fina e apresentam espaço extraprotoplástico, onde o néctar se acumula antes de ser liberado através da parede e da cutícula. A corona  $C_{(is)}$  secreta exclusivamente carboidratos, incluindo glicose e mucilagem (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados da aplicação dos testes histoquímicos para identificação das principais classes de metabólitos que compõem a secreção da ala estaminal e nectários primário e secundário de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**; **+** = presente; **-** = ausente).

Tratamento histoquímico	Substância a ser detectada	Ala estaminal (Figuras)	<b>Nectário</b> primário (Figuras)		Nectário secundário (Figuras)	
			Ac,Ga	Md,Ob	Ga	Md
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+ (51)	+ (52)	+	+	+ (53)
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	+ (54)	+	+ (55)	+	+ (56)
reação PAS	carboidratos	+	+	+ (57-58)	+	+ (59)
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	-	-	-	-	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	-	-	-	-	-
preto de Sudão B	lipídios totais	+ (60)	+ (61-62)	+ (63)	+ (64)	-
Sudão IV	lipídios totais	+	+ (66)	+	+ (65)	-
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	+	+	+	+	-
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-	-	-	-
reagente de Dragendorff	alcalóides	-	-	-	-	-
reagente de Wagner	alcalóides	-	-	-	-	-

## ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-6.** Eletromicrografias de varredura das flores adultas de espécies de Asclepiadeae. **1.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. Vista geral da flor seccionada longitudinalmente. **2-5.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **6.** *Asclepias curassavica* L. **2.** Tubo dos filetes seccionado transversalmente. **3.** Detalhe da câmara estigmática nectarífera e fenda estaminal. **4-5.** Pormenores da figura 3. **5.** Detalhe da corona interestaminal. Notar presença de secreção. **6.** Câmara estigmática nectarífera e ala estaminal. Flor seccionada longitudinalmente. **A** = antera; **Ae** = ala estaminal; **C** = corona; **Ce** = cabeça dos estiletes; **Ci** = corona interestaminal; **Cn** = câmara estigmática nectarífera.



**Figuras 7-12.** Eletromicrografias de varredura das flores adultas de espécies de Asclepiadeae. **7,9.** Flores seccionadas transversalmente. **8,10.** Flores seccionadas longitudinalmente. **7,12.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **8-9.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **10-11.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **7.** Câmara estigmática nectarífera. **8-12.** Vista geral das coronas. **8,12.** Corona estaminal. **Ca** = corona anelar; **Ce** = cabeça dos estiletes; **C(is)** = corona ginostegial formando um anel ao redor do tubo dos filetes; **Cs** = corona estaminal; **Tc** = tubo da corola; **Tf** = tubo dos filetes.



**Figuras 13-16.** Estrutura das flores de espécies de Asclepiadeae. Secções transversais. **13-15.** Flores adultas. **13.** *Asclepias curassavica* L. **14.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **15.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **16.** *Oxypetalum banksii subsp. banksii* Roem. & Schult. Botão floral. **Ae** = ala estaminal; **Cn** = câmara estigmática nectarífera; **Cs** = corona estaminal. **Barras: 13,15-16.** 300 μm; **14.** 150 μm.



**Figuras 17-21.** Ontogênese da ala estaminal em botões florais de espécies de Asclepiadeae. **17-18,20.** Secções transversais. **19,21.** Secções longitudinais. **17-18.** *Asclepias curassavica* L. **19.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **20.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **21.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **17,20.** Origem da ala a partir de tecidos das anteras. **18.** Origem da ala a partir de tecidos das anteras. **18.** Origem da ala a partir de tecidos das anteras. **18.** Origem da ala a partir de tecidos dos filetes. **A** = antera; **Ae** = ala estaminal; **Tf** = tubo dos filetes. **Barras: 17,19-20.** 75 μm; **18,21.** 150 μm.



**Figuras 22-27.** Estrutura e senescência da porção secretora da ala estaminal em flores de espécies de Asclepiadeae. **22-26.** Secções transversais. **22-23,25,27.** Botões florais. **24,26.** Flores adultas. **22-24.** *Asclepias curassavica* L. **25-26.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **27.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **26.** Secção longitudinal. **23,25.** Regiões secretoras externa e interna. **24,26.** Porções secretoras necrosadas. **Cn** = câmara estigmática-nectarífera; **ce** = câmara externa; **ci** = câmara interna; **Sh** = cabeça dos estiletes. **Barras: 22,24.** 150 μm; **23.** 50 μm; **25,27.** 30 μm; **26.** 75 μm.



**Figuras 28-33.** Estrutura e senescência da porção secretora da ala estaminal em flores de espécies de Asclepiadeae. **28-29,31-33.** Secções transversais. **30.** Secção longitudinal da ala estaminal. **28-29,32-33.** Flores adultas. **28-29.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **30-31.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. Botões florais. **32-33.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **29,33.** Microscopia de polarização. **31.** Regiões secretoras externa e interna delimitando a câmara externa (**ce**). **Barras: 28-31.** 75 μm; **32-33.** 150 μm.



**Figuras 34-38.** Estrutura da câmara estigmática nectarífera de flores de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**34-36**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**37-38**). **34-35,37.** Secções transversais. **36,38.** Secções longitudinais. **34,37.** Epiderme contínua na câmara estigmática nectarífera. **35.** Abertura da câmara estigmática nectarífera na região do estigma. **36.** Término do tubo dos filetes (**Tf**) e da câmara estigmática na base da cabeça dos estiletes (**Sh**). Notar secreção no interior da câmara. **38.** Câmara curta repleta de secreção. **Barras: 34,37.** 30 μm; **35-36.** 50 μm; **38.** 75 μm.



**Figuras 39-45.** Ontogênese e estrutura da corona em flores de espécies de Asclepiadeae. **39,41-43,45.** Secções longitudinais. **40,44.** Secções transversais. **39-40.** *Asclepias curassavica* L. **41,44-45.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **42.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **43.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **39-43.** Origem da corona na base do tubo dos filetes. **42.** Formação da corona ginostegial [C<sub>(is)</sub>] ao longo de quase todo o filete e presença da corona anelar (Ca) já desenvolvida. **44-45.** Epiderme secretora na corona estaminal (Cs) abaixo do nível da antera. **Ci** = corona interestaminal; **Pt** = pétala; **Tf** = tubo dos filetes. **Barras: 39-40,42-43,45.** 75 μm; **41.** 50 μm; **44.** 150 μm.



**Figuras 46-50.** Estrutura da corona em flores de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**46-47**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**48-50**). **46-49.** Secções transversais. **46.** Epiderme secretora da corona estaminal junto ao tubo dos filetes (**cabeça de seta** = espaço extraprotoplástico). **47.** Cavidades interestaminais formadas pela adnação da corona ao tubo corolino. **48.** Vista geral da corona ginostegial. **49.** Pormenor da figura 48. **50.** Vista geral das coronas C<sub>(is)</sub> e C<sub>a</sub> em secção longitudinal. **Ca** = corona anelar; **C**<sub>(is)</sub> = corona ginostegial formando um anel ao redor do tubo dos filetes; **Cs** = corona estaminal; **Tc** = tubo corolino; **Tf** = tubo dos filetes. **Barras: 46.** 30 µm; **47-48.** 300 µm; **49.** 75 µm; **50.** 150 µm.


**Figuras 51-59.** Testes histoquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. **51,53,56,58-59.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **52.** *Asclepias curassavica* L. **54-55,57.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **51-55,57-58.** Secções transversais. **56,59.** Secções longitudinais. **51,54.** Ala estaminal. **52,55,57-58.** Câmara estigmática nectarífera. **53,56,59.** Corona. **51-53.** Vermelho de rutênio. **54-56.** Ácido tânico e cloreto férrico. **57-59.** Reação PAS. **Barras: 51,53.** 30 μm; **52,55-58.** 75 μm; **54,59.** 50 μm.



**Figuras 60-66.** Testes histoquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. Secções transversais. **60-62.** *Asclepias curassavica* L. **63.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **64-66.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **60.** Ala estaminal. **61-63,66.** Câmara estigmática nectarífera. **64-65.** Corona. **60-64.** Preto de Sudão B. **65-66.** Sudão IV. **Barras: 60,64.** 50 μm; **61,63,65-66.** 75 μm; **62.** 30 μm.



#### Discussão

Todas as espécies de Asclepiadeae possuem complexos mecanismos de polinização e as estruturas secretoras envolvidas no processo são semelhantes. As quatro espécies estudadas possuem células secretoras nas alas estaminais e câmaras estigmática-nectaríferas. Elas variam apenas quanto à presença de tecido secretor na corona. A corona de *A. curassavica* não é secretora e o néctar encontrado na corona estaminal é secretado pela câmara estigmática nectarífera e passa através de canais formados pela corona até o interior deste contentor (Galil & Zeroni 1965). Da mesma forma, o néctar encontrado nos contentores de *O. banksii* subsp. *banksii* e outras espécies de *Oxypetalum* é secretado por estes nectários primários (Valente 1977; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002).

Todas as flores de Asclepiadeae possuem alas estaminais lignificadas (Endress 1994; Kunze 1996; Endress & Bruyns 2000), que são consideradas alongamentos basais dos sacos polínicos dorsais (Kunze 1996; Endress & Bruyns 2000). Entretanto, o estudo ontogenético provou que a origem das alas em flores de Asclepiadeae é variável. Em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, elas são formadas por projeções laterais da antera e do filete e, portanto, devem ser designadas alas estaminais e não alas/asas das anteras, como referido por diversos autores (Frye 1902; Rao & Ganguli 1963; Valente 1977,1980,1983,1995; Valente & Silva 1984; Swarupanandan *et a*l. 1996; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Vieira & Shepherd 2002; Valente & Costa 2005; Gomes 2006). A origem exclusiva desta estrutura a partir de tecidos da antera foi confirmada apenas para *M. denticulata*. Com base nestes resultados, o presente estudo propõe a alteração do termo ala da antera para ala estaminal em espécies de Asclepiadeae.

As quatro espécies estudadas possuem regiões secretoras na ala estaminal; entretanto, poucos trabalhos detectaram-nas. Kunze (1995) observou-as em *Matelea reticulata* (Engelm.) Woodson, porém, designou-as "pads" e Valente (1995) registrou-as como "pequenas expansões" em *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. A primeira referência à presença de células secretoras na ala estaminal foi feita por Valente (1977) ao estudar flores de *O. banksii* subsp. *banksii*; esta pesquisadora mencionou "saliências com células secretoras" (porção secretora interna) na ala estaminal desta espécie. Esta estrutura secretora foi descrita pela primeira vez por Demarco (2005) em

*Blepharodon bicuspidatum* e pode ter ampla ocorrência em botões florais de espécies de Asclepiadeae, embora, Kunze (1995) tenha considerado a presença dos "pads" em *M. reticulata* como uma modificação da fenda estaminal nesta espécie.

As alas estaminais das espécies investigadas possuem duas regiões com epiderme secretora: uma externa, na margem da ala, e outra interna, em uma protuberância. Em *B. bicuspidatum*, apenas a porção interna da ala possui células epidérmicas secretoras (Demarco 2005). Estas porções secretoras degeneram antes da antese floral. A desintegração já foi notada por Valente (1977) em *O. banksii* subsp. *banksii*; entretanto, esta autora registrou a necrose como precedente à atividade secretora da cabeça dos estiletes e relatou que a secreção produzida por estas estruturas colaboraria na morfogênese do translador, impedindo que a secreção deste se espalhasse no exterior, ficando retida e moldada nos sulcos. Contudo, o estudo da ontogênese floral de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* mostrou que a secreção do translador precede o início da atividade secretora da ala estaminal (capítulo 10) e, conseqüentemente, não interfere na sua produção e morfogênese.

As fendas estaminais das quatro espécies estudadas são divididas em duas câmaras: uma externa, situada entre as regiões secretoras da ala, e outra interna, localizada entre a câmara estigmática-nectarífera e as protuberâncias secretoras da ala. A câmara externa possui tricomas tectores lignificados direcionados para a base da flor. Tricomas lignificados também ocorrem em fendas de espécies de Cynanchum (Konta et al. 1986) e em B. bicuspidatum (Demarco 2005). Segundo Kunze (1991,1996), as fendas estaminais das espécies de Asclepiadoideae podem ser divididas em duas câmaras; a externa com tricomas lignificados, na qual a probóscide do inseto se insere, e a interna sem tricomas que receberá a polínia. Quando a probóscide é inserida na fenda após a coleta de néctar, o inseto só consegue removê-la se fizer um movimento para a frente e para cima devido aos tricomas lignificados voltados para a base da flor; quando ele faz esse movimento, a probóscide entra em contato com o corpúsculo que se adere à ela e a polínia trazida pelo polinizador é retida no interior da fenda/ câmara pela quebra, geralmente, da caudícula (Kunze 1991; Liede 1994; Vieira 1998). Fendas simples e indivisas foram interpretadas como um caráter plesiomórfico, devido à sua presença em Secamone, ou como uma adaptação ao tipo de inserção da polínia (Kunze 1991). Em B. bicuspidatum, a fenda possui uma única câmara onde toda a polínia é inserida e fica retida (Demarco 2005).

Nas quatro espécies analisadas, assim como observado em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005), as porções secretoras da ala têm sua formação, fase secretora e senescência durante os estádios intermediários do desenvolvimento dos botões florais. Pela localização destas glândulas, a natureza viscosa da secreção, composta por mucilagem e lipídios, e a sua desintegração antes da antese, supõe-se que a secreção liberada no interior da fenda e a desintegração da protuberância interna auxiliem nas funções exercidas pela fenda estaminal. A desintegração das protuberâncias secretoras aparentemente está relacionada ao aumento da área da fenda que é muito estreita, permitindo a introdução da probóscide e/ou da polínia; a presença de secreção nesta região repleta de tricomas lignificados pode servir como lubrificante, facilitando a entrada do aparelho bucal e/ou auxiliando na retirada do polinário aderido ao inseto.

Nas Asclepiadoideae, o tecido nectarífero pode ocorrer em diversas regiões, mas sua localização primária é na região interestaminal do tubo dos filetes (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Kunze & Liede 1991; Kunze 1991, 1995, 1997; Endress 1994; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; Gomes 2006), assim como nas espécies estudadas. O néctar pode ser encontrado na câmara estigmática-nectarífera (CEN), corona e base da corola junto ao ginostégio (Kunze 1991). Woodson (1954) registrou células nectaríferas na corona estaminal de espécies de Asclepias, entretanto, a partir do trabalho de Galil e Zeroni (1965) com Asclepias curassavica, passou-se a admitir que há apenas cinco nectários (CENs) e que o néctar flui através de passagens capilares até os contentores formados pela corona estaminal. Este ponto de vista foi adotado por diversos autores, que trabalharam com Asclepias (Kevan et al. 1989; Wyatt & Broyles 1994), Calotropis (Eisikowitch 1986) e outras 20 espécies de Asclepiadinae e quatro de Metastelmatinae (Kunze 1997; Liede 1997). Posteriormente, Kunze (1999) observou três regiões secretoras em espécies de Gonolobus: câmara estigmática-nectarífera, base do tubo dos filetes e porção externa do anel formado pela corona.

Nas quatro espécies estudadas, os nectários primários correspondem à epiderme secretora da CEN; este tecido secretor pode se prolongar até a base das anteras, como observado em *M. denticulata* ou pouco abaixo da câmara estigmática, como ocorre em *A.* 

*curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*. A epiderme é contínua até a porção distal do tubo dos filetes em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, em *Matelea denticulata*, assim como nas demais espécies de Gonolobinae (Kunze 1995), as anteras são fundidas na base e o tecido secretor da câmara é contínuo até a sua porção terminal, onde a CEN é recoberta pela cabeça dos estiletes. Câmaras estigmática-nectaríferas já foram registradas em *A. curassavica* (Galil & Zeroni 1965), *A. syriaca* L. (Kevan *et al.* 1989), *B. bicuspidatum* (Demarco 2005), *Oxypetalum alpinum* (Vell.) Font. & Shw. var. *alpinum, O. appendiculatum* Mart., *O. banksii* subsp. *banksii, O. jacobinae* Decne., *O. mexiae* Malme, *O. pachyglossum* Decne., *O. subriparium* Malme (Valente 1977; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002) e diversas outras espécies de Asclepiadeae (Kunze 1997; Gomes 2006). De acordo com Endress e Bruyns (2000), há cinco nectários opostos às cinco fendas estaminais (câmaras estigmáticas) no tubo dos filetes das flores de Asclepiadoideae.

As CENs de *G. axillaris* e *M. denticulata* são compostas por uma única camada de células epidérmicas secretoras, da mesma forma que descrito para *A. curassavica* e *O. banksii* subsp. *banksii* (Galil & Zeroni 1965; Valente 1977; Schnepf & Christ 1980). Em geral, este nectário é composto por apenas uma camada de células epidérmicas nas espécies de Asclepiadoideae (Schnepf & Christ 1980; Valente 1984,1995; Valente & Silva 1984; Kunze 1991, 1995, 1999; Kunze & Liede 1991; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006), mas em *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers. há uma camada de células secretoras subepidérmica (Christ & Schnepf 1985) e em *Leptadenia* cf. *abyssinica* Decne., três a quatro (Kunze 1991).

O estudo histoquímico das câmaras estigmáticas nectaríferas de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* detectou a presença de carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais. Secreção de mucilagem já foi registrada nas células que revestem o interior do tubo dos filetes ao redor dos estiletes e são contínuas com a epiderme da câmara estigmática em *O. banksii* subsp. *banksii* (Vieira & Shepherd 2002). Christ e Schnepf (1985) também detectaram açúcares, substâncias de natureza lipídica e polissacarídeos em *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers.; estes mesmos autores, registraram material eletrodenso no interior de vacúolos das células secretoras de *Hoya carnosa* R.Br. e *H. obovata* Decne. (Christ & Schnepf 1988).

Há grande divergência em relação ao tipo de corona das espécies de Asclepiadoideae, devido principalmente às diferentes terminologias empregadas pelos diversos pesquisadores e pela falta de estudos ontogenéticos (Woodson 1941; Rao & Ganguli 1963; Valente 1977; Valente & Silva 1984; Hofmann & Specht 1986; Liede & Kunze 1993; Endress & Bruyns 2000; Kunze & Wanntorp 2008). A corona pode ter origem do tubo da corola ou do androceu (Liede & Kunze 1993; Kunze 1995).

A corona de A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii é C(is), enquanto a de *M. denticulata* é C<sub>(is)</sub> + C<sub>a</sub>. A presença de corona anelar (C<sub>a</sub>), que é um espessamento anelar do tubo da corola, está restrita à tribo Ceropegieae e em Asclepiadeae, ocorre em Gonolobinae (sensu Liede 1997; Liede & Kunze 1993; Kunze 1995), à qual pertence Matelea. Há apenas um registro deste tipo de corona para Marsdenieae (Liede & Kunze 1993). A corona formada na região entre as bases da corola gamopétala e do tubo dos filetes, que representa o tipo mais complexo de corona segundo Endress e Bruyns (2000), tem origem na base do tubo dos filetes. A atividade meristemática inicia na região estaminal, oposta aos feixes dos filetes em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii, e sincronicamente ao redor de todo o tubo dos filetes em M. denticulata. Embora a corona de O. banksii subsp. banksii seja adnata ao tubo da corola (Valente 1977; Vieira 1998), assim como observado em G. axillaris, esta adnação ocorre secundariamente e a sua origem é exclusiva a partir do androceu. Corona de origem estaminal já foi relatada anteriormente para diversos gêneros de Asclepiadoideae (Frye 1902; Rao & Ganguli 1963; Tiaqi & Dixit 1965; Hofmann & Specht 1986; Konta et al. 1986; Konta & Kitagawa 1989; Liede & Kunze 1993; Kunze 1995, 1997, 1999; Valente 1995; Valente & Costa 2005; Gomes 2006). A corona estaminal é muito mais desenvolvida que a corona interestaminal em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii, mas em M. denticulata, a corona forma um anel ao redor do tubo dos filetes. Este anel também está presente em outras espécies de Matelea (Kunze 1995; Valente 1995), além de Holostemma, Sarcostemma (Rao & Ganguli 1963), Fischeria, Trichosacme (Kunze 1995) e Gonolobus (Kunze 1999).

*Gonioanthela axillaris* e *M. denticulata* possuem tecido secretor na corona. Em *G. axillaris*, ele corresponde apenas à epiderme da corona estaminal, enquanto em *M. denticulata*, toda a superfície do anel  $[C_{(is)}]$  é secretora e composta por epiderme e diversas camadas de células subepidérmicas. Apenas a epiderme é secretora na corona de

*Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005), mas em *Gonolobus fraternus* Schltdl., *G. chloranthus* Schltdl. e *Matelea argentinensis* (Meyer) A. Pontiroli, há também células subepidérmicas secretoras (Kunze 1995, 1999). A presença de nectários secundários parece ser uma característica de Asclepiadoideae e epiderme secretora na corona foi registrada por Rao e Ganguli (1963), Valente e Silva (1984), Bruyns (1993), Kunze (1995, 1999), Valente (1995) e Demarco (2005); entretanto, as primeiras descrições bem documentadas de sua atividade secretora foram efetuadas em *B. bicuspidatum, G. fraternus* e *G. chloranthus* (Kunze 1999; Demarco 2005).

A composição da secreção da corona varia entre as espécies. A corona estaminal de *G. axillaris* secreta um exsudato de natureza mista, composto por carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais, mas a corona de *M. denticulata* secreta exclusivamente carboidratos, incluindo glicose e mucilagem. Esta diferença na composição da secreção pode estar relacionada ao tipo de polinizador de cada uma destas espécies.

A posição do contentor de néctar é determinante na retirada do polinário pela probóscide ou pernas do polinizador. Em flores onde o néctar está disponível na corona estaminal, o polinário é retirado pelas pernas e quando está abaixo da fenda estaminal, é retirado pela probóscide (Pant *et al.* 1982; Eisikovitch 1986; Kunze & Liede 1991; Lumer & Yost 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999); porém, isto pode variar e o polinário pode ser retirado tanto pelas pernas quanto pela probóscide em algumas espécies (Macior 1965; Frost 1965; Pant *et al.* 1982). O oferecimento de néctar na base, abaixo da fenda estaminal, amplamente distribuído nas Asclepiadoideae foi considerado por Kunze (1997) como um caráter plesiomórfico.

Embora *G. axillaris* possua tecido secretor na corona estaminal, a secreção produzida é acumulada em cavidades interestaminais formadas pela adnação da corona ao tubo da corola, favorecendo a retirada do polinário pela probóscide do polinizador, assim como observado em *Oxypetalum*, onde a secreção da câmara estigmática nectarífera também se acumula em cavidades interestaminais (Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999). Em *M. denticulata*, a secreção acumula-se nas regiões interestaminais e entre os anéis das coronas C<sub>(is)</sub> e C<sub>a</sub>. Em *Gonolobus chloranthus* e *G. fraternus*, o néctar produzido na base do tubo dos filetes provavelmente serve como recurso para o polinizador e para que o polinário seja retirado em sua probóscide, enquanto o néctar secretado pela corona se acumula entre os anéis da C<sub>(is)</sub> e C<sub>a</sub>, aumentando a chance de retirada do polinário pelas pernas de Hymenoptera que se concentram neste néctar (Kunze 1999).

Atribui-se ao néctar dupla função: recurso para o polinizador e indutor da germinação dos grãos de pólen (Galil & Zeroni 1965; Eisikowitch 1986; Kunze 1991). Estas duas funções podem ser exercidas pelo néctar produzido pela câmara estigmática-nectarífera, como ocorre em *A. curassavica* e *O. banksii* subsp. *banksii*, ou por regiões topograficamente separadas. Em *G. axillaris* e *M. denticulata*, a secreção da CEN provavelmente estimula a germinação dos grãos de pólen, enquanto o recurso para o polinizador é produzido pela corona (nectário secundário). Esta separação de funções também foi descrita para outras espécies de *Matelea* (Kunze 1995), *Gonolobus* (Kunze 1999) e *Blepharodon* (Demarco 2005).

Germinação dos grãos de pólen estimulada pelo néctar da CEN já foi comprovada por diversos estudos. Grãos de pólen não germinam em câmaras secas e o estímulo está relacionado à concentração do néctar (Jaeger 1971; Pant *et al.* 1982; Eisikowitch 1986; Kevan *et al.* 1989; Wyatt & Broyles 1994). Esta concentração pode variar ao longo do dia (Wyatt & Shannon 1986) e se a polínia for inserida enquanto a concentração não é adequada, a germinação só ocorrerá quando as condições forem favoráveis (Eisikowitch 1986). Concentração de néctar acima de 30% inibe a germinação em *Asclepias* (Wyatt & Broyles 1994). A polínia não precisa entrar em contato com o estigma para que os grãos de pólen germinem (Kevan *et al.* 1989; Kunze 1991) e estes podem germinar até mesmo fora da fenda (Kunze 1991, 1995).

A presença de mucilagem e lipídios totais na secreção da CEN das quatro espécies estudadas provavelmente está relacionada às funções de estímulo de germinação e direcionamento dos tubos polínicos até o estigma. Os tubos polínicos crescem em direção à cabeça dos estiletes quando uma polínia é deixada abaixo da fenda estaminal ou parcialmente inserida na câmara (Kunze 1991; Vieira 1998) e, de acordo com Vieira e Shepherd (2002), a mucilagem presente nas câmaras de *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* age como um meio transmissor para os tubos polínicos.

#### Conclusões

As alas estaminais formam-se durante o início do desenvolvimento dos botões florais. Elas originam-se de tecidos da antera e filete em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. *banksii* e são exclusivamente anterais apenas em *M. denticulata*. Desta forma, as alas devem ser designadas estaminais. Todas as espécies possuem tecido secretor em duas regiões das alas: na margem externa e em protuberâncias no interior da fenda. Estas duas regiões delimitam a câmara externa que possui tricomas lignificados. Os tecidos secretores liberam uma secreção composta por mucilagem e lipídios totais no interior da fenda, que provavelmente auxilie na introdução da probóscide e posterior retenção da polínia. Estes tecidos degeneram antes da antese floral, aumentando o espaço no interior da fenda. Os nectários primários correspondem às câmaras estigmática-nectaríferas das quatro espécies e são compostos por uma camada de células epidérmicas. A secreção liberada no interior da câmara é composta por carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais. Dois tipos de corona são registrados: corona originada no androceu  $[C_{(is)}]$ nas quatro espécies e corona anelar (C<sub>a</sub>) na base do tubo da corola em *M. denticulata*. A corona C<sub>(is)</sub> origina-se na base do tubo dos filetes. Inicialmente, a atividade meristemática é observada nas regiões opostas ao feixe dos filetes em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii e a corona estaminal é muito mais desenvolvida que a interestaminal; em *M. denticulata*, a atividade é sincrônica ao redor do tubo dos filetes e forma um anel em torno do androceu. A corona estaminal de G. axillaris é nectarífera e possui epiderme secretora com exsudato composto por carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios que se acumula em cavidades interestaminais formadas pela adnação secundária da corona ao tubo da corola. Epiderme e parênquima nectaríferos estão presentes em toda a base do anel formado pela corona C<sub>(is)</sub> de *M. denticulata* e exsudam apenas carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, que são acumulados na região interestaminal e entre os anéis das coronas C<sub>(is)</sub> e C<sub>a</sub>.

## Referências bibliográficas

BOOKMAN, SS 1981 The floral morphology of *Asclepias speciosa* (Asclepiadaceae) in relation to pollination and a clarification in terminology for the genus. American Journal of Botany 68:675-679.

- BRUYNS, P 1993 A revision of *Hoodia* and *Lavrania* (Asclepiadaceae-Stapelieae). Botanische Jahrbücher für Systematik 115:145-270.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CHRIST, P & SCHNEPF, E 1985 The nectaries of *Cynanchum vincetoxicum* (Asclepiadaceae). Israel Journal of Botany 34:79-90.
- CHRIST, P & SCHNEPF, E 1988 Zur Struktur und Funktion von Asclepiadaceen-Nektarien. Beiträge zür Biologie der Pflanzen 63:55-79.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s./.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- EISIKOWITCH, D 1986 Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in Israel. Plant Systematics and Evolution 152:185-194.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanishe Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FISHBEIN, M 2001 Evolutionary innovation and diversification in the flowers of Asclepiadaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 88:603-623.
- FROST, SW 1965 Insects and pollinia. Ecology 46:556-558.
- FRYE, TC 1902 A morphological study of certain Asclepiadaceae. Botanical Gazette 34:389-413.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GALIL, J & ZERONI, M 1965 Nectar system of *Asclepias curassavica*. Botanical Gazette 126:144-148.

- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GOMES, SM 2006 Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae *s.l.* Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- HOFMANN, U & SPECHT, AK 1986 Der morphologische Charakter der Asclepiadaceencorona. Beiträge zür Biologie der Pflanzen 61:79-85.
- JAEGER, P 1971 Contribution a l'étude de la biologie florale des Asclépiadacées. Le *Calotropis procera* Ait. Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (A) 33:32-43.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- KEVAN, PG; EISIKOWITCH, D & RATHWELL, B 1989 The role of nectar in the germination of pollen in *Asclepias syriaca* L. Botanical Gazette 150:266-270.
- KONTA, F & KITAGAWA, J 1989 Taxonomic notes of Asclepiadaceae in Thailand. I. The floral morphology of *Dischidia raffresiana* Wall., *Marsdenia glabra* Cost. and *Secamone ferruginea* Pierre ex Cost. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 40:125-132.
- KONTA, F; SUDA, T & KOBAYASHI, C 1986 A preliminary study on the floral morphology of *Cynanchum* (Asclepiadaceae). Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 37:59-68.
- KUNZE, H 1990 Morphology and evolution of the corona in Asclepiadaceae and related families. Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 76:1-51.
- KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. Plant Systematics and Evolution 176:227-253.

- KUNZE, H 1995 Floral morphology of some Gonolobeae (Asclepiadaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik 117:211-238.
- KUNZE, H 1996 Morphology of the stamen in the Asclepiadaceae and its systematic relevance. Botanische Jahrbücher für Systematik 118:547-579.
- KUNZE, H 1997 Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). Flora 192:175-183.
- KUNZE, H 1999 Pollination ecology in two species of *Gonolobus* (Asclepiadaceae). Flora 194:309-316.
- KUNZE, H 2005 Morphology and evolution of the corolla and corona in the Apocynaceae *s.l.* Botanische Jahrbücher für Systematik 126:347-383.
- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (Asclepiadaceae). Plant Systematics and Evolution 178:95-105.
- KUNZE, H & WANNTORP, L 2008 Corona and anther skirt in *Hoya* (Apocynaceae, Marsdenieae). Plant Systematics and Evolution 271:9-17.
- LIEDE, S 1994 Some observations on pollination in Mexican Asclepiadaceae. Madroño 41:266-276.
- LIEDE, S 1997 Subtribes and genera of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae Asclepiadoideae) a synopsis. Taxon 46:233-247.
- LIEDE, S & KUNZE, H 1993 A descriptive system for corona analysis in Asclepiadaceae and Periplocaceae. Plant Systematics and Evolution 185:275-284.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- LUMER, C & YOST, SE 1995 The reproductive biology of *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench (Asclepiadaceae), a Mediterranean weed in New York State. Bulletin of the Torrey Botanical Club 122:12-23.
- MACIOR, LW 1965 Insect adaptation and behavior in *Asclepias* pollination. Bulletin of the Torrey Botanical Club 92:114-126.
- McMANUS, JFA 1948 Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain

Technology 23:99-108.

- OMLOR, R 1996 Do *Menabea venenata* and *Secamonopsis madagascariensis* represent missing links between Periplocaceae, Secamonoideae and Marsdenieae (Asclepiadaceae)? Kew Bulletin 51:695-715.
- PANT, DD; NAUTIYAL, DD & CHATURVEDI, SK 1982 Pollination ecology of some Indian asclepiads. Phytomorphology 32:302-313.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963 The floral anatomy of some Asclepiadaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (B) 57:15-44.
- SCHNEPF, E & CHRIST, P 1980 Unusual transfer cells in the epithelium of the nectaries of *Asclepias curassavica* L. Protoplasma 105:135-148.
- SCHUMANN, K 1895 Asclepiadaceae. In: Engler, A & Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien 4:109-189. Leipzig, Wilhelm Engelmann.
- SVENDSEN, AB & VERPOORTE, R 1983 Chromatography of alkaloids. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- SWARUPANANDAN, K; MANGALY, JK; SONNY, TK; KISHOREKUMAR, K & CHAND BASHA, S 1996 The subfamilial and tribal classification of the family Asclepiadaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 120:327-369.
- TIAGI, B & DIXIT, G 1965 Studies in the floral anatomy of some Asclepiadaceae. Bulletin of the Botanical Society of Bengal 19:111-123.
- VALENTE, M da C 1977 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Estudo da anatomia e vascularização (Asclepiadaceae). Rodriguésia 29:161-283.
- VALENTE, M da C 1980 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. et Val., comb. nov. – vascularização floral. Rodriguésia 32:81-98.

- VALENTE, M da C 1983 Vascularização floral em *Peplonia nitida* Decaisne (Asclepiadaceae). Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:55-62.
- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C 1995 *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. Anatomia e vascularização floral (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 33:75-98.
- VALENTE, M da C & COSTA, CG 2005 Estudo anatômico da flor de *Marsdenia Ioniceroides* E. Fournier (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Rodriguésia 56:51-66.
- VALENTE, M da C & SILVA, NMF da 1984 Anatomia floral de *Barjonia erecta* (Vell.) Schum. (Asclepiadaceae). Rodriguésia 36:95-106.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae), na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 1999 Pollinators of *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. Revista Brasileira de Biologia 59:693-704.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002 *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*: a taxon of Asclepiadaceae with an extragynoecial compitum. Plant Systematics and Evolution 233:199-206.
- WOODSON, RE Jr 1941 The North American Asclepiadaceae. I. Perspective of the genera. Annals of the Missouri Botanical Garden 28:193-244.
- WOODSON, RE Jr 1954 The North American species of *Asclepias* L. Annals of the Missouri Botanical Garden 41:1-211.
- WYATT, R & BROYLES, SB 1994 Ecology and evolution of reproduction in milkweeds. Annual Review of Ecology and Systematics 25:423-441.
- WYATT, R & SHANNON, TR 1986 Nectar production and pollination of *Asclepias exaltata*. Systematic Botany 11:326-334.

# **Capítulo 9**

# Sistema transmissor carpelar em flores de espécies de Asclepiadeae: estigma, tecido transmissor sólido, canal estilar e obturador

# Introdução

A polinização das flores de Asclepiadoideae representa um dos mais complexos sistemas das angiospermas, envolvendo mecanismos de remoção e inserção das polínias (Kunze 1991) e tecido transmissor altamente eficiente no direcionamento e nutrição dos tubos polínicos.

De acordo com Tilton e Horner (1980), tecido transmissor é o tecido ao longo ou através do qual os tubos polínicos crescem até chegar à micrópila do óvulo. Ele estende-se do estigma ao ovário, pode ser parcial ou inteiramente secretor e é composto por três regiões: tecido transmissor estigmático, tecido transmissor estilar e tecido transmissor ovariano.

Após a inserção da polínia na fenda estaminal, o néctar da câmara estigmáticanectarífera estimula a germinação do pólen e a mucilagem fornece o meio para que os tubos polínicos cresçam através da câmara até o estigma (anexo I; Jaeger 1971; Pant *et al.* 1982; Eisikowitch 1986; Kevan *et al.* 1989; Valente 1994; Wyatt & Broyles 1994; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; capítulo 8).

A posição do estigma em Asclepiadoideae é controversa (Corry 1883; Galil & Zeroni 1965; Valente 1977,1984,1995; Valente & Silva 1984; Kunze 1991; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005). Corry (1883) descreveu o estigma de *Asclepias cornuti* Decne. como um anel contínuo sob a cabeça dos estiletes. Frye (1902), Holm (1950), Rao e Ganguli (1963b) e Galil e Zeroni (1965) consideraram apenas as cinco regiões abaixo da cabeça dos estiletes que se alternam com as anteras, acessíveis pelas aberturas das câmaras estigmáticas. De maneira geral, a superfície receptiva está localizada abaixo da cabeça dos estiletes (Sage *et al.* 1990; Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; Simões *et al.* 2007).

Após penetrarem o estigma, os tubos polínicos crescem por um tecido transmissor sólido, até os canais estilares e destes, até o ovário e óvulos (Frye 1902; Sage *et al.* 1990; Kunze 1991,1999; Kunze & Liede 1991; Valente 1994; Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). Segundo Sage e Williams (1995), os tubos polínicos crescem imersos em exsudatos do tecido transmissor durante todo o percurso.

Embora a presença de tecido transmissor e o caminho percorrido pelo tubo polínico através do gineceu de flores de Asclepiadoideae sejam bem conhecidos, há raras informações estruturais sobre estes tecidos transmissores e quase nenhuma sobre as secreções produzidas por eles. Alguns dados esparsos podem ser obtidos de estudos da estrutura floral, podendo-se citar a referência a células epidérmicas ricas em conteúdo e tecido nutridor (transmissor) na placenta e ao redor dos canais estilares em *Ditassa eximia* Decne, *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (Valente 1977, 1984, 1995), além do registro de epiderme secretora no canal estilar e placenta de espécies de *Oxypetalum* (Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). Apenas o trabalho realizado por Sage e Williams (1995) em *Asclepias exaltata* L. descreveu em detalhes a estrutura dos tecidos transmissores e de suas respectivas secreções ao longo do gineceu.

O presente trabalho tem por objetivo analisar a ontogênese e estrutura dos tecidos transmissores de flores de *Asclepias curassavica* L., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*, verificar a ocorrência de secreção e avaliar a sua composição por meio de estudo histoquímico.

# Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de setembro de 2006 a fevereiro de 2007. Três indivíduos de *A. curassavica* foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50' 14,2"W) e praia da Fazenda (23°21'33,7"S/44°51'0,37"W); três de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W) e trilha do Noelo (23°20'53,1"S/44°51'00,9"W);

dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23°21′02,4″S/44°51′05,4″W; 23°20′55,3″S/44°51′01,5″W) e dois de *O. banksii* subsp. *banksii* na praia da Fazenda (23°21′24,0″S/44°50′14,7″W; 23°21′34,5″S/44°51′02,1″W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos florais de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Para a análise micromorfológica, flores adultas fixadas em FAA foram isoladas, desidratadas em série etílica, secas pelo método de ponto crítico, montadas e metalizadas com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada.

Diversos estádios do desenvolvimento floral foram selecionados para o estudo da ontogênese do sistema transmissor, desde o início da formação do botão junto aos ápices dos ramos até a flor adulta em pós-antese. Os diversos botões e flores foram isolados, desidratados em série butílica (Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 10 a 18  $\mu$ m. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética.

Para o estudo histoquímico, diferentes tratamentos foram realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes das secreções: vermelho de rutênio para pectinas e mucilagens ácidas (Johansen 1940; Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), reagente de Lugol para amido (Johansen 1940), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), reagentes de

Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

Flores foram mantidas por 48 h à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e receberam o mesmo tratamento das demais flores. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

### Resultados

Asclepias curassavica, G. axillaris, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii possuem sistema transmissor que se estende do estigma à placenta e é composto por estigma, tecido transmissor sólido, canal estilar e obturador (Fig. 1-6). Todas as espécies estudadas possuem estiletes livres (Fig. 1, 42, 46, 48, 53-54), semi-sólidos, fundidos apenas na porção superior (Fig. 1), formando a cabeça dos estiletes (Fig. 10, 15). Apenas em O. banksii subsp. banksii, os ápices dos estiletes não se fundem, permanecendo como dois apêndices apicais.

Estigma (Fig. 1-2, 7-13, 15-17, 19-21)

Nas quatro espécies estudadas, o estigma é do tipo seco e está localizado na região fundida dos estiletes, abaixo da cabeça dos estiletes. Ele estende-se do nível da adnação do androceu à base da cabeça dos estiletes (retináculo), que corresponde à abertura da câmara estigmática em sua porção superior, até próximo ao nível da fusão dos estiletes (Fig. 1, 7, 10-11, 15, 19).

O estigma é composto por uma camada de células epidérmicas alongadas (Fig. 1-2, 7-13, 16, 19-21). Estas células formam um anel ao redor dos estiletes (Fig. 8, 13, 17, 20); são mais longas nas cinco regiões de abertura da câmara estigmática (Fig. 9, 12, 20-21) e particularmente longas em *A. curassavica* e *G. axillaris*, projetando-se para dentro da câmara estigmática através de suas aberturas (Fig. 9, 12).

As células estigmáticas não são secretoras, possuem grandes vacúolos e o citoplasma não se cora ou cora fracamente (Fig. 8-9, 11-13, 16, 19, 21). Apenas grãos de amido são detectados em seu interior (Tabela 1).

#### <u>Tecido transmissor sólido</u> (Fig. 3, 8, 10-11, 13-14, 17-20, 28)

O tecido transmissor sólido é composto por células parenquimáticas não secretoras. Este tecido possui duas regiões distintas: uma ao nível do estigma e outra entre a região estigmática e o ponto de fusão dos estiletes. O tecido presente ao nível do estigma é formado por células parenquimáticas comuns de diferentes tamanhos, alongadas longitudinalmente em relação ao eixo floral, com paredes espessas, vacúolo central e citoplasma parietal (Fig. 8, 10-13, 16-17, 19-21). Espaços intercelulares são pequenos ou ausentes. Idioblastos cristalíferos portando drusas estão presentes em abundância em A. curassavica (Fig. 8) e G. axillaris (Fig. 13). O tecido transmissor sólido presente entre a região estigmática e o ponto de fusão dos estiletes (Fig. 10) forma dois cordões distintos de células não secretoras isodiamétricas, de paredes finas, citoplasma levemente corado (Fig. 14) e núcleo evidente em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii, mas em *M. denticulata*, ele forma um único cordão central (Fig. 3, 18). Espaços intercelulares são pequenos ou ausentes. Estas células estão presentes ao redor de todo o canal estilar (Fig. 24, 26, 28-33) e se estendem até a placenta (Fig. 27, 30, 33). As paredes destas células coram fortemente para pectinas (Fig. 42) e não foi detectada secreção através do estudo histoquímico; a única substância encontrada é o amido (Tabela 1).

#### Canal estilar (Fig. 4, 24-33)

O canal estilar forma-se durante o dobramento do primórdio carpelar (Fig. 22) na região dos estiletes (Fig. 23). As células protodérmicas interiorizadas pelo dobramento do primórdio não se fundem, dando origem a um canal ao longo da porção livre dos estiletes (Fig. 25, 27, 30, 33). Mesmo neste estádio inicial de desenvolvimento do gineceu, já é possível diferenciar as células do canal que terão atividade secretora (Fig. 23).

A porção superior do canal pode ser observada na região de separação dos estiletes, circundada pelas células do cordão de tecido transmissor sólido (Fig. 28). O canal se estende até o ovário e tem sua abertura na cavidade ovariana (Fig. 25, 27, 30, 33).

Os canais são estreitos e possuem lume bastante reduzido nas quatro espécies analisadas (Fig. 24, 26, 29, 31-32). Eles são revestidos por uma camada de células epidérmicas secretoras que variam de quadradas a alongadas, possuem paredes finas, citoplasma com conteúdo de aspecto denso e núcleo evidente geralmente em posição basal (Fig. 24, 26, 29, 31-32). Estas células permanecem em estádio pré-secretor até pouco antes da antese, mas já são alongadas e com núcleos em posição basal durante os últimos estádios do desenvolvimento do botão floral (Fig. 31). As células iniciam sua atividade secretora em flores em pré-antese e liberam sua secreção no lume do canal, preenchendo-o. Ela é composta por mucilagem e lipídios totais; grãos de amido foram detectados no interior das células secretoras (Tabela 1).

A epiderme secretora do canal estilar é contínua com a epiderme secretora da placenta (obturador; fig. 30, 33).

## Obturador (Fig. 5-6, 34-41)

A epiderme da placenta já apresenta características que a distingue das células epidérmicas comuns durante o desenvolvimento do botão floral, principalmente devido à afinidade mais acentuada dos componentes do citoplasma pela safranina (Fig. 34-35).

Assim como no canal estilar, a epiderme secretora da placenta é composta por uma camada de células quadradas a ligeiramente alongadas, com paredes finas e citoplasma com conteúdo de aspecto denso (Fig. 36-39, 41); os núcleos são evidentes e foram observados preferencialmente em posição central (Fig. 35-36). Algumas células da base dos funículos também são secretoras (Fig. 37-38, 40). A atividade secretora deste tecido permite identificá-lo como obturador placentário-funicular.

O obturador inicia sua atividade secretora, juntamente com o canal estilar, em flores em pré-antese. A secreção composta por mucilagem e lipídios totais (Tabela 1) é liberada no lóculo (Fig. 6, 37, 40) e preenche todo o seu interior (Fig. 40).

As secreções do canal estilar e do obturador formam uma camada de secreção contínua do início do canal à micrópila dos óvulos constituída por mucilagem e lipídios, através da qual os tubos polínicos crescerão.

**Tabela 1.** Resultados da aplicação dos testes histoquímicos para identificação das principais classes de metabólitos das secreções presentes nos tecidos transmissores de *Asclepias curassavica* L., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (+ = presente; - = ausente).

Tratamento histoquímico	Substância a ser detectada	<b>Estigma</b> (Figuras)	Tecido transmissor sólido (Figuras)	Canal estilar (Figuras)	<b>Obturador</b> (Figuras)
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	-	-	+ (42-43)	+ (43)
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	-	-	+ (45)	+ (44)
reação PAS	polissacarídeos totais	-	-	+ (46,48)	+ (47)
reagente de Lugol	amido	+ (49)	+ (50-52)	+ (50)	-
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	-	-	-	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	-	-	-	-
preto de Sudão B	lipídios totais	-	-	+ (53-55)	+
Sudão IV	lipídios totais	-	-	+	+
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	-	-	+	+ (56)
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-	-	-
reagente de Dragendorff	alcalóides	-	-	-	-
reagente de Wagner	alcalóides	-	-	-	-

# ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-6.** Eletromicrografias de varredura dos tecidos transmissores de flores de espécies de Asclepiadeae. **1.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **2-3.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **4.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **5-6.** *Asclepias curassavica* L. **1-2.** Estigma (**seta larga**). **3.** Tecido transmissor sólido (**TTS**). Notar a presença de um único cordão no centro dos estiletes. **4.** Canal estilar (**CE**). **5.** Ovário (**PI** = placenta). **6.** Secreção do obturador (**seta**) na cavidade ovariana entre os óvulos.



**Figuras 7-13.** Posição e estrutura do estigma de flores de *Asclepias curassavica* L. (**7-9**) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**10-13**). **7,10-11.** Secções longitudinais. **8-9,12-13.** Secções transversais. **7,10.** Estigma sob a cabeça dos estiletes. **8,13.** Células estigmáticas formando um anel ao redor da porção unida dos estiletes. **9,12.** Células estigmáticas projetando-se na câmara estigmática. **11.** Pormenor da figura 10. **TTSe** = tecido transmissor sólido da região estigmática; **TTSc** = cordão de tecido transmissor sólido. **Barras: 7-9.** 150 μm; **10,12-13.** 75 μm; **11.** 50 μm.



**Figuras 14-21.** Posição e estrutura do estigma e tecido transmissor sólido de flores de espécies de Asclepiadeae. **14.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **15-18.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **19-21.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **15-16,19.** Secções longitudinais. **14,17-18,20-21.** Secções transversais. **14.** Cordões de tecido transmissor sólido (**TTSc**). **15.** Porção superior do ginostégio. **16.** Pormenor da figura 15. **17,20.** Vista geral dos estiletes unidos na região estigmática. **18.** Cordão de tecido transmissor sólido único e central. **19,21.** Estigma. **21.** Pormenor da figura 20. **TTSe** = tecido transmissor sólido da região estigmática. **Barras: 14.** 50 μm; **15.** 300 μm; **16,18-19,21.** 75 μm; **17,20.** 150 μm.



**Figuras 22-27.** Ontogênese do gineceu e estrutura do tecido transmissor estilar em flores de *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**22,26-27**) e *Asclepias curassavica* L. (**23-25**). **22-24,26.** Secções transversais. **25,27.** Secções longitudinais. **22-23.** Dobramento dos primórdios carpelares na região do ovário (**22**) e estiletes (**23**) em botões em início de desenvolvimento. **24-27.** Flores adultas. **24,26.** Canais estilares delimitados por uma camada de células epidérmicas secretoras circundadas por tecido transmissor sólido. **25,27.** Continuidade entre entre o lume do canal e a cavidade ovariana. **Barras: 22-23,27.** 75 μm; **24.** 30 μm; **25.** 150 μm; **26.** 15 μm.



**Figuras 28-33.** Estrutura do canal estilar em flores de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**28-30**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**31-33**). **28-29,31-32.** Secções transversais. **30,33.** Secções longitudinais. **28-30,32-33.** Flores adultas. **28.** Início dos canais estilares logo abaixo do ponto de fusão dos estiletes circundados pelas células do cordão de tecido transmissor sólido (**TTSc**). **29,31-32.** Canais estilares delimitados por uma camada de células epidérmicas secretoras circundadas por tecido transmissor sólido. **30,33.** Epiderme do canal estilar contínua com a epiderme da placenta (obturador). **31.** Canal em estádio pré-secretor em botão floral. **Barras: 28.** 150 μm; **29-30,33.** 75 μm; **31-32.** 30 μm.



**Figuras 34-41.** Ontogênese e estrutura do obturador em flores de espécies de Asclepiadeae. Secções transversais. **34,39-40.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **35,41.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **36-37.** *Asclepias curassavica* L. **38.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **34-35.** Formação do obturador em botões florais (**PI** = placenta). **36-41.** Flores adultas. **36,39,41.** Epiderme secretora na placenta. **37-38,40.** Epiderme secretora na placenta e base dos funículos. **37,40.** Secreção do obturador entre os óvulos, preenchendo a cavidade ovariana. **Barras: 34-35,37-38,41.** 75 μm; **36,39.** 30 μm; **40.** 150 μm.


**Figuras 42-48.** Resultados dos testes histoquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. **42,44.** *Asclepias curassavica* L. **43,45-46.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **47.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **48.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **42,44,46-48.** Secções transversais. **43,45.** Secções longitudinais. **42-43.** Vermelho de rutênio (**o** = parede do ovário). **44-45.** Ácido tânico e cloreto férrico. **46-48.** Reação PAS. **Barras: 42-43,45-46,48.** 75 μm; **44.** 50 μm; **47.** 30 μm.



**Figuras 49-56.** Resultados dos testes histoquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. Secções transversais. **49-50,53,56.** *Asclepias curassavica* L. **51,55.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**PI** = placenta). **52.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **54.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **49-52.** Azul de astra, safranina e reagente de Lugol. **53-55.** Preto de Sudão B. **56.** Sulfato azul do Nilo. **Barras: 49-50.** 50 µm; **51,54-56.** 75 µm; **52.** 30 µm; **53.** 150 µm.



#### Discussão

O tecido carpelar que tem relação nutricional ou fisiológica com os tubos polínicos foi descrito pela primeira vez no século XVIII e recebeu diferentes denominações dos diversos pesquisadores; atualmente ele é conhecido como tecido transmissor, mas os pesquisadores costumam se referir apenas à porção estilar deste tecido (Tilton & Horner 1980). Devido a isso, Tilton e Horner (1980) redefiniram o tecido transmissor como um todo baseados na origem dos tecidos e subseqüente função, definindo-o como a parte do gineceu através da qual os tubos polínicos crescem até a micrópila e subdividiram-no em estigmático, estilar e ovariano.

Segundo Heslop-Harrison (1981), a superfície receptiva deve capturar os grãos de pólen, prover as condições para que eles se hidratem e germinem, fornecer pontos de entrada para os tubos polínicos, guiá-los em direção ao estilete, além de poder estar envolvida em sistemas de incompatiblidade inter e intraespecífica. Portanto, em Asclepiadoideae, as duas primeiras funções foram transferidas para tecidos não carpelares, embora as características estruturais relacionadas às outras funções tenham sido retidas (Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; capítulo 8).

O estigma das quatro espécies estudadas é composto por células não secretoras com grandes vacúolos sobre a superfície unida dos estiletes sob a cabeça dos estiletes, estendendo-se até próximo ao ponto de fusão dos estiletes. Existe controvérsia sobre a posição do estigma nas Asclepiadoideae e nas Apocynaceae em geral (Corry 1883; Galil & Zeroni 1965; Valente 1977,1984,1995; Valente & Silva 1984; Fallen 1986; Kunze 1991; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; Simões *et al.* 2007). Com exceção de alguns gêneros de Rauvolfioideae, onde as flores possuem o tipo mais básico de cabeça dos estiletes e aparentemente toda a superfície secretora é receptiva, todas as demais espécies possuem a região receptiva abaixo da cabeça dos estiletes (Corry 1883; Frye 1902; Holm 1950; Rao & Ganguli 1963b; Fallen 1986; Sage *et al.* 1990; Valente 1994; Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Sage & Williams 1995; Swarupanandan *et al.* 1996; Vieira & Shepherd 2002; Demarco 2005; Simões *et al.* 2007). Corry (1883) descreveu o estigma de *Asclepias cornuti* como um anel contínuo sob a cabeça dos estiletes; Frye (1902), estudando esta mesma espécie e outras nove de *Asclepias*, concordou com as observações de Corry, mas salientou que devido às projeções dos estiletes o estigma é

acessível apenas através das câmaras estigmáticas e corresponde somente aos intervalos entre os estames. Em diversas outras espécies, o estigma também foi registrado como sendo apenas as cinco regiões sob a cabeça dos estiletes que se alternam com as anteras, acessíveis pelas câmaras estigmáticas (Holm 1950; Rao & Ganguli 1963b; Valente 1994), mas Swarupanandan *et al.* (1996) consideraram-no como toda a superfície unida dos estiletes abaixo da cabeça dos estiletes. Em geral, todas as descrições de flores de Asclepiadoideae referem-se à superfície receptiva como sendo a região basal da cabeça dos estiletes (Sage *et al.* 1990; Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Sage & Williams 1995; Swarupanandan *et al.* 1996; Demarco 2005). No presente estudo, observou-se que o estigma de *O. banksii* subsp. *banksii* tem a mesma localização e possui as mesmas características que o das demais espécies; além disso, Vieira e Shepherd (2002) registraram tubos polínicos penetrando nesta região dos estiletes de *O. banksii* subsp. *banksii*.

Todas as espécies descritas até o momento possuem estigma composto por células alongadas (Sage *et al.* 1990; Kunze 1991; Demarco 2005) com grandes vacúolos (Sage & Williams 1995) e embora toda a superfície aparentemente seja receptiva, a proximidade desta região com o androceu devido à fusão entre os verticilos faz com que apenas as cinco regiões de abertura das câmaras estigmáticas provavelmente sejam penetradas pelos tubos polínicos. Em *O. banksii* subsp. *banksii*, há um espaço entre o estigma e o androceu onde a presença de mucilagem funciona como um cômpito extracarpelar e os tubos polínicos crescem ao redor dos estiletes unidos (Vieira & Shepherd 2002) podendo penetrar em qualquer porção do estigma. Estruturalmente, não há diferença da epiderme ou do tecido subepidérmico entre as regiões opostas e alternas às câmaras estigmáticas; desta forma, o estigma envolve os estiletes, mas os tubos polínicos penetram apenas em cinco regiões restritas devido à sua proximidade com a câmara. Experimentos de germinação e receptividade do estigma visando esclarecer se a restrição do estigma é espacial ou funcional são necessários.

O estigma de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* é do tipo seco, assim como em *A. exaltata* (Sage & Williams 1995). Estigmas secos e úmidos já foram citados para espécies de *Asclepias* (Heslop-Harrison & Shivanna 1977). Uma camada epicuticular protéica denominada película está presente em estigmas secos e é

relacionada à sua receptividade (Mattsson *et al.* 1974; Heslop-Harrison & Shivanna 1977; Vithanage & Knox 1977; Heslop-Harrison 1981; Dumas *et al.* 1988); esta camada foi detectada em *A. exaltata* tendo uma camada lipídica externa à cutícula sob ela (Sage & Williams 1995).

O tecido transmissor estilar das espécies analisadas possui características intermediárias entre os tecidos transmissores de estiletes ocos e sólidos, podendo ser considerado um estilete semi-sólido (misto), de acordo com a classificação de Tilton e Horner (1980). O tecido transmissor sólido das quatro espécies é composto por células parenquimáticas não secretoras alongadas longitudinalmente, com paredes espessas e grandes vacúolos ao nível do estigma e por células de paredes finas, citoplasma levemente corado e núcleo evidente que formam dois cordões em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii ou um cordão em M. denticulata entre a região estigmática e o ponto de fusão dos estiletes. As células parenquimáticas dos cordões de tecido transmissor sólido permanecem ao redor do canal ao longo do estilete e se estendem até a placenta. Embora este tecido, geralmente referido como tecido nutridor (Valente 1977,1984,1995; Valente & Silva 1984), tenha perdido sua função de tecido transmissor no ovário, uma vez que os tubos polínicos atingem a cavidade ovariana através do canal estilar, ele permanece presente em todas as espécies estudadas e aparentemente é uma herança filogenética das Apocynaceae basais, onde este tecido apresentava função transmissora e se estendia da região estigmática à placenta (Fallen 1986).

As células do estigma e as parenquimáticas do tecido transmissor sólido não são secretoras e apenas grãos de amido foram detectados em seu interior. Amiloplastos também foram registrados no tecido transmissor estilar de diversas espécies (Vasil & Johri 1964; Tilton & Horner 1980). Sage e Williams (1995) consideraram o tecido transmissor sólido de *Asclepias exaltata* como sendo secretor; estes autores detectaram a presença de proteínas, arabinogalactano-proteínas e carboidratos, incluindo pectinas nos espaços intercelulares. Estas células possuem grandes vacúolos e citoplasma periférico, como observado no tecido transmissor sólido da região estigmática. Os compostos presentes nos espaços intercelulares são comumente encontrados nas paredes celulares (Carpita & McCann 2000) e aparentemente resultam da dissolução de regiões das paredes e/ou lamela média. Este pode ser o mecanismo pelo qual as células deste tecido guiam os tubos

polínicos até o cordão de tecido transmissor sólido. Segundo Knox (1984), os diferentes exsudatos deste tecido provavelmente fornecem o meio físico e nutricional para o crescimento dos tubos polínicos, assim como moléculas de reconhecimento (auto-incompatibilidade) e quimiotrópicas, que formarão um sistema guia para os tubos polínicos. Ausência de plasmodesmos nas paredes laterais das células de tecidos transmissores sólidos é uma característica comumente encontrada (Sassen 1974; Cresti *et al.* 1976; Bell & Hicks 1976).

Vieira (1998) e Vieira e Shepherd (2002) descreveram os tecidos transmissores sólidos de *O. banksii* subsp. *banksii* e de outras espécies de *Oxypetalum* como duas regiões individualizadas, separadas por células parenquimáticas frouxamente organizadas, cujas células têm afinidade diferenciada pela safranina. Nas quatro espécies analisadas, verificou-se que este tecido está presente entre o nível da base do estigma e o ponto de fusão dos estiletes, onde se iniciam os canais estilares. Segundo Rao e Ganguli (1963a), o tecido transmissor das Rauvolfioideae e Apocynoideae também termina próximo ao nível do estigma.

Após atravessarem o tecido transmissor sólido, os tubos polínicos atingem o canal estilar (Frye 1902; Sage et al. 1990; Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Valente 1994; Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). Os canais de A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii são estreitos, com lume bastante reduzido e revestidos por uma camada de células epidérmicas secretoras com paredes finas, citoplasma de aspecto denso e núcleo evidente. Estas células possuem grãos de amido e secretam um exsudato composto por mucilagem e lipídios totais a partir da préantese floral, que é liberado no lume, preenchendo-o. O canal também é estreito em outras espécies da família e provavelmente é um local de forte competição dos tubos polínicos, aumentando a chance de seleção do gametofito (Kunze & Liede 1991). Poucos estudos registraram atividade secretora no canal estilar. Vieira e Shepherd (2002) citaram a presença de epiderme secretora em espécies de Oxypetalum, cujo exsudato preenche o lume do canal. Em Asclepias exaltata, o canal também está presente na porção livre dos estiletes e é revestido por uma camada de células papilosas, com núcleo proeminente, diversos vacúolos e grandes grãos de amido; a secreção é composta por proteínas e carboidratos (Sage & Williams 1995).

O tecido transmissor ovariano é um obturador placentário-funicular constituído por células epidérmicas secretoras quadradas a ligeiramente alongadas da placenta e base dos funículos, que secretam mucilagem e lipídios totais a partir da pré-antese floral. Este é o primeiro registro de obturador em Apocynaceae. O obturador é gualquer modificação anatômica do tecido transmissor ovariano, cuja função é direcionar o crescimento do tubo polínico até a micrópila (Tilton & Horner 1980). Ele pode ter origem do funículo, placenta ou uma combinação de ambos, e ser formado por tricomas secretores e tecido subepidérmico ou simplesmente por uma camada epidérmica geralmente papilosa e secretora (Tilton & Horner 1980; Johri 1984; Werker 1997). Embora ele tenha ampla ocorrência em algumas famílias, como Euphorbiaceae, Rosaceae e Liliaceae (Tilton & Horner 1980; Sutter & Endress 1995), a única referência a um possível obturador em Apocynaceae foi feita para Aspidosperma australe Müll. Arg.; entretanto, nesta espécie, a epiderme da placenta é composta por células alongadas (tricomas) com paredes de composição distinta das paredes das demais células e não foi observado secreção no meio extracelular (Demarco 2005). A presença de obturador foi registrada como exclusiva de Rubiaceae em Gentianales e considerada uma das características que a distingue das demais famílias da ordem (Backlund et al. 2000).

No ovário, os tubos polínicos crescem sobre a superfície placentária (Kunze & Liede 1991; Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). Apesar destas observações, poucos estudos detectaram a presença de tecido secretor na placenta de espécies de Asclepiadoideae. Valente (1977, 1984, 1995) e Valente e Silva (1984) descreveram células epidérmicas da placenta como ricas em conteúdo celular em *Barjonia erecta* (Vell.) Schum., *Ditassa eximia, Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* e *O. banksii* subsp. *banksii*; Vieira e Shepherd (2002) citaram a ocorrência de epiderme secretora na placenta de espécies de *Oxypetalum*, inclusive *O. banksii* subsp. *banksii*, mas suas características foram analisadas apenas por Sage e Williams (1995), que registraram epiderme secretora na placenta e porção inferior do funículo em *Asclepias exaltata*; estas células são similares às do canal estilar e secretam carboidratos e proteínas. A pequena quantidade de dados anatômicos sobre a estrutura da placenta de flores de Apocynaceae e de registros de atividade secretora em tecidos ovarianos possivelmente foram os responsáveis pela ausência de relatos anteriores de obturador nesta família.

A epiderme secretora do canal estilar é contínua com o obturador em todas as espécies estudadas. Esta continuidade já foi observada anteriormente em espécies de *Asclepias* (Frye 1902; Sage & Williams 1995) e *Oxypetalum* (Vieira & Shepherd 2002). Os canais estilares e obturadores placentário-funiculares de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* exsudam uma secreção composta por mucilagem e lipídios que forma uma camada contínua que preenche o lume dos canais estilares e a cavidade ovariana através da qual os tubos polínicos crescem até a micrópila dos óvulos. Sage e Williams (1995) também detectaram uma outra secreção no interior da micrópila dos óvulos de *Asclepias exaltata* que provavelmente é produzida pelas sinérgides.

Embora os estiletes sejam unidos na região estigmática possibilitando que os tubos polínicos atinjam os óvulos dos dois ovários independentemente do seu local de entrada, salvo raras exceções (Sparrow & Pearson 1948; Sage *et al.* 1990; Vieira & Shepherd 2002), isto não ocorre em Asclepiadoideae. Mesmo nestas exceções, a taxa de folículos gêmeos é menor que 5,5% (Sparrow & Pearson 1948; Sage *et al.* 1990).

Fallen (1986) considerou a presença de um cômpito (Carr & Carr 1961) como uma das funções primárias da cabeça dos estiletes; entretanto, funcionalmente, o cômpito corresponde ao cordão de tecido transmissor sólido. Em Rauvolfioideae e Apocynoideae, ele se diferencia na região de fusão dos estiletes, interconectando os carpelos, e se estende como um único cilindro central até o ovário (Fallen 1986). Cômpito também foi descrito para *Secamone alpinii* Schultes; nesta espécie, os canais estilares compartilham um início comum e a polínia pode emitir tubos polínicos para ambos os ovários (Kunze 1991). Em todas as espécies de Asclepiadoideae descritas até o momento, com exceção de *Tylophora* (Marsdenieae) que possui as mesmas características de *Secamone alpinii*, os tubos polínicos de uma polínia penetram apenas um dos ovários (Kunze 1991). A separação em dois cordões isolados de tecido transmissor provavelmente ocorreu em Marsdenieae (Asclepiadoideae), mas em *M. denticulata*, há apenas um cordão central e, teoricamente, os tubos polínicos podem atingir ambos os canais estilares, fertilizando os dois ovários e funcionando como um cômpito.

Segundo Kunze (1991), a alocação dos tubos polínicos de uma polínia para fertilizar os óvulos de apenas um ovário é uma estratégia das Asclepiadoideae mais evoluídas, pois o número de grãos de pólen por polínia é limitado e uma distribuição similar de tubos polínicos para os dois ovários resultaria em muitos óvulos não fertilizados. Em quase todas estas espécies de Asclepiadoideae, há uma relação entre as câmaras estigmáticas adjacentes e o ovário que receberá os tubos polínicos e pode-se prever o ovário que será fertilizado baseado na posição da câmara que recebeu a polínia em relação ao sulco ou apêndices apicais da porção superior da cabeça dos estiletes (Sage *et al.* 1990; Kunze & Liede 1991; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). *O. banksii* subsp. *banksii* possui um cômpito extracarpelar que permite que a polinização por uma única polínia produza folículos gêmeos. Este é um caso único dentre as Apocynaceae, onde a porção superior da superfície interna do tubo dos filetes possui epiderme secretora contínua com a epiderme da câmara estigmática-nectarífera e a mucilagem produzida age como meio transmissor (Vieira & Shepherd 2002).

A descrição geral do caminho do tubo polínico através dos tecidos transmissores do gineceu das espécies de Asclepiadoideae inicia com a germinação dos grãos de pólen pelo néctar presente nas câmaras estigmáticas (Eisikowitch 1986; Kevan *et al.* 1989; Valente 1994; Wyatt & Broyles 1994; Sage & Williams 1995). Os tubos polínicos penetram o estigma e crescem intercelularmente pelo tecido transmissor sólido (Sage *et al.* 1990; Sage & Williams 1995). Aparentemente, o tecido parenquimático entre os cordões do tecido transmissor sólido funciona como uma barreira (Kunze 1999; Vieira & Shepherd 2002). Os tubos crescem pelo canal e obliteram-no, assim como às células parenquimáticas do tecido transmissor adjacente (Sage *et al.* 1990; Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). No ovário, os tubos polínicos crescem na cavidade ovariana sobre a superfície da placenta até a micrópila dos óvulos (Sage & Williams 1995; Vieira & Shepherd 2002).

#### Conclusões

O tecido transmissor de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possui características estruturais e secretoras semelhantes. O estigma é composto por células alongadas não secretoras com grãos de amido, que envolvem a região unida dos estiletes abaixo da cabeça dos estiletes. O tecido transmissor sólido ao nível do estigma é composto por células parenquimáticas não secretoras com paredes espessas e grandes vacúolos; entretanto, abaixo da região estigmática há dois cordões isolados de

células parenquimáticas não secretoras com paredes finas, citoplasma levemente corado e núcleo evidente em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* e um cordão central em *M. denticulata* que pode funcionar como um cômpito. Estas células possuem grãos de amido e estão presentes ao redor dos canais ao longo da porção livre dos estiletes e também na placenta. Os canais são compostos por uma camada de células epidérmicas secretoras quadradas a alongadas que são contínuas com a epiderme secretora da placenta e base dos funículos (obturador placentário-funicular). Em ambas as regiões, a epiderme inicia a atividade secretora na pré-antese floral e exsuda uma secreção heterogênea composta por mucilagem e lipídios totais que preenche os canais estilares e cavidade ovariana, formando uma camada contínua de secreção através da qual os tubos polínicos crescem até a micrópila dos óvulos.

#### Referências bibliográficas

- BACKLUND, M; OXELMAN, B & BREMER, B 2000 Phylogenetic relationships within the Gentianales based on NDHF and RBCL sequences, with particular reference to the Loganiaceae. American Journal of Botany 87:1029-1043.
- BELL, J & HICKS, G 1976 Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. Planta 131:187-200.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CARPITA, N & McCANN, M 2000 The cell wall. *In*: Biochemistry and molecular biology of plants. (Buchanan, BB; Gruissem, W & Jones, R, eds.), Rockville, American Society of Plant Physiologists.
- CARR, SGM & CARR, DJ 1961 The functional significance of syncarpy. Phytomorphology 11:249-256.
- CORRY, TH 1883 On the structure and development of gynostegium and the mode of fertilisation in *Asclepias cornuti*. Transactions of the Linnean Society of London 2:173-207.
- CRESTI, M; VAN WENT, JL; PACINI, E & WILLEMSE, MTM 1976 Ultrastructure of

transmitting tissue of *Lycopersicon peruvianum* style: development and histochemistry. Planta 132:305-312.

- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DUMAS, C; BOWMAN, RB; GAUDE, T; GUILLY, CM; HEIZMANN, Ph; ROECKEL, P & ROUGIER, M 1988 Stigma and stigmatic secretion reexamined. Phyton (Annales Rei Botanicae) 28:193-200.
- EISIKOWITCH, D 1986 Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in Israel. Plant Systematics and Evolution 152:185-194.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanishe Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FRYE, TC 1902 A morphological study of certain Asclepiadaceae. Botanical Gazette 34:389-413.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GALIL, J & ZERONI, M 1965 Nectar system of *Asclepias curassavica*. Botanical Gazette 126:144-148.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier - Villars.
- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.

- HESLOP-HARRISON, Y 1981 Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. Nordic Journal of Botany 1:401-420.
- HESLOP-HARRISON, Y & SHIVANNA, KR 1977 The receptive surface of the angiosperm stigma. Annals of Botany 41:1233-1258.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- HOLM, RW 1950 The American species of *Sarcostemma* R. Br. (Asclepiadaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 37:477-560.
- JAEGER, P 1971 Contribution a l'étude de la biologie florale des Asclépiadacées. Le *Calotropis procera* Ait. Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (A) 33:32-43.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- JOHRI, BM 1984 Embryology of angiosperms. Berlin, Heildelberg.
- KEVAN, PG; EISIKOWITCH, D & RATHWELL, B 1989 The role of nectar in the germination of pollen in *Asclepias syriaca* L. Botanical Gazette 150:266-270.
- KNOX, RB 1984 Pollen-pistil interactions. Annual Review of Plant Physiology 17:508-608.
- KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. Plant Systematics and Evolution 176:227-253.
- KUNZE, H 1999 Pollination ecology in two species of *Gonolobus* (Asclepiadaceae). Flora 194:309-316.
- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (Asclepiadaceae). Plant Systematics and Evolution 178:95-105.
- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- MATTSSON, O; KNOX, RB; HESLOP-HARRISON, J & HESLOP-HARRISON, Y 1974 Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. Nature 247:298-300.

- PANT, DD; NAUTIYAL, DD & CHATURVEDI, SK 1982 Pollination ecology of some Indian asclepiads. Phytomorphology 32:302-313.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963a Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963b The floral anatomy of some Asclepiadaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (B) 57:15-44.
- SAGE, TL; BROYLES, SB & WYATT, R 1990 The relationship between the five stigmatic chambers and two ovaries of milkweed (*Asclepias amplexicaulis* Sm.) flowers: a three-dimensional assessment. Israel Journal of Botany 39:187-196.
- SAGE, TL & WILLIAMS, EG 1995 Structure, ultrastructure, and histochemistry of the pollen tube pathway in the milkweed *Asclepias exaltata* L. Sexual Plant Reproduction 8:257-265.
- SASSEN, MMA 1974 The stylar transmitting tissue. Acta Botanica Neerlandica 23:99-108.
- SIMÕES, AO; RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2007 Gynostegium morphology of Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae) as it pertains to the classification of the tribe. International Journal of Plant Sciences 168: 999-1012.
- SPARROW, FK & PEARSON, NL 1948 Pollen compatibility in *Asclepias syriaca*. Journal of Agricultural Research 77:187-199.
- SUTTER, D & ENDRESS, PK 1995 Aspects of gynoecium structure and macrosystematics in Euphorbiaceae. Botanishe Jahrbücher für Systematik 116:517-536.
- SVENDSEN, AB & VERPOORTE, R 1983 Chromatography of alkaloids. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.

- SWARUPANANDAN, K; MANGALY, JK; SONNY, TK; KISHOREKUMAR, K & CHAND BASHA,
  S 1996 The subfamilial and tribal classification of the family Asclepiadaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 120:327-369.
- TILTON, VR & HORNER, HT Jr 1980 Stigma, style, and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. American Journal of Botany 67:1113-1131.
- VALENTE, M da C 1977 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Estudo da anatomia e vascularização (Asclepiadaceae). Rodriguésia 29:161-283.
- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C 1994 Germinação dos polínios em *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. (Asclepiadaceae). Atas da Sociedade Botânica do Brasil 3:129-135.
- VALENTE, M da C 1995 Matelea maritima subsp. ganglinosa (Vell.) Font. Anatomia e vascularização floral (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 33:75-98.
- VALENTE, M da C & SILVA, NMF da 1984 Anatomia floral de *Barjonia erecta* (Vell.) Schum. (Asclepiadaceae). Rodriguésia 36:95-106.
- VASIL, IK & JOHRI, MM 1964 The style, stigma and pollen tube. I. Phytomorphology 14:352-369.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae), na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002 *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*: a taxon of Asclepiadaceae with an extragynoecial compitum. Plant Systematics and Evolution 233:199-206.
- VITHINAGE, HIMV & KNOX, RB 1977 Development and cytochemistry of stigma surface and response to self and foreign pollination on *Helianthus annuus*. Phytomorphology 27:168-179.

296

WERKER, E 1997 Seed anatomy. Berlin, Stuttgart: Borntraeger.

WYATT, R & BROYLES, SB 1994 Ecology and evolution of reproduction in milkweeds. Annual Review of Ecology and Systematics 25:423-441.

### Capítulo 10

## Morfogênese, estrutura e microquímica do polinário em espécies de Asclepiadeae

#### Introdução

As flores das Asclepiadoideae destacam-se das demais dicotiledôneas pela ocorrência de diversas sinapomorfias, dentre elas, a apresentação do pólen em polínias. Essa característica é única dentre as dicotiledôneas e só é compartilhada com as Orchidaceae. A polínia está associada a estruturas acessórias e indubitavelmente foi uma inovação evolutiva que promoveu a diversificação das espécies (Johnson & Edwards 2000; Wyatt & Lipow 2007).

Os membros deste grupo possuem flores com ovário considerado apocárpico e porção superior dos estiletes fundidas, formando a cabeça dos estiletes (Fallen 1986; Endress 1994; Swarupanandan *et al.* 1996; Demarco 2005). Os filetes são unidos formando o tubo dos filetes e as anteras são livres, mas posgenitamente adnatas à porção inferior da cabeça dos estiletes através do retináculo, originando o ginostégio e um complexo sistema de polinização (Pichon 1948; Rao & Ganguli 1963; Fallen 1986; Kunze 1991; Endress 1994; Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000). As forças seletivas que levaram à separação dos carpelos nesta família não são claras, mas a complexa morfogênese da porção superior do gineceu aparentemente teve um papel importante (Fallen 1986).

O estabelecimento do ginostégio possibilitou o surgimento do polinário, pois este é produzido em parte pelo androceu e parte pelo gineceu (Endress 1994). A cabeça dos estiletes possui epiderme secretora em todas as espécies da família (Corry 1883; Valente 1977, 1995; Valente & Silva 1984; Fallen 1986; Kunze 1993, 1994; Galetto 1997; Lin & Bernardello 1999; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006; Rio 2006; Simões *et al.* 2007; Marasca 2008). Em Asclepiadoideae, ela é responsável pela secreção do translador constituído por corpúsculo e caudículas (Brown 1810; Corry 1883; Schumann 1895; Valente 1977, 1984, 1995; Vijayaraghavan & Cheema 1977; Schnepf *et al.* 1979; Valente & Silva 1984; Kunze 1993, 1994; Endress 1994; Swarupanandan *et al.* 1996; Vieira

1998; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006). Poucos trabalhos analisaram a morfogênese e composição química. Demeter (1922) registrou-o como goma, Woodson (1954) e Safwat (1962) como lipídio, Vijataraghavan e Cheema (1977) como lipídios, proteínas e fenólicos e Schnepf *et al.* (1979) como uma emulsão de lipídios e polissacarídeos.

A morfologia do translador é amplamente utilizada para agrupar gêneros em nível tribal ou infratribal e em chaves de identificação (Woodson 1941; Volk 1950; Pereira & Silva 1973; Kunze 1995; Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000) e pode-se distinguir as tribos de Asclepiadoideae com base no polinário. Em Asclepiadeae, as caudículas têm inserção apical e as polínias são pêndulas (abaixo do corpúsculo), raramente eretas (Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000); nas outras duas tribos, a inserção é basal, com polínias eretas (acima do corpúsculo), ou médio-lateral (Volk 1950; Endress & Bruyns 2000). Marsdenieae pode ser distinguida de Ceropegieae pela ausência de crista de inserção hialina na parte superior ou externa da polínia (Endress & Bruyns 2000) e as polínias de Gonolobinae são horizontais em relação ao filete (raramente pêndulas) com crista de inserção hialina e pelo menos uma face côncava (Woodson 1941; Kunze 1995; Valente 1995; Swarupanandan *et al.* 1996).

O tapete está universalmente presente nas plantas terrestres, devido à sua principal função de nutrição dos micrósporos/grãos de pólen, mas outras funções são atribuídas a ele, tais como produção do fluido locular, calase, polissacarídeos, precursores da exina, ligamentos de viscina, orbículos, proteínas, enzimas e "polenkitt"/trifina. Há dois tipos principais de tapete: o secretor ou parietal e o amebóide ou periplasmodial. Todas as Apocynaceae possuem o tapete do tipo secretor, com anteras volumosas e muitos micrósporos/grãos de pólen (Pacini *et al.* 1985). O tapete também é responsável pela secreção da camada que envolve as polínias (Woodson 1954; Linskens & Suren 1969; Schnepf *et al.* 1979).

Tendo em vista a complexidade estrutural e os diversos aspectos ainda não totalmente explicados da formação dos polinários, o presente estudo tem por objetivo investigar a morfogênese do translador e das polínias e a composição das secreções produzidas pela cabeça dos estiletes e pelo tapete das flores de *Asclepias curassavica* L.,

*Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult.

#### Material e métodos

O material de estudo foi obtido no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, na praia da Fazenda, estrada para a Casa de Farinha, Casa de Farinha e trilha do Noelo. As coletas foram realizadas de setembro de 2006 a fevereiro de 2007. Três indivíduos de A. curassavica foram coletados na Casa de Farinha (23°20'24,2"S/44°50'14,6"W; 23°20'23,2"S/44°50'14,3"W; 23°20'22,9"S/44°50' 14,2"W) e praia da Fazenda (23º21'33,7"S/44º51'0,37"W); três de *G. axillaris* na praia da Fazenda (23°21'35,0"S/44°50'58,9"W) e trilha do Noelo (23°20'53,1"S/44°51'00,9"W); dois de *M. denticulata* na estrada para a Casa de Farinha (23º21'02,4"S/44º51'05,4"W; 23°20'55,3"S/44°51'01,5"W) e dois de O. banksii subsp. banksii na praia da Fazenda (23° 21'24,0"S/44°50'14,7"W; 23°21′34,5″S/44°51′02,1″W). Materiais testemunha dos indivíduos processados estão depositados nos Herbários UEC (Universidade Estadual de Campinas) e SPSF(Instituto Florestal).

Ramos florais de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool etílico) por 24 h (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (Lillie 1965) e SFF (sulfato ferroso em formalina; Johansen 1940) por 48 h, sendo estocados em álcool etílico 70%.

Para a análise micromorfológica, flores adultas fixadas em FAA foram isoladas, desidratadas em série etílica, secas pelo método de ponto crítico, montadas e metalizadas com ouro. As observações e registro de imagens foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol JSM 5800 LV a 10 kV com câmera digital acoplada. Os esquemas dos transladores com suas estrias foram realizados em microscópio com câmara clara acoplada.

Diversos estádios do desenvolvimento floral foram selecionados para o estudo da ontogênese das glândulas florais desde o início da formação do botão junto aos ápices dos ramos até a flor adulta em pós-antese. Os diversos botões e flores foram isolados, desidratados em série butílica (Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados

transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 10 a 18  $\mu$ m. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (C.I. 50240; Gerlach 1984) e as lâminas montadas em resina sintética.

Para o estudo microquímico, diferentes tratamentos foram realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes do translador, película da polínia e crista hialina: vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico e cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977), reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reaction; pararosanilina C.I. 42500) para polissacarídeos totais (Jensen 1962), Calcofluor white (C.I. 40621) para celulose (Hughes & McCully 1975), preto de amido B (C.I. 20470) para proteínas (Fisher 1968), preto de Sudão B (C.I. 26150) e Sudão IV (C.I. 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (C.I. 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), acetato de cobre e ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970), cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940), reagentes de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcalóides. As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

Botões florais foram mantidos por diversos dias à temperatura ambiente em solução composta por metanol, clorofórmio, água e ácido clorídrico (High 1984) para realização do controle dos testes para substâncias lipofílicas, mas não foi possível extraí-las do translador, película da polínia e crista hialina.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak ProImage ASA 100, digitalizadas e as ilustrações, editadas em Adobe Photoshop. As escalas das figuras foram calculadas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

#### Resultados

Asclepias curassavica, G. axillaris, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii possuem ginostégio (Fig. 1, 3) formado pela adnação de projeções laterais da base antera (retináculo) à superfície inferior da cabeça dos estiletes (Fig. 2-3) nos estádios intermediários do desenvolvimento floral. Em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii, o retináculo é formado por duas projeções laterais da base da antera, mas em M. denticulata, estas projeções se fundem formando um anel e este une-se à cabeça dos

estiletes. O polinário é composto pelo translador (Fig. 4-7, 10-13), secretado pela cabeça dos estiletes, e pelas as polínias (Fig. 5-7, 10-13), formadas pelas anteras.

Os transladores são constituídos pelo corpúsculo, que é a região alongada, rígida, com um sulco mediano (Fig. 4, 6, 10-11, 13), e por duas caudículas filiformes em *A. curassavica* (Fig. 5, 10) e *G. axillaris* (Fig. 6, 11), laminares em *M. denticulata* (Fig. 7) e com apêndice aliforme e espessamento lateral linear em *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 13). As polínias de *A. curassavica*, *G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* são pêndulas (Fig. 5-6, 10-11, 13) e as de *M. denticulata*, horizontais (Fig. 7) com margem pelúcida e crista hialina (Fig. 12; anexo I).

#### Cabeça dos estiletes

A cabeça dos estiletes é pentagonal nas quatro espécies (Fig. 8-9) e é resultado da fusão posgênita da porção superior dos estiletes (Fig. 3, 18) no início do desenvolvimento floral. Ela é circundada pelas anteras (Fig. 3-4, 7) e sua porção superior é parcialmente recoberta pelos apêndices membranáceos, que são expansões do ápice das anteras (Fig. 1, 3-4). O gineceu de *G. axillaris* é quase totalmente recoberto pelo androceu (Fig. 1).

As regiões secretoras dos transladores situam-se na superfície lateral (Fig. 6, 17-18, 21, 23, 25) dos ângulos da cabeça dos estiletes, que são alternos às anteras (Fig. 1, 4, 8-9). Este tecido secretor é composto por uma única camada de células epidérmicas retangulares estreitas dispostas em paliçada (Fig. 14-27). Estas células possuem paredes finas, conteúdo citoplasmático de aspecto denso (Fig. 14-15, 19, 21-22, 25-26) e núcleo em posição mediana (Fig. 18-19). A cutícula é fina e espaço extraprotoplástico é observado na porção distal destas células (Fig. 22). Não há vascularização próximo à epiderme secretora; os feixes dos dois estiletes não emitem ramos em sua direção e mantêm sua individualidade ao longo de toda a cabeça dos estiletes (Fig. 9), unindo-se apenas próximo ao seu ápice (Fig. 8).

A produção do translador inicia nos primeiros estádios de desenvolvimento do botão floral, pouco após a abertura do cálice. Primeiramente, forma-se o corpúsculo (Fig. 14-15, 17-18, 21, 24-25). Ele é secretado simultaneamente por células de toda a extensão da superfície secretora (Fig. 17, 21, 25) como duas lâminas separadas (Fig. 14). Essa secreção inicial (Fig. 14) irá compor as bordas do corpúsculo. Em seguida, as laterais são exsudadas (Fig. 24) e por último, o assoalho (Fig. 15, 22, 24), unindo as duas metades do

corpúsculo. Em *M. denticulata*, observa-se ligamento (anexo I) no sulco do corpúsculo durante a produção do assoalho (Fig. 22), que provavelmente auxilia na estabilização das duas metades do translador até o término de sua morfogênese.

O corpúsculo de *A. curassavica* e *M. denticulata* apresentam laterais íntegras e sólidas (Fig. 15, 22), mas em *G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, pode-se delimitar uma lateral externa e outra interna (Fig. 20, 26-27). Em *O. banksii* subsp. *banksii*, a secreção que preenche o espaço entre estas laterais (Fig. 26) tem composição distinta do restante do corpúsculo (Fig. 60). O translador é secretado imediatamente acima da fenda estaminal e o sulco do corpúsculo é contínuo com a fenda (Fig. 1, 4).

A secreção das caudículas inicia após a produção do corpúsculo (Fig. 19, 22) nos estádios intermediários do desenvolvimento floral. Elas são exsudadas centrifugamente em direção às anteras e são contínuas com as laterais externas do corpúsculo (Fig. 19-20, 22, 26-27). Pouco antes da pré-antese floral, o translador já está completamente formado (Fig. 16, 20, 23, 26-27) e as caudículas se ligam a duas polínias de anteras adjacentes (Fig. 36, 39). A porção terminal que se liga às polínias tem dimensões semelhantes ao restante da caudícula em *G. axillaris* (Fig. 6), *M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*, mas é dilatada em *A. curassavica* (Fig. 5). As caudículas aderem-se diretamente aos ápices das polínias (Fig. 5-6, 10-11, 13) de *A. curassavica*, *G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, mas em *M. denticulata*, elas unem-se à crista hialina (Fig. 12, 36, 39).

A morfogênese do translador se deve à atividade secretora diferenciada das células da cabeça dos estiletes e às irregularidades da superfície secretora (Fig. 16, 27). A perfeita coordenação espacial e temporal das células secretoras, assim como a quantidade e composição do exsudato liberado geram a curvatura do corpúsculo e as diferentes partes que constituem o translador. Este fato pode ser percebido pelas estrias do corpúsculo (Fig. 69-70) que correspondem a secreção de cada uma das células envolvidas nesse processo. As caudículas possuem aspecto homogêneo e composição distinta da do corpúsculo. Mucilagem, compostos fenólicos, proteínas e ácidos graxos estão presentes no corpúsculo das quatro espécies. Por outro lado, as caudículas são compostas apenas por mucilagem e lipídios neutros (Tabela 1). As diferentes substâncias foram detectadas desde o início da formação do translador (Fig. 44, 54), mas a quantidade de algumas delas varia entre as espécies. Mucilagem foi detectada em pequena quantidade no corpúsculo (Fig. 41-43, 47),

especialmente em *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 40, 47), mas ocorrem em maior quantidade em *M. denticulata* (Fig. 42, 46); proteína é abundante no corpúsculo de *G. axillaris, M. denticulata* (Fig. 50-51) e *O. banksii* subsp. *banksii*, mas escassa em *A. curassavica* (Fig. 52). Há semelhança entre a composição da porção terminal das caudículas e o corpúsculo, e entre a substância presente entre as laterais externa e interna do corpúsculo e as caudículas (Fig. 60).

#### <u>Polínia</u>

Cada antera possui dois sacos polínicos (Fig. 29-30). Nos primeiros estádios do desenvolvimento floral, já é possível observar as células-mãe de micrósporo alongadas perpendicularmente ao eixo floral com grandes núcleos em posição mediana e nucléolos evidentes (Fig. 28-29, 34). A meiose forma quatro micrósporos arranjados radialmente (Fig. 32), que dão origem aos grãos de pólen nos estádios intermediários do desenvolvimento do botão floral (Fig. 33, 36-38). Todos os grãos de pólen mantêm-se unidos (Fig. 38) e formam a polínia (Fig. 30-31, 35, 39).

O tapete é do tipo secretor (Fig. 28-29, 32-34, 36-38) e, além de produzir os precursores da exina, também secreta a película da polínia (Fig. 38; anexo I), que a recobre inteiramente. Pouco antes da pré-antese, as polínias já estão formadas e ocorre a deiscência apical da antera. Com a deiscência, as polínias de *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* (Fig. 35), por um movimento ascendente, entram em contato com as caudículas, às quais se aderem.

As polínias de *M. denticulata* apresentam margem pelúcida (Fig. 12) ao longo da face dorsal e crista hialina, que é produzida pelas células do tapete presentes entre o ápice da polínia e a região lateral de deiscência da teca (Fig. 37). A crista é similar e contínua à película da polínia. Ambas são compostas basicamente por lipídios, mas polissacarídeos também foram detectados (Tabela 1). Os lipídios também são observados ao redor dos grãos de pólen (Fig. 65-68).

**Tabela 1.** Resultados da aplicação dos testes microquímicos para identificação das principais classes de metabólitos que compõem o translador e a película da polínia em *Asclepias curassavica* L., *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz, *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. e a crista hialina de *M. denticulata* (+ = presente; - = ausente).

Tratamento	Substância a ser detectada	Translador		Dolícula	Crista
histoquímico		corpúsculo	caudícula	da polínia-	<u>hialina</u> Md
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	<b>+</b> (41-42)	+	+	+
ácido tânico e cloreto férrico	mucilagem	+ (43)	+	<b>+</b> (63)	+
reação PAS	polissacarídeos totais	<b>+</b> (44,46-47)	<b>+</b> (45-47)	<b>+</b> (64)	+
cloreto férrico	compostos fenólicos totais	+ (48)	-	-	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	+	-	-	-
Calcofluor white	celulose	- (49)	-	-	-
preto de amido B	proteínas	+ (50-51)	-	-	-
preto de Sudão B	lipídios totais	+ (53)	+	+ (65)	+
Sudão IV	lipídios totais	+ (54-56)	+ (56)	+ (66-67)	+
acetato de cobre e ácido rubeânico	ácidos graxos	+ (57-60)	-	-	-
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	+ (61-62)	-	+ (68)	+
sulfato azul do Nilo	lipídios neutros	-	+ (61-62)	-	-
reagente de Dragendorff	alcalóides	-	-	-	-
reagente de Wagner	alcalóides	-	-	-	-

# ILUSTRAÇÕES

**Figuras 1-7.** Eletromicrografias de varredura das flores adultas de espécies de Asclepiadeae. **1,3,6.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **2,7.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **4.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **5.** *Asclepias curassavica* L. **1.** Vista frontal do ginostégio. **2.** Retináculo (**R**). **3.** Porção superior do ginostégio seccionado longitudinalmente. **4.** Corpúsculo acima da fenda estaminal parcialmente recoberto pelos apêndices membranáceos das anteras. **5-6.** Polinário. **7.** Antera seccionada longitudinalmente. **Am** = apêndice membranáceo; **Ca** = caudícula; **Ce** = cabeça dos estiletes; **Cp** = corpúsculo; **Fe** = fenda estaminal; **P** = polínia.



**Figuras 8-13.** Morfologia da cabeça dos estiletes e polinários de espécies de Asclepiadeae. **8,10.** *Asclepias curassavica* L. **9,11.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **12.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **13.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **8-9.** Cabeça dos estiletes pentagonal com regiões secretoras do translador alternas às anteras. Secções transversais. **10-13.** Polinários. **Ac** = apêndice aliforme da caudícula; **Ca** = caudícula; **Cp** = corpúsculo; **Ch** = crista hialina; **El** = espessamento lateral linear da caudícula; **P** = polínia; **seta** = margem pelúcida. **Barras: 8,10,12-13.** 300 μm; **9,11.** 150 μm.





**Figuras 14-20.** Morfogênese do translador de *Asclepias curassavica* L. (**14-16**) e *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**17-20**). **14-16,19-20.** Secções transversais. **17-18.** Secções longitudinais. **14-15,17-19.** Botões florais. **16,20.** Flores adultas. **14.** Formação das bordas do corpúsculo separadamente. **15.** Corpúsculo formado por borda (**Bo**), lateral (**L**) e assoalho (**As**). **16,19-20.** Translador. **17-18.** Secreção simultânea do corpúsculo em toda a extensão da superfície secretora. **Barras: 14-15,17,19-20.** 75 μm; **16,18.** 150 μm.



**Figuras 21-27.** Morfogênese do translador de *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**21-23**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**24-27**). **21,23,25.** Secções longitudinais. **22,24,26-27.** Secções transversais. **21-22,24-26.** Botões florais. **23,27.** Flores adultas. **21,25.** Secreção simultânea do corpúsculo em toda a extensão da superfície secretora. **22,24.** Início da secreção das caudículas após a formação do corpúsculo. **23,26-27.** Translador. **Ac** = apêndice aliforme da caudícula; **Bo** = borda do corpúsculo; **Ca** = caudícula; **Cp** = corpúsculo; **El** = espessamento lateral linear da caudícula; **Le** = lateral externa do corpúsculo; **Lg** = ligamento; **Li** = lateral interna do corpúsculo. **Barras: 21-22.** 30 μm; **23,26.** 75 μm; **24-25,27.** 150 μm.



**Figuras 28-33.** Ontogênese da polínia de espécies de Asclepiadeae. **28.** *Asclepias curassavica* L. **29-31.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **32-33.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **28,31-32.** Secções longitudinais. **29-30,33.** Secções transversais. **28-29,32-33.** Botões florais. **30-31.** Flores adultas. **28-29.** Células-mãe de micrósporos alongadas perpendicularmente ao eixo floral com núcleos em posição mediana circundadas pelo tapete. **30-31.** Polínias no interior das anteras. **32.** Micrósporos arranjados radialmente. **33.** Grãos de pólen no interior da polínia. **Barras: 28,30,32-33.** 75 μm; **29.** 30 μm; **31.** 150 μm.


**Figuras 34-39.** Ontogênese da polínia de *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**34-35**) e *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**36-39**). **34-35.** Secções longitudinais. **36-39.** Secções transversais. **34,36-38.** Botões florais. **35,39.** Flores adultas. **34.** Células-mãe de micrósporos alongadas perpendicularmente ao eixo floral com núcleos em posição mediana circundadas pelo tapete. **35.** Polínia no interior da antera. **36.** Vista geral do translador e polínias em formação. **37-38.** Pormenores da figura 36. **37.** Secreção da crista hialina pelas células do tapete. **38.** Secreção da película da polínia pelas células do tapete. **39.** Polinário. **Barras: 34.** 50 μm; **35.** 75 μm; **36.** 150 μm; **37-38.** 30 μm; **39.** 250 μm.



**Figuras 40-47.** Resultados dos testes microquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. **41,43,45.** *Asclepias curassavica* L. **42,44,46.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **40,47.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **40-45,47.** Secções transversais. **46.** Secção longitudinal. **40-42.** Vermelho de rutênio. **43.** Ácido tânico e cloreto férrico. **44-47.** Reação PAS. **Barras: 40,42-43,45-46.** 75 μm; **41,44.** 50 μm; **47.** 150 μm.



**Figuras 48-55.** Resultados dos testes microquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. **48,52-53,55.** *Asclepias curassavica* L. **49,54.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **50-51.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **48-52,54-55.** Secções transversais. **48.** Cloreto férrico. **49.** Calcofluor white. **50-52.** Preto de amido B. **53.** Preto de Sudão B. Secção longitudinal. **54-55.** Sudão IV. **Barras: 48.** 300 μm; **49,51-53,55.** 75 μm; **50.** 30 μm; **54.** 150 μm.



**Figuras 56-62.** Resultados dos testes microquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. **56,58.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **57,59,61.** *Asclepias curassavica* L. **60,62.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **56-60,62.** Secções transversais. **61.** Secção longitudinal. **56.** Sudão IV. **57-60.** Acetato de cobre e ácido rubeânico. **61-62.** Sulfato azul do Nilo. **Barras: 56.** 40 μm; **57-58,61-62.** 75 μm; **59-60.** 150 μm.



**Figuras 63-68.** Resultados dos testes microquímicos realizados em flores de espécies de Asclepiadeae. Secções transversais. **63.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. **64-65.** *Asclepias curassavica* L. **66,68.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **67.** *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz. **63.** Ácido tânico e cloreto férrico. **64.** Reação PAS. **65.** Preto de Sudão B. **66-67.** Sudão IV. **68.** Sulfato azul do Nilo. **Barras: 63-67.** 75 μm; **68.** 50 μm.



**Figuras 69-70.** Esquemas do translador em secção transversal evidenciando a relação entre as estrias do corpúsculo e as células secretoras da cabeça dos estiletes. **69.** *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz. **70.** *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult.



#### Discussão

As subfamílias de Apocynaceae são facilmente diferenciadas pelas características do ginostégio. Em Rauvolfioideae, não há adnação do androceu ao gineceu; o ginostégio surgiu em Apocynoideae e está presente em todas as demais subfamílias (Pichon 1948; Rao & Ganguli 1963; Jaeger 1971; Fallen 1986; Valente & Silva 1984; Kunze 1995; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Rio 2006; Simões et al. 2007). Os filetes das quatro espécies de Asclepiadeae analisadas são fundidos formando o tubo dos filetes e as anteras são livres, mas posgenitamente adnatas à porção inferior da cabeça dos estiletes através do retináculo. Em A. curassavica, G. axillaris e O. banksii subsp. banksii, o retináculo corresponde a duas projeções laterais da base das anteras e em M. *denticulata*, estas projeções se fundem formando um anel e este se une à cabeça dos estiletes, assim como descrito para outras Gonolobinae (Kunze 1995). Segundo Kunze (1995, 1996), a adnação ocorre por acoplamento entre as células epidérmicas dos dois verticilos, assim como por fusão cuticular, na porção superior dos filetes; entretanto, o retináculo foi descrito como tecido da base da antera ou conectivo por diversos autores (Pichon 1948; Rao & Ganguli 1963; Jaeger 1971; Valente & Silva 1984; Endress & Bruyns 2000; Valente & Costa 2005; Rio 2006; Simões et al. 2007). Esta adnação entre os verticilos parece ter possibilitado o surgimento do polinário (Endress 1994) e também ocorreu em Orchidaceae, família que também apresenta o pólen em polínias (Johnson & Edwards 2000).

A cabeça dos estiletes é pentagonal nas quatro espécies investigadas. Ela está presente em todas as Asclepiadoideae e são sempre pentagonais (Brown 1810; Corry 1883; Rao & Ganguli 1963; Tiagi & Dixit 1965; Stevens 1975,1988; Vijayaraghavan & Cheema 1977; Dan Dicko-Zafimahova 1980; Valente & Silva 1984; Murphy 1986; Konta & Kitagawa 1989; Endress 1994; Kunze 1994; Valente 1995; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006; Wyatt & Lipow 2007).

A formação da cabeça dos estiletes ocorre pela fusão do ápice dos carpelos em *A. curassavica, G. axillaris* e *M. denticulata* e da região subapical, em *O. banksii* subsp. *banksii* durante o início do desenvolvimento do gineceu. A rápida diferenciação da cabeça dos estiletes durante o desenvolvimento floral é um indício de sua complexidade e importância nos estádios posteriores (Fallen 1986; Endress 1994; Swarupanandan *et al.* 

1996; Demarco 2005; Gomes 2006). Nos gêneros mais derivados de Apocynaceae, a fusão dos estiletes é precoce na ontogênese floral; enquanto nos gêneros basais, ela é tardia (Fallen 1986; Demarco 2005; Gomes 2006).

O tecido secretor da cabeça dos estiletes é composto por epiderme em paliçada ao longo da superfície lateral das regiões alternas às anteras em todas as espécies investigadas e é responsável pela produção do translador, assim como nas demais espécies de Asclepiadoideae (Corry 1883; Tiagi & Dixit 1965; Valente 1977, 1984, 1995; Valente & Silva 1984; Kunze 1994; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006).

O translador é rígido e composto pelo corpúsculo, que irá se fixar ao corpo do polinizador, e por duas caudículas que se prendem a duas polínias provenientes de anteras adjacentes, formando o polinário. Nas quatro espécies estudadas, a sua morfogênese inicia nos primeiros estádios do desenvolvimento floral, pouco após a abertura do cálice. Transladores compostos por corpúsculo e caudículas são característicos de Asclepiadoideae (Brown 1810; Corry 1883; Schumann 1895; Valente 1977, 1984, 1995; Valente & Silva 1984; Kunze 1993, 1994; Endress 1994; Swarupanandan *et al.* 1996; Vieira 1998; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006) e as caudículas estão ausentes apenas em *Fockea* e *Cibirhiza* (Kunze 1993, 1994; Swarupanandan *et al.* 1996), gêneros posicionados em Marsdenieae, tribo basal de Asclepiadoideae (Endress & Bruyns 2000). Segundo Liede e Albers (1994), estes gêneros estão incluídos em uma tribo à parte denominada Fockeeae.

A morfogênese do translador inicia pela secreção das bordas do corpúsculo como duas lâminas separadas ao longo da superfície da cabeça dos estiletes. Posteriormente, as laterais são exsudadas e, em seguida, o assoalho, unindo as duas metades. Após a produção do corpúsculo, as caudículas são secretadas centrifugamente em direção às anteras e tornam-se contínuas com a lateral externa do corpúsculo. Esta mesma seqüência de morfogênese ocorre em outras espécies de Asclepiadoideae (Vijayaraghavan & Cheema 1977; Schnepf *et al.* 1979; Endress 1994; Kunze 1994; Demarco 2005; Gomes 2006). A secreção inicial do corpúsculo como duas partes separadas já foi registrada também em *A. curassavica, Barjonia erecta* (Vell.) Schum., *Ditassa eximia* Decne, *Marsdenia loniceroides* E.Fournier e *O. banksii* subsp. *banksii* (Valente 1977, 1984, 1995; Schnepf *et al.* 1979;

Valente & Silva 1984; Valente & Costa 2005). Alguns trabalhos descreveram a secreção das caudículas como sendo anterior a do corpúsculo (Brown 1810; Corry 1883; Valente 1977, 1984, 1995; Valente & Silva 1984; Valente & Costa 2005).

Ligamento está presente durante a formação do corpúsculo de *M. denticulata*. A sua presença também foi registrada em *Calotropis procera* (Willd.) R.Br. Ele é secretado durante a formação do assoalho e estabiliza a posição das duas bordas, desintegrando-se nos estádios posteriores; aparentemente, o ligamento não possui lipídios (Kunze 1994).

O formato específico dos transladores das espécies analisadas é atribuído principalmente à atividade diferencial das células secretoras coordenadas espacial e temporalmente, além da quantidade e composição do material produzido, e do pelo relevo da superfície secretora da cabeça dos estiletes. A secreção possui aspecto viscoso e denso desde o início de sua liberação e é uma característica necessária para que o corpúsculo adquira sua forma durante o processo secretor. As estrias presentes no corpúsculo permitem inferir as células que deram origem a cada uma de suas partes e analisar sua morfogênese ao longo do desenvolvimento floral. Segundo Kunze (1994), o principal fator responsável pela forma do translador é a atividade secretora diferencial das células da epiderme da cabeça dos estiletes, ao contrário do papel desempenhado pela desidratação do translador sugerido por Schnepf *et al.* (1979).

A morfologia dos transladores de *A. curassavica, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* é bastante distinta e se assemelha às descrições dos transladores das demais espécies dos respectivos gêneros. Caudículas horizontais com parte membranácea hialina, espessamento lateral linear com dente curvo no ápice e pedículo curvo na base são características do translador de *Oxypetalum* (Valente *et al.* 1971,1973; Pereira & Schwarz 1984; Silva *et al.* 2007). O apêndice aliforme dos transladores só foi descrito até o momento para espécies de Ceropegieae e, em Asclepiadeae, para *Oxypetalum* e *Calostigma* (Swarupanandan *et al.* 1996). Em *Gonioanthela*, o corpúsculo pode ter várias formas, geralmente suboval e caudículas descendentes espessadas na base do corpúsculo (Silva *et al.* 1975; Pereira & Schwarz 1983). Em *Matelea*, o corpúsculo é sagitado com caudículas aladas (Stevens 1975,1988).

Nas quatro espécies investigadas, o translador é composto principalmente por lipídios, mas outras substâncias também foram detectadas. A composição do corpúsculo e das

caudículas é distinta. Mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas foram detectados no corpúsculo e apenas lipídios neutros e mucilagem, nas caudículas. Demeter (1922) registrou a composição do translador como sendo goma, Woodson (1954) e Safwat (1962) como lipídio, Vijataraghavan e Cheema (1977) como lipídios e fenólicos no corpúsculo e lipídios e proteínas nas caudículas. Schnepf *et al.* (1979) descreveram o corpúsculo e as caudículas de *A. curassavica* e *Gomphocarpus fruticosus* (L.) Ait. como tendo uma estrutura fina similar, composta por uma mistura de substância básica lipídica envolvendo um componente hidrofílico, provavelmente mucilagem. Proteínas presentes nas caudículas foram associadas à adesão destas ao corpúsculo e ao ápice da polínia, assim como à sua capacidade de rotação por desidratação e retorno à posição original por reidratação (Vijayaraghavan & Cheema 1977); entretanto, não foram detectadas proteínas nas caudículas das espécies investigadas no presente estudo.

As anteras das espécies analisadas possuem dois sacos polínicos férteis. As célulasmãe de micrósporo são alongadas perpendicularmente ao eixo floral e a meiose forma tétrades lineares. Grãos de pólen são observados nos estádios intermediários do desenvolvimento floral; eles mantêm-se unidos e constituem a polínia. Em Asclepiadoideae, todos os grãos de pólen de uma teca formam a polínia (Corry 1883; Frye 1902; Demeter 1922; Volk 1950; Woodson 1954; Safwat 1962; Linskens & Suren 1969) e o padrão de disposição das células-mãe de micrósporo e da meiose é semelhante ao observado no presente estudo (Gager 1902; Linskens & Suren 1969; Dan Dicko-Zafimahova 1980; Valente 1982; Schill & Dannenbaum 1984).

As células do tapete secretam uma película que envolve toda a polínia durante a formação dos grãos de pólen. Esta secreção é composta basicamente por lipídios, mas polissacarídeos também foram detectados. Os lipídios também são observados entre os grãos de pólen. Os grãos de pólen das Asclepiadoideae possuem uma parede comum composta por esporopolenina que envolve a polínia e é secretada pelo tapete multiestratificado (Corry 1883; Vijayaraghavan & Shukla 1976; Schill & Jäkel 1978; Schill & Dannenbaum 1984; Pacini *et al.* 1985; Wyatt & Lipow 2007). Película lipídica envolvendo a polínia de Asclepiadoideae também foi registrada por outros autores (Woodson 1954; Galil & Zeroni 1969; Linskens & Suren 1969; Schnepf *et al.* 1979; Wyatt & Lipow 2007). Segundo Pacini e Hesse (2005), o que mantém os grãos de pólen unidos nas polínias de

Asclepiadoideae é elastoviscina e Dannenbaum e Schill (1991) encontraram esta substância recobrindo as tétrades de *Raphionacme* (Periplocoideae).

Durante a formação da parede dos grãos de pólen e da polínia de *A. curassavica*, gotas lipídicas surgem no citoplasma das células do tapete e dos grãos de pólen e parecem atravessar a plasmalema. O tapete participa da formação da parede da polínia (anexo I) e da dos grãos de pólen. No início do desenvolvimento da polínia, forma-se uma camada eletro-opaca entre as células mãe de micrósporo e o tapete, onde as gotas lipídicas serão depositadas e formarão a película da polínia. A parte externa da exina (tectum e columela) envolve toda a polínia, enquanto a parte interna e a nexina envolve os grãos de pólen individuais (Linskens & Suren 1969; Dan Dicko-Zafimahova 1980).

Após a formação das polínias nas quatro espécies, pouco antes da pré-antese, o tapete desintegra, deixando as polínias suspensas no interior do lóculo e ocorre a deiscência da antera. As polínias, por movimento ascendente, entram em contato com as caudículas, aderindo a elas por sua porção apical. Os lipídios produzidos pelo tapete no ápice da polínia podem estar envolvidos na adesão da caudícula à esta (Schnepf *et al.* 1979). Em *M. denticulata*, as caudículas se aderem à crista hialina. A crista é contínua com a película da polínia e tem a mesma composição. As polínias de *M. denticulata* também diferem das demais por possuírem margem pelúcida na face dorsal côncava. Em *Matelea reticulata* e *M. argentinensis*, a crista da polínia também é formada pelas células do tapete e é composta pelo mesmo material que envolve a polínia (Kunze 1995).

Segundo Schill e Dannenbaum (1984), grãos de pólen marginais colapsam na região da crista e parte hialina adjacente e suas paredes guiam os tubos polínicos em direção à crista e serve como abertura para a germinação dos tubos polínicos em *Hoya carnosa* (L.) Br., mas em Gonolobinae a abertura de germinação está localizada longe da crista na face dorsal da polínia e a crista não tem esta função de guia (Kunze 1995). Aparentemente, o local de germinação dos tubos polínicos na face dorsal é único, pois eles geralmente germinam na face lateral da polínia, usualmente no lado convexo (Brown 1833; Galil & Zeroni 1969; Linskens & Suren 1969; Kunze 1995). Há uma diferenciação anatômica ou uma zona mais frágil na região por onde os tubos polínicos emergem e esta é a região da polínia que fica em contato com a câmara estigmática e por onde o néctar penetra (Galil & Zeroni 1965, 1969; Dan Dicko-Zafimahova 1980).

Margem pelúcida ocorre em espécies de Ceropegieae, em várias Gonolobinae e já foram referidas também para *Heterostemma, Hoya, Leptadenia* (Marsdenieae), *Pergularia* (Asclepiadeae; Woodson 1941; Kunze 1995; Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000; Wanntorp 2007) e corresponde à abertura por onde os tubos polínicos emergem (Kunze 1995). A posição da abertura de germinação em Gonolobinae está coordenada com o aparato de polinização como um todo: inserção parcial da polínia, tamanho e estrutura interna da fenda, localização do nectário primário, abertura para os tubos polínicos abaixo da cabeça dos estiletes e local de germinação (Kunze 1995).

Após a remoção do polinário, as polínias muitas vezes modificam sua posição devido a uma rotação das caudículas por desidratação (Corry 1883; Galil & Zeroni 1965, 1969; Macior 1965; Bookman 1981; Kunze 1991, 1995, 1999; Kunze & Liede 1991; Endress 1994; Vieira 1998), isto garante que as polínias serão inseridas corretamente na fenda estaminal (Brown 1833; Corry 1883; Galil & Zeroni 1969; Vieira 1998), ou seja, com a face por onde os tubos emergem voltada para o eixo floral.

As Asclepiadoideae são polinizadas por insetos de seis ordens, mas há registros de pássaros que visitam as flores. Marsdenieae, Ceropegieae e Gonolobinae são primariamente polinizadas por Diptera; as demais Asclepiadeae são polinizadas principalmente por Hymenoptera e Lepidoptera (Jaeger 1971; Pant *et al.* 1982; Eisikowitch 1986; Kunze & Liede 1991; Endress 1994; Forster 1994; Liede 1994; Ollerton & Liede 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999; Theiss *et al.* 2007). As Asclepidadeae do Novo Mundo possuem maior diversidade de sistemas de polinização que as do Velho Mundo. A polinização por Hymenoptera é a mais comum, com Lepidoptera e Diptera tendo um papel secundário. Coleoptera pode ser o principal grupo de polinizadores de algumas espécies, mas Hemiptera e Neuroptera são os maiores polinizadores de outras. A maioria das Asclepiadoideae possuem entre um e cinco polinizadores, mas *Asclepias verticillata* possui 126 (Ollerton & Liede 1997).

As espécies de *Matelea* são polinizadas por moscas que carregam o polinário na probóscide (Kunze 1995, 1998; Krings 1999) e embora a polinização por moscas em flores de Ceropegieae esteja associada ao estímulo olfativo (Meve & Liede 1994; Jürgens *et al.* 2006), fragrância não foi detectada em *M. denticulata* no presente estudo, assim como não há registros para outras espécies deste gênero. *Fischeria funebris* S.F. Blake é polinizada

por abelhas e borboletas que carregam os polinários em suas pernas (Skutch 1988) e em *Gonolobus fraternus* Schltdl., vespas e abelhas também são polinizadoras, além das moscas (Kunze 1999). As espécies de *Asclepias* são polinizadas por abelhas, vespas e borboletas (Frost 1965; Macior 1965; Wyatt & Broyles 1994; Theiss *et al.* 2007). A utilização de diversos polinizadores pode ter facilitado a sua ampla distribuição (Willson & Bertin 1979). *A. curassavica* é polinizada por borboletas que carregam o polinário nas pernas, probóscide e em outras partes do corpo (Ule 1897; Endress 1994). As espécies de *Oxypetalum* são polinizadas por vespas e abelhas, sendo *O. banksii* subsp. *banksii* polinizada principalmente por vespas que carregam os polinários no aparelho bucal (Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999). Trabalhos relacionados à polinização de espécies de *Gonioanthela* não foram localizados.

## Conclusões

As espécies estudadas possuem a porção superior dos estiletes expandida, formando a cabeça dos estiletes, que é resultado da fusão posgênita do ápice dos carpelos em *A. curassavica, G. axillaris* e *M. denticulata* e da região subapical em *O. banksii* subsp. *banksii* durante o início do desenvolvimento floral. Ela é pentagonal e possui epiderme secretora em paliçada ao longo da superfície lateral nas regiões alternas às anteras, responsável pela secreção do translador. Os filetes são fundidos formando o tubo dos filetes e as anteras são livres, mas posgenitamente adnatas à porção inferior da cabeça dos estiletes através do retináculo, formando o ginostégio.

O translador é composto por corpúsculo e duas caudículas, formando o polinário. A sua morfogênese inicia nos primeiros estádios do desenvolvimento floral, pouco após a abertura do cálice. O formato específico do translador é devido principalmente à atividade diferenciada das células secretoras coordenadas espacial e temporalmente, além da quantidade e composição da secreção, e ao relevo da superfície secretora da cabeça dos estiletes. O translador de *O. banksii* subsp. *banksii* diferencia-se dos demais por apresentar caudículas com apêndice aliforme e espessamento lateral linear. A secreção possui aspecto viscoso e denso desde o início de sua liberação e é uma característica necessária para que o corpúsculo adquira sua forma durante o processo secretor. Mucilagem, ácidos graxos,

compostos fenólicos e proteínas foram detectados no corpúsculo e apenas lipídios neutros e mucilagem, nas caudículas.

Nos sacos polínicos das quatro espécies, as células-mãe de micrósporos são alongadas perpendicularmente ao eixo floral e dividem-se, gerando tétrades lineares que se mantêm unidas durante o desenvolvimento da polínia. As células do tapete adjacentes aos micrósporos secretam um material constituído principalmente por lipídios, mas que também possui polissacarídeos, que forma uma película ao redor da polínia. As polínias de *M. denticulata* possuem características particulares, como a margem pelúcida, que é uma proeminência da parede da polínia, e crista hialina produzida pelas células do tapete, que une a polínia à caudícula. Pouco antes da antese ocorre a deiscência da antera e as polínias de anteras adjacentes aderem-se às caudículas formando o polinário.

## Referências bibliográficas

- BOOKMAN, SS 1981 The floral morphology of *Asclepias speciosa* (Asclepiadaceae) in relation to pollination and a clarification in terminology for the genus. American Journal of Botany 68:675-679.
- BROWN, R 1810 On the Asclepiadeae, a natural order of plants separated from the Apocineae of Jussieu. Memoirs of the Wernerian Natural History Society 1:12-78.
- BROWN, R 1833 On the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. Transactions of the Linnean Society of London 16:685-745.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- CORRY, TH 1883 On the structure and development of gynostegium and the mode of fertilisation in *Asclepias cornuti*. Transactions of the Linnean Society of London 2:173-207.
- DAN DICKO-ZAFIMAHOVA, L 1980 Ultrastructure des parois des pollinies de *Calotropis procera*. Adansonia 17:455-463.
- DANNENBAUM, C & SCHILL, R 1991 Die Entwicklung der Pollentetraden und Pollinien bei *Asclepiadaceae*. Bibliotheca Botanica 141:1-138.

- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DEMETER, K 1922 Vergleichende Asclepiadeenstudien. Flora 15:130-176.
- EISIKOWITCH, D 1986 Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in Israel. Plant Systematics and Evolution 152:185-194.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanishe Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FISHER, DB 1968 Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- FORSTER, PI 1994 Diurnal insects associated with the flowers of *Gomphocarpus physocarpus* E.Mey. (Asclepiadaceae), an introduced weed in Australia. Biotropica 26:214-217.
- FROST, SW 1965 Insects and pollinia. Ecology 46:556-558.
- FRYE, TC 1902 A morphological study of certain Asclepiadaceae. Botanical Gazette 34:389-413.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44:153-159.
- GAGER, CS 1902 The development of the pollinium and sperm-cells in *Asclepias cornuti*, Decaisne. Annals of Botany 16:123-148.
- GALETTO, L 1997 Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. Flora 192:197-207.

- GALIL, J & ZERONI, M 1965 Nectar system of *Asclepias curassavica*. Botanical Gazette 126:144-148.
- GALIL, J & ZERONI, M 1969 On the organization of the pollinium in *Asclepias curassavica*. Botanical Gazette 130:1-4.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969 Histologie normale et pathologique. v. 1, Paris, Gauthier Villars.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1970 Histologie normale et pathologique. v. 2, Paris, Gauthier Villars.
- GERLACH, D 1984 Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. 3<sup>rd</sup> ed., Stuttgart, Georg Thieme.
- GOMES, SM 2006 Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae *s.l.* Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- HUGHES, J & McCULLY, ME 1975 The use of an optical brightener in the study of plant structure. Stain Technology 50:319-329.
- JAEGER, P 1971 Contribution a l'etude de la biologie florale des Asclepiadacees. Le *Calotropis procera* Ait. Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (A) 33:32-43.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- JOHNSON, SD & EDWARDS, TJ 2000 The structure and function of orchid pollinaria. Plant Systematics and Evolution 222:243-269.
- JÜRGENS, A; DÖTTERL, S & MEVE, U 2006 The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae). New Phytologist 172: 452-

468.

- KONTA, F & KITAGAWA, J 1989 Taxonomic notes of Asclepiadaceae in Thailand. I. The floral morphology of *Dischidia raffresiana* Wall., *Marsdenia glabra* Cost. and *Secamone ferruginea* Pierre ex Cost. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 40:125-132.
- KRINGS, A 1999 Observations on the pollination biology and flowering phenology of Texan *Matelea reticulata* (Engelm. ex A. Gray) Woods. (Asclepiadaceae). Madroño 46:155-158.
- KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. Plant Systematics and Evolution 176:227-253.
- KUNZE, H 1993 Evolution of the translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. Plant Systematics and Evolution 185:99-122.
- KUNZE, H 1994 Ontogeny of the translator in Asclepiadaceae *s.str*. Plant Systematics and Evolution 193:223-242.
- KUNZE, H 1995 Floral morphology of some Gonolobeae (Asclepiadaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik 117:211-238.
- KUNZE, H 1996 Morphology of the stamen in the Asclepiadaceae and its systematic relevance. Botanische Jahrbücher für Systematik 118:547-579.
- KUNZE, H 1998 Floral structure and pollination biology in *Matelea lanata* (Asclepiadaceae). Asklepios 75:23-27.
- KUNZE, H 1999 Pollination ecology in two species of *Gonolobus* (Asclepiadaceae). Flora 194:309-316.
- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (Asclepiadaceae). Plant Systematics and Evolution 178:95-105.
- LIEDE, S 1994 Some observations on pollination in Mexican Asclepiadaceae. Madroño 41:266-276.
- LIEDE, S & ALBERS, F 1994 Tribal disposition of genera in the Asclepiadaceae. Taxon 43:201-231.

- LILLIE, RD 1965 Histopathologic technic and practical histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, McGraw-Hill.
- LIN, S & BERNARDELLO, G 1999 Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Science 160:869-878.
- LINSKENS, HF & SUREN, ML 1969 Die Entwicklung des Polliniums von *Asclepias curassavica*. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 82:527-534.
- MACIOR, LW 1965 Insect adaptation and behavior in *Asclepias* pollination. Bulletin of the Torrey Botanical Club 92:114-126.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- MEVE, U & LIEDE, S 1994 Floral biology and pollination in stapeliads new results and a literature review. Plant Systematics and Evolution 192:99-116.
- MURPHY, H 1986 A revision of the genus *Fischeria* (Asclepiadaceae). Systematic Botany 11:229-241.
- OLLERTON, J & LIEDE, S 1997 Pollination systems in the Asclepiadaceae: a survey and preliminary analysis. Biological Journal of the Linnean Society 62:593-610.
- PACINI, E; FRANCHI, GG & HESSE, M 1985 The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. Plant Systematics and Evolution 149:155-185.
- PACINI, E & HESSE, M 2005 Pollenkitt its composition, forms and functions. Flora 200:399-415.
- PANT, DD; NAUTIYAL, DD & CHATURVEDI, SK 1982 Pollination ecology of some Indian asclepiads. Phytomorphology 32:302-313.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. 4<sup>th</sup> ed., v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.

- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1983 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. XX. Uma nova espécie de *Gonioanthela* Malme. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:71-74.
- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1984 Estudos em Asclepiadaceae. XX. Novos táxons em *Ditassa* R.Br. e *Oxypetalum* R.Br. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:145-148.
- PEREIRA, JF & SILVA, NMF da 1973 Estudos em Asclepiadaceae. IV *Blepharodon* Decaisne. Revista Brasileira de Biologia 33:77-86.
- PICHON, M 1948 Classification des Apocynacées: XIX. Le rétinacle des Echitoïdées. Bulletin de la Société Botanique de France 95:211-216.
- PIZZOLATO, TD 1977 Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104:277-279.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963 The floral anatomy of some Asclepiadaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (B) 57:15-44.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- SAFWAT, FM 1962 The floral morphology of *Secamone* and the evolution of the pollinating apparatus in Asclepiadaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 49:95-129.
- SCHILL, R & DANNENBAUM, KC 1984 Bau und Entwicklung der Pollinien von *Hoya carnosa* (L.) Br. (Asclepiadaceae). Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 48:1-54.
- SCHILL, R & JÄKEL, U 1978 Beiträge zür Kenntnis der Asclepiadaceen-Pollinarien. Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 22:1-122.
- SCHNEPF, E; WITZIG, F & SCHILL, R 1979 Über Bildung und Feinstruktur des Translators der Pollinarien von Asclepias curassavica und Gomphocarpus fruticosus (Asclepiadaceae). Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 25:1-33.
- SCHUMANN, K 1895 Asclepiadaceae. *In*: Die natürlichen Pflanzenfamilien (A. Engler & K. Prantl, eds.), Leipzig, Wilhelm Engelmann.

- SILVA, NMF da; PEREIRA, JF & VALENTE, M da C 2007 Asclepiadoideae (Apocynaceae) from southeastern Brazil. I. The genus *Oxypetalum* from Rio de Janeiro state, Brazil. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:435-462.
- SILVA, NMF; VALENTE, M da C; ALENCASTRO, FMMR; PEREIRA, JF & SUCRE, BD 1975 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. X. Estudos taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35:745-756.
- SIMÕES, AO; RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2007 Gynostegium morphology of Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae) as it pertains to the classification of the tribe. International Journal of Plant Sciences 168: 999-1012.
- SKUTCH, AF 1988 Flowering and seed-production of *Fischeria funebris* (Asclepiadaceae). Brenesia 30:13-17.
- STEVENS, WD 1975 Notes on the genus *Matelea* (Apocynaceae s.l.). Phytologia 32:387-406.
- STEVENS, WD 1988 A synopsis of *Matelea* subg. *Dictyanthus* (Apocynaceae: Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 75:1533-1564.
- SVENDSEN, AB & VERPOORTE, R 1983 Chromatography of alkaloids. New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- SWARUPANANDAN, K; MANGALY, JK; SONNY, TK; KISHOREKUMAR, K & CHAND BASHA,
  S 1996 The subfamilial and tribal classification of the family Asclepiadaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 120:327-369.
- THEISS, K; KEPHART, S & IVEY, CT 2007 Pollinator effectiveness on co-occurring milkweeds (*Asclepias*; Apocynaceae, Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 94:505-516.
- TIAGI, B & DIXIT, G 1965 Studies in the floral anatomy of some Asclepiadaceae. Bulletin of the Botanical Society of Bengal 19:111-123.
- ULE, E 1897 Symbiosis between an *Asclepias* and a butterfly. Journal of Botany 35:441-443.

- VALENTE, M da C 1977 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Estudo da anatomia e vascularização (Asclepiadaceae). Rodriguésia 29:161-283.
- VALENTE, M da C 1982 Observações sobre a formação das polínias em *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Boletim do Museu Botânico Municipal 52:1-5.
- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C 1995 Matelea maritima subsp. ganglinosa (Vell.) Font. Anatomia e vascularização floral (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 33:75-98.
- VALENTE, M da C & COSTA, CG 2005 Estudo anatômico da flor de *Marsdenia Ioniceroides* E. Fournier (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Rodriguésia 56:51-66.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1971 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. VII – Estudos taxonômico e anatômico de *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. *et* Val., comb. nov. Anais da Academia Brasileira de Ciências 43:177-189.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1973 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. IX Estudos taxonômico e anatômico de: *Oxypetalum appendiculatum* Mart., *Oxypetalum pilosum* Gardn. e *Oxypetalum sublanatum* Malme. Anais da Academia Brasileira de Ciências 45:121-149.
- VALENTE, M da C & SILVA, NMF da 1984 Anatomia floral de *Barjonia erecta* (Vell.) Schum. (Asclepiadaceae). Rodriguésia 36:95-106.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae), na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 1999 Pollinators of *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. Revista Brasileira de Biologia 59:693-704.

- VIJAYARAGHAVAN, MR & CHEEMA, K 1977 Ontogenetical and histochemical studies on the translator apparatus in *Calotropis procera* R.Br. I. The retinaculum. Acta Histochemica 59:15-20
- VIJAYARAGHAVAN, MR & SHUKLA, AK 1976 The nature of covering around the aggregate of microspores in *Pergularia daemia* (Forsk.) McC. & Blat. Annals of Botany 40:417-421.
- VOLK, OH 1950 Zur Kenntnis der Pollinien der Asclepiadaceen. Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft 62:69-73.
- WANNTORP, L 2007 Pollinaria of *Hoya* (Marsdenieae, Apocynaceae) shedding light on molecular phylogenetics. Taxon 56:465-478.
- WILLSON, MF & BERTIN, RI 1979 Flower visitors, nectar production, and inflorescence size of *Asclepias syriaca*. Canadian Journal of Botany 57:1380-1388.
- WOODSON, RE Jr. 1941 The North American Asclepiadaceae. I. Perspective of the genera. Annals of the Missouri Botanical Garden 28:193-244.
- WOODSON, RE Jr. 1954 The North American species of *Asclepias* L. Annals of the Missouri Botanical Garden 41:1-211.
- WYATT, R & BROYLES, SB 1994 Ecology and evolution of reproduction in milkweeds. Annual Review of Ecology and Systematics 25:423-441.
- WYATT, R & LIPOW, SR 2007 A new explanation for the evolution of pollinia and loss of carpel fusion in *Asclepias* and the Apocynaceae *s.l.* Annals of the Missouri Botanical Garden 94:474-484.

# Discussão geral

As Asclepiadoideae são conhecidas por possuírem as flores mais complexas e elaboradas de todas as dicotiledôneas e por apresentarem um conjunto de estruturas que não são encontradas em outras famílias (Endress 1994), tais como a fenda estaminal, a corona, o contentor de néctar, câmara estigmática-nectarífera, polínia com translador (Kunze 1991, 1995, 1999) e um sistema de tecidos transmissores altamente especializado (capítulo 9).

Dentre as Asclepiadoideae, Asclepiadeae se destaca como a tribo mais derivada e pode ser distinguida de Marsdenieae e Ceropegieae por características do ginostégio e principalmente do polinário (Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000). Em Asclepiadeae, as caudículas geralmente têm inserção apical e as polínias são pêndulas, raramente eretas (Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000), com exceção de Gonolobinae, onde as polínias são horizontais em relação ao filete (raramente pêndulas) com crista de inserção hialina e pelo menos uma face côncava (Woodson 1941; Kunze 1995; Valente 1995; Swarupanandan *et al.* 1996).

## Estruturas secretoras em Asclepiadeae

As espécies de Asclepiadoideae possuem uma grande diversidade de estruturas secretoras em órgãos vegetativos e florais, podendo ser citados tricomas, idioblastos taníferos, "espaços intercelulares contendo mucilagem", laticíferos, coléteres, nectários, osmóforos, epiderme da cabeça dos estiletes e epiderme da ala estaminal (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1983; Vogel 1990; Kunze 1991, 1995, 1997, 1999; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Vieira & Shepherd 2002a; Demarco 2005; Gomes 2006; Castro & Demarco 2008).

No presente estudo, as estruturas secretoras investigadas são: coléteres, laticíferos, tricomas, idioblastos oleíferos, epiderme secretora da ala estaminal, nectários na câmara estigmática-nectarífera e corona, canal estilar, obturador placentário-funicular cuja descrição é inédita para a família, epiderme da cabeça dos estiletes e tapete (Tabela 2).

Serra do N	/lar – Nucleo	$\beta$				
Estruturas secretoras		Floresta de restinga		Floresta ombrófila densa de terras baixas		
		Ga	Ob	Ac	Fs	Md
coléteres	estipulares	+ mucilagem	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais
	peciolares	+ mucilagem	-	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais	-
	laminares	-	+ mucilagem e lipídios totais	-	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais
	calicinais	+ mucilagem	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais		+ mucilagem e lipídios totais
laticíferos	caulinares e foliares	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, lipídios neutros, compostos fenólicos e alcalóides	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, lipídios neutros, compostos fenólicos e alcalóides	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides
	florais	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios totais, compostos fenólicos	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios totais, compostos fenólicos	+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios totais, compostos fenólicos		+ polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios totais, compostos fenólicos
tricomas	caulinares e foliares	-	-	-	+ aminoácidos e/ou proteínas	+ aminoácidos e/ou proteínas
	florais	-	-	-		+ aminoácidos e/ou proteínas
idioblastos	florais	+ óleos essenciais	-	-		-
ala estaminal	floral	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais		+ mucilagem e lipídios totais
nectário primário	floral	+ carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais	+ carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais	+ carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais		+ carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais
nectário secundário	floral	+ carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais	-	-		+ carboidratos, incluindo glicose e mucilagem
canal estilar	floral	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais		+ mucilagem e lipídios totais
obturador	floral	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais	+ mucilagem e lipídios totais		+ mucilagem e lipídios totais
cabeça dos estiletes	floral	+ Cp - mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas Ca lipídios neutros e mucilagem	+ Cp - mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas Ca- lipídios neutros e mucilagem	+ Cp - mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas Ca- lipídios neutros e mucilagem		+ Cp - mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas Ca- lipídios neutros e mucilagem
tapete	floral	+ lipídios e mucilagem	+ lipídios e mucilagem	+ lipídios e mucilagem		+ lipídios e mucilagem

**Tabela 2.** Glândulas vegetativas e florais de *Asclepias curassavica* L. (**Ac**), *Fischeria stellata* E.Fourn. (**Fs**), *Gonioanthela axillaris* (Vell.) Fontella & E.A. Schwarz (**Ga**), *Matelea denticulata* (Vahl) Fontella & E.A. Schwarz (**Md**) e *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii* Roem. & Schult. (**Ob**) do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba. (**+** = presente; - = ausente; ... = flor não disponível; **Cp** = corpúsculo; **Ca** = caudícula).

## **Coléteres**

Coléteres foliares e calicinais foram localizados nas espécies analisadas (Tabela 1). Os foliares são encontrados nas três possíveis posições propostas por Woodson e Moore (1938): peciolares e/ou laminares (opostos), interpeciolares laterais ao pecíolo de A. curassavica, F. stellata, M. denticulata e O. banksii subsp. banksii (alternos), e interpeciolares de G. axillaris (contínuos). Em A. curassavica, os coléteres foliares opostos estão localizados na base do pecíolo, em G. axillaris, na porção distal do pecíolo, em M. *denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*, na base da lâmina foliar e em *F. stellata*, nas bases da lâmina e do pecíolo (capítulo 1). Nas flores, todos os coléteres observados são alternos às sépalas (capítulo 6). As posições dos coléteres foliares são condizentes com os dados das demais espécies dos respectivos gêneros (Arraes 1960; Pereira et al. 1971; Valente et al. 1971, 1973; Pereira & Schwarz 1984; Murphy 1986; Schwarz & Furlan 2002). Os coléteres calicinais são alternos às sépalas em todas as demais espécies de Asclepiadoideae estudadas até o momento (Frye 1902; Rao & Ganguli 1963b; Tiagi & Dixit 1965; Valente et al. 1973; Silva et al. 1975; Valente 1983,1984,1995; Pereira & Schwarz 1983; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006), com exceção apenas de Oxystelma esculentum R.Br., onde eles são opostos (Rao & Ganguli 1963b).

Os coléteres foliares são cônicos pedunculados ou sésseis e caducos, verdes durante a fase pré-secretora, amarelos durante a secretora e castanhos conforme senescem; a única exceção desta seqüência de coloração em Apocynaceae foi registrada em *M. denticulata*, cujos coléteres apresentam-se enegrecidos durante a fase secretora, devido à presença de hipoderme secretora (capítulo 1). Os coléteres calicinais são pedunculados ou sésseis, achatados dorso-ventralmente, persistentes e amarelos. Além dos foliares e calicinais, o ápice da bractéola de *O. banksii* subsp. *banksii* também é modificado em coléter, sendo esta uma ocorrência única em Apocynaceae (capítulo 6). Todos os demais coléteres foliares das espécies de Apocynaceae são citados como persistentes (Thomas & Dave 1989a,b,c;Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Schwarz & Furlan 2002; Marasca 2008), ao contrário das observações efetuadas no presente estudo, em *Blepharodon bicuspidatum* E.Fourn. (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008) e para alguns dos coléteres de espécies de *Forsteronia* (Rio *et al.* 2005);

os calicinais também são descritos como persistentes (Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c, 1991; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006) e podem ser encontrados no cálice na base dos frutos (Thomas 1991; Thomas & Dave 1991,1994).

Os coléteres interpeciolares são os mais constantes e não apresentam variação em tipo e número (capítulo 1). Nas espécies estudadas, diferenças quanto ao tipo foram encontradas nos coléteres peciolares e calicinais de *A. curassavica* e quanto ao número, em foliares e/ou calicinais de quase todas as espécies, com exceção apenas de *M. denticulata* (capítulos 1, 6). Variações quanto ao tipo e número de coléteres já foram registradas em outras espécies da família (Rao & Ganguli 1963b; Ramayya & Bahadur 1968; Silva *et al.* 1975; Stevens 1975, 1988; Pereira & Schwarz 1983; Thomas & Dave 1989a; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005; Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006). Eles formam-se precocemente na ontogenia dos órgãos e os calicinais já apresentam secreção em botões ainda envoltos pelo cálice (capítulo 6). Os coléteres foliares têm um padrão na seqüência de origem. Os primeiros a serem formados são os interpeciolares, seguidos pelos laminares e/ou peciolares. Eles se encontram em atividade secretora nos primeiros nós dos ramos e a secreção envolve todo o ápice e os órgãos em desenvolvimento (capítulo 1).

A porção secretora de todos os coléteres é composta por epiderme unisseriada em paliçada. As células secretoras dos coléteres de *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* possuem citoplasma com aspecto denso e heterogêneo, enquanto as células de *G. axillaris* têm citoplasma de aspecto homogêneo. A secreção é acumulada em um espaço extraprotoplástico antes de ser liberada para o meio externo através da parede e da cutícula, sem rompê-las (capítulos 1, 6). Os coléteres, em geral, possuem epiderme unisseriada (Thomas 1991), mas em *Allamanda cathartica* L. e *Roupelia grata* Wall., ocasionalmente algumas células se dividem periclinalmente (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas *et al.* 1989). Segundo Fahn (1990), a liberação da secreção destas glândulas ocorre normalmente por ruptura da cutícula, mas este fato não tem sido observado nas espécies brasileiras de Apocynaceae investigadas (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006; Marasca 2008).

Nenhum dos coléteres analisados possui vascularização, mas idioblastos cristalíferos e laticíferos foram encontrados nos coléteres de todas as espécies e tricomas tectores, nos foliares de *A. curassavica, F. stellata* e *M. denticulata*. Normalmente, os coléteres são avascularizados (Woodson & Moore 1938), mas a ocorrência de vascularização pode variar dentre os diferentes coléteres de órgãos vegetativos (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002). Há registro de coléteres vascularizados em folhas de apenas uma espécie de Asclepiadoideae (Arekal & Ramakrishna 1980). Por outro lado, cristais e laticíferos estão presentes em coléteres de diversos gêneros de Apocynaceae (Ramayya & Bahadur 1968; Arekal & Ramakrishna 1980; Fjell 1983; Murugan & Inamdar 1987a,b; Thomas & Dave 1989a,b; Subramanian *et al.* 1989; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, 2000; Schwarz & Furlan 2002; Demarco 2005; Marasca 2008) e tricomas, apenas em *Aganosma caryophyllata* G.Don. (Dave *et al.* 1987) e *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio *et al.* 2002).

A senescência é basípeta em todos os coléteres. Os calicinais permanecem em atividade secretora durante todo o desenvolvimento floral, exceto em *G. axillaris*, e mantêm sua forma durante a fase pós-secretora em flores em pós-antese; entretanto, os foliares em estádio pós-secretor acumulam compostos fenólicos resultantes do processo de senescência e depois contraem-se do ápice para a base até se desconectarem das folhas, assim como observado em outras espécies de Asclepiadeae (Kuriachen & Dave 1989; Demarco 2005; Castro & Demarco 2008).

## Secreção dos coléteres

Os coléteres de *G. axillaris* secretam exclusivamente mucilagem, enquanto os foliares de *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* e florais de *A. curassavica, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* produzem mucilagem e lipídios totais simultaneamente. Esta composição distinta da secreção confere funções diferentes aos coléteres destas espécies. A composição da secreção dos coléteres calicinais das quatro espécies estudadas é semelhante à dos foliares nas respectivas espécies (capítulo 2, 6, tabela 1). Em *Blepharodon bicuspidatum*, os coléteres foliares secretam mucilagem e compostos fenólicos lipossolúveis, enquanto os calicinais secretam mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos lipossolúveis (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008).

Mucilagem é o principal componente da secreção dos coléteres e já foi detectada em coléteres de diversos gêneros, além de alguns açúcares, proteínas e lipídios (Mohan & Inamdar 1986; Dave *et al.* 1987; Kuriachen & Dave 1989; Subramanian *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c, 1990;Thomas *et al.* 1989; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Rio 2006; Marasca 2008). A produção de compostos lipofílicos por coléteres de órgãos vegetativos varia em diferentes espécies. Em *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986), *B. bicuspidatum* (Demarco 2005; Castro & Demarco 2008) e nas espécies de Asclepiadeae estudadas (capítulo 2), eles são continuamente produzidos do estádio inicial ao final. Em *Allamanda cathartica* L., a fração lipofílica é exsudada apenas em coléteres jovens (Thomas & Dave 1989a). Duas fases de secreção distintas foram registradas para os coléteres foliares de espécies de *Mandevilla* e em *Forsteronia glabrescens* Müll.Arg. (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2006; Rio 2006; Rio 2006; Rio 2006).

Nas espécies investigadas, o eixo central dos coléteres foliares e calicinais é composto por células parenquimáticas não secretoras que possuem grãos de amido, mas nos foliares de *M. denticulata* há também uma hipoderme que produz compostos fenólicos (capítulos 2, 6).

## Laticíferos

Os laticíferos de órgãos vegetativos e florais de *A. curassavica, F. stellata, G. axillaris, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii* são articulados anastomosados. Eles ramificamse por fusão lateral de outras células meristemáticas, formando um sistema que interconecta a maior parte dos laticíferos da planta adulta (capítulos 3, 7). Estes registros discordam da interpretação geral dos laticíferos atribuída à família (Chauveaud 1891; Solereder 1908; Metcalfe 1967; Mahlberg 1993), incluindo os gêneros *Asclepias* e *Oxypetalum* (Chauveaud 1891; Solereder 1908; Wilson *et al.* 1976; Wilson & Mahlberg 1977; Serpe *et al.* 2001) e os estudos anteriores de *Asclepias curassavica* (Groom 1889; Arraes 1960; Giordani 1978, 1996). Divergência semelhante ocorre em relação aos laticíferos de *Aspidosperma australe, Cryptostegia grandiflora, Nerium oleander, Stapelia bella* A. Berger e *Vinca sardoa* (Stearn) Pign., cujos laticíferos são articulados (Blaser 1945; Mahlberg 1961, 1963; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Wilson & Maxam 1987; Sacchetti *et al.* 1999; Demarco *et al.* 2006). Embora descritos como do tipo não articulado, laticíferos continuamente produzidos também foram registrados em tecidos primários e secundários
de outras espécies da família (Murugan & Inamdar 1987b; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997).

Nas espécies estudadas, as paredes dos laticíferos são exclusivamente primárias, altamente hidratadas e mais espessas que as das células parenquimáticas adjacentes. Elas não são seladas por substância incrustante ou adcrustante, sendo exclusivamente pectocelulósicas. As paredes das porções jovens têm caráter ácido e permanecem mais flexíveis, possibilitando o aumento do diâmetro celular (capítulos 4, 7). Segundo Fahn (1979), as paredes podem ser tão finas quanto as das células parenquimáticas ou mais espessas, são muito hidratadas e contêm uma grande proporção de substâncias pécticas e hemiceluloses. Estudo imunocitoquímico das paredes dos laticíferos de *Asclepias speciosa* Torr. (Serpe *et al.* 2001, 2002) também mostrou que as paredes das porções maduras dos laticíferos têm propriedades citoquímicas diferentes das paredes da porção mais jovem com relação a epitopos de pectina e que os diferentes componentes da parede exibem padrão de distribuição distinta.

Todos os laticíferos analisados são multinucleados e estão presentes em todas as regiões dos tecidos fundamental e vascular do caule, da folha e da flor. Eles estão ausentes apenas nos óvulos das espécies investigadas e no xilema secundário de *A. curassavica* (capítulos 3, 7). Os laticíferos das demais espécies de Apocynaceae também foram descritos como multinucleados (Mahlberg 1959, 1993; Milanez 1960/1961, 1977; Demarco *et al.* 2006) e possuem distribuição similar a encontrada no presente estudo (Groom 1889; Solereder 1908; Blaser 1945; Metcalfe & Chalk 1950; Arraes 1960; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Mahlberg 1963; Pereira *et al.* 1971; Silva *et al.* 1975; Valente 1977, 1984, 1995, 1996; Murugan & Inamdar 1987a,b; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Rio *et al.* 2005; Valente & Costa 2005; Demarco *et al.* 2006; Rio 2006; Marasca 2008). A única exceção é *Aspidosperma australe*, que não possui laticíferos medulares (Demarco *et al.* 2006).

### <u>Látex</u>

O látex é observado desde a porção mais jovem do laticífero e corresponde ao seu próprio protoplasto. Pequenas vesículas com secreção ocorrem em todos os laticíferos jovens e aparentemente fundem-se ao vacúolo central, transferindo o conteúdo para o seu interior e fazendo com que este aumente em volume, restringindo o citoplasma a uma fina

camada parietal (capítulos 3, 4, 7). Segundo Giordani (1978), Fahn (1979) e Fineran (1983), o protoplasto pode permanecer intacto ou degenerar na maturidade; entretanto, o seu desarranjo aparentemente se deve a um artefato durante a coleta e fixação do material pela desestabilização da pressão de turgor, alterando todo o seu conteúdo.

O látex das espécies investigadas é branco leitoso tanto nos órgãos vegetativos quanto nos florais, porém sua composição não é semelhante. Nos órgãos vegetativos, ele é composto por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides; em F. stellata e G. axillaris, a presenca de lipídios neutros também foi detectada. Contudo, nas flores, o látex é constituído por polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, compostos fenólicos e lipídios totais, mas não apresentam lipídios neutros, ácidos graxos nem alcalóides (capítulo 4, 7, tabela 1). O látex geralmente é descrito como tendo predominantemente lipídios, especialmente terpenos (van Die 1955; Warnaar 1982; Giordani 1996) e diversas substâncias já foram detectadas no látex de espécies de Apocynaceae, tais como lipídios, incluindo triterpenos e poliisoprenos, esteróides, ácidos graxos e aromáticos, polissacarídeos, cardenolídeos, proteínas, incluindo enzimas, compostos fenólicos e alcalóides (van Die 1955; Rao & Malaviya 1966; Wilson et al. 1976; Yoder & Mahlberg 1976; Baas et al. 1981; Groeneveld & van der Made 1982; Warnaar 1982; Allen & Nessler 1984; Eilert et al. 1985; Murugan & Inamdar 1987b; Giordani & Lafon 1993; Giordani 1996; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti et al. 1999; Giordani et al. 2000; Aquiar 2003; Rio 2006; Castro & Demarco 2008).

A diferença encontrada na composição do látex do caule e da folha em relação ao da flor das espécies estudadas pode estar relacionada à origem dos laticíferos, pois eles são articulados e crescem por adição de células; portanto, os laticíferos caulinares e foliares são originados pelos meristemas primários do sistema caulinar, enquanto os florais são provenientes das células meristemáticas do botão floral, onde a indução, expressão gênica e conseqüente diferenciação celular são distintas. Além disso, a alta viscosidade do exsudato provavelmente impede que haja uma homogeneidade da secreção nas diferentes partes do sistema. Há também a possibilidade dos lipídios neutros, ácidos graxos e alcalóides estarem presentes no látex das flores, mas em concentrações muito baixas, não sendo detectadas pelos métodos de microscopia de luz empregados neste estudo. O látex não tem necessariamente a mesma composição nos diferentes órgãos. Em *Mandevilla* 

*illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*), o látex da parte aérea é branco leitoso, enquanto o da raiz é amarelo (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Outras glândulas também podem produzir secreções de composição distinta nos diferentes órgãos, como registrado para os canais de órgãos vegetativos e reprodutivos de *Anacardium humile* St.Hil. e *Mangifera indica* L. (Joel & Fahn 1980a,b; Lacchia 2006).

### Tricomas glandulares

Tricomas glandulares foram localizados em toda a superfície do caule e da folha de *F. stellata* e *M. denticulata*, além do pedicelo e da face abaxial das sépalas de *M. denticulata* (capítulos 5, 6). Tricomas glandulares têm ocorrência restrita em Apocynaceae e foram registrados em apenas oito gêneros de Asclepiadoideae: *Araujia, Dischidia; Fischeria, Gongronema, Gonolobus, Marsdenia, Matelea* e *Sarcostemma* (Solereder 1908; Woodson 1941; Metcalfe & Chalk 1950; Stevens 1975, 1988; Murphy 1986; Morillo 1998). A distribuição restrita destes tricomas nos verticilos florais de *M. denticulata* é a mesma observada em diversas espécies deste gênero (Stevens 1975, 1988). Segundo Woodson (1941), a presença de indumento misto composto por tricomas tectores longos e glandulares curtos em *Fischeria* e *Matelea* é única e evidencia a afinidade destes gêneros agrupados na subtribo Gonolobinae (Rapini *et al.* 2003).

Os tricomas são multicelulares unisseriados com uma célula secretora apical que possui uma base dilatada e uma porção superior acuminada bastante alongada. Cristais estão localizados em posição subapical e proporcionam um local de ruptura preferencial sob ação mecânica. Os tricomas de *M. denticulata* têm uma constrição sob um ápice arredondado, ao contrário dos tricomas de *F. stellata* que possuem ápice agudo, geralmente sem constrição. A secreção em ambas as espécies é composta por aminoácidos e/ou proteínas (capítulos 5, 6, tabela 1). Embora a morfologia do tricoma, mecanismo de liberação e composição da secreção sejam semelhantes aos dos urticantes (Thurston & Lersten 1969; Thurston 1974, 1976; Fahn 1979), nenhuma reação alérgica ocorreu durante as coletas de *F. stellata* e *M. denticulata*.

### **Idioblastos oleíferos**

Idioblastos oleíferos estão presentes nas flores *G. axillaris* (Tabela 1). Eles já foram registrados em 38 famílias de dicotiledôneas (Baas & Gregory 1985; Judd *et al.* 2002),

incluindo 12 gêneros de Apocynaceae, nenhum deles pertencente à subfamília Asclepiadoideae.

No presente estudo, os idioblastos ocupam a maior parte do córtex do pedicelo e são encontrados sob a epiderme das sépalas e pétalas, variam de quadrados a alongados, têm paredes trilamelares, sendo a externa e a interna celulósicas e a mediana suberizada. Os óleos essenciais ocorrem sob a forma de gotas na região central da célula ou junto à parede (capítulo 7). Há raros relatos de idioblastos secretores em Apocynaceae, basicamente restritos a registros em órgãos vegetativos (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Baas & Gregory 1985; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Rio 2006). Em Asclepiadoideae, idioblastos secretores foram registrados em órgãos vegetativos na tribo Ceropegieae e Asclepiadeae (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Endress & Bruyns 2000) e sua presença varia até mesmo em uma mesma subtribo. *Blepharodon* e *Gonioanthela* pertencem à subtribo Metastelmatinae (Rapini *et al.* 2003); entretanto, *B. bicuspidatum* não possui idioblastos secretores em órgãos vegetativos e florais (Demarco 2005). Em geral, os idioblastos oleíferos são caracterizados por possuirem paredes trilamelares, sendo a externa e a interna celulósicas e a mediana suberizada; entretanto, nem sempre a lamela de suberina está presente (Postek & Tucker 1983).

Um dos únicos trabalhos a estudar a distribuição e conteúdo dos idioblastos florais foi realizado em espécies de *Forsteronia* (Rio 2006). Nesse estudo, idioblastos foram encontrados em quase todas as peças florais e compostos fenólicos e ácidos graxos foram detectados em sua secreção.

#### Ala estaminal

O estudo ontogenético evidenciou que a origem das alas é variável em flores de Asclepiadeae. Em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, elas são formadas por projeções laterais da antera e do filete; a origem exclusiva desta estrutura a partir da antera ocorre apenas em *M. denticulata* (capítulo 8) e, portanto, devem ser designadas alas estaminais e não alas/asas das anteras, como referido por diversos autores (Frye 1902; Rao & Ganguli 1963b; Valente 1977,1980,1983,1995; Valente & Silva 1984; Swarupanandan *et a*l. 1996; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Vieira & Shepherd 2002a; Valente & Costa 2005; Gomes 2006).

As quatro espécies estudadas possuem epiderme secretora em duas regiões da ala

estaminal: uma externa, na margem da ala, e outra interna, em uma protuberância, que secreta mucilagem e lipídios totais (capítulo 8, tabela 1). Estas porções secretoras têm sua formação, fase secretora e senescência durante os estádios intermediários do desenvolvimento dos botões florais (capítulo 8). A primeira referência à presença de células secretoras na ala foi feita por Valente (1977) e esta estrutura foi descrita pela primeira vez por Demarco (2005). Em *Blepharodon bicuspidatum*, apenas a porção interna da ala possui células epidérmicas secretoras (Demarco 2005).

As fendas estaminais das quatro espécies estudadas são divididas em duas câmaras: uma externa, situada entre as regiões secretoras da ala que possui tricomas tectores lignificados direcionados para a base da flor, e outra interna, localizada entre a câmara estigmática e as protuberâncias secretoras da ala (capítulo 8). Câmara externa com tricomas lignificados também foi observada em fendas de espécies de *Cynanchum* (Konta *et al.* 1986) e em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005). Segundo Kunze (1991, 1996), a fenda externa com tricomas lignificados guia a probóscide do inseto até o nectário e a interna sem tricomas, em geral, recebe a polínia.

### Nectários

As flores das Asclepiadeae estudadas possuem nectários florais em duas posições: no tubo dos filetes, correspondendo à epiderme da câmara estigmática-nectarífera (nectário primário), e na corona (nectário secundário). Os nectários primários estão presentes nas quatro espécies, porém os secundários ocorrem apenas em *G. axillaris* e *M. denticulata* e têm posição e estrutura distintas (capítulo 8, tabela 1). Em *G. axillaris*, apenas a epiderme da corona estaminal é secretora, enquanto em *M. denticulata*, toda a superfície do anel  $[C_{(is)}]$  é secretora e composta pela epiderme e diversas camadas de células subepidérmicas (capítulo 8). A posição dos nectários das Asclepiadoideae é controversa, devido muitas vezes à terminologia empregada na descrição e a imprecisões na compreensão da complexa morfologia floral; todavia, todas as espécies analisadas até o momento possuem nectários primários no tubo dos filetes (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Kunze & Liede 1991; Kunze 1991, 1995, 1997; Endress 1994; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Vieira & Shepherd 2002a; Demarco 2005; Gomes 2006) e correspondem à epiderme que reveste a câmara estigmática (Galil & Zeroni 1965; Valente 1977, 1984, 1995; Schnepf & Christ 1980; Valente & Silva 1984; Kunze 1991, 1995, 1999; Kunze & Liede 1991; Vieira

& Shepherd 2002a; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006), mas em *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers. há uma camada de células secretoras subepidérmica (Christ & Schnepf 1985) e em *Leptadenia* cf. *abyssinica* Decne., três a quatro (Kunze 1991). A ocorrência de nectários secundários aparentemente está restrita a alguns gêneros, mas tecido secretor na corona já foi registrado anteriormente por Rao e Ganguli (1963b), Valente e Silva (1984), Bruyns (1993), Kunze (1995, 1999), Valente (1995) e Demarco (2005); entretanto, as primeiras descrições bem documentadas de atividade secretora na corona foram efetuadas em *Gonolobus fraternus* Schltdl., *G. chloranthus* Schltdl. (Kunze 1999) e *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005).

As câmaras estigmática-nectaríferas das quatro espécies analisadas produzem uma secreção de composição semelhante, composta por carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais. A corona estaminal de *G. axillaris* também secreta um exsudato de natureza mista, composto por carboidratos, incluindo glicose e mucilagem, e lipídios totais, mas a corona de *M. denticulata* exsuda exclusivamente carboidratos, incluindo glicose e mucilagem (capítulo 8, tabela 1). Secreção de mucilagem já foi registrada em células que revestem o interior do tubo dos filetes em *O. banksii* subsp. *banksii* ao redor dos estiletes e são contínuas com a epiderme da câmara estigmática (Vieira & Shepherd 2002a). Christ e Schnepf (1985) também detectaram açúcares, substâncias de natureza lipídica e polissacarídeos em *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers.

O estudo ontogenético evidenciou que a corona de *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* é C<sub>(is)</sub>, enquanto a de *M. denticulata* é C<sub>(is)</sub> + Ca. A corona C<sub>(is)</sub> é formada a partir do tubo dos filetes e adnata posgenitamente ao tubo da corola. A sua porção estaminal (C<sub>s</sub>) é muito mais desenvolvida que a interestaminal (C<sub>i</sub>) em *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii*, mas em *M. denticulata*, a corona forma um anel ao redor do tubo dos filetes (capítulo 8). Corona de origem estaminal já foi relatada anteriormente para diversos gêneros de Asclepiadoideae (Frye 1902; Rao & Ganguli 1963b; Tiagi & Dixit 1965; Hofmann & Specht 1986; Konta *et al.* 1986; Konta & Kitagawa 1989; Liede & Kunze 1993; Kunze 1995, 1997, 1999; Valente 1995; Valente & Costa 2005; Gomes 2006) e anel ao redor do tubo dos filetes 1995; Valente 1995), além de *Holostemma, Sarcostemma* (Metastelmatinae; Rao & Ganguli 1963b), *Fischeria, Trichosacme* e

*Gonolobus* (Gonolobinae; Kunze 1995, 1999). Por outro lado, a presença de corona anelar (Ca) está restrita à tribo Ceropegieae e em Asclepiadeae, ocorre apenas em Gonolobinae (Liede & Kunze 1993; Kunze 1995; Endress & Bruyns 2000), à qual pertence *Matelea*.

#### Sistema transmissor

O gineceu das Asclepiadeae investigadas possui um sistema transmissor composto por tecidos trasmissores estigmático, estilar e ovariano. O estigma das quatro espécies estudadas é composto por células alongadas não secretoras com grandes vacúolos sobre a superfície unida dos estiletes sob a cabeça dos estiletes (capítulo 9). Com exceção de alguns gêneros de Rauvolfioideae, onde as flores possuem o tipo mais básico de cabeça dos estiletes e aparentemente toda a superfície secretora é receptiva, todas as demais espécies de Apocynaceae possuem a região receptiva na base da cabeça dos estiletes (Corry 1883; Frye 1902; Holm 1950; Rao & Ganguli 1963b; Fallen 1986; Sage *et al.* 1990; Valente 1994; Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Sage & Williams 1995; Swarupanandan *et al.* 1996; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002a; Demarco 2005; Simões *et al.* 2007). Em todas as espécies descritas até o momento, o estigma é composto por células alongadas (Sage *et al.* 1990; Kunze 1991; Demarco 2005) com grandes vacúolos (Sage & Williams 1995).

Os estiletes apresentam dois tecidos com origens e funções distintas que são transmissores: tecido transmissor sólido e canal estilar. O tecido transmissor sólido é composto por células parenquimáticas não secretoras, com paredes espessas e grandes vacúolos ao nível do estigma e por células de paredes finas, citoplasma levemente corado e núcleo evidente que formam dois cordões entre a região estigmática e o ponto de fusão dos estiletes, exceto em *M. denticulata*, onde há apenas um cordão central que pode funcionar como um cômpito. Os canais estilares estão presentes na região livre dos estiletes. Eles são estreitos e revestidos por uma camada de células epidérmicas que possuem grãos de amido e secretam um exsudato composto por mucilagem e lipídios totais a partir da pré-antese floral, que é liberado no lume, preenchendo-o (capítulo 9, tabela 1). Cômpito carpelar foi descrito apenas para *Tylophora* em Asclepiadoideae (Kunze 1991). O canal também é estreito em outras espécies da família e provavelmente é um local de forte competição dos tubos polínicos, aumentando a chance de seleção do

gametofito (Kunze & Liede 1991). Poucos estudos registraram atividade secretora no canal estilar (Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002a).

No ovário, a epiderme da placenta e funículo também é secretora e pode ser considerada um obturador, cuja secreção também é constituída por mucilagem e lipídios totais (capítulo 9, tabela 1). A epiderme secretora do canal estilar é contínua com a do obturador placentário-funicular e a secreção, nestas porções, forma uma camada contínua entre o lume dos canais estilares e a cavidade ovariana, através da qual os tubos polínicos crescerão até a micrópila dos óvulos (capítulo 9). Os tubos polínicos são comumente observados crescendo sobre a superfície da placenta até a micrópila dos óvulos (Sage & Williams 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002a), contudo, este é o primeiro registro de obturador em Apocynaceae. Poucos estudos detectaram a presença de tecido secretor na placenta de espécies de Asclepiadoideae (Sage & Williams 1995; Vieira & Shepherd 2002a).

### Cabeça dos estiletes

Todas as espécies estudadas possuem a porção superior dos estiletes expandida, formando a cabeça dos estiletes, que é resultado da fusão posgênita do ápice dos carpelos em A. curassavica, G. axillaris e M. denticulata ou da região subapical em O. banksii subsp. banksii durante o início do desenvolvimento floral. A cabeça dos estiletes é pentagonal e possui epiderme secretora em paliçada ao longo da superfície lateral nas regiões alternas às anteras, responsável pela produção do translador. Os filetes são fundidos formando o tubo dos filetes e as anteras são livres, mas posgenitamente adnatas à porção inferior da cabeça dos estiletes através do retináculo, formando o ginostégio (capítulo 10). Nas Asclepiadoideae, a formação da cabeça dos estiletes ocorre durante o início do desenvolvimento floral e é um indício de sua complexidade e importância nos estádios posteriores (Fallen 1986; Endress 1994; Swarupanandan et al. 1996; Demarco 2005; Gomes 2006). Ela é diferenciada em cinco zonas secretoras alternas às anteras responsáveis pela produção do translador em Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (Brown 1810; Corry 1883; Rao & Ganguli 1963b; Tiagi & Dixit 1965; Vijayaraghavan & Cheema 1977; Dan Dicko-Zafimahova 1980; Valente & Silva 1984; Konta & Kitagawa 1989; Endress 1994; Kunze 1994; Valente 1995; Vieira 1998; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006).

O translador consiste somente de material secretado rígido e é composto pelo corpúsculo, que irá se fixar ao corpo do polinizador, e por duas caudículas que se prendem a duas polínias provenientes de anteras adjacentes, formando o polinário. A sua morfogênese inicia nos primeiros estádios do desenvolvimento floral, pouco após a abertura do cálice; o corpúsculo é formado antes das caudículas. O formato específico do translador é devido principalmente à atividade desigual das células secretoras e pelo relevo da superfície secretora da cabeça dos estiletes. O translador de *O. banksii* subsp. *banksii* diferencia-se dos demais por apresentar caudículas aliformes. A secreção possui aspecto viscoso e denso desde o início de sua liberação e é uma característica necessária para que o corpúsculo adquira sua forma durante o processo secretor. As estriações presentes no corpúsculo permitem deduzir as células que deram origem a cada uma de suas partes e analisar sua morfogênese ao longo do desenvolvimento floral (capítulo 10).

Transladores compostos por corpúsculo e caudículas são característicos de Asclepiadoideae (Brown 1810; Corry 1883; Schumann 1895; Valente 1977, 1984, 1995; Valente & Silva 1984; Kunze 1993, 1994; Endress 1994; Swarupanandan *et al.* 1996; Vieira 1998; Demarco 2005; Valente & Costa 2005; Gomes 2006) e as caudículas estão ausentes apenas em *Fockea* e *Cibirhiza* (Kunze 1993, 1994; Swarupanandan *et al.* 1996), gêneros posicionados em Marsdenieae, tribo basal de Asclepiadoideae (Endress & Bruyns 2000). Poucos pesquisadores estudaram a morfogênese do translador. O estudo mais importante foi realizado por Kunze (1994) e de acordo com este autor, o principal fator responsável pela forma do translador é a atividade secretora diferencial das células da epiderme da cabeça dos estiletes, ao contrário do papel desempenhado pela desidratação do translador sugerido por Schnepf *et al.* (1979).

Nas quatro espécies investigadas, o translador é composto principalmente por lipídios. A composição do corpúsculo e das caudículas é distinta. Mucilagem, ácidos graxos, compostos fenólicos e proteínas foram detectados no corpúsculo e apenas lipídios neutros e mucilagem, nas caudículas (capítulo 10, tabela 1). Demeter (1922) registrou a composição do translador como sendo goma, Woodson (1954) e Safwat (1962) como lipídio, Vijataraghavan e Cheema (1977) como lipídios e fenólicos no corpúsculo e lipídios e proteínas nas caudículas, e Schnepf *et al.* (1979) como uma emulsão de lipídios e polissacarídeos de estrutura fina similar tanto no corpúsculo quanto nas caudículas. As

proteínas presentes nas caudículas foram associadas à adesão destas ao corpúsculo e ao ápice da polínia e à sua capacidade de rotação das polínias por desidratação e retorno à posição original por reidratação (Vijayaraghavan & Cheema 1977); entretanto, não foram detectadas proteínas nas caudículas das espécies investigadas no presente estudo.

### <u>Polínia</u>

Nos sacos polínicos das espécies em estudo, as células-mãe de micrósporos são alongadas perpendicularmente ao eixo floral e dividem-se, gerando tétrades lineares que se mantêm unidas durante o desenvolvimento da polínia. As células do tapete secretam um material constituído principalmente por lipídios, mas que também possui polissacarídeos, que forma uma película ao redor da polínia (capítulo 10, tabela 1). As polínias de *M. denticulata* possuem características particulares, como a margem pelúcida, que é uma proeminência da parede da polínia, e crista hialina produzida pelas células do tapete, que une a polínia à caudícula (capítulo 10). O padrão de disposição das célulasmãe de micrósporo e da meiose é semelhante nas demais Asclepiadoideae (Gager 1902; Linskens & Suren 1969; Dan Dicko-Zafimahova 1980; Valente 1982; Schill & Dannenbaum 1984). As polínias são formadas por grãos de pólen individuais recobertas por uma parede comum (ectexina; Linskens & Suren 1969; Schill & Jäkel 1978; Dan Dicko-Zafimahova 1980; Schill & Dannenbaum 1984; Dannenbaum & Schill 1991; Wyatt & Lipow 2007), envoltas por uma película polinial de origem do tapete que já foi descrita como sendo lipídica (Woodson 1954; Galil & Zeroni 1969; Linskens & Suren 1969; Schnepf et al. 1979; Wyatt & Lipow 2007) ou, mais especificamente, como elastoviscina (Pacini & Hesse 2005). Margem pelúcida ocorre em espécies de Ceropegieae, em várias Gonolobinae e já foram referidas também para Heterostemma, Hoya, Leptadenia (Marsdenieae), Pergularia (Asclepiadeae; Kunze 1995; Swarupanandan et al. 1996; Endress & Bruyns 2000) e corresponde à abertura por onde os tubos polínicos emergem (Kunze 1995).

### Importância ecológica das estruturas secretoras de Asclepiadeae

As espécies de Asclepiadeae investigadas possuem glândulas envolvidas em duas funções principais: proteção e polinização. As funções de proteção são desempenhadas pelos coléteres, cuja secreção tem função de proteção externa, e pelos laticíferos, que

desempenha sua função caso o órgão seja danificado e os tecidos rompidos. Além disso, *F. stellata* e *M. denticulata* possuem tricomas glandulares e *G. axillaris*, idioblastos secretores florais que possivelmente também têm função de proteção. As demais glândulas florais estão relacionadas à polinização, envolvendo síntese de recurso para o polinizador, remoção e inserção da polínia, secreção da película da polínia e crista hialina, germinação dos grãos de pólen, direcionamento e nutrição dos tubos polínicos até os óvulos e produção do translador.

#### <u>Coléteres</u>

A secreção dos coléteres foliares e calicinais permeia as gemas, evitando o dessecamento dos órgãos em desenvolvimento. O exsudato é exclusivamente mucilaginoso em *G. axillaris* e heterogêneo em *A. curassavica, F. stellata, M. denticulata* e *O. banksii* subsp. *banksii*, eficiente na proteção contra o dessecamento e contra a proliferação de fungos. Os coléteres calicinais são persistentes e observando-se a ontogênese floral, depreende-se que a secreção dos coléteres no início do desenvolvimento dos botões florais tem como principal função evitar o dessecamento; posteriormente, sua função é a de evitar a proliferação de microorganismos, corroborada pela curta atividade secretora dos coléteres de *G. axillaris*, cujo exsudato é exclusivamente mucilaginoso (capítulos 2, 6, tabela 1). A proteção contra o dessecamento se deve à capacidade de retenção de água da mucilagem (Fahn 1979; Simões *et al.* 2004). A fração da secreção responsável por evitar a proliferação dos microorganismos é lipofílica, assim como em *B. bicuspidatum*, onde ela também pode imobilizar pequenos fitófagos nos órgãos vegetativos (Demarco 2005).

# Laticíferos

Nenhum sinal de predação foi observado nos indivíduos das espécies estudadas devido, provavelmente, a alguns compostos detectados no látex, tais como compostos fenólicos e alcalóides que podem ser tóxicos e inibir a proliferação de fungos e bactérias, além dos lipídios que têm a capacidade de coagular, selando ferimentos e impedindo a entrada de microorganismos (capítulos 3, 4, 7, tabela 1). A ausência de predação e a rápida coagulação do látex após a coleta do material corroboram a função de defesa do látex (capítulos 3, 4, 7). O látex é comumente descrito como tendo função de proteção

contra herbívoros, microorganismos e de selar ferimentos (Fahn 1979; Farrell *et al.* 1991, Demarco *et al.* 2006; Castro & Demarco 2008; Pickard 2008), embora alguns herbívoros tenham desenvolvido coevolutivamente estratégias para conseguir se alimentar de plantas latescentes (Compton 1987; Dussourd & Eisner 1987; Dussourd 1990; Dussourd & Denno 1991). Farrell *et al.* (1991) consideraram a presença de laticíferos como uma síndrome de defesa que propiciou uma maior diversidade das linhagens que os possuem em relação aos seus grupos irmãos. A proteção conferida pelo látex geralmente é atribuída à presença de compostos tóxicos ou dissuasivos alimentares (Farrell *et al.* 1991) e diversas funções já foram registradas para o látex de *A. curassavica*, como antifúngica, bactericida, atividades enzimáticas de glicosidases envolvidas na degradação da parede celular de fungos, proteases, Rnases, peroxidases e ácido fosfatases (Giordani *et al.* 2000), além de ser tóxico para larvas de insetos herbívoros generalistas (Dussourd & Hoyle 2000).

A continuidade do sistema laticífero nas cinco espécies estudadas, gerada pela dissolução das paredes transversais e pela anastomose lateral entre diferentes laticíferos, também é um importante fator na defesa da planta, pois propicia um maior afluxo de látex no local seccionado ou injuriado através da liberação simultânea do látex das regiões interconectadas do sistema (capítulos 3, 7), o que não ocorre em plantas cujos laticíferos são articulados não anastomosados. O extravasamento do látex é auxiliado pela água dos tecidos adjacentes que atravessa as paredes dos laticíferos por osmose quando um órgão é cortado e há a diminuição da pressão de turgor neste sistema secretor (Kozlowski 1976, Downton 1981; Pickard 2008).

#### Ala estaminal

Devido à localização das alas estaminais, a natureza viscosa de sua secreção composta por mucilagem e lipídios e a sua desintegração antes da antese, supõe-se que a secreção liberada no interior da fenda e a degeneração da protuberância interna auxiliem nas funções exercidas pela fenda estaminal (capítulo 8, tabela 1). Esta degeneração aparentemente está relacionada ao aumento da área da fenda que é muito estreita, permitindo a introdução da probóscide e/ou da polínia; a presença de secreção nesta região repleta de tricomas lignificados pode servir como lubrificante, facilitando a entrada do aparelho bucal e/ou auxiliando na retirada do polinário aderido ao polinizador (capítulo 8). Quando um inseto insere a probóscide na fenda estaminal durante a coleta de néctar,

só consegue removê-la se fizer um movimento para a frente e para cima, devido aos tricomas lignificados voltados para a base da flor presentes na câmara externa da fenda. Quando ele faz esse movimento, a probóscide entra em contato com o corpúsculo que se adere à ela e a polínia trazida pelo polinizador é retida no interior da fenda ou câmara estigmática pela quebra, geralmente, da caudícula (Kunze 1991; Liede 1994).

# <u>Nectários</u>

As câmaras estigmática-nectaríferas (nectários primários) das quatro espécies investigadas produzem, além dos açúcares que caracterizam o néctar, mucilagem e lipídios totais, que provavelmente estão relacionados às funções de estímulo de germinação e direcionamento dos tubos polínicos até o estigma (capítulo 8, tabela 1). O néctar das CENs de *A. curassavica* e *O. banksii* subsp. *banksii* tem dupla função: recurso para o polinizador e indutor de germinação dos grãos de pólen; entretanto, em *G. axillaris* e *M. denticulata*, estas funções são exercidas por tecidos distintos. A secreção da CEN estimula a germinação dos grãos de pólen, enquanto o recurso para o polinizador é produzido pela corona (capítulo 8). Em Asclepiadoideae, normalmente atribui-se a dupla função ao néctar das CENs (Galil & Zeroni 1965; Jaeger 1971; Pant *et al.* 1982; Eisikowitch 1986; Kevan *et al.* 1989; Kunze 1991; Wyatt & Broyles 1994; Vieira & Shepherd 2002a).

A posição do contentor de néctar é determinante na retirada do polinário. Embora *G. axillaris* possua tecido secretor na corona estaminal, a secreção produzida é acumulada em cavidades interestaminais formadas pela adnação da corona ao tubo da corola e em *M. denticulata*, a secreção da corona  $C_{(is)}$  acumula-se nas regiões interestaminais e entre os anéis das coronas  $C_{(is)}$  e  $C_a$ . A diferença na composição da secreção destes nectários secundários, carboidratos e lipídios em *G. axillaris* e apenas carboidratos em *M. denticulata*, provavelmente está relacionada ao tipo de polinizador de cada uma destas espécies (capítulo 8, tabela 1). O contentor do néctar das CENs de *A. curassavica* é a corona estaminal (Galil & Zeroni 1965), enquanto ele corresponde a cavidades interestaminais em *O. banksii* subsp. *banksii* (Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002a). Em flores onde o néctar está disponível na corona estaminal, o polinário geralmente é retirado pelas pernas do polinizador e quando está abaixo da fenda estaminal, pela probóscide (Pant *et al.* 1982; Eisikovitch 1986; Kunze & Liede 1991; Lumer & Yost 1995; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999); porém, isto pode variar e o polinário pode ser retirado tanto

pelas pernas quanto pela probóscide em algumas espécies (Macior 1965; Frost 1965; Pant *et al.* 1982; Kunze 1999).

### <u>Polinário</u>

A secreção do translador pela cabeça dos estiletes é indispensável ao tipo de polinização das Asclepiadoideae e a sua localização está diretamente relacionada às diversas estruturas-guia das flores. O corpúsculo fica localizado acima da fenda estaminal, aderido à cabeça dos estiletes e o seu sulco é contínuo com a fenda (capítulo 10). Deste modo, quando o inseto retrai a probóscide que estava inserida na fenda, esta prende-se ao sulco do corpúsculo, fazendo com que o polinário seja retirado inteiramente (Kunze 1991).

Após a remoção do polinário, as polínias podem ter sua posição alterada pela rotação das caudículas por desidratação do translador, devido provavelmente à distinta composição das caudículas em relação ao corpúsculo (capítulo 10, tabela 1). Esta rotação já foi registrada por diversos pesquisadores (Corry 1883; Galil & Zeroni 1965, 1969; Macior 1965; Bookman 1981; Kunze 1991, 1995, 1999; Kunze & Liede 1991; Endress 1994; Vieira & Shepherd 2002b) e possibilita que as polínias sejam inseridas corretamente na fenda estaminal, ou seja, com a face por onde os tubos emergem voltada para o eixo floral (Brown 1833; Corry 1883; Galil & Zeroni 1969; Vieira 1998).

Ao contrário de *A. curassavica, G. axillaris* e *O. banksii* subsp. *banksii* que possuem fendas estaminais com características para reter a polínia em seu interior ou junto à câmara estigmática, a fenda de *M. denticulata* é curta e estreita, impossibilitando a introdução da polínia neste local; contudo, as polínias são horizontais e possuem uma longa crista hialina (capítulo 10). Todas as Gonolobinae possuem polínias com crista hialina e somente esta parte é inserida na fenda; desta forma, a polínia fica adpressa à abertura basal da câmara estigmática sob a parte inferior do tubo dos filetes ao redor da cabeça dos estiletes e entra em contato com a secreção da câmara estigmática, estimulando a germinação dos grãos de pólen que crescem através da câmara até o estigma (Kunze 1995, 1998, 1999).

As Asclepiadoideae são polinizadas por insetos de seis ordens, mas também há registros de pássaros que visitam as flores. Marsdenieae, Ceropegieae e Gonolobinae são primariamente polinizadas por Diptera; as demais Asclepiadeae são polinizadas principalmente por Hymenoptera e Lepidoptera (Jaeger 1971; Pant *et al.* 1982; Eisikowitch

1986; Kunze & Liede 1991; Endress 1994; Forster 1994; Liede 1994; Ollerton & Liede 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999). As espécies de *Matelea* são polinizadas por moscas que carregam o polinário na probóscide (Kunze 1995, 1998; Krings 1999) e embora a polinização por moscas em flores de Ceropegieae esteja associada ao estímulo olfativo (Meve & Liede 1994; Jürgens *et al.* 2006), não há registros de perfume nas flores das espécies deste gênero. As espécies de *Asclepias* são polinizadas por abelhas, vespas e borboletas (Frost 1965; Macior 1965; Wyatt & Broyles 1994) e *A. curassavica* é polinizada por borboletas (Ule 1897; Endress 1994). As espécies de *Oxypetalum* são polinizadas por vespas e abelhas, sendo *O. banksii* subsp. *banksii* polinizada principalmente por vespas que carregam os polinários no aparelho bucal (Vieira 1998; Vieira & Shepherd 1999). Trabalhos relacionados à polinização de espécies de *Gonioanthela* não foram localizados.

### Comparação entre floresta de restinga, floresta ombrófila densa de terras baixas e cerrado

Variação estrutural ou funcional não foi detectada nas glândulas vegetativas e florais devido ao ambiente. As espécies pertencentes a cinco gêneros de quatro subtribos de Asclepiadeae distintas possuem muitas características em comum e a diversidade encontrada está relacionada filogeneticamente em nível genérico ou supragenérico.

Em relação ao tipo de estrutura secretora presente nos órgãos vegetativos e florais (Tabela 1), tricomas glandulares são encontrados apenas em *F. stellata* e *M. denticulata* que pertencem à mesma subtribo (Gonolobinae); idioblastos oleíferos ocorrem apenas em flores de *G. axillaris*, corona com tecido secretor está presente apenas em *G. axillaris*, coletada em Floresta de Restinga (FR) e Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (FODTB) e em *M. denticulata*, coletada em FODTB. *Blepharodon bicuspidatum*, espécie de cerrado que também pertence à tribo Asclepiadeae, apresenta as mesmas estruturas secretoras encontradas em *G. axillaris*, exceto os idioblastos florais de conteúdo lipídico (Demarco 2005). Esta semelhança aparentemente também é filogenética, pois ambos os gêneros pertencem à subtribo Metastelmatinae. A corona  $C_{(s)}$  em forma de anel encontrada em *M. denticulata* (capítulo 8) também está presente em outras espécies de Gonolobinae (Kunze 1995, 1999), além de *Holostemma* e *Sarcostemma* (Metastelmatinae; Rao & Ganguli 1963b).

A ontogênese e estrutura das glândulas são caracteres conservativos e não variam em relação à formação vegetacional. A única estrutura cuja morfologia varia é o coléter, mas esta característica aparentemente está restrita a algumas espécies e não é observada em todos os tipos de coléteres. Ela ocorre apenas nos coléteres peciolares de *A. curassavica* e nos laminares de *F. stellata* (capítulo 1), assim como observado anteriormente para o cerrado em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005).

As estruturas secretoras também não alteram a composição dos exsudatos em resposta ao ambiente nas espécies estudadas (Tabela 1). Os coléteres de *A. curassavica*, *F. stellata* e *M. denticulata* secretam mucilagem e lipídios totais, enquanto os coléteres de *G. axillaris* secretam exclusivamente mucilagem. Não há alteração em relação às principais classes de metabólitos da secreção dos coléteres dos indivíduos de *A. curassavica* e *G. axillaris* coletados nas diferentes formações. No cerrado, os coléteres de *B. bicuspidatum* exsudam mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos lipossolúveis (Demarco 2005).

Os laticíferos dos órgãos vegetativos produzem polissacarídeos, incluindo mucilagem, proteínas, lipídios, incluindo ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides. *G. axillaris* e *F. stellata* diferenciam-se pela presença de lipídios neutros (capítulo 4). Esta diferença não está relacionada à formação vegetacional, pois os indivíduos de *G. axillaris* coletados em FR e FODTB apresentam os mesmos resultados, assim como os indivíduos de *A. curassavica* também coletados nas duas formações e que não produzem lipídios neutros. O látex das flores é semelhante nas quatro espécies investigadas e tem composição distinta do látex dos órgãos vegetativos (Tabela 1).

Epiderme secretora da ala estaminal, da câmara estigmática, do canal estilar, do obturador placentário-funicular e da cabeça dos estiletes, e o tapete (Tabela 1) estão presentes em todas as flores de Asclepiadeae de FR, FODTB e cerrado estudadas até o momento. A composição das diversas secreções produzidas por estas glândulas é semelhante e a principal variação encontrada refere-se à morfologia do polinário que é um caráter constante, específico e comumente utilizado para a delimitação dos diversos *taxa* de Asclepiadoideae.

#### Importância taxonômica das estruturas secretoras de Asclepiadeae

Dentre as glândulas estudadas com potencial utilização na taxonomia da tribo, destacam-se os coléteres foliares, os tricomas glandulares, a cabeça dos estiletes e o translador.

Asclepias curassavica (Asclepiadinae) tem coléteres foliares na base do pecíolo; em *G. axillaris* e *Blepharodon bicuspidatum* (Metastelmatinae), eles estão inseridos na sua porção distal junto à lâmina foliar. *F. stellata* e *M. denticulata* (Gonolobinae) têm coléteres na base da lâmina e os interpeciolares apresentam tricomas tectores. *O. banksii* subsp. *banksii* (Oxypetalinae) foi a única das espécies estudadas, em que todos os coléteres são inteiros e pedunculados. Além disso, os coléteres de *M. denticulata* têm uma hipoderme secretora que confere uma cor enegrecida durante a fase secretora. Com base na posição, ocorrência de pedúnculo e hipoderme, os coléteres podem ser utilizados como caráter distintivo para as seis espécies investigadas. Embora o número de coléteres não tenha variado em duas das cinco espécies investigadas, variação já foi observada em outras espécies dos respectivos gêneros e não deve ser utilizada como caráter taxonômico. A importância taxonômica dos coléteres na família já foi reconhecida anteriormente (Woodson & Moore 1938; Thomas 1991; Simões *et al.* 2006) e a sua ocorrência, tipo e/ou posição utilizados como caráter diagnóstico em chaves de identificação em nível de gênero e de espécie (Barroso 1986; Rio & Kinoshita 2005; Rio *et al.* 2005).

Os tricomas glandulares são observados apenas em *F. stellata* e *M. denticulata*. Segundo Woodson (1941), a presença de indumento composto por tricomas tectores longos e glandulares curtos em *Fischeria* e *Matelea* é única em Asclepiadoideae.

A cabeça dos estiletes é uma estrutura muito utilizada na taxonomia (Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000; Gomes 2006; Simões *et al.* 2007) e a morfologia do translador já foi extensamente utilizada para agrupar gêneros em nível tribal e infratribal e em chaves de identificação (Woodson 1941; Volk 1950; Pereira & Silva 1973; Kunze 1995; Swarupanandan *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000). Serbanescu-Jitariu e Tarnavschi (1976) observaram que a estrutura do polinário fornece caracteres úteis para a identificação e classificação desta subfamília. Para os gêneros estudados, pode-se destacar o formato do corpúsculo e da polínia (Valente *et al.* 1971,1973; Silva *et al.* 1975; Stevens 1975,1988; Valente 1977; Pereira & Schwarz 1983, 1984; Murphy 1986) e caracteres mais específicos, tais como a presença de ala membranácea hialina e dente curvo no ápice do espessamento lateral linear da caudícula de *Oxypetalum* (Valente *et al.* 1971,1973; Valente 1977; Pereira & Schwarz 1988; Silva *et al.* 2007) e caudículas aladas e crista hialina na porção superior das polínias em *Matelea* (Stevens 1975,1988). A morfologia do translador é distinta e específica. *O. banksii* subsp. *banksii* diferencia-se das demais espécies por apresentar caudícula com apêndice aliforme e um espessamento lateral linear e *M. denticulata*, por possuir polínias com margem pelúcida e crista hialina.

Os laticíferos articulados de Apocynaceae ainda não devem ser utilizados para diagnosticar *taxa*, pois o registro de sua ocorrência ainda é restrito e discordante dos dados anteriores em nível de gênero e espécie; além disso, a sua identificação baseia-se na ontogênese, que muitas vezes não foi satisfatoriamente analisada em Apocynaceae.

Os idioblastos oleíferos foram encontrados apenas em *G. axillaris* e, em geral, foram pouco explorados nos trabalhos anteriores, não sendo passíveis de comparação no momento. As estruturas secretoras envolvidas na polinização são semelhantes em estrutura e função nas espécies de Asclepiadeae e também não representam caráter distintivo, exceto pelo registro de epiderme secretora na corona; entretanto, estes dados ainda são recentes e restritos a poucos gêneros.

# Perspectivas futuras

O presente trabalho reforça a importância de dar continuidade aos estudos anatômicos, investigando outras espécies de Apocynaceae em relação à:

- Ocorrência de idioblastos secretores em espécies da família;
- Ontogênese dos laticíferos em outras espécies da família;
- Ocorrência de obturador placentário em espécies da família;
- Estudos de botões florais de espécies de Asclepiadoideae, pois algumas glândulas podem estar ausentes na flor adulta, como o tecido secretor da ala estaminal;
- Ocorrência de tecido secretor na corona em espécies de Asclepiadoideae;
- Composição do corpúsculo e das caudículas em espécies de Asclepiadoideae;
- Ultra-estrutura das glândulas relacionadas à polinização das espécies de Asclepiadoideae.

# Anexo I . Terminologia adotada para as flores de Asclepiadoideae.

**Ala estaminal** – projeções laterais dos estames que formam a fenda estaminal (Demarco 2008).

**Cabeça dos estiletes** – porção superior expandida dos estiletes, formada pela fusão posgênita do ápice dos carpelos (Fallen 1986).

**Câmara estigmática** – câmara do tubo dos filetes alterna e envolta pelas anteras e suas alas (Woodson 1954).

**Câmara estigmática-nectarífera** (=câmara estigmática) – câmara interestaminal do tudo dos filetes com tecido nectarífero (Demarco 2008).

**Caudícula** – secreção da cabeça dos estiletes de forma alongada que liga lateralmente o corpúsculo à polínia (Corry 1883).

**Contentor de néctar** – parte da flor que recebe e contém o néctar produzido pelo nectário (sob Safthalter, Sprengel 1793)

**C**<sub>(is)</sub> – corona formada pela fusão entre a corona estaminal e interestaminal (Liede & Kunze 1993).

**Corona** (C) – órgão floral de diferentes origens diferenciado em forma de anel ou em estruturas cupuliformes (Schumann 1895).

**Corona anelar** ( $C_a$ ) – espessamento anelar no interior do tubo da corola (Liede & Kunze 1993).

**Corona estaminal** ( $C_s$ ) – corona que se insere dorsalmente aos estames ao longo de seu comprimento ou na base do tubo dos filetes (Liede & Kunze 1993).

**Corona interestaminal** (C<sub>i</sub>) – corona de origem na base do tubo dos filetes nas regiões interestaminais (Liede & Kunze 1993).

**Corpúsculo** – corpo rígido com um sulco longitudinal, formado exclusivamente pela secreção dos ângulos da cabeça dos estiletes (Corry 1883).

**Crista hialina** – secreção das células do tapete que liga a porção apical da polínia à caudícula (Demarco 2008).

**Espaço extraprotoplástico** – espaço intracelular externo ao protoplasto, geralmente restrito à porção distal da célula (Demarco 2008).

**Estigma** – superfície através da qual os tubos polínicos penetram no gineceu (Corry 1883).

**Fenda estaminal** – fenda formada pelas alas de dois estames adjacentes (Demarco 2008).

**Ligamento** – secreção da cabeça dos estiletes exsudada durante a morfogênese do corpúsculo que estabiliza as suas duas metades durante a secreção do assoalho (Kunze 1994).

**Margem pelúcida** – protuberância da parede da polínia por onde os tubos polínicos emergem (Swarupanandan *et al.* 1996).

**Morfogênese** – seqüência de formação de uma estrutura acelular que adquire formato específico, de acordo com o seu processo de secreção (Demarco 2008).

Nectário primário – tecido secretor da câmara estigmática (Kunze 1999).

Nectário secundário – corona com tecido nectarífero (Demarco 2008).

**Ontogênese** – seqüência de desenvolvimento do indivíduo, órgão ou parte deste (estrutura, tecidos etc.) desde o estádio meristemático até a sua maturidade (Demarco 2008).

**Parede da polínia** – camada de ectexina comum a todos os grãos de pólen periféricos que envolve a polínia (Linskens & Suren 1969).

**Película da polínia** – secreção das células do tapete que envolve externamente a polínia (Demarco 2008).

**Retináculo** – tecido da antera adnato à base da cabeça dos estiletes (Pichon 1948).

**Sistema transmissor carpelar** - conjunto de tecidos transmissores carpelares: estigmático, estilar e ovariano (Demarco 2008).

**Translador** – aparato para transferência do pólen que pode ser simples (Periplocoideae) ou diferenciado em duas partes: corpúsculo e caudículas (Schumann 1895).

**Tecido transmissor** - tecido ao longo ou através do qual os tubos polínicos crescem até chegar à micrópila do óvulo (Tilton & Horner 1980).

# Anexo II . Aceite de publicação do artigo referente ao Capítulo 3.



Revista Brasileira de Botânica

**Prezado Dr.** Marilia de Moraes Castro *Dear Dr.* 

Manuscrito nº 183/07 Manuscript nº

**Data:** 29/08/2008 *Date* 

#### Título

*Title:* Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadaceae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas

Autor/es: Diego Demarco e Marília de Moraes Castro *Author/s* 

X Aceito / Accepted

Agradecemos a sua contribuição Thanking you for your contribution

> Cordialmente Sincerely yours

Editor - Chefe

REVISTA BRASILEIRA DE BOTÂNICA Caixa postal 57088 04093-970 São Paulo - SP Brasil

# Referências bibliográficas

- AGUIAR, S 2003 Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ALLEN, RD & NESSLER, CL 1984 Cytochemical localization of pectinase activity in laticifers of *Nerium oleander* L. Protoplasma 119:74-78.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. Phytomorphology 30:303-306.
- ARRAES, MAB 1960 Contribuição ao conhecimento de *Asclepias curassavica* L. Fortaleza, Tese de doutorado, Faculdade de Farmácia e Odontologia, Universidade do Ceará.
- BAAS, P & GREGORY, M 1985 A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. Israel Journal of Botany 34:167-186.
- BAAS, WJ; WARNAAR, F & NIEMANN, GJ 1981 Investigations on *Hoya* species. VI. Latex composition and leaf phenolics and their taxonomic significance. Acta Botanica Neerlandica 30:257-263.
- BARROSO, GM 1986 Sistemática de angiospermas do Brasil. v. 3, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária.
- BLASER, HW 1945 Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. American Journal of Botany 32:135-141.

- BOOKMAN, SS 1981 The floral morphology of *Asclepias speciosa* (Asclepiadaceae) in relation to pollination and a clarification in terminology for the genus. American Journal of Botany 68:675-679.
- BROWN, R 1810 On the Asclepiadeae, a natural order of plants separated from the Apocineae of Jussieu. Memoirs of the Wernerian Natural History Society 1:12-78.
- BROWN, R 1833 On the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. Transactions of the Linnean Society of London 16:685-745.
- BRUYNS, P 1993 A revision of *Hoodia* and *Lavrania* (Asclepiadaceae-Stapelieae). Botanische Jahrbücher für Systematik 115:145-270.
- CASTRO, M de M & DEMARCO, D 2008 Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. Natural Product Communications 3:1273-1284.
- CHAUVEAUD, MLG 1891 Recherches embryogèniques sur l'appareil laticifère des Euphorbiacèes, Apocynées et Asclépiadées. Annales des Sciences Naturelles. Botanique et Biologie Vegetale (ser. 7) 14:1-161.
- CHRIST, P & SCHNEPF, E 1985 The nectaries of *Cynanchum vincetoxicum* (Asclepiadaceae). Israel Journal of Botany 34:79-90.
- COMPTON, S G 1987 *Aganais speciosa* and *Danaus chrysippus* (Lepidoptera) sabotage the latex defenses of their host plants. Ecological Entomology 12:115-118.
- CORRY, TH 1883 On the structure and development of gynostegium and the mode of fertilisation in *Asclepias cornuti*. Transactions of the Linnean Society of London 2:173-207.
- DAN DICKO-ZAFIMAHOVA, L 1980 Ultrastructure des parois des pollinies de *Calotropis procera*. Adansonia 17:455-463.
- DANNENBAUM, C & SCHILL, R 1991 Die Entwicklung der Pollentetraden und Pollinien bei *Asclepiadaceae*. Bibliotheca Botanica 141:1-138.
- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.

- DE BARY, A 1884 Comparative anatomy of the vegetative organs of the phanerogams and ferns. English translation by F.O. Bower & D.H. Scott, Oxford, Clarendon Press.
- DEMARCO, D 2005 Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de Aspidosperma Mart. e Blepharodon Decne. (Apocynaceae s.l.). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DEMARCO, D; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2006 Laticíferos articulados anastomosados novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.
- DEMETER, K 1922 Vergleichende Asclepiadeenstudien. Flora 15:130-176.
- DOWNTON, WJS 1981 Water relations of laticifers in *Nerium oleander*. Australian Journal of Plant Physiology 8:329-334.
- DUSSOURD, DE 1990 The vein drain; or, how insects outsmart plants. Natural History 90:44-49.
- DUSSOURD, DE & DENNO, RF 1991 Deactivation of plant defense correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. Ecology 72:1383-1396.
- DUSSOURD, DE & EISNER, T 1987 Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defense of plants. Science 237:898-901.
- DUSSOURD, DE & HOYLE, AM 2000 Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars. Chemoecology 10:11-16.
- EILERT, U; NESBITT, LR & CONSTABEL, F 1985 Laticifers and latex in fruits of periwinkle, *Catharanthus roseus*. Canadian Journal of Botany 63:1540-1546.
- EISIKOWITCH, D 1986 Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in Israel. Plant Systematics and Evolution 152:185-194.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.

- ENDRESS, ME; LIEDE-SCHUMANN, S & MEVE, U 2007 Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:259-267.
- EZCURRA, C & BELGRANO, MJ 2007 A new species and a new combination in *Matelea* (Apocynaceae, Asclepiadoideae) from southern South America. Systematic Botany 32:856-861.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanishe Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FARINACCIO, MA & ASSIS, MA de 1998 Flórula fanerogâmica da planície litorânea de Picinguaba-Ubatuba, SP: Asclepiadaceae. Pesquisas. Botânica 48:145-156.
- FARRELL, BD; DUSSOURD, DE & MITTER, C 1991 Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.
- FEDERICI, E; GALEF, C & NICOLETTI, M 1988 Constituents of *Araujia sericifera*. Journal of Natural Products 51:189-190.
- FINERAN, BA 1983 Differentiation of non-articulated laticifers in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.). Annals of Botany 52:279-293.
- FJELL, I 1983 Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.
- FORSTER, PI 1994 Diurnal insects associated with the flowers of *Gomphocarpus physocarpus* E.Mey. (Asclepiadaceae), an introduced weed in Australia. Biotropica 26:214-217.
- FROST, SW 1965 Insects and pollinia. Ecology 46:556-558.
- FRYE, TC 1902 A morphological study of certain Asclepiadaceae. Botanical Gazette 34:389-413.
- GAGER, CS 1902 The development of the pollinium and sperm-cells in *Asclepias cornuti*, Decaisne. Annals of Botany 16:123-148.

- GALETTO, L 1997 Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. Flora 192:197-207.
- GALIL, J & ZERONI, M 1965 Nectar system of *Asclepias curassavica*. Botanical Gazette 126:144-148.
- GALIL, J & ZERONI, M 1969 On the organization of the pollinium in *Asclepias curassavica*. Botanical Gazette 130:1-4.
- GIORDANI, R 1978 Autophagie cellulaire et différenciation des laticifères non articulés chez une Asclépiade. Biologie Cellulaire 33:253-260.
- GIORDANI, R 1996 Les lipids du latex chez *Asclepias curassavica* et *Lactuca sativa*: nature, origine, localisation subcellulaire et rôle. Oleagineux Corps Gras Lipides 3:89-94.
- GIORDANI, R & LAFON, L 1993 A β-D-fucosidase from *Asclepias curassavica* latex. Phytochemistry 33:1327-1331.
- GIORDANI, R; TOLLA, D; REGLI, P & BUC, J 2000 Role of terpenes from *Asclepias curassavica* latex for antifungal activity. Journal de Mycologie Medicale 10:34-38.
- GOMES, SM 2006 Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae *s.l.* Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- GOMES, SM; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2008 Hemisincarpia e nectário apendicular enfocados através de ontogênese floral em *Mandevilla velame* (A. St.-Hil.)
  Pichon, Apocynoideae. Revista Brasileira de Botânica 31:81-93.
- GOYDER, D; NICHOLAS, A & LIEDE-SCHUMANN, S 2007 Phylogenetic relationships in subtribe Asclepiadinae (Apocynaceae: Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 94:423-434.
- GROENEVELD, HW & VAN DER MADE, LA 1982 Cardenolide and triterpene synthesis in the laticifers of *Asclepias curassavica* L. Acta Botanica Neerlandica 31:5-10.

GROOM, P 1889 On the function of laticiferous tubes. Annals of Botany 3:157-169.

- HANSEN, BF 1985 A monographic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). Florida, Thesis, University of South Florida.
- HOFMANN, U & SPECHT, AK 1986 Der morphologische Charakter der Asclepiadaceencorona. Beiträge zür Biologie der Pflanzen 61:79-85.
- HOLM, RW 1950 The American species of *Sarcostemma* R. Br. (Asclepiadaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 37:477-560.
- JAEGER, P 1971 Contribution a l'etude de la biologie florale des Asclepiadacees. Le *Calotropis procera* Ait. Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (A) 33:32-43.
- JOEL, DM & FAHN, A 1980a Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 2. Resin secretion in the primary shoot ducts. Annals of Botany 46:779-783.
- JOEL, DM & FAHN, A 1980b Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 3. Secretion of the protein-polysaccharide mucilage in the fruit. Annals of Botany 46:785-790.
- JUAREZ-JAIMES, V; ALVARADO-CARDENAS, LO & VILLASENOR, JL 2007 The family Apocynaceae *sensu lato* in Mexico: diversity and distribution. Revista Mexicana de Biodiversidad 78:459-482.
- JUDD, WS; CAMPBELL, CS; KELLOGG, EA; STEVENS, PF & DONOGHUE, MJ 2002 Plant systematics: a phylogenetic approach. 2<sup>nd</sup> ed., Sunderland, Sinauer Associates.
- JÜRGENS, A; DÖTTERL, S & MEVE, U 2006 The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae). New Phytologist 172: 452-468.
- KEVAN, PG; EISIKOWITCH, D & RATHWELL, B 1989 The role of nectar in the germination of pollen in *Asclepias syriaca* L. Botanical Gazette 150:266-270.
- KONTA, F & KITAGAWA, J 1989 Taxonomic notes of Asclepiadaceae in Thailand. I. The floral morphology of *Dischidia raffresiana* Wall., *Marsdenia glabra* Cost. and *Secamone ferruginea* Pierre ex Cost. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 40:125-132.
- KONTA, F; SUDA, T & KOBAYASHI, C 1986 A preliminary study on the floral morphology of *Cynanchum* (Asclepiadaceae). Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 37:59-68.

KOZLOWSKI, TT 1976 Water deficit and plant growth. v. 4, New York, Academic Press.

- KRINGS, A 1999 Observations on the pollination biology and flowering phenology of Texan *Matelea reticulata* (Engelm. ex A. Gray) Woods. (Asclepiadaceae). Madroño 46:155-158.
- KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. Plant Systematics and Evolution 176:227-253.
- KUNZE, H 1993 Evolution of the translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. Plant Systematics and Evolution 185:99-122.
- KUNZE, H 1994 Ontogeny of the translator in Asclepiadaceae *s.str*. Plant Systematics and Evolution 193:223-242.
- KUNZE, H 1995 Floral morphology of some Gonolobeae (Asclepiadaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik 117:211-238.
- KUNZE, H 1996 Morphology of the stamen in the Asclepiadaceae and its systematic relevance. Botanische Jahrbücher für Systematik 118:547-579.
- KUNZE, H 1997 Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). Flora 192:175-183.
- KUNZE, H 1998 Floral structure and pollination biology in *Matelea lanata* (Asclepiadaceae). Asklepios 75:23-27.
- KUNZE, H 1999 Pollination ecology in two species of *Gonolobus* (Asclepiadaceae). Flora 194:309-316.
- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (Asclepiadaceae). Plant Systematics and Evolution 178:95-105.
- KUNZE, H & WANNTORP, L 2008 Corona and anther skirt in *Hoya* (Apocynaceae, Marsdenieae). Plant Systematics and Evolution 271:9-17.
- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.
- LACCHIA, APS 2006 Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de

espécies de Anacardiaceae: anatomia, histoquímica e ultra-estrutura. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- LEWINSOHN, TM & VASCONCELLOS-NETO, J 1980 Alimentação de crisomelídeos em Asclepiadáceas: um comportamento que reduz a ingestão de substâncias tóxicas. Ciência e Cultura 32 (Suppl.):497.
- LEWINSOHN, TM & VASCONCELLOS-NETO, J 1985 Convergência comportamental e padrões coevolutivos de insetos folívoros em plantas latescentes. XII Congresso Brasileiro de Zoologia, Campinas, Resumos: 152-153.
- LIEDE, S 1994 Some observations on pollination in Mexican Asclepiadaceae. Madroño 41:266-276.
- LIEDE, S 1997 Subtribes and genera of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae Asclepiadoideae) a synopsis. Taxon 46:233-247.
- LIEDE, S & ALBERS, F 1994 Tribal disposition of genera in the Asclepiadaceae. Taxon 43:201-231.
- LIEDE, S & KUNZE, H 1993 A descriptive system for corona analysis in Asclepiadaceae and Periplocaceae. Plant Systematics and Evolution 185:275-284.
- LIEDE-SCHUMANN, S 2007 New results in floral biology of Asclepiadoideae (Apocynaceae). Phyton (Annales Rei Botanicae) 46:191-193.
- LIN, S & BERNARDELLO, G 1999 Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Science 160:869-878.
- LINSKENS, HF & SUREN, ML 1969 Die Entwicklung des Polliniums von *Asclepias curassavica*. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 82:527-534.
- LOOKADOO, SE & POLLARD, AJ 1991 Chemical contents of stinging trichomes of *Cnidoscolus texanus*. Journal of Chemical Ecology 17:1909-1916.
- LUMER, C & YOST, SE 1995 The reproductive biology of *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench (Asclepiadaceae), a Mediterranean weed in New York State. Bulletin of the Torrey Botanical Club 122:12-23.
- MABBERLEY, DJ 1997 The plant-book. 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press.

- MACIOR, LW 1965 Insect adaptation and behavior in *Asclepias* pollination. Bulletin of the Torrey Botanical Club 92:114-126.
- MAHLBERG, PG 1961 Embridgeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. American Journal of Botany 48:90-99.
- MAHLBERG, PG 1963 Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. Botanical Gazette 124:224-231.
- MAHLBERG, PG 1959 Kariokinesis in the non-articulated laticifers of *Nerium oleander* L. Phytomorphology 9:110-118.
- MAHLBERG, PG 1961 Embridgeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. American Journal of Botany 48:90-99.
- MAHLBERG, PG 1963 Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. Botanical Gazette 124:224-231.
- MAHLBERG, PG 1993 Laticifers: an historical perspective. The Botanical Review 59:1-23.
- MARASCA, RM 2008 Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- METCALFE, CR 1967 Distribution of latex in the plant kingdom. Economic Botany 21:115-127.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1979 Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2<sup>nd</sup> ed., v. 1, Oxford, Clarendon Press.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1983 Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction. 2<sup>nd</sup> ed., v. 2, Oxford, Clarendon Press.
- MEVE, U & LIEDE, S 1994 Floral biology and pollination in stapeliads new results and a literature review. Plant Systematics and Evolution 192:99-116.

- MEVE, U & LIEDE-SCHUMANN, S 2007 *Ceropegia* (Apocynaceae, Ceropegieae, Stapeliinae): paraphyletic but still taxonomically sound. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:392-406.
- MILANEZ, FR 1960/1961 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia* grandiflora - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae). Rodriguésia 35/36:99-128.
- MILANEZ, FR 1966 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – III. Nota sobre a estrutura secundária. Rodriguésia 25:335-350.
- MILANEZ, FR 1977 Ontogênese dos laticÍferos contínuos de *Neridium* (*Nerium*) *oleander* L. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975:343-379.
- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- MORILLO, G 1995 Tres nuevas especies en las Asclepiadaceae sudamericanas. Caldasia 17:413-418.
- MORILLO, G 1998 *Matelea gracieae* Morillo, a new species from French Guiana, and *Cynanchum gortsianum* Morillo, a new record for Suriname. Brittonia 50:296-300.
- MURPHY, H 1986 A revision of the genus *Fischeria* (Asclepiadaceae). Systematic Botany 11:229-241.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences) 97:25-31.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.
- OCCHIONI, P 1953 Notas sôbre o gênero Oxypetalum II (As espécies do Estado do Rio de Janeiro). Dusenia 4:251-271.
- OLLERTON, J & LIEDE, S 1997 Pollination systems in the Asclepiadaceae: a survey and preliminary analysis. Biological Journal of the Linnean Society 62:593-610.

- PACINI, E & HESSE, M 2005 Pollenkitt its composition, forms and functions. Flora 200:399-415.
- PANT, DD; NAUTIYAL, DD & CHATURVEDI, SK 1982 Pollination ecology of some Indian asclepiads. Phytomorphology 32:302-313.
- PEREIRA, JF 1989 Estudos em Asclepiadaceae. XXVI. Novas combinações e novos sinônimos. Bradea 23:261-266.
- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1983 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. XX. Uma nova espécie de *Gonioanthela* Malme. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:71-74.
- PEREIRA, JF & SCHWARZ, E de A 1984 Estudos em Asclepiadaceae. XX. Novos táxons em *Ditassa* R.Br. e *Oxypetalum* R.Br. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:145-148.
- PEREIRA, JF & SILVA, NMF da 1973 Estudos em Asclepiadaceae. IV *Blepharodon* Decaisne. Revista Brasileira de Biologia 33:77-86.
- PEREIRA, JF; VALENTE, M da C ALENCASTRO, FMMR de 1971 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. V. Estudo taxonômico e anatômico de *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. Rodriguésia 26:261-281.
- PICKARD, WF 2008 Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. New Phytologist 177:877-888.
- POSTEK, MT & TUCKER, SC 1983 Ontogeny and ultrastructure of secretory oil cells in *Magnolia grandiflora* L. Botanical Gazette 144:501-512.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963a Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963b The floral anatomy of some Asclepiadaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (B) 57:15-44.

- RAO, AR & MALAVIYA, M 1966 The non-articulated laticifers and latex of *Tabernaemontana coronaria* Willd. Proceedings of the National Institute of Sciences of India 32:233-242.
- RAPINI, A; MELLO-SILVA, R & KAWASAKI, ML 2001 Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 19:55-169.
- RAPINI, A; CHASE, MW; GOYDER, DJ & GRIFFITHS, J 2003 Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). Taxon 52:33-50.
- RAPINI, A; CHASE, MW & KONNO, TUP 2006 Phylogenetics of South American Asclepiadoideae (Apocynaceae). Taxon 55: 119-124.
- RAPINI, A; VAN DEN BERG, C & LIEDE-SCHUMANN, S 2007 Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:407-422.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom. cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do 2006 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.
- RIO, MCS do & KINOSHITA, LS 2005 *Prestonia* (Apocynaceae) no sul e sudeste do Brasil. Hoehnea 32:233-258.
- RIO, MCS do; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2005 Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.

- ROBERTSON, C 1886 Notes on the mode of pollination of *Asclepias*. Botanical Gazette 11:262-269.
- SACCHETTI, G; BALLERO, M; SERAFINI, M; ROMAGNOLI, C; BRUNI, A & POLI, F 1999 Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). Phyton (Annales Rei Botanicae) 39:265-275.
- SAFWAT, FM 1962 The floral morphology of *Secamone* and the evolution of the pollinating apparatus in Asclepiadaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 49:95-129.
- SAGE, TL; BROYLES, SB & WYATT, R 1990 The relationship between the five stigmatic chambers and two ovaries of milkweed (*Asclepias amplexicaulis* Sm.) flowers: a three-dimensional assessment. Israel Journal of Botany 39:187-196.
- SAGE, TL & WILLIAMS, EG 1995 Structure, ultrastructure, and histochemistry of the pollen tube pathway in the milkweed *Asclepias exaltata* L. Sexual Plant Reproduction 8:257-265.
- SCHILL, R & DANNENBAUM, KC 1984 Bau und Entwicklung der Pollinien von *Hoya carnosa* (L.) Br. (Asclepiadaceae). Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 48:1-54.
- SCHILL, R & JÄKEL, U 1978 Beiträge zür Kenntnis der Asclepiadaceen-Pollinarien. Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 22:1-122.
- SCHNEPF, E & CHRIST, P 1980 Unusual transfer cells in the epithelium of the nectaries of *Asclepias curassavica* L. Protoplasma 105:135-148.
- SCHNEPF, E; WITZIG, F & SCHILL, R 1979 Über Bildung und Feinstruktur des Translators der Pollinarien von Asclepias curassavica und Gomphocarpus fruticosus (Asclepiadaceae). Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 25:1-33.
- SCHUMANN, K 1895 Asclepiadaceae. *In*: Die natürlichen Pflanzenfamilien (A. Engler & K. Prantl, eds.), Leipzig, Wilhelm Engelmann.
- SCHWARZ, E de A & FURLAN, A 2002 Coléteres foliares de Oxypetalum R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) — aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). Acta Biológica Paranaense 31:79-97.

- SENNBLAD, B; ENDRESS, ME & BREMER, B 1998 Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. American Journal of Botany 85:1143-1158.
- SERBANESCU-JITARIU, G & TARNAVSCHI, IT 1976 Observations regarding the structure of the pollinaria of some representatives of the family Asclepidaceae. Bulletin de la Société d'Historie Naturelle de l'Afrique du Nord 67:19-41.
- SERPE, MD; MUIR, AJ & KEIDEL, AM 2001 Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. Protoplasma 216:215-226.
- SERPE, MD; MUIR, AJ & DRIOUICH, A 2002 Immunolocalization of β-D-glucans, pectins, and arabinogalactan-proteins during intrusive growth and elongation of nonarticulated laticifers in *Asclepias speciosa* Torr. Planta 215:357-370.
- SILVA, NMF da; PEREIRA, JF & VALENTE, M da C 2007 Asclepiadoideae (Apocynaceae) from southeastern Brazil. I. The genus *Oxypetalum* from Rio de Janeiro state, Brazil. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:435-462.
- SILVA, NMF; VALENTE, M da C; ALENCASTRO, FMMR; PEREIRA, JF & SUCRE, BD 1975 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. X. Estudos taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35:745-756.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- SIMÕES, AO; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2006 Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152:387-398.
- SIMÕES, AO; RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2007 Gynostegium morphology of Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae) as it pertains to the classification of the tribe. International Journal of Plant Sciences 168: 999-1012.
- SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP de; MENTZ, LA & PETROVICK, PR 2004 Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5<sup>a</sup> ed., Porto
Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.

- SOLEREDER, H 1908 Systematic anatomy of the dicotyledons. English translation by L.A. Boodle & F.G. Fritsch, 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- SPARROW, FK & PEARSON, NL 1948 Pollen compatibility in *Asclepias syriaca*. Journal of Agricultural Research 77:187-199.
- SPRENGEL, CK 1793 Das entdeckte Geheimniss der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen. Berlin, Friedrich Vieweg.
- STEVENS, WD 1975 Notes on the genus *Matelea* (Apocynaceae s.l.). Phytologia 32:387-406.
- STEVENS, WD 1988 A synopsis of *Matelea* subg. *Dictyanthus* (Apocynaceae: Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 75:1533-1564.
- STOCKSTILL, BL & NESSLER, CL 1986 Ultrastructural observations on the nonarticulated, branched laticifers in *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). Phytomorphology 36:347-355.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.
- SWARUPANANDAN, K; MANGALY, JK; SONNY, TK; KISHOREKUMAR, K & CHAND BASHA,
  S 1996 The subfamilial and tribal classification of the family Asclepiadaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 120:327-369.
- THEISS, K; KEPHART, S & IVEY, CT 2007 Pollinator effectiveness on co-occurring milkweeds (*Asclepias*; Apocynaceae, Asclepiadoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 94:505-516.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:201-203.

388

- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989c Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). Phyton (Annales Rei Botanicae) 30:209-212.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1991 Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Repertorium 102:23-28.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1994 Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 63:9-20.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.
- THURSTON, EL 1974 Morphology, fine structure, and ontogeny of the stinging emergence of *Urtica dioica*. American Journal of Botany 61:809-817.
- THURSTON, EL 1976 Morphology, fine structure, and ontogeny of the stinging emergence of *Tragia ramosa* and *T. saxicola* (Euphorbiaceae). American Journal of Botany 63:710-718.
- THURSTON, EL & LERSTEN, NR 1969 The morphology and toxicology of plant stinging hairs. The Botanical Review 35:393-412.
- TIAGI, B & DIXIT, G 1965 Studies in the floral anatomy of some Asclepiadaceae. Bulletin of the Botanical Society of Bengal 19:111-123.
- TORRES, C & GALETTO, L 1998 Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127:207-223.
- ULE, E 1897 Symbiosis between an *Asclepias* and a butterfly. Journal of Botany 35:441-443.

- VALENTE, M da C 1977 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Estudo da anatomia e vascularização (Asclepiadaceae). Rodriguésia 29:161-283.
- VALENTE, M da C 1980 A flor de *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. et Val., comb. nov. – vascularização floral. Rodriguésia 32:81-98.
- VALENTE, M da C 1982 Observações sobre a formação das polínias em *Oxypetalum banksii* Roem. et Schult. subsp. *banksii*. Boletim do Museu Botânico Municipal 52:1-5.
- VALENTE, M da C 1983 Vascularização floral em *Peplonia nitida* Decaisne (Asclepiadaceae). Atas da Sociedade Botânica do Brasil 1:55-62.
- VALENTE, M da C 1984 *Ditassa eximia* Decne (Asclepiadaceae). Anatomia vegetal. Atas da Sociedade Botânica do Brasil 2:53-59.
- VALENTE, M da C 1994 Germinação dos polínios em *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. (Asclepiadaceae). Atas da Sociedade Botânica do Brasil 3:129-135.
- VALENTE, M da C 1995 Matelea maritima subsp. ganglinosa (Vell.) Font. Anatomia e vascularização floral (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 33:75-98.
- VALENTE, M da C 1996 *Matelea maritima* subsp. *ganglinosa* (Vell.) Font. Anatomia vegetal (Asclepiadaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 34:145-176.
- VALENTE, M da C & COSTA, CG 2005 Estudo anatômico da flor de *Marsdenia Ioniceroides* E. Fournier (Asclepiadoideae – Apocynaceae). Rodriguésia 56:51-66.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1971 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. VII – Estudos taxonômico e anatômico de *Oxypetalum banksii* Roem. *et* Schult. subsp. *corymbiferum* (Fourn.) Font. *et* Val., comb. nov. Anais da Academia Brasileira de Ciências 43:177-189.
- VALENTE, M da C ; PEREIRA, JF & ALENCASTRO, FMMR de 1973 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. IX Estudos taxonômico e anatômico de: *Oxypetalum appendiculatum* Mart., *Oxypetalum pilosum* Gardn. e *Oxypetalum sublanatum* Malme. Anais da Academia Brasileira de Ciências 45:121-149.

390

- VALENTE, M da C & SILVA, NMF da 1984 Anatomia floral de *Barjonia erecta* (Vell.) Schum. (Asclepiadaceae). Rodriguésia 36:95-106.
- VAN DIE, J 1955 A comparative study of the particle fractions from Apocynaceae latices. Annales Bogorienses 2:1-124.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae), na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 1999 Pollinators of *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. Revista Brasileira de Biologia 59:693-704.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002a *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*: a taxon of Asclepiadaceae with an extragynoecial compitum. Plant Systematics and Evolution 233:199-206.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002b Removal and insertion of pollinia in flowers of *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) in southeastern Brazil. Revista de Biologia Tropical 50:37-43.
- VIJAYARAGHAVAN, MR & CHEEMA, K 1977 Ontogenetical and histochemical studies on the translator apparatus in *Calotropis procera* R.Br. I. The retinaculum. Acta Histochemica 59:15-20
- VIJAYARAGHAVAN, MR & SHUKLA, AK 1976 The nature of covering around the aggregate of microspores in *Pergularia daemia* (Forsk.) McC. & Blat. Annals of Botany 40:417-421.
- VOGEL, S 1990 The role of scent glands in pollination. On the structure and function of osmophores. English translation by J.S. Bhatti, New Delhi, Amerind Publishing.
- VOLK, OH 1950 Zur Kenntnis der Pollinien der Asclepiadaceen. Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft 62:69-73.
- WANDERLEY, MGL; SHEPHERD, GJ; MELHEM, TS & GIULIETTI, AM 2005 Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. v. 4, São Paulo, RiMa.

- WANNTORP, L 2007 Pollinaria of *Hoya* (Marsdenieae, Apocynaceae) shedding light on molecular phylogenetics. Taxon 56:465-478.
- WANNTORP, L & FORSTER, PI 2007 Phylogenetic relationships between *Hoya* and the monotypic genera *Madangia*, *Absolmsia*, and *Micholitzia* (Apocynaceae, Marsdenieae): insights from flower morphology. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:36-55.
- WARNAAR, F 1982 Investigation on *Hoya* species. V. Determination of the amount of latex present in *Hoya australis* R. Br. ex Traill. and *Hoya bella* Hook. and its relation with shoot development. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 105:307-314.
- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1977 Investigation of laticifer differentiation in tissue cultures derived from *Asclepias syriaca* L. Annals of Botany 41:1049-1054.
- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1978 Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 65:98-109.
- WILSON, KJ & MAXAM, TE 1987 Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 74:628-628.
- WILSON, KJ; NESSLER, CL & MAHLBERG, PG 1976 Pectinase in *Asclepias* latex and its possible role in laticifer growth and development. American Journal of Botany 63:1140-1144.
- WOLFF, D; MEVE, U & LIEDE-SCHUMANN, S 2008 Pollination ecology of Ecuadorian Asclepiadoideae (Apocynaceae): How generalized are morphologically specialized flowers? Basic and Applied Ecology 9:24-34.
- WOODSON, RE Jr. 1941 The North American Asclepiadaceae. I. Perspective of the genera. Annals of the Missouri Botanical Garden 28:193-244.
- WOODSON, RE Jr. 1954 The North American species of *Asclepias* L. Annals of the Missouri Botanical Garden 41:1-211.
- WOODSON, RE Jr. & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. Bulletin of the Torrey Club 65:135-166.

392

- WYATT, R & BROYLES, SB 1994 Ecology and evolution of reproduction in milkweeds. Annual Review of Ecology and Systematics 25:423-441.
- WYATT, R & LIPOW, SR 2007 A new explanation for the evolution of pollinia and loss of carpel fusion in *Asclepias* and the Apocynaceae *s.l.* Annals of the Missouri Botanical Garden 94:474-484.
- YAMASHIRO, T; YAMASHIRO, A; YOKOYAMA, J & MAKI, M 2008 Morphological aspects and phylogenetic analyses of pollination systems in the *Tylophora-Vincetoxicum* complex (Apocynaceae-Asclepiadoideae) in Japan. Biological Journal of the Linnean Society 93:325-341.
- YODER, LR & MAHLBERG, PG 1976 Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). American Journal of Botany 63:1167-1173.