



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Botânica.

**Raíssa Guimarães Leite**

**Brasília, agosto de 2012.**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Botânica.

**Raíssa Guimarães Leite**

**Orientadora: Professora Dra. Sueli Maria Gomes**

**Brasília, agosto de 2012.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1002454.

L533a Leite, Raíssa Guimarães.  
Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae) / Raíssa Guimarães Leite. -- 2012.  
106 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2012.  
Inclui bibliografia.  
Orientação: Sueli Maria Gomes.

1. Botânica - Morfologia. 2. Anatomia vegetal. 3. Secreção. 4. Cerrados. I. Gomes, Sueli Maria. II. Título.

CDU 581.19

Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)

Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae).

Brasília, 31 de agosto de 2012.

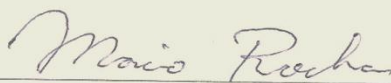
BANCA EXAMINADORA



Professora Dra. Sueli Maria Gomes  
Universidade de Brasília  
Presidente



Professora Dra. Dalva Graciano Ribeiro  
Universidade de Brasília  
Membro Interno



Professor Dr. Márcio Rocha  
Universidade de Brasília  
Membro Externo

Professora Dra. Nádia Silvia Dalla Nora Somavilla  
Universidade de Brasília  
Suplente

**A perseverança é a mãe da boa sorte (Miguel de Cervantes).**

**A Deus, aos meus amados João e Vera (pais) e Aldo João e Telma (tios).**

## Agradecimentos

À Universidade de Brasília (UnB) pelo curso de pós-graduação em Botânica e ao corpo docente do curso pelo ensino ministrado.

À Secretaria de Educação do Distrito Federal, que concedeu licença para estudos.

Ao departamento de Pós-graduação da UnB - DPP/UnB, pela Bolsa Reuni concedida.

À acolhida, apoio e amor dos meus tios, Aldo João e Telma, com os quais aprendi a perseverar e a confiar em minhas capacidades.

À Professora Dr<sup>a</sup> Sueli Maria Gomes, por sua acolhida, valiosa orientação e a confiança depositada em mim, meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Maria José d'Avila Charchar e ao Dr. José Ribamar Nazareno dos Anjos, (pesquisadores da Embrapa Cerrados) cujos exemplos deram início aos meus estudos em Botânica.

À Professora Lourdes Isabel Velho do Amaral, *in memoriam*, pela valiosa orientação e ajuda.

Aos meus familiares, pais, irmãos (Antônio Felipe e João Paulo), sobrinhas (Giovanna e Maria Gabriela) e cunhadas pelo amor que me devotam e que me dá forças para acreditar e lutar pelos meus sonhos.

Aos amigos e colegas de curso, Renata Cristina Costa e Silva, Patrícia Monah, Jéssika Vieira, Ísis Arantes, Daniel Vilarroel, Mayara Lima, Ludmila Gondim, Bruno Edson, William Carmo, Juliane Laner, Patrícia Marques Almeida e Kadja Milena, pela amizade e ajuda em tudo que precisei.

Ao Dr. Antônio José Camillo de Aguiar, professor e entomologista do Departamento de Zoologia da UnB, pela ajuda prestada, bem como ao Dr. Rodrigo dos Santos Machado Feitosa, especialista do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (USP), pela identificação das espécies de formigas.

A toda equipe do Laboratório de Anatomia e de Bioquímica Vegetal do Departamento de Botânica da UnB.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Botânica da UnB.

Aos técnicos do Departamento de Botânica, José Carmo M. de Lima e Fábio Nakamura Moda.

Ao irmão Talisson Iago, pela companhia nas saídas de campo.

Aos técnicos e estagiários do laboratório de Biologia Celular: Felipe Coutinho  
Guimarães, Lauro de Campos Dourado e Ingrid Gracielle M. da Silva, pelo apoio dispensado.



# Sumário

Resumo Geral .....	1
General Abstract .....	3
<b>Introdução geral e revisão bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
1.    Estruturas secretoras.....	5
2.    Coléteres .....	5
2.1.  Estrutura e classificação dos coléteres .....	6
2.2.  Secreções dos coléteres e sua possível função.....	9
2.3.  Mecanismos de produção e de secreção de material.....	9
2.4.  Utilidade taxonômica dos coléteres .....	10
2.5.  Estudos anatômicos .....	11
3.    Breve descrição das espécies estudadas .....	11
4.    Lacunas no conhecimento dos coléteres.....	12
Objetivo geral .....	13
Referências .....	14

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Evolução dos formatos de coléteres em espécies de Rubiaceae

**Figura 2.** Outros formatos de coléteres, descritos por Robbrecht (1987 *apud* Thomas 1991)

**CAPÍTULO 1** - Morfologia externa, micromorfologia, anatomia e identidade das glândulas de ramos vegetativos de *Himatanthus obovatus*, *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae), *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (Rubiaceae)

Resumo.....	19
Abstract .....	20
Introdução.....	21
Objetivos .....	21
Materiais e métodos .....	22
Obtenção do material .....	22
Morfologia externa .....	22
Micromorfologia.....	22
Caracterização anatômica.....	23
Identificação de mucilagens .....	24
Resultados .....	24
Morfologia externa .....	23
Micromorfologia e espectroscopia por energia dispersiva (MEV e EDS) .....	27
Caracterização anatômica.....	32
Identificação de mucilagens .....	36
Discussão.....	38
Conclusões.....	46
Referências bibliográficas .....	47

### LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

**Figuras 1-13.** Plantas estudadas e morfologia externa das glândulas: *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC., Apocynaceae.

**Figuras 14-25.** Plantas estudadas e morfologia externa das glândulas: *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K. Schum, Rubiaceae.

**Figuras 26-31.** Micromorfologia das glândulas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC, Apocynaceae.

**Figuras 32-37.** Micromorfologia das glândulas de *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K. Schum, Rubiaceae.

**Figura 38.** Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) dos cristais encontrados nas glândulas de *Palicourea rigida* Kunth.

**Figuras 39-44.** Caracterização anatômica das glândulas analisadas - I.

**Figuras 45-53.** Caracterização anatômica das glândulas analisadas - II.

**Figuras 54-64.** Resultados dos testes histoquímicos das glândulas adultas das quatro espécies analisadas.

### **LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1**

**Tabela 1.** Quantidade e dimensão das glândulas adultas em *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

**Tabela 2.** Resultados dos testes histoquímicos realizados nas secreções das glândulas adultas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae) para detectar mucilagens.

**CAPÍTULO 2** - Caracterização das secreções dos coléteres de *Himatanthus obovatus*, *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae), *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (Rubiaceae), quantificação dos compostos secretados por três espécies e evidências de seu papel ecológico.

Resumo .....	55
Abstract .....	56
Introdução.....	57
Objetivos .....	58
Materiais e métodos .....	58
Observações ecológicas.....	58
Caracterização histoquímica das secreções .....	59
Composição química e quantificação das secreções.....	60
Extração e quantificação das secreções.....	60
Quantificação de proteínas pelo método de "Bradford Assay" .....	61
Quantificação de açúcares solúveis totais .....	61
Análise qualitativa de monossacarídeos por cromatografia .....	62
Bioensaios com as secreções de <i>Palicourea rigida</i> Kunth e <i>Tocoyena formosa</i> (Cham. & Schltld.) K. Schum.....	64
Resultados .....	65
Observações ecológicas.....	65
Testes histoquímicos .....	70
Composição química e quantificação das secreções.....	74
Extração das secreções .....	74
Quantificação de proteínas pelo método de "Bradford Assay" .....	74
Quantificação de açúcares solúveis totais .....	75
Análise qualitativa de monossacarídeos por cromatografia .....	76
Bioensaios.....	78
Discussão .....	80
Conclusões.....	85
Referências bibliográficas .....	86

## LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Esquema ilustrativo dos bioensaios com extratos de coléteres testados contra fungos.

Figuras 2-6. Formiga sp. 1 visitando a região peciolar de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figuras 7-11.** Formiga sp. 4 raspando secreções dos coléteres em *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figuras 12-14.** Formigas nas secreções dos coléteres na região da gema de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figuras 15-17.** Formiga sp. 2 anda pela lâmina da folha de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figuras 18-26.** Formigas lutam em ramo de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figuras 27-30.** Formigas não recuam diante do objeto introduzido na secreção de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figuras 31-36.** Formigas da sp. 5 cortam folhas e raspam secreções em *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figura 37-43.** Testes histoquímicos com Sudan IV, realizados nas glândulas.

**Figuras 44-47.** Secções transversais e longitudinais das glândulas estudadas, sem coloração (controle).

**Figuras 48-59.** Testes histoquímicos realizados em coléteres de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

**Figura 60.** Quantidade média de proteínas totais obtidas pelo método “Bradford Assay” nas secreções glandulares extraídas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

**Figura 61.** Quantidade média de proteínas totais obtidas pelo método fenol-sulfúrico nas secreções glandulares extraídas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum.

**Figura 62.** Análise cromatográfica de troca iônica de alto desempenho em amostra de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson.

**Figura 63.** Bioensaios com as secreções de *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum - I.

## LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Testes histoquímicos realizados em coléteres adultos de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae) e respectivos grupos de compostos que identificam.

**Tabela 2.** Fungos utilizados nos bioensaios e suas características.

**Tabela 3.** Características das espécies de insetos visitantes dos ramos de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson e da espécie introduzida.

**Tabela 4.** Comportamentos de diferentes tipos de formigas que visitaram 11 indivíduos de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson observados em três dias diferentes.

**Tabela 5.** Resultados dos testes histoquímicos realizados nas glândulas adultas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

**Tabela 6.** Quantidade das secreções das glândulas adultas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

**Tabela 7.** Quantidade de monossacarídeo fucose detectado por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho.

## ANEXOS

**Anexos** ..... 90

**ANEXO 1** - Anatomia e MEV realizados em *Cuphea* sp. e *Mandevilla novocapitalis* Markgr.

### LISTA DE FIGURAS DO ANEXO 1

**Figura 1-3.** Coléteres sob teste histoquímico com vermelho de rutênio em *Mandevilla novocapitalis* Markgr (Apocynaceae).

**Figuras 4-7.** Emergências sob microscopia eletrônica de varredura em *Cuphea* sp., Lythraceae e *Mandevilla novocapitalis* Markgr, Apocynaceae.



**Resumo Geral.** As glândulas dos vegetais são classificadas conforme o tipo de substâncias que secretam. Estas estruturas são encontradas na face adaxial dos pecíolos de *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.) Woodson e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), bem como em estípulas de *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldtl.) K. Schum. (Rubiaceae). Estas quatro espécies nativas são muito comuns no Cerrado e suas glândulas ainda não foram caracterizadas. O objetivo do presente trabalho é caracterizar as glândulas destas plantas, por meio da morfo-anatomia, inclusive microscopia eletrônica de varredura (MEV), observações ecológicas e identificar a natureza química e a ação biológica de suas secreções. Amostras das glândulas foram fixadas, desidratadas e metalizadas para análise sob MEV, onde os cristais foram analisados por espectroscopia de energia dispersiva (energy dispersive spectroscopy, EDS). A análise anatômica foi realizada mediante inclusão em parafina utilizando cortes seriados. Cortes das glândulas frescas foram obtidos em micrótomo e submetidos aos testes histoquímicos. As imagens dos cortes foram obtidas sob fotomicroscópio com sistema de captura. Observações de campo, especialmente em *H. obovatus*, foram registradas por anotações, fotografias e filmes. As secreções de *H. obovatus*, *P. rigida* e *T. formosa* foram removidas das glândulas e liofilizadas. A matéria seca foi quantificada e foram realizados testes bioquímicos. Realizaram-se bioensaios com a secreção de *P. rigida* e *T. formosa*, usando-se os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* (Mart.) Sacc e duas cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. As secreções das glândulas reagiram positivamente ao vermelho de rutênio, o que evidencia as mucilagens ácidas. A composição das secreções, assim como a morfologia das glândulas possibilitaram sua identificação como coléteres. Eles são típicas emergências, constituídos por um núcleo parenquimático, revestido por epiderme em paliçada, exceto em *P. rigida*, onde foi constatado coléter do tipo "simples", não relatado na literatura, que possivelmente representa uma condição derivada em relação às emergências. Coléteres do tipo padrão ("standard") foram constatados, todos sem poros em sua superfície. Em *T. formosa*, eles possuem pedúnculo. Os coléteres em *P. rigida* são vascularizados, com um feixe xilemático central e floema. Os coléteres em *P. rigida* possuem cristais prismáticos e ráfides, constituídos por cálcio, níquel, nióbio e alumínio, conforme análise em EDS. Aparentemente este é um relato inédito da presença destes três últimos elementos na constituição química de cristais em plantas. Os testes histoquímicos revelaram pectinas, substâncias lipídicas e proteínas nas secreções dos coléteres das quatro espécies. Açúcares redutores foram verificados em *H. obovatus* e *T. solanifolia* e alcalóides em *P. rigida* e compostos fenólicos em *T. solanifolia*. A metodologia de obtenção das secreções foi muito satisfatória, sendo vantajoso seu uso em estudos fitoquímicos. As maiores quantidades de secreção obtidas foram de 500 mg para *P. rigida* e *T.*



*formosa*. As quantidades médias de matéria seca das secreções, seus açúcares solúveis totais e proteínas foram, respectivamente, para cada espécie: *H. obovatus* – 0,68 mg/peciolo, 69,2 µg/mg e 82,9 µg/mg; *P. rigida* – 5 mg/gema, 162,2 µg/mg e 76,8 µg/mg; *T. formosa* – 13,8 mg/gema, 174 µg/mg e 89 µg/mg (quantidades por mg de secreção). Os monossacarídeos detectados foram fucose nas três espécies analisadas e manose, arabinose e xylose em *H. obovatus*. Os bioensaios mostraram diferenças discretas, mas significativas entre o controle e o tratamento com as secreções. Formigas foram encontradas nos pecíolos de *H. obovatus*, onde permaneceram paradas e secreção foi constatada em seu aparelho bucal. Defesa do território também foi um comportamento observado. Os resultados indicam que as secreções dos coléteres estudados são de natureza química complexa, onde mucilagens, lipídios, proteínas e açúcares solúveis estão presentes. Os coléteres encontrados em *H. obovatus*, cujas secreções apresentaram as menores quantidades de açúcares solúveis e as maiores quantidades de fucose, estabelecem relações interespecíficas entre esta planta e várias espécies de formigas, que podem estar utilizando suas secreções como fonte alimentar, ou outra finalidade. O significado ecológico e evolutivo dos resultados é discutido.

**Palavras-chave:** açúcares solúveis, alumínio, cristais, ecologia, formigas, fucose, glândulas, nióbio, níquel, proteínas, secreções.

**General Abstract.** The glands of the plants are classified according to the type of substances which secrete. These structures are found in the adaxial side of petioles from *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.) Woodson and *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), as well as in stipules of *Palicourea rigida* Kunth and *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae). These four native species are very common in the Cerrado and their glands have not yet been characterized. The objective of this study is to characterize the glands of these plants, by means of the morphology and anatomy, including scanning electron microscopy (SEM), ecological observations and identify the chemical nature and the biological action of their secretions. Samples of the glands were fixed, dehydrated and metallized for analysis under SEM, where the crystals were analyzed by energy dispersive spectroscopy (energy dispersive spectroscopy, EDS). The anatomical analysis was performed on paraffin inclusion using serial sections. Sections of fresh glands were obtained in a and subjected to histochemical tests. The images of the cuts were obtained under fotomicroscopio with capture system. Observations from field, especially in *H. obovatus* were recorded by annotations, photos and movies. The secretions of *H. obovatus*, *P. rigida* and *T. formosa* were removed from glands and lyophilized. The dry matter was quantified and were carried out biochemical tests. Bioassays were performed with the secretion of *P. rigida* and *T. formosa*, using the phytopathogenic effects on succeeding fungi *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. and two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. The secretions from glands reacted positively to the red of ruthenium, which highlights the mucilage acidic. The composition of secretions, as well as the morphology of glands allowed its identification as colleters. They are typical emergencies, consisting of a core parenchymatous, coated by epidermis in palisade, except in *P. rigida*, where it was found coleter of type "simple", not reported in the literature, which possibly represents a derived condition in relation to emergencies. Colleters standard type ("standard") were found, all without pores on its surface. In *T. formosa*, they have flower stalk. Colleters in *P. rigida* are vascularized, with a central vascular and phloem. Colleters in *P. rigida* have prismatic crystals and rafides, consisting of calcium, nickel, niobium and aluminum, as analysis in EDS. Apparently this is a unpublished report of the presence of these last three elements in the constitution chemistry of crystals in plants. The histochemical tests revealed pectins, lipid and protein in the secretions of colleters of the four species. Reducing sugars were recorded in *H. obovatus* and *T. solanifolia*, alkaloids in *P. rigida* and phenolic compounds in *T. solanifolia*. The methodology for obtaining secretions was very satisfactory, being advantageous its use in studies phytochemicals. The largest quantities of secretion were obtained from 500 mg to *P. rigida* and *T. formosa*. The average amounts of dry matter of secretions, its soluble sugars and

total proteins were, respectively, for each species: *H. obovatus* - 0.68 mg/petiole, 69.2 µg/mg and 82.9 µg/mg; *P. rigida* - 5 mg/gema, 162.2 µg/mg and 76.8 µg/mg; *T. formosa* - 13.8 mg/gema, 174,2 µg/mg, and 89 µg/mg (quantities per mg of secretion). Monosaccharides detected were fucose in the three species analyzed and mannose, arabinose and xylose in *H. obovatus*. The bioassays showed differences discreet but significant between the control and the treatment with the secretions. Ants were found in petioles of *H. obovatus*, where they remained standing and secretion was observed in its mouthparts. Defense of the territory was also an observed behavior. The results indicate that the secretions of colleters studied are of chemical nature complex, where mucilage, lipids, proteins and soluble sugars are present. Colleters found in *H. obovatus*, whose secretions showed the smallest quantities of soluble sugars and the largest quantities of fucose, establish interspecific relations between this plant and several species of ants, which may be using their secretions as a food source, or other purpose. The ecological and evolutionary significance of the results are discussed.

**Key words:** aluminum, ants, crystals, ecology, fucose, glands, mutualism, nickel, niobium, proteins, secretions, soluble sugars.

# Revisão bibliográfica e introdução geral

## 1. Estruturas secretoras

“Os vegetais sintetizam diversas substâncias, que são separadas do protoplasto e confinadas em vacúolos, ou outros locais, tais como células mortas, canais ou ductos, podendo ser liberadas para espaços no interior dos órgãos, ou para uma superfície externa” (Esau 1974). As secreções vegetais são tratadas por Fahn (1979) como sendo substâncias eliminadas pela planta, sem que sejam armazenadas para remobilização metabólica posterior.

“As estruturas secretoras, também chamadas de glândulas, podem se apresentar em unidades denominadas idioblastos ou compor estruturas mais complexas, como tricomas, emergências, cavidades ou canais” (Castro & Machado 2009). A natureza química dos materiais produzidos abrange uma variedade de compostos tais como óleos voláteis, gomas, látex, mucilagem, sais, alcalóides e glicosídeos (Dickison 2000). É difícil estabelecer uma diferenciação entre as secreções, visto que uma mistura de mais de um composto é frequentemente encontrada (Castro & Machado 2009).

Classificar as estruturas secretoras é uma tarefa muitas vezes difícil para botânicos que se ocupam do assunto. Isso se deve ao fato da morfologia das estruturas ser variável e às vezes não específica ao tipo de secreção. Desta forma, o material secretado em maior quantidade pode ser considerado como determinante para a classificação das glândulas, em detrimento das demais características (Fahn 1979).

## 2. Coléteres

Um tipo especial de estrutura secretora, e que aqui é objeto de estudo, é o coléter. Os coléteres podem ser tricomas ou emergências, encontram-se comumente em ápices vegetativos ou florais e secretam substâncias pegajosas (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2009). A secreção, em geral, é formada por uma mistura de compostos de natureza glicídica e lipofílica, com a predominância de carboidratos mucilaginosos (Rio *et al.* 2002; Martins *et al.* 2010).

Segundo Foster (1949) a palavra coléter foi utilizada primeiramente por Hanstein em 1968 no trabalho intitulado “Ueber die Organe der Harz and Scheleimabsonderung in den Laubknospen”. Esse termo, posteriormente, empregado por outros autores, designou um pequeno eixo multicelular secretor de uma substância viscosa que recobre certas estruturas foliares das plantas (Foster 1949). Literalmente, deriva da palavra grega “colla” (Thomas 1991), que significa cola em português.

Ao longo do tempo, os coléteres receberam diversos nomes, tais como glândulas resinosas (Curtis & Lersten 1974, 1980; Dell 1977; Durkee 1984; Subramanian *et al.* 1989), tricomas glandulares (Horner & Lersten 1968), glândulas estipulares (Lersten 1972), e nectários extraflorais (Mohan & Inamdar 1986), devido às semelhanças quanto às características do produto secretado, à distribuição das estruturas em partes das plantas, como também pela sua morfologia (Thomas 1991). Estas glândulas estão presentes na superfície adaxial de partes vegetais tais como, pecíolos, lâmina foliar, nervuras, brácteas e verticilos florais e, quando jovens, suas secreções podem recobrir parcial ou totalmente os primórdios foliares ou florais (Thomas 1991).

Coléteres estão presentes em muitas famílias, tanto nas monocotiledôneas como nas eudicotiledôneas, sendo que neste último grupo Thomas (1991) contabiliza 60 famílias detentoras destas glândulas, porém, com o rearranjo devido às mudanças taxonômicas ocorridas desde então, totalizam hoje 48 famílias, segundo aquele trabalho: Apocynaceae, Araliaceae, Asteraceae, Begoniaceae, Betulaceae, Capparaceae, Caricaceae, Crassulaceae, Cruciferae, Cunoniaceae, Cuscutaceae, Datisceae, Davidsoniaceae, Dilleniaceae, Elaeocarpaceae, Elatinaceae, Epacridaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Erythroxylaceae, Fabaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Gunneraceae, Hippocastanaceae, Linaceae, Loganiaceae, Lythraceae, Malvaceae, Melastomataceae, Menispermaceae, Nepenthaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Poligonaceae, Portulacaceae, Ranunculaceae, Rhamnaceae, Rhizophoraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Saxifragaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Stylidiaceae, e Turneraceae (Thiebaut & Hoffmann 2005; Angiosperm Phylogeny Website 2011).

### **2.1. Estrutura e classificação dos coléteres**

Solereider (1908, *apud* Thomas 1991) caracterizou estas glândulas como constituídas por “um eixo multicelular de tamanho variável, formado por uma cabeça de células centrais alongadas, embainhadas por células epidérmicas em paliçada, cobertas por cutícula”. Estudos que caracterizam os tecidos formadores, assim como investigações ontogênicas, têm permitido identificar as células centrais das glândulas do tipo coléter como células parenquimáticas e as que as envolvem como células epidérmicas (Paiva & Machado 2006) Alquini *et al.* (2009) apresentam o termo emergência como sinônimo das estruturas comumente chamadas coléteres, sendo caracterizada como formada por células de origem protodérmica e do meristema fundamental. Porém, embora exista a tendência de generalizar os tricomas como formados somente a partir da protoderme há aqueles tricomas que se formam sobre uma base de tecido subepidérmico, sendo assim não há uma diferença clara

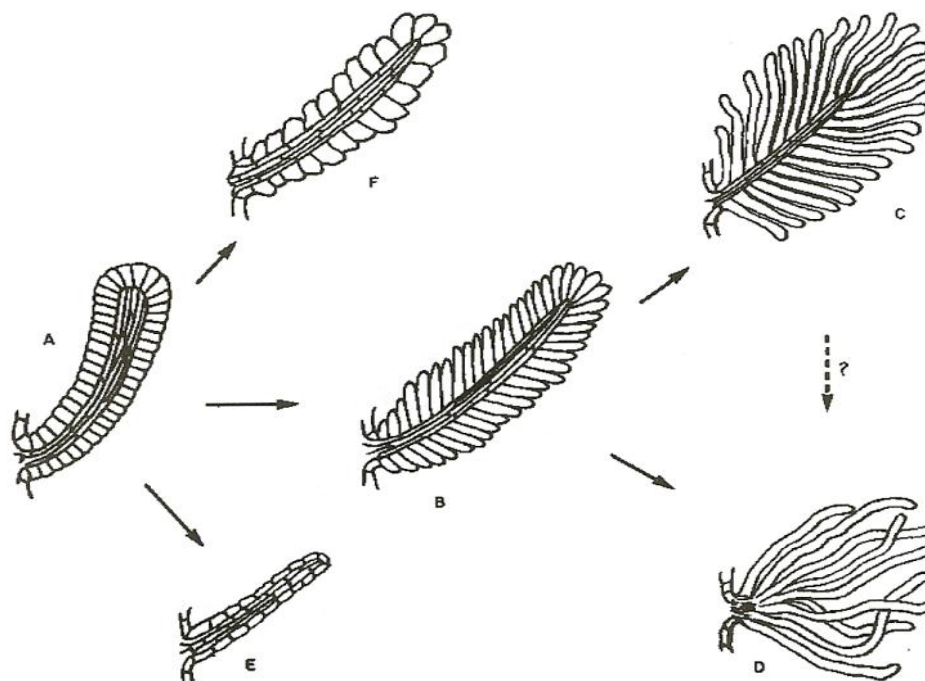
entre os dois termos (Alquini *et al.* 2009) e ainda encontramos na literatura o termo tricoma para se referir aos coléteres. Anteriormente à classificação de emergência era comum o uso do termo tricoma (Fahn 1979; Metcalfe & Chalk 1957). Hoje, porém, usam-se os termos coléteres ou emergências ou ambos para designar tais estruturas.

Lersten (1974) definiu os coléteres descritos por Solereder (1908 *apud* Thomas 1991) como o tipo que ele denominou de padrão ("standard"). Este autor descreveu cinco tipos de coléteres tendo por base suas observações para os gêneros de Rubiaceae: *Pavetta* L., *Neorosea* N. Hallé e *Tricalysia* A. Rich. ex DC. Eles são definidos da seguinte forma: a) tipo padrão, com eixo formado de células parenquimáticas cercadas por células epidérmicas em paliçada, justapostas e cobertas por uma cutícula; b) tipo intermediário, com células epidérmicas longas, conspícuas, ligeiramente separadas umas das outras e um centro reduzido de células parenquimáticas; c) tipo dendróide, células epidérmicas mais alongadas e separadas umas das outras e com eixo central parenquimático bem reduzido; d) tipo escova, o eixo parenquimático é praticamente ausente havendo somente as células epidérmicas alongadas; e) tipo padrão reduzido, estrutura com redução geral de tamanho em relação ao tipo padrão e perda da forma do arranjo de células epidérmicas (Lersten 1974). A evolução destes tipos foi representada por este autor, que sugere serem os tipos: padrão reduzido, escova, dendróide e intermediário, modificações ocorridas no tipo padrão (Figura 1). Robbrecht (1987 *apud* Thomas 1991) em estudos com o gênero *Tricalysa* (Rubiaceae) relatou dois outros formatos que foram denominados alado e filiforme (Figura 2).

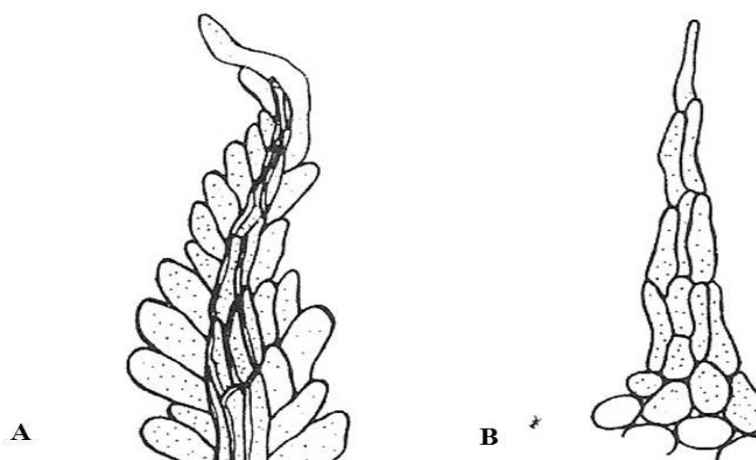
A classificação proposta por Lersten (1974), tendo como fundamento os gêneros citados de Rubiaceae, foi e ainda é usada por estudiosos do assunto para famílias botânicas diversas. Porém, a disparidade de morfologias encontradas impede uma identificação exata se apoiada somente nas formas descritas. Talvez diante desta limitação Gonzáles (1998) introduziu os termos: lacrimiforme, séssil e a forma de tróclea em seu estudo com os gêneros *Turnera* L. e *Piriqueta* Aubl., ambos da família Turneraceae.

Nos coléteres ocorrem modificações estruturais curiosas tais como a presença de pedúnculo em *Azadirachta indica* A. Juss. (Inamdar *et al.* 1986), tricomas tectores anexos, tecido vascular entre as células centrais em *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers (Martins *et al.* 2010) e em *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson. (Rio *et al.* 2002), cristais de cálcio na forma de ráfides em *Psychotria nuda* (Cham. & Schldl. Wawra (Miguel *et al.* 2009), drusas, tecido extra e subepidérmico em *Strophanthus gratus* (Wall. et Hook.) Baill. et Arn (Thomas *et al.* 1989), laticíferos não articulados em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e em *Mandevilla velutina* K. Schum. (Appezato-da-Glória & Estelita 2000) e poros na superfície da cutícula em *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Vitarelli & Santos 2009).

Investigações sobre a ontogênese do coléter tem indicado sua formação a partir de células protodérmicas e subprotodérmicas nas estruturas que os apresentam (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Paiva & Machado 2006). As células protodérmicas dividem-se anticlinalmente e as células subprotodérmicas dividem-se em diversos planos (Subramanian *et al.* 1989). Como resultado destas divisões, há um alargamento em direção ao ápice e o surgimento das emergências, mostrando-se como uma saliência na superfície dos órgãos (Thomas 1991).



**Figura 1.** Evolução dos formatos de coléteres em espécies de Rubiaceae. **A.** Padrão. **B.** Intermediário. **C.** Dendróide. **D.** Escova. **E-F.** Reduzido. Fonte: Lersten (1974a).



**Figura 2.** Outros formatos de coléteres, descritos por Robbrecht (1987 *apud* Thomas 1991). **A.** Alado. **B.** Filiforme. Fonte: Thomas (1991)

## **2.2. Secreções dos coléteres e sua possível função**

Quanto à composição química do material secretado por coléteres já foram encontrados mucilagens, lipídios, proteínas e terpenos (Mohan & Inamdar 1986; Thomas & Dave 1990), contudo há uma tendência entre os estudiosos em considerar a mucilagem o composto mais abundante (Martins *et al.* 2010).

As mucilagens secretadas pelas plantas são constituídas por polímeros de polissacarídeos ácidos ou neutros de alto peso molecular (Fahn 1979). Elas são viscosas e apresentam elevado teor de água (Mauseth 1988). Apresentam cor branca ou amarelada sendo mais viscosas quando recém-secretadas e mais rígidas com o passar do tempo (Curtis & Lersten 1974). Nos vegetais, tais compostos são vinculados a mecanismos contra a desidratação (Mauseth 1988), como substância lubrificante e facilitadora do crescimento de raízes, na regulação da germinação de sementes e como composto eficiente na captura de insetos por algumas espécies vegetais (Fahn 1979).

Os coléteres desenvolvem-se precocemente, juntamente com os primórdios foliares e começam a secretar antes mesmo da expansão destes. Suas secreções viscosas encobrem as gemas e por isso a função chefe das estruturas secretoras está associada à proteção dos tecidos meristemáticos da desidratação (Thomas 1991). Outra função também atribuída aos coléteres é a de proteção contra herbivoria e o ataque de patógenos pela proteção química fornecida pelo exsudado (Thomas 1991). Estas funções são hipóteses levantadas na literatura, sustentadas pelas características das secreções e pelas observações de campo, mas sem evidências experimentais que as comprovem.

Contrária às hipóteses acima relatadas é a função comprovada experimentalmente em *Psychotria bacteriophila* Valetton. (Horner & Lersten 1968). Nesta espécie a secreção é o meio pelo qual as bactérias simbióticas conseguem penetrar nas folhas da planta via estômatos e é o meio do qual retiram seus nutrientes antes de se estabelecer a relação interespecífica entre as bactérias simbióticas nodulares e as folhas da planta.

## **2.3. Mecanismos de produção e de secreção de material**

Aplicam-se às células epidérmicas dos coléteres as funções de produção e de secreção, sendo evidência destas funções a retenção maior de corantes no citoplasma destas células quando comparado às células epidérmicas, após as práticas anatômicas de coloração.

Os trabalhos que abrangem a ultraestrutura dos coléteres por meio de microscopia de transmissão têm encontrado diferenças significativas no citoplasma das células epidérmicas em diferentes estágios (Horner & Lersten 1968; Mohan & Inamdar 1985; Klein *et al.* 2004; Paiva & Machado 2006). Desta forma, com base nestas verificações, pode-se afirmar que os



períodos pré-secretor e secretor são marcados por presença de muitos ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso com extensas cisternas, paralelas à membrana plasmática, abundantes mitocôndrias, complexo de golgi, e plasmalema com muitas invaginações, cercado por corpos eletro-densos (Horner & Lersten 1968; Mohan & Inamdar 1985; Klein *et al.* 2004; Paiva & Machado 2006). Parece ser o período pré-secretor marcado pela dissolução da lamela média permitindo assim a formação de espaços intercelulares, o afrouxamento das fibrilas que compõem a parede celular das células epidérmicas e o levantamento da cutícula; e o período secretor marcado pelo aumento do volume celular e preenchimento dos espaços pela secreção assim como a presença de numerosos corpos próximos a membrana plasmática e entre ela e a parede celular (Mohan & Inamdar 1986). No período pós-secretor há escurecimento do citoplasma, diminuição da quantidade de organelas e formação de largos vacúolos (Paiva & Machado 2006).

A forma de secreção dos compostos ainda carece de estudos mais delimitados, não sendo ainda bem esclarecida com as investigações realizadas até o momento. Alguns estudos direcionam para o fenômeno de acumulação sub-cuticular de material e posterior ruptura da cutícula como forma pela qual o material produzido alcança o meio externo (Thomas & Dave 1990; Paiva & Machado 2006). Há um relato de observação de poros que supostamente são passagens para saída de secreção na espécie *Psychotria carthagenensis* (Vitarelli & Santos 2009). No entanto, são maioria, os trabalhos em que não se observam rompimento evidente de cutícula ou presença de poros.

#### **2.4. Utilidade taxonômica dos coléteres**

Grande número de famílias apresenta coléteres, mas a maior parte dos estudos se concentra em espécies de Apocynaceae e Rubiaceae, ambas pertencentes às Gentianales e, portanto, muito próximas filogeneticamente. No entanto, a presença destas glândulas tanto entre as eudicotiledôneas (Thomas 1991), como entre as monocotiledôneas (Mayer *et al.* 2011) evidenciam que este caráter é polifilético, que não deriva apenas de um ancestral em comum, conforme Thomas (1991) já apontava.

Caracteres relativos aos coléteres têm-se revelado úteis para a taxonomia e filogenia de grupos de plantas, como por exemplo, as Rubiaceae (Barreiro & Machado 2007). A presença de estípulas interpeciolares portadoras de coléteres é uma das características vegetativas mais importantes nestas plantas, constituindo um caráter que a distingue da maioria das outras famílias de sua ordem (Robbrecht 1988 *apud* Thomas 1991). Os coléteres são também encontrados nas folhas, cálices, brácteas, bractéolas, cálice e corola (Barreiro 2006).

A posição, a classificação e as características das glândulas secretoras de mucilagem muitas vezes são típicas de certos grupos. Nas Apocynaceae, por exemplo, a posição e o número de coléteres no cálice servem para a delimitação de gêneros, e em alguns casos de espécies, a saber: *Mandevilla hirsuta* (Rich.) K. Schumann tem coléteres opositissépalos, ao passo que eles são alternissépalos em *M. atrovioleae* (Stadelm.) Woodson, *M. emarginata* (Vell.) C. Ezcurra, *M. illustris* e *M. widgrenii* C. Ezcurra, apresentando-se em grupos de cinco em posição oposta ou um a vários quando em posição alterna (Simões 2002).

As espécies de Apocynaceae contêm coléteres na região nodal, pecíolo, lâmina foliar e cálice (Simões 2000). Podendo ocorrer também em brácteas, bractéolas, e corola (Spina 2004).

## 2.5. Estudos anatômicos

Destacam-se os seguintes estudos sobre coléteres espécies de Apocynaceae: *Aganosma caryophyllata* G. Don (Dave *et al.* 1987), *Allamanda cathartica* L. (Thomas & Dave 1989), *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1989), *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *Mandevilla velutina* K. Schum (Apezato-da-Glória & Estelita 2000), *Nerium indicum* Mill. (Thomas & Dave 1989), *Oxypetalum* R. Br. (Schwarz & Furlan 2002), *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio *et al.* 2002), *Roupelia grata* Wall. (Thomas *et al.* 1989), *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers (Martins *et al.* 2010). Outros trabalhos relatam a ontogênese destas estruturas (Thomas & Dave 1989) e discutem seu modo de secreção (Thomas & Dave 1990).

Para as Rubiaceae, citam-se os estudos realizados com *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum (Barreiro & Machado 2007), *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth. (Thomas & Dave 1990). Coléteres foram analisados para diferentes espécies de *Bathysa* (Miguel *et al.* 2006; Miguel *et al.* 2009), de *Gardenia* (Dave *et al.* 1988; Mangalan *et al.* 1990), de *Neorosea*, *Pavetta* e *Tricalysia* (Lersten 1974) e de *Simira* (Klein *et al.* 2004). Já *Psychotria* destaca-se como um gênero de Rubiaceae que teve um grande número de espécies cujos coléteres foram descritos na literatura (Lersten & Horner 1968; Lersten 1974a; Miller *et al.* 1983; Miguel *et al.* 2009; Vitarelli & Santos 2009).

## 3. Breve descrição das espécies estudadas

*Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.). Woodson, *Palicourea rigida* Kunth, *Tabernaemontana solanifolia*. A. DC. e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum. são nativas do bioma Cerrado e presentes na flora do Distrito Federal. Faz-se relevante destacar as espécies *P. rigida* e *T. formosa* consideradas marcadores ecológicos devido à sua

ampla distribuição por diversas fitofisionomias do bioma; ocorrem do norte ao sul do Brasil sendo seu limite às manchas de Cerrado no estado do Paraná (Delprete & Rizzo 2010).

*H. obovatus* e *T. solanifolia* são espécies vegetais pertencentes à família Apocynaceae. *H. obovatus* também conhecida por pau-de leite é uma árvore ou arvoreta, com filotaxia alterna, as folhas simples são obovadas a elípticas, glabras ou papilosas, sésseis ou com pecíolo curto (Spina 2004). Suas flores são brancas e perfumadas, o fruto é folicular (Koch & Kinoshita 1999). *T. solanifolia* é conhecida pelo nome comum leiteira-do-brejo (Soares 2010), de hábito arbustivo ou arbóreo, filotaxia oposta, suas folhas são obovadas-oblongas, lâmina glabra, sésseis ou curto-pecioladas, suas flores possuem corola branca ou creme, exalam aroma ligeiramente perfumado. Seus frutos são mericarpos pares de coloração roxo-esverdeada a marrom (Leeuwenberg 1994).

*P. rigida* e *T. formosa* são espécies pertencentes à família Rubiaceae ocorrem na forma de arvoretas, arbustos ou subarbustos. *P. rigida* é comumente conhecida como bate-caixa nome atribuído ao som produzido pelo vento ao tocar em suas folhas, que possuem consistência coriácea. Possui ramos tortuosos de casca grossa e profundamente fissurada. Sua filotaxia é oposta com folhas sésseis ou com curtos pecíolos; a lâmina foliar é oval a lanceolada de cor oliváceo-esverdeada; contém estípulas interpeciolares bilobadas. Suas flores são amarelo-alaranjadas, seus frutos são drupas ovoides de cor azulada a preta (Delprete & Rizzo 2010). *T. formosa* é uma espécie com grande plasticidade pode chegar à árvore com 7m de altura, reconhecida pelo nome de jenipapo-bravo. Possui xilopódio rastejante, seus ramos são cilíndricos, sua filotaxia é oposta com folhas pecioladas e lâminas ovais a elípticas, velutina-tomentosas, possui estípulas interpeciolares deltóides, caducas ou persistentes, suas flores são tubulosas e amarelo-claras devido à cor de suas corolas. O fruto é uma baga globosa verde-amarelada a alaranjada (Delprete & Rizzo 2010).

#### **4. Lacunas no conhecimento dos coléteres**

Descrições anatômicas e estudos histoquímicos sobre os coléteres já avançaram muito no conhecimento sobre estas estruturas, mas poucos trabalhos se voltaram para a análise da hipotética função protetora contra herbivoria e patógenos. Duas exceções são encontradas em Miguel *et al.* (2006), que constataram que as secreções de coléteres de *Bathysa nicholsonii* K. Schum inibem o crescimento de esporos fúngicos; e o ensaio realizado por Curtis & Lersten (1974) em glândulas de *Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall onde os autores observaram que as larvas do inseto *Chrysomela scripta* Fabricius (Coleoptera) evitaram as folhas cobertas por secreção resinosa das glândulas (Curtis & Lersten 1974). Fora isto, não se tem estudos claros que analisem o papel ecológico dos coléteres e de suas secreções, a

despeito da importância que podem desempenhar nas relações ecológicas das plantas com seu ambiente e os organismos ali presentes.

Não foram encontrados estudos sobre coléteres em espécies de *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.), Woodson, *Palicourea rigida* Kunth, *Tabernaemontana solanifolia*. A. DC. e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. A literatura taxonômica sobre espécies destes gêneros algumas vezes cita coléteres (Delprete & Rizzo 2010; Spina 2004), mas não há estudos mais aprofundados acerca de sua morfologia, anatomia e, histoquímica.

## **Objetivo geral**

O presente trabalho almeja caracterizar e identificar glândulas em ramos vegetativos de *Himatanthus obovatus*, *Tabernaemontana solanifolia*, *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (capítulo 1), testar um método de coleta das secreções e identificar os compostos nas mesmas (capítulo 2).

## Referências

ALQUINI, Y., BONA, C., BOEGER, M. R. T., COSTA, C. G., & BARROS, C. F. (2009). Epiderme. In: Appezatto-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. (Editoras). Anatomia Vegetal (2ª ed.). Viçosa: UFV pp. 88-108.

ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE. Acessado em dezembro/ 2011. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

APPEZATTO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. (2009). Anatomia Vegetal (2ª ed.). Viçosa: UFV. 438p.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M. M. (2000). Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica, 23(2), pp. 113-120.

BARREIRO, D. P. (2006). Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schumm. (Rubiaceae). (Dissertação de Mestrado). Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 80 p.

BARREIRO, D. P. & MACHADO, S. R. (2007). Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. Revista Brasileira de Botânica, 30(3), pp. 387-399.

CURTIS, J. D. & LERSTEN, N. R. (1980). Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). American Journal of Botany, 67(9), 1289-1296.

CASTRO, M. DE MORAES & MACHADO, S. R. (2009). Células e tecidos secretores. In: Appezatto-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. (Editoras). Capítulo 7. pp. 179-204. Anatomia Vegetal (2ª ed.). Viçosa: UFV.

CURTIS, J. & LERSTEN, N. R. (1974). Morphology, seasonal variation and function resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). American Journal of Botany, 61(8), pp. 835-845.

DAVE, Y., KURIACHEN, P. M. & THOMAS, V. (1988). Development, structure and senescence of colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). Acta Botanicorum Polonie, 57, pp. 3-7.

DELL, B. (1977). Distribution and function of resins and glandular hairs in Western Australian plants. Journal of the Royal Society of the Western Australia, 59 (4), pp. 119-123.

DELPRETE, P. G. & RIZZO, J. Â. (2010). Flora dos Estados de Goiás e Tocantins: Rubiaceae. 40(III PARTE). Goiânia: PRPPG/UFG e IRD, GO: Editora Vieira. 512p

- DICKISON, W. C. (2000). Integrative Plant Anatomy. San Diego: Academic Press. 532p.
- DURKEE, L. T., CHRIS, W. B. & COHEN, P. F. (1984). Light and electron microscopy of the glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). American Journal of Botany, 71(4), pp. 596-602.
- ESAU, K. (1974). Anatomia das Plantas com sementes. (B. L. Morretes, Trad.) São Paulo: Edgard Blucher LTDA. 312 p.
- FAHN, A. (1979). Secretory tissues in Plants. London: Academic Press INC. 588p.
- FAHN, A. (1990). Plant Anatomy (4<sup>a</sup> ed.). Oxford: Pergamon Press. 302p.
- FOSTER, A. S. (1949). Practical Plant Anatomy. Nova York: Von Nostrand, 228p.
- GONZÁLES, A. (1998). Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 128, pp. 215-228.
- HORNER, H. T. & LERSTEN, N. R. (1968). Development, structure, and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). American Journal of Botany, 55(9), pp. 1089-1099.
- INAMDAR, J. A., BAGAVATHI SUBRAMANIAN, R. & MOHAN, J. S. (1986). Studies on the resin glands of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). Annals of Botany, 58, pp. 425-429.
- KLEIN, D. E., GOMES, V. M., DA SILVA-NETO, S. J. & DA CUNHA, M. (2004). The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). Annals of Botany, 94, pp. 733-740.
- KOCH, I.; KINOSHITA, L. S. (1999). The Apocynaceae s. str. da região de Bauru, São Paulo, Brazil. Acta botanica Brasilica, 13(1). pp. 61-86.
- LEEUWENBERG, A. (1994). A revision of *Tabernaemontana*. Kew: Royal Botanic Gardens. 450p.
- LERSTEN, N. R. (1972). Stipchomes in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. Brittonia, 24, p. 123.
- LERSTEN, N. R. (1974). Colleter morphology in *Paveta*, *Neorosea* and *Tricalysia*. Botany Journal of the Linnean Society, pp. 125-136.
- LERSTEN, N. R. & HORNER, H.T. JR. (1968). Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). American Journal of botany, 55, pp. 1089-1099.
- MILLER, I. M., SCOTT, A. & GARDNER, I. C. (1983). The development, structure and function of dendroid colleters in *Psychotria kirkii* Hiern (Rubiaceae). Annals of Botany, 51, pp. 621-630.

MANGALAN, S., KURIEN, K. P., JOHN, P. & NAIR, G. M. (1990). Development, structure and cytochemistry of resin-secreting collectors of *Gardenia gummifera* (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 66, pp. 123-132.

MARTINS, F. M., KINOSHITA, L. S. & CASTRO, M. D. (2010). Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violacea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. *Revista Brasileira de Botânica*, 33(3), pp. 489-500.

MAUSETH, J. D. (1988). *Plant Anatomy*. Califórnia: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 558p.

MAYER, J. L., GUSTAVSON, P. C. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. (2011). Collecters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora*, 206, pp. 185-190.

METCALFE, C. R. & CHALK, L. (1957). *Anatomy of the dicotyledons* (Vol. 1). Oxford: Clarendon Press 806p.

MIGUEL, E. D., DE MORAES, D. G. & DA CUNHA, M. (2009). Stipular collectors in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltld.) Wawra. *Acta Botanica Brasilica*, 23(4), pp. 1034-1039.

MIGUEL, E. D., GOMES, V. M., OLIVEIRA, M. A. & DA CUNHA, M. (2006). Collecters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae). Ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology*, 8, pp. 715-722.

MOHAN, J. & INAMDAR, J. (1986). Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57 (3), pp 389-401.

PAIVA, E. A. & MACHADO, S. R. (2006). Ontogenesis, structure, and ultrastructure of *Hymenaea stignocarpa* (Fabaceae: Caesalpinoideae) collectors. *Revista Biologia Tropical*, 54(3), pp. 943-950.

PAIVA, E. A. & MACHADO, S. R., (2006). Collecters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology*, 66(1), pp. 301-308.

RIO, M. S., CASTRO, M. M. & KINOSHITA, L. S. (2002). Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 25(3), 339-349.

SCHWARZ, E. 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.

SPINA, A. P. (2004). Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae). (Tese de Doutorado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 197 p.

- SIMÕES, A. O. & KINOSHITA, L. S. (2002). The Apocynaceae s. str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. *Darwiniana*, 40(1-4), pp. 127-169.
- SOARES, L. H. (2010). Avaliação do impacto produzido pela duplicação da BR 101 sobre a vegetação, através de parcelas permanentes. Monografia. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). 76 p.
- SUBRAMANIAN, R., MURUGAN, V., MOHAN, J. & INAMDAR, J. (1989). Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Plant Science*, 99(5), pp. 423-429.
- THIEBAUT, L. & HOFFMANN, P. (2005). Occurrence of colleters in Erythroxylaceae. *Kew Bulletin*, 60, pp. 455-459.
- THOMAS, V. (1991). Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany*, 68, pp. 287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. (1990). Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton Annales Rei Botanicae*, 30(2), 209-336.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. (1990). Structure and necrosis of stipular colleters in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). *Belgian Journal of Botany*, 123, 67-72.
- THOMAS, V., DAVE, Y. & MENON, A. (1989). Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata*. *Nordic Journal of Botany*, 8(5), pp. 493-496.
- Vitarelli, N. C. & Santos, M. (2009). Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 23(4), pp. 923-928.



## **CAPÍTULO 1**

**Morfologia externa, micromorfologia, anatomia e identidade das glândulas de ramos vegetativos de *Himatanthus obovatus*, *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae), *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (Rubiaceae)**

**Resumo.** Glândulas constituídas por estruturas do tipo emergências são encontradas na face adaxial dos pecíolos de *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.) Woodson e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), bem como em estípulas de *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.) K. Schum. (Rubiaceae). O objetivo do presente trabalho foi estudar glândulas destas plantas nativas do Cerrado, por meio de sua análise morfo-anatômica, inclusive sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como identificar se suas secreções contêm mucilagens. As amostras foram fixadas, desidratadas e metalizadas para análise sob MEV, onde os cristais foram analisados por espectroscopia de energia dispersiva (energy dispersive spectroscopy, EDS). A análise anatômica foi realizada mediante inclusão em parafina, utilizando cortes seriados. Para análise histoquímica, cortes das glândulas frescas foram obtidos em micrótomo e submetidos aos reagentes: azul de alcian, vermelho de rutênio e ácido tânico com cloreto férrico. Os resultados da anatomia e histoquímica foram registrados sob fotomicroscópio com sistema de captura de imagens. As secreções das glândulas reagiram positivamente ao vermelho de rutênio, o que evidencia mucilagens ácidas. A composição das secreções, assim como a morfologia das glândulas possibilitaram sua identificação como típicas emergências, constituídas por um núcleo parenquimático, revestido por epiderme em paliçada, exceto em *P. rigida*, onde foi constatado também o tipo "simples", não relatado na literatura, que possivelmente representa uma condição derivada em relação às demais emergências. Nas quatro espécies estudadas, os coléteres apresentam o formato padrão ("standard") e não foram constatados poros em sua superfície. Os coléteres possuem pedúnculo em *T. formosa* e *T. solanifolia* são vascularizados em *P. rigida*, onde o floema faz parte do feixe vascular e ocorre também isolado, abaixo da epiderme em paliçada. Os coléteres em *P. rigida* possuem cristais prismáticos e ráfides, constituídos por cálcio, níquel, nióbio e alumínio, conforme EDS. Aparentemente este é um relato inédito sobre a presença destes três últimos elementos na constituição química de cristais em plantas.

**Palavras-chave:** alumínio, Cerrado, coléteres, cristais, glândulas, níquel, nióbio.

**Abstract.** Glands consisting of structures of type emergencies are found in the adaxial side of petioles from *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.) Woodson and *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), as well as in stipules of *Palicourea rigida* Kunth and *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K. Schum. (Rubiaceae). The objective of this work was to study glands of these native plants of the Cerrado, by means of his analysis morpho-anatomical, including under scanning electron microscopy (SEM), as well as identify if their secretions contain mucilage. The samples were fixed, dehydrated and metallized for analysis under SEM, where the crystals were analyzed by energy dispersive spectroscopy (energy dispersive spectroscopy, EDS). The anatomical analysis was performed by inclusion in paraffin, using serial sections. For histochemical analyzes, cuts of fresh glands were obtained and submitted to the reagents: alcian blue, red of ruthenium and tannic acid with ferric chloride. The results of the Anatomy and histochemistry were recorded under fotomicroscopio with system to capture images. The secretions from glands reacted positively to the red of ruthenium, which highlights mucilage acidic. The composition of secretions, as well as the morphology of the glands allowed its identification as typical emergencies, composed of a nucleus parenchymatous, coated by epidermis in palisade, except in *P. rigida*, where it was also found the type "simple", not reported in the literature, which possibly represents a derived condition in relation to other emergencies. In the four studied species, colleters exhibit the standard format ( "standard") and were not observed pores on its surface. Colleters have stalks in *T. formosa* and *T. solanifolia* are vascularized in *P. rigida*, where the phloem is part of the vascular bundle and occurs also isolated, below the epidermis in palisade. Colleters in *P. rigida* have prismatic crystals and rafides, consisting of calcium, nickel, niobium and aluminum, as EDS. Apparently this is a unpublished report on the presence of these last three elements in the constitution chemistry of crystals in plants.

**Keywords:** aluminum, Cerrado, colleters, crystals, glands, nickel, niobium.

## Introdução

As estruturas secretoras designadas coléteres são encontradas em faces adaxiais de partes vegetativas e reprodutivas de um grande número de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas, tanto em monocotiledôneas (Mayer *et al.* 2011), como em eudicotiledôneas (Thomas 1991). Tais estruturas são secretoras de materiais de natureza complexa; apresentam-se como uma mistura de mais de uma substância, no entanto é comum o relato de materiais de natureza lipídica e glicídica, sendo os polissacarídeos mucilaginosos os que as tipificam (Thomas & Dave 1980; Inamdar *et al.* 1986; Mohan & Inamdar 1986; Rio *et al.* 2002).

Atribuem-se aos coléteres as funções de defesa contra herbivoria e microorganismos patogênicos bem como de evitar a dessecação de partes meristemáticas que, em geral, ficam cobertas por secreção de consistência viscosa liberada por estas glândulas (Thomas 1991). Os papéis adjudicados estão baseados principalmente nas propriedades químicas dos compostos mucilaginosos, relacionados à sua capacidade de retenção de água (Mauseth 1988; Gregory & Bass 1989), baseando-se também na baixa frequência de organismos visitante, de sinais de herbivoria e de doenças nas regiões em que os coléteres estão presentes, quando observações de campo são realizadas.

Apesar do grande número e diversidade de plantas que apresentam estas glândulas, os estudos convergem para duas famílias da ordem Gentianales: Apocynaceae e Rubiaceae. Autores que se ocupam do tema têm concentrado seus esforços principalmente na caracterização anatômica e histoquímica, utilizando suas investigações como ferramenta taxonômica (Appezato-da-Glória & Estelita 2000; Simões 2002; Spina 2004; Rio *et al.* 2002).

Os estudos sobre coléteres têm sido realizados tanto por sua importância taxonômica, quanto pela curiosidade que este tema desperta na comunidade científica, ainda carente de um conhecimento integral acerca de sua função nos vegetais.

## Objetivos

Analisar a morfologia externa, a micromorfologia e a anatomia das glândulas presentes em regiões vegetativas de *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.) Woodson,

*Palicourea rigida* Kunth, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltldl.) K. Schum., e testar sua secreção, a fim de verificar se apresentam mucilagens.

## **Materiais e métodos**

### **Obtenção do material**

Quatro espécies foram analisadas: *Himatanthus obovatus*, *Palicourea rigida*, *Tabernaemontana solanifolia* e *Tocoyena formosa*. Amostras de quatro indivíduos de cada espécie foram coletadas no Centro Olímpico no mês de novembro/2010 e 2011 até janeiro/2011 e 2012, campus da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil. Exsicatas testemunhas foram confeccionadas e tombadas no Herbário da UnB (UB) com os seguintes números de coleta R. G. Leite nº de coleta 6, *Palicourea rigida* coletor R. G. Leite nº de coleta 8, *Tabernaemontana solanifolia* coletor R. G. Leite nº de coleta 10 e 11 e *Tocoyena formosa* R. G. Leite nº de coleta 12 e 13. As espécies foram identificadas por comparação com exemplares do acervo UB e consulta à especialista Dra. Sueli Maria Gomes.

Os ramos vegetativos que consistiram de caules com folhas e gemas foram coletados com auxílio de tesoura de poda e levados ao laboratório para exame sob microscópio estereoscópico (marca Leica M.EZ4D) e as regiões dos ramos contendo glândulas foram isoladas.

### **Morfologia externa**

O registro das glândulas foi feito no Laboratório de Taxonomia Vegetal da UnB, sob microscópio estereoscópico (marca Leica M.EZ4D), acoplado ao microcomputador, com sistema de captura de imagens LA EZ 2.0. As seguintes características das estruturas secretoras foram analisadas: localização, quantidade, altura, largura, formato, cor das estruturas secretoras e aspecto da secreção liberada. Foram feitas medidas em 30 amostras aleatórias em nós desenvolvidos, obtidos de quatro indivíduos de cada espécie, seguidas do cálculo da média e do desvio padrão para cada parâmetro quantitativo, sendo a comparação das médias feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando programa estatístico Sisvar 5.3.

## **Micromorfologia**

No laboratório, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB (Departamento de Biologia Celular) foi efetuado o estudo micromorfológico. Para tanto, regiões dos ramos contendo as glândulas foram isoladas sob microscópio estereoscópico, fixadas em glutaraldeído 2,5% por 24h, desidratadas em concentrações crescentes de acetona aquosa a 50-60-70-80-90-100%, secas ao ponto crítico de dióxido de carbono em evaporadora (marca Balzers CPD 030). As amostras foram montadas sobre suportes de cobre (“stubs”) e metalizadas com ouro com 20nm de espessura na "sputter" (marca Balzers SCD 050) (Dedavid & Machado 2007). As observações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (marca Jeol JSM- 7001F) com programa de captura de imagens PC SEM. A análise de material sob espectroscopia por energia dispersiva (energy dispersive spectroscopy, EDS) foi realizada no programa “Noran System Six” (NSS), sob aceleração de voltagem de 15kV e magnificação de 1700X.

## **Caracterização anatômica**

No laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UnB, as regiões contendo glândulas foram isoladas sob microscópio estereoscópico, sendo fixadas durante 24-48h em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 7,2, sendo desidratadas por uma hora em cada solução etanólica a 20-30-40-50-60-70-80-90-100%, sob vácuo (bomba de vácuo marca Tecnal TE058). As amostras foram lavadas em tampão fosfato, pré-infiltradas por 2h em cada solução de álcool: xilol 3:1, 2:2 e 1:3, xilol puro. A infiltração foi feita por 24h em estufa (marca Nova Técnica NT516), a 60°C, em soluções de xilol: parafina 1:3 e em parafina pura por 48h (adaptado de Johansen 1940). Os blocos de parafina contendo os espécimes foram montados sobre blocos de madeira e seccionados em micrótomo rotativo (marca Leica RM 2145). Os cortes seriados foram obtidos com espessura de 10µm e distendidos em solução de Haupt, sobre lâminas de vidro. Após estarem secos, foram desparafinizados por 20min em xilol puro duas vezes, solução de xilol: etanol 1:1 e em etanol 100%. Os cortes foram corados com safranina etanólica 1% e verde firme por 30s, sendo lavados por três vezes em etanol 100% (Kraus & Arduin 1997). As lâminas foram montadas com verniz vitral incolor (marca Acrilex) (Paiva *et al.* 2006). Os resultados foram registrados por meio de fotomicroscópio (marca Zeiss Axioscop) acoplado a microcomputador usando como sistema de captura o programa LA EZ 2.0. Conforme a necessidade foi feita a infiltração em historesina

(Marca Leica) e coradas com azul de toluidina aquoso a 0,05% por 10s (Kraus & Arduim 1997).

## Caracterização histoquímica das glândulas

Esta abordagem foi realizada no laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UnB. Amostras frescas recém coletadas foram utilizadas sendo as regiões contendo as glândulas, seccionadas com auxílio de micrótomo de mesa marca Ranvier. Os cortes frescos foram submetidos aos seguintes reagentes para detecção de compostos de natureza glicídica (Ascensão 2003): 1- vermelho de rutênio aquoso, por 10min e posterior lavagem em água, para detecção de pectinas; 2- azul de alcian aquoso, por 30min e lavagem em água por 3 min, para detecção de mucopolissacarídeos; 3- ácido tânico aquoso a 5%, por 10 min, seguidos de lavagem em água, e posterior aplicação de cloreto de ferro III aquoso a 3%, por 1min e lavagem rápida em água, para detecção de mucilagens. Foram confeccionadas quatro lâminas de cada indivíduo de quatro indivíduos analisados.

## Resultados

### Morfologia externa

Dados sobre a quantidade e tamanho das glândulas encontradas nas quatro espécies são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Quantidade e dimensão das glândulas adultas em *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

Espécie	Nº/pecíolo ou estípula*	Dimensões	
		Altura (µm) *	Largura (µm) *
<i>H. obovatus</i>	132	480±132 b	261±52 b
<i>T. solanifolia</i>	30	675±156 b	197±32 b c
<i>P. rigida</i>	76	1610± 513 a	285±49 a
<i>T. formosa</i>	130	388±50 c	151 ±21 c

\*Média de 30 amostras aleatórias, oriundas de três indivíduos de cada espécie.

Médias seguidas por letras iguais são semelhantes pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade.

A descrição morfológica das lâminas foliares e glândulas é apresentada a seguir, para as duas espécies de Apocynaceae, seguidas pelas espécies de Rubiaceae.

*Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson (Fig. 1-7, Tabela 1).

As folhas são simples, alternas, com pecíolo reduzido, em cuja base e axilas situam-se numerosas glândulas (Fig. 2-3). As glândulas são translúcidas quando jovens (Fig. 4) e marrons quando velhas (Fig. 5), algumas vezes com a ponta escurecida, tanto em nós jovens quanto velhos. Em nós cujas folhas caíram naturalmente, as glândulas remanescentes em geral são brancas ou marrons. Quando a folha é destacada do caule propositalmente, algumas glândulas permanecem, indicando serem também de posição nodal (Fig. 7). A secreção ainda úmida é observada sobre as gemas, sendo encontrada também no ápice da lâmina foliar (Fig. 6) e internós, mas neste caso ela se apresenta seca e se destaca quando pressionada, como uma casca fina. A secreção é abundante e pegajosa, de coloração entre o amarelo e o marrom (Fig. 6). Formigas foram observadas visitando as glândulas em nós jovens e velhos (Fig. 7).

*Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Fig. 8-13, Tabela 1).

As folhas são simples, pecioladas e opostas cruzadas (Fig. 8). As glândulas ocorrem na face adaxial do pecíolo, já estando presentes quando as folhas iniciam seu desenvolvimento. As glândulas são alongadas, com o ápice levemente mais fino que a base (Fig. 9-10). São verde-claras até levemente amareladas quando jovens, tornando-se esbranquiçadas com o tempo. Suas pontas podem-se apresentar escurecidas em nós mais jovens, porém há mais glândulas com pontas escuras em nós mais velhos (Fig. 10, 12). Se folha é arrancada, ou cai naturalmente, algumas glândulas ficam presas ao caule, acima da cicatriz, o que indica sua posição nodal (Fig. 13). A secreção está presente nos primórdios foliares (Fig. 11) e até no ápice da lâmina foliar, possui cor translúcida, é pegajosa e escassa (Fig. 9).





**Figuras 1-13.** Plantas estudadas e morfologia externa das glândulas: *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson (1-7) e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (8-13), Apocynaceae. 1, 8. Hábito das plantas. 2-3. Pecíolos com glândulas. 4-5. Detalhe das glândulas. 6. Ápice dos ramos com secreção. 7. Formigas visitando regiões com glândulas. 9-10, 12. Detalhes das glândulas. 11. Primórdios foliares em gema axilar. 13. Cicatriz foliar e glândulas remanescentes. **Setas:** indicam secreção. Abreviações: **Ci:** cicatriz, **ES:** estruturas secretoras, **Pe:** pecíolo, **PF:** primórdio foliar, **RM:** região meristemática, \* ápice das estruturas. **Escalas:** 1= 1 m; 2-3= 2 mm; 4-5= 260  $\mu$ m; 6= 4 mm; 7= 1 cm; 8= 3 cm; 9-10, 12= 150  $\mu$ m; 11; 13= 3 mm.

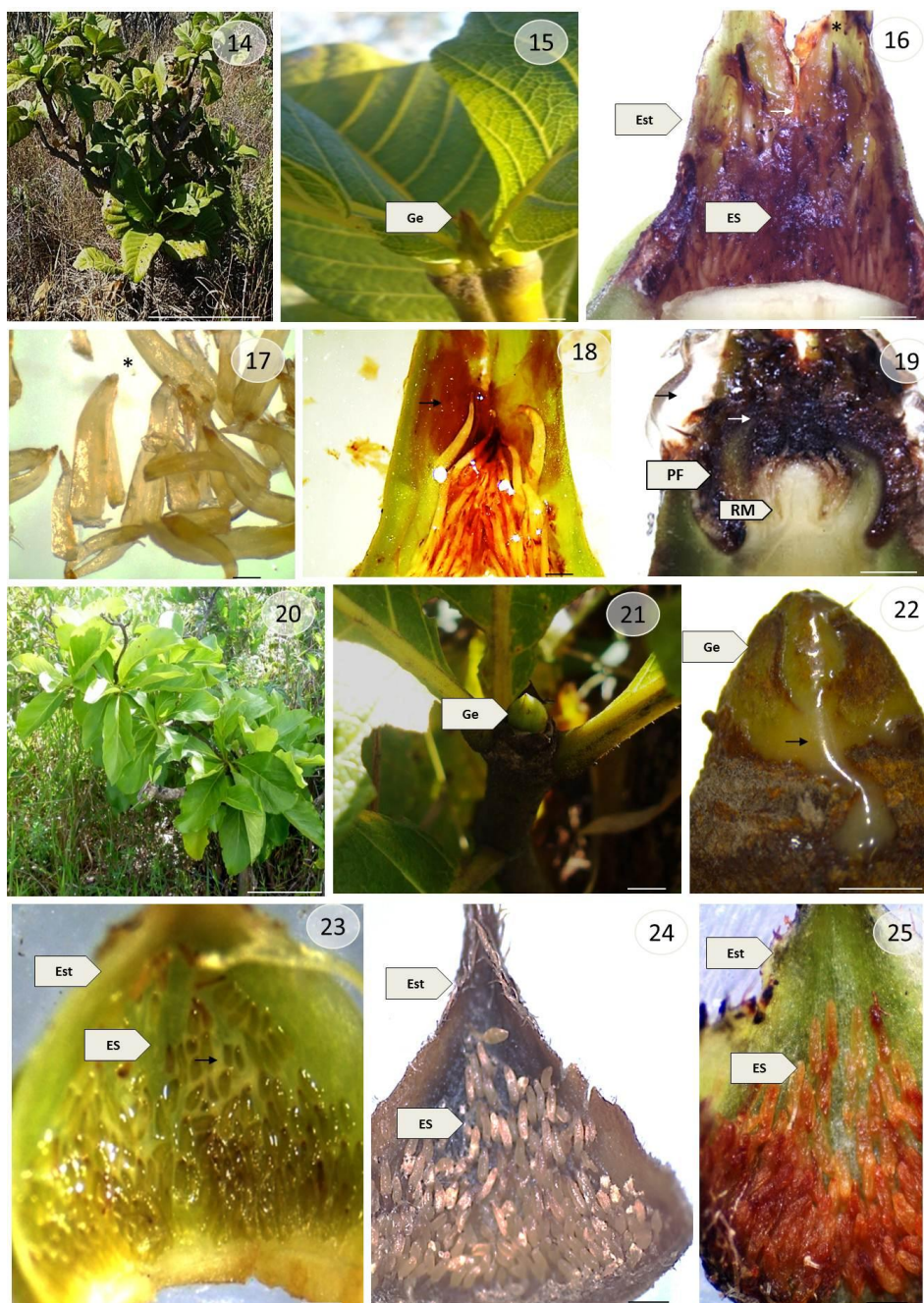
*Palicourea rigida* Kunth (Fig. 14-19, Tabela 1).

As folhas de são simples, opostas, com pecíolo curto, apresentando estípulas interpeciolares bilobadas (Fig. 16). Numerosas glândulas concentram-se na parte mais basal das estípulas (Fig. 16), cujas axilas abrigam gemas. (Fig. 19). São as maiores glândulas entre as espécies analisadas (Tabela 1). Elas são translúcidas (Fig.17), ou verde-claras em nós jovens e posteriormente tornam-se escurecidas. As glândulas persistem por muito tempo nas estípulas, mesmo em épocas secas, e suas pontas escurecem com o passar do tempo. A secreção é inicialmente viscosa, marrom e translúcida (Fig. 18), tornando-se rígida e escurecida ou até preta com o passar do tempo (Fig. 19).

*Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum (Fig. 20-25, Tabela 1).

O ápice de ramos vegetativos de *T. formosa* (Fig. 21) possui brotos com regiões meristemáticas recobertas por várias estípulas, das quais transborda abundante secreção (Fig. 22). Estas estípulas apresentam tricomas tectores abaxialmente, sendo adaxialmente glabras e com glândulas em quase toda a sua extensão, mas concentradas na região basal (Fig. 23-25). As glândulas são alongadas e estreitas, verde-claras ou translúcidas nas estípulas mais internas (Fig. 23) e castanhas, com o ápice mais escuro e pouca ou nenhuma secreção nas estípulas mais externas (Fig. 24-25). A secreção é esbranquiçada ou amarelada.





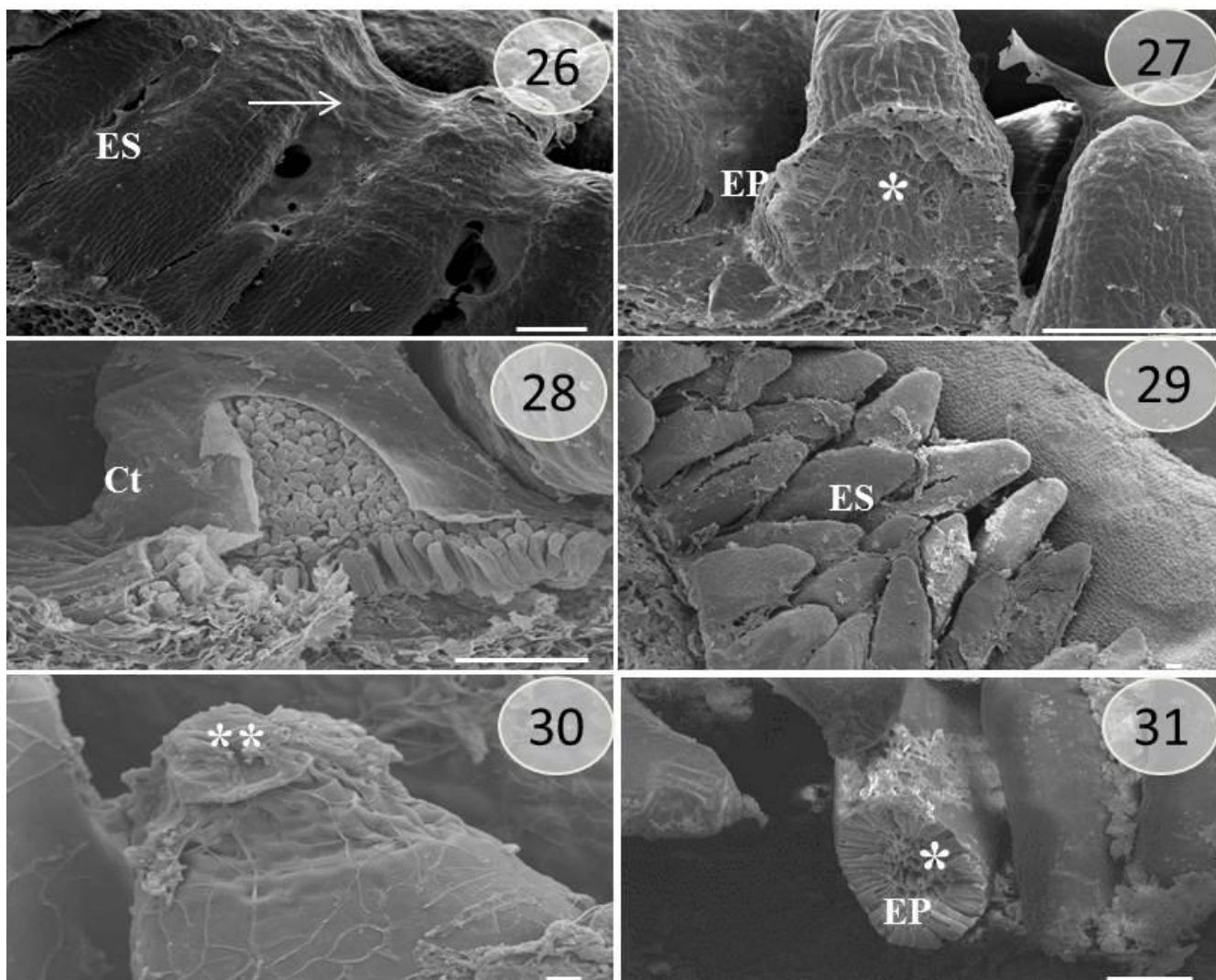
**Figuras 14-25.** Plantas estudadas e morfologia externa das glândulas: *Palicourea rigida* Kunth (14-19) e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum (20-25), Rubiaceae. 14, 20. Hábito das plantas. 15. Gema. 16, 18-19. Estípulas bilobadas com glândulas e secreção. 17. Glândulas isoladas. 21-22. Gema apical (22, detalhe). 23-25. Estípulas, interna (23) e externas (24-25). **Setas:** indicam secreção. Abreviações: **ES:** estruturas secretoras, **Est:** estípula **Ge:** gema, **PF:** primórdio foliar, **RM:** região meristemática; **Escala:** 14= 75 cm, 15= 1 cm, 16= 2 mm, 17= 250  $\mu$ m, 18, 24= 500  $\mu$ m, 19= 5 mm, 20= 50 cm, 21= 8 mm, 22= 4 mm, 23, 25= 520  $\mu$ m.

### Micromorfologia e espectroscopia por energia dispersiva (MEV e EDS)

As glândulas analisadas em MEV (mostradas nas figuras 26-37) apresentam-se alongadas nas quatro espécies, exceto algumas muito curtas em *Himatanthus obovatus* (Fig. 26, 29, 32, 36).

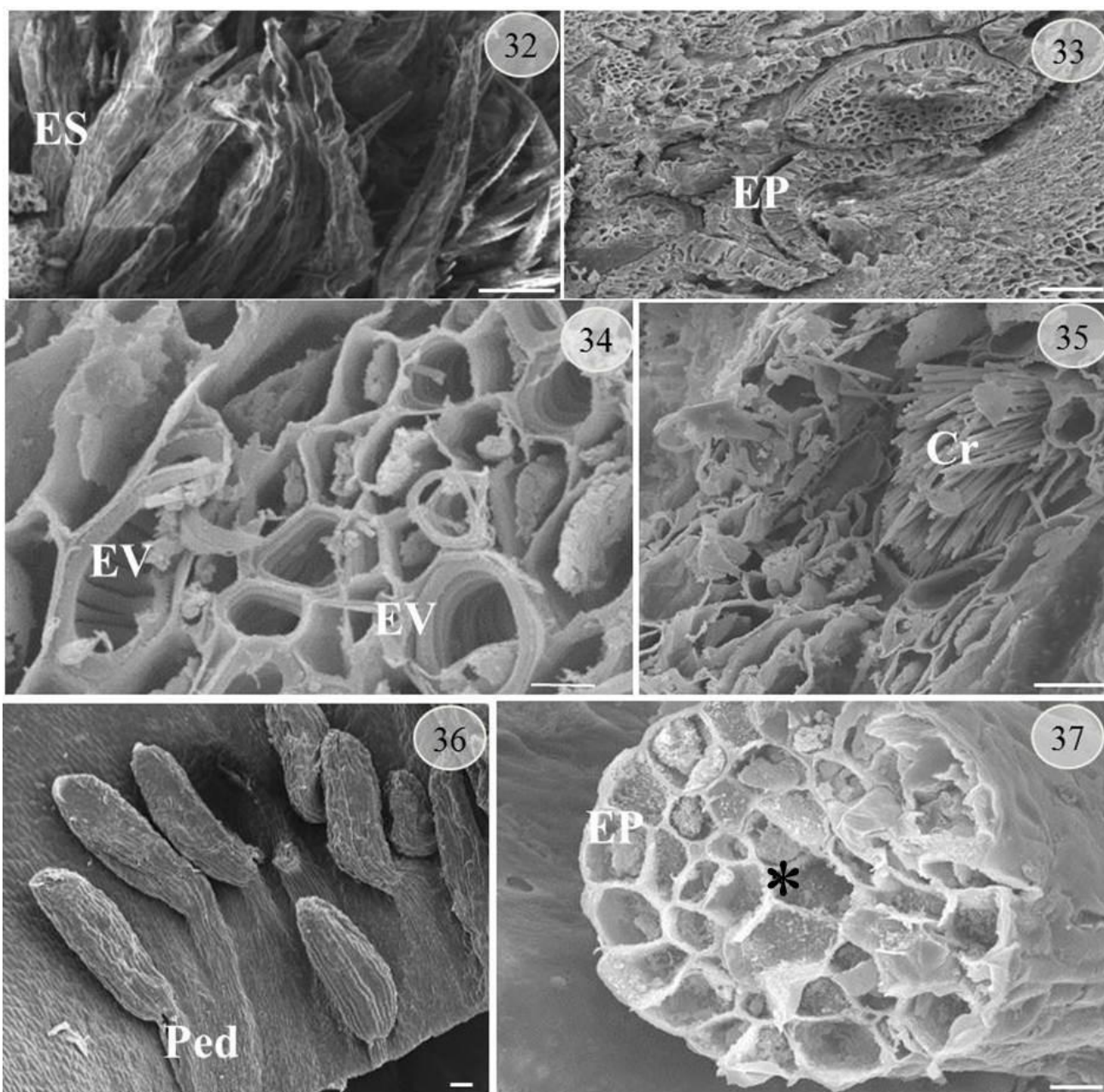
O ápice das glândulas é obtuso (Fig. 29,36), raro agudo. Em todas as glândulas foram constatados dois tecidos, sendo um externo, identificado como epiderme em paliçada (Fig. 28, 31 e 33), com cutícula frouxa que facilmente se destaca (Fig. 28), contínua, de superfície lisa, sem ornamentações. Não foram observados poros, mas o ápice algumas vezes tem a cutícula enrugada em *Tabernaemontana solanifolia* (Fig. 30). O outro tecido glandular constitui seu interior, formado por células isodiamétricas, identificado como parênquima (Fig. 31e 37).

Em *Palicourea rigida*, foram constatados elementos de vaso (Fig. 34), bem como idioblastos contendo ráfides e cristais prismáticos (Fig. 35, 38 A-B).



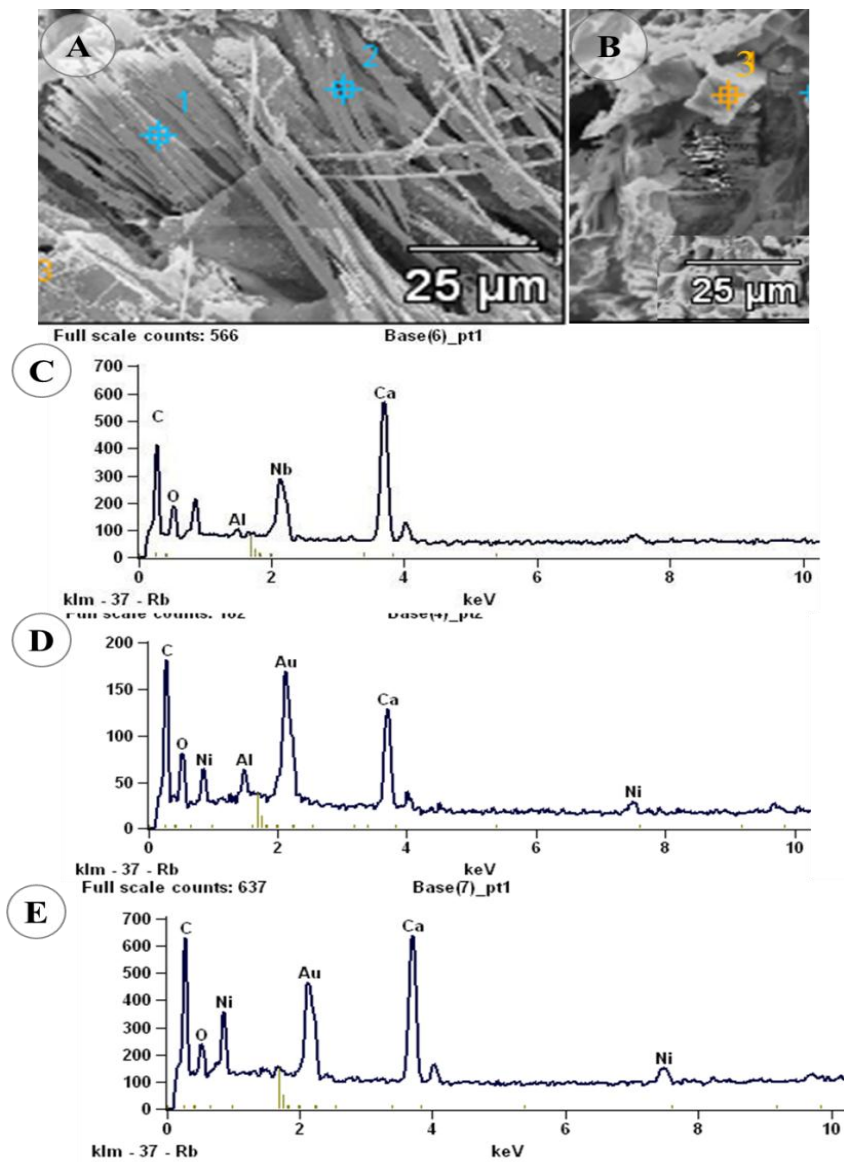
**Figuras 26-31.** Micromorfologia das glândulas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson (26-28) e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (29-31), Apocynaceae. **Seta:** indica secreção Abreviações. **Ct:** cutícula, **EP:** epiderme em paliçada, **ES:** estruturas secretoras, \*: parênquima, \*\*: ápice. **Escala:** 26-29= 100 µm, 30= 10 µm, 31= 100 µm.





**Figuras 32-37.** Micromorfologia das glândulas de *Palicourea rigida* Kunth (32-35) e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum (36-37), Rubiaceae. Abreviações: **Cr:** cristais. **EP:** epiderme em paliçada, **ES:** estruturas secretoras, **EV:** elemento de vaso, **Ped:** pedúnculo, \* parênquima. **Escala:** 32-33=100  $\mu\text{m}$ , 34= 20  $\mu\text{m}$ , 35= 10  $\mu\text{m}$ , 36= 100  $\mu\text{m}$ = 37= 10  $\mu\text{m}$ .

A espectroscopia por energia dispersiva (EDS) revelou que os cristais presentes nas glândulas de *Palicourea rigida* são ricos em carbono, oxigênio e cálcio (Fig. 38 C-E), podendo conter também níquel e alumínio (Fig. 38 C, D e E). Adicionalmente, as ráfides têm grandes quantidades de nióbio em sua constituição (Fig. 38 C).



**Figura 38.** Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) dos cristais encontrados nas glândulas de *Palicourea rigida* Kunth. **A-B.** Morfologia das ráfides (**A**) e cristais prismáticos (**B**). **C-E.** Gráficos obtidos após análise em programa “Noran System Six” (NSS), sob aceleração de voltagem de 15kV e magnificação de 1700X, nos pontos assinalados em A e B os números 1 (**gráfico C**), 2 (**gráfico D**), 3 (**gráfico E**). Notar altos picos de cálcio nos dois tipos de cristais e nióbio nas ráfides.

## Caracterização anatômica

A anatomia das glândulas está ilustrada nas Figuras 39-53. Em *Palicourea rigida*, elas são entremeadas por tricomas (Fig. 46).

As glândulas são constituídas por emergências, exceto em um caso, em que se constatou apenas uma glândula formada exclusivamente por epiderme em paliçada, situada diretamente sobre a estípula de *Palicourea rigida* (Fig. 53). As emergências são formadas por dois tipos distintos de tecidos nas quatro espécies estudadas. O tecido interno é parenquimático, com células alongadas, acompanhando o comprimento das glândulas (Fig. 39-40, 43-44, 48, 52). O tecido externo constitui uma epiderme em paliçada, com células muito altas, estreitas, justapostas, com afinidade por corantes acidófilos.

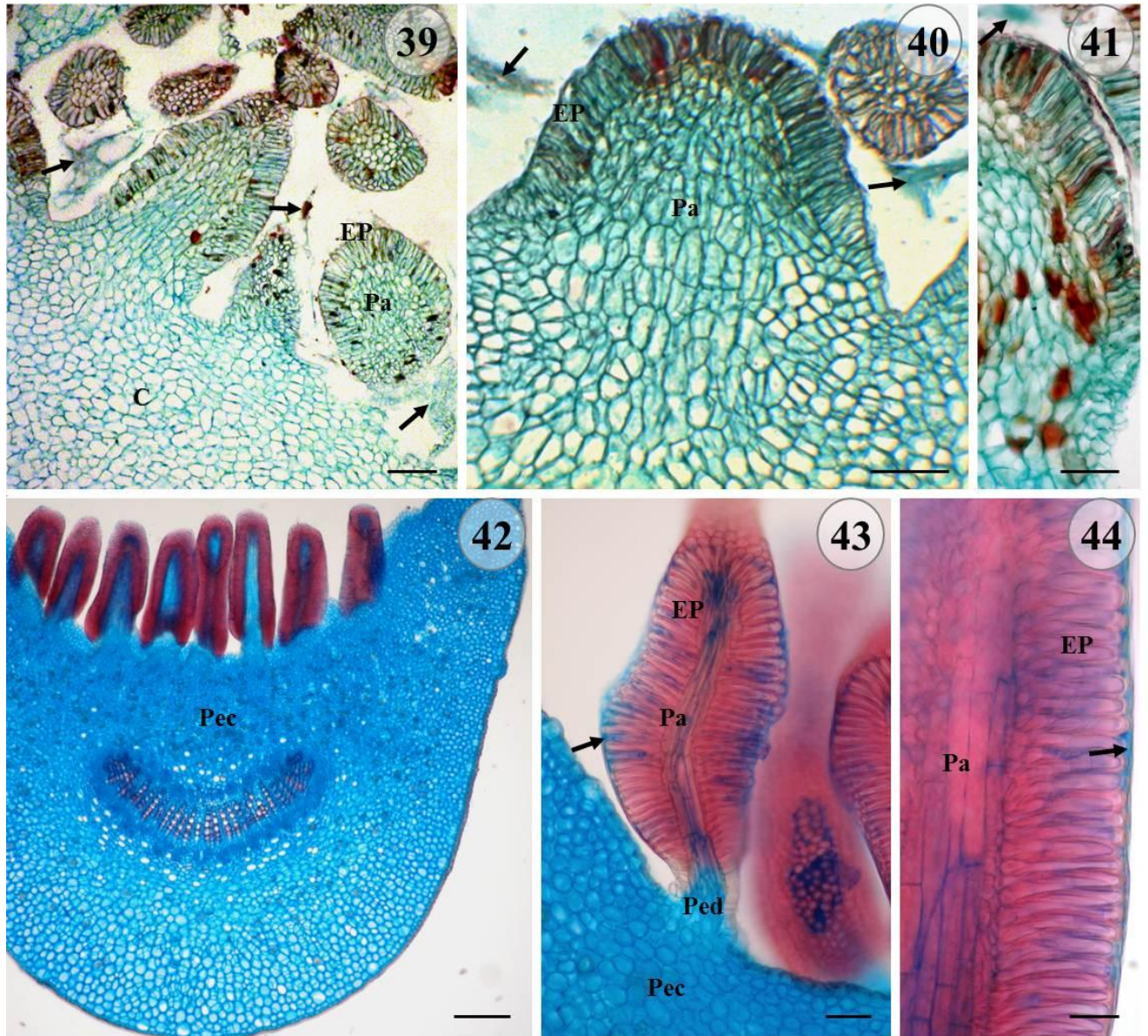
Geralmente a parede das células epidérmicas tem afinidade pela safranina (Fig. 43-44, 48), ou pelo azul de toluidina (Fig. 51). A afinidade pela safranina em *Himatanthus obovatus* começa a partir do 5º nó (Fig. 39-41), enquanto em *Tabernaemontana solanifolia* isto ocorre a partir do 3º nó (Fig. 43-44).

As glândulas de *Palicourea rigida* são vascularizadas, apresentando tanto xilema, como floema (Fig. 46-48). Na região mais basal, até cerca de quarenta vasos foram observados (Fig. 46). Os elementos de vaso apresentam reforço de parede secundária do tipo helicoidal (Fig. 48), raro anelar. Não foi observado procâmbio.

As glândulas de *P. rigida* possuem vários idioblastos com ráfides (Fig. 46, 47) e cristais prismáticos (Fig. 47) mergulhados no parênquima, de modo semelhante ao que ocorre com o mesófilo das estípulas que as contêm. A secção transversal do terço mais basal das glândulas pode ter mais de dez idioblastos com cristais (Fig. 46). Os cristais prismáticos são bem mais longos que as ráfides, podendo alcançar até cerca de 18µm de comprimento.

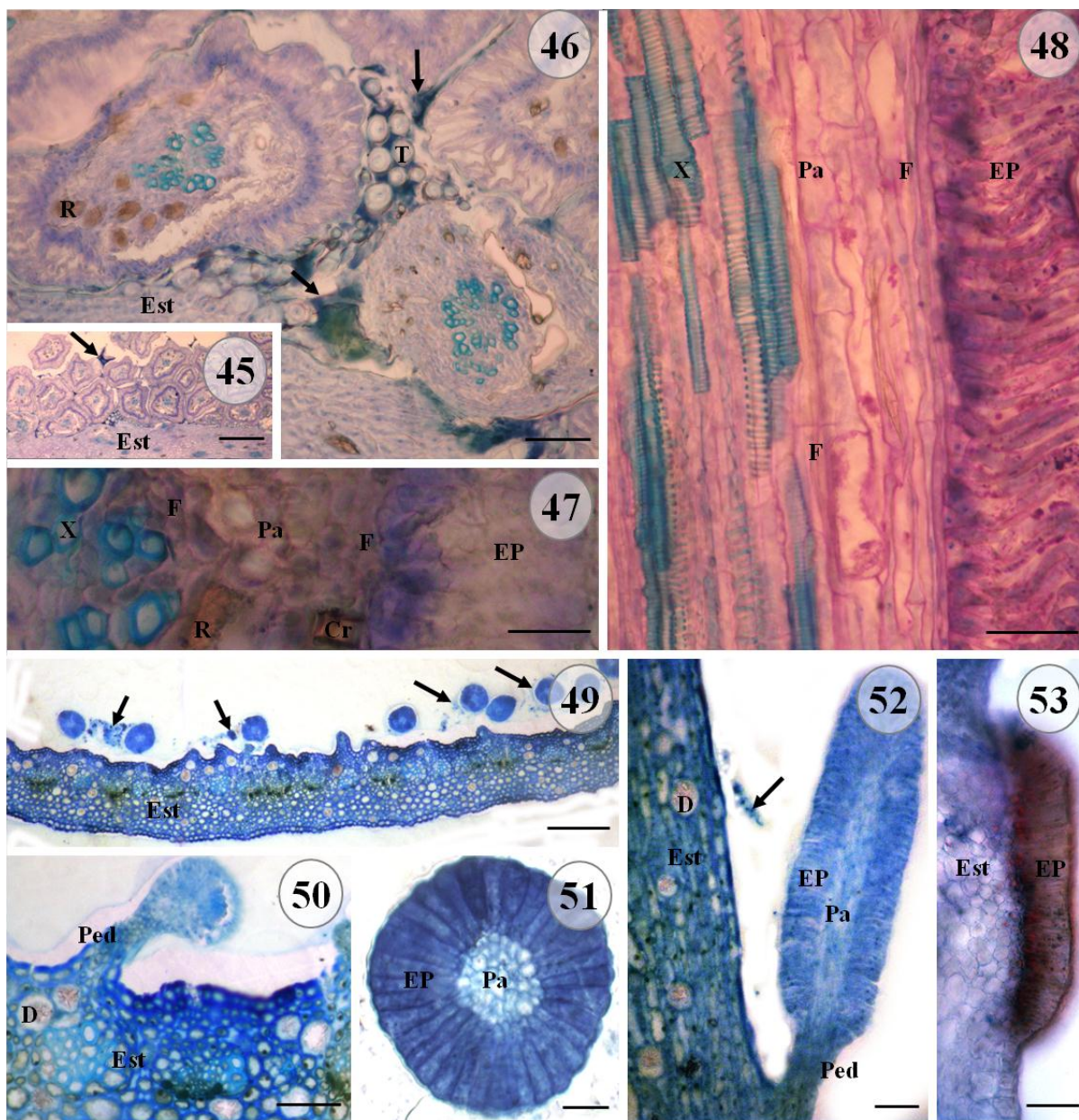
As glândulas são pedunculadas em *Tocoyena formosa* (Fig. 50, 52). Nas demais espécies, elas geralmente são sésseis (Fig. 39, 53), exceto por apenas uma glândula pedunculada observada em *Tabernaemontana solanifolia* (Fig. 43). O pedúnculo liga a glândula à estípula ou ao pecíolo, havendo continuidade no parênquima destas estruturas (Fig. 43, 50). Na região do pedúnculo, a epiderme possui células mais baixas do que no restante das glândulas, mas elas são mais altas do que no resto da estípula e do pecíolo.





**Figuras 39-44.** Caracterização anatômica das glândulas analisadas. Secções transversais e longitudinais de pecíolo. Todas as glândulas possuem epiderme em paliçada e interior parenquimático. **39-41.** *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson : glândulas curtas (**39-40**), com secreções externas (**setas**) e cutícula recuada (**41**). **42-44.** *Tabernaemontana solanifolia* A. DC: glândulas sésseis em vista geral (**42**) e uma pedunculada (**43**), situadas na face adaxial do pecíolo; secreção acumulada no espaço periplasmático (**setas**). Abreviações: **C:** caule, **EP:** epiderme em paliçada, **Pa:** parênquima, **Pec:** pecíolo, **Ped:** pedúnculo. **Escalas:** 39-41, ; 42= 300  $\mu\text{m}$ , 43= 100  $\mu\text{m}$ ; 44= 50  $\mu\text{m}$ .





**Figuras 45-53.** Caracterização anatômica das glândulas analisadas. Secções transversais e longitudinais. Todas as glândulas estão situadas na face adaxial de estípulas; notar secreções (setas). **45-48, 53.** *Palicourea rigida* Kunth: numerosos idioblastos contendo ráfides e cristais prismáticos nas glândulas e na estípula (**45-47**); elementos de vaso numerosos (**46**), com reforço de parede secundária helicoidal (**48**); floema adjacente ao xilema e também subepidérmico (**47-48**) glândulas raro sem núcleo parenquimático (**53**). **49-52.** *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum: numerosas drusas na estípula (**50 e 52**); glândula pedunculada (**50, 52**). Abreviações: **Cr**: cristal prismático, **EP**: epiderme em paliçada, **Est**:

estípula, **F**: floema, **Pa**: parênquima, **Ped**: pedúnculo, **R**: ráfides, **T**: tricoma, **X**: xilema.  
**Escala**s: 45= 200 µm; 46-48, 51-53= 50 µm; 49= 300 µm; 50= 100 µm.

### Identificação da presença de mucilagens

Os resultados dos testes histoquímicos para identificação de mucilagem realizados nas glândulas são apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 54-64.

**Tabela 2.** Resultados dos testes histoquímicos realizados nas secreções das glândulas adultas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae) para detectar mucilagens.

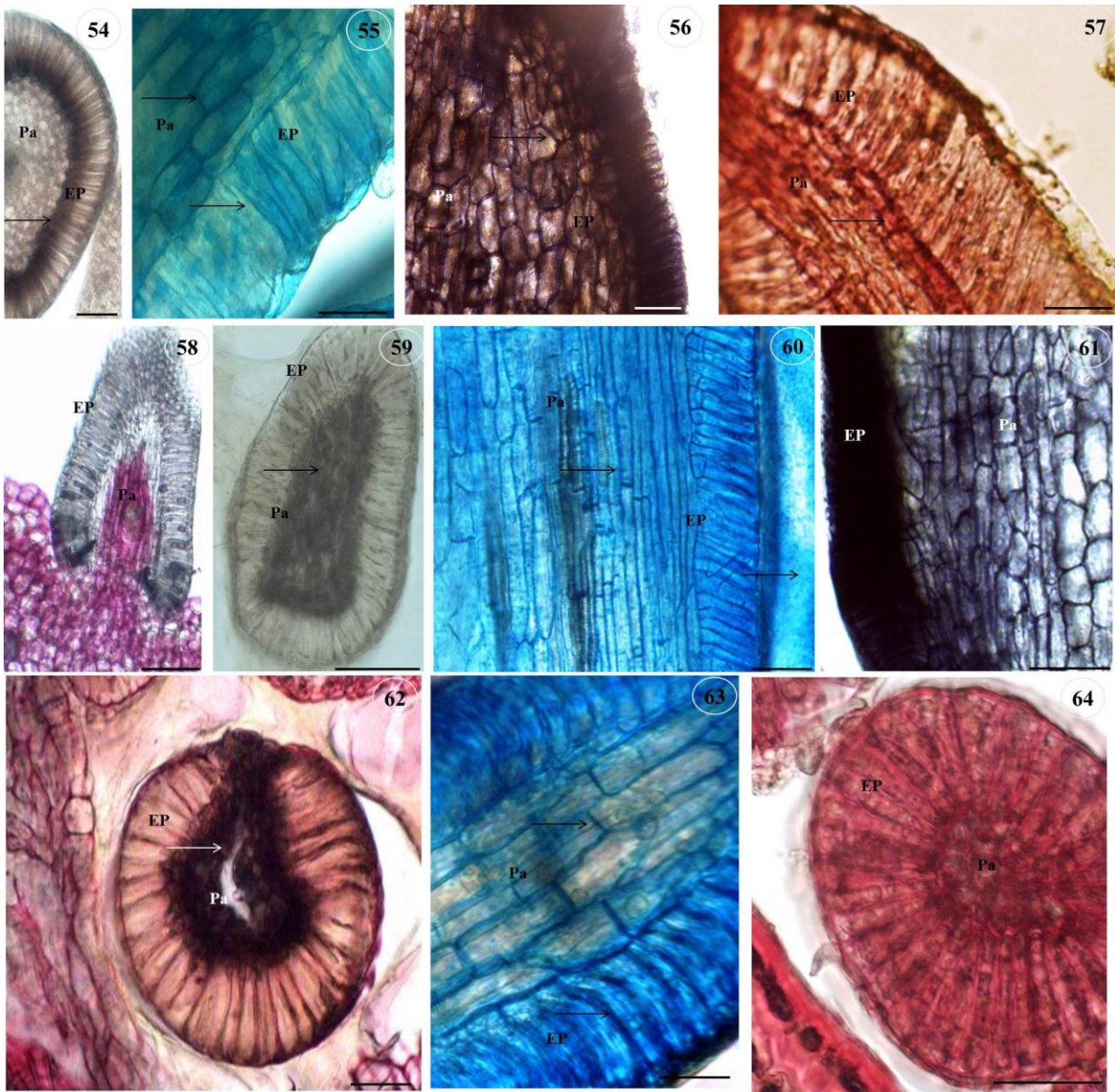
Teste histoquímico	Apocynaceae		Rubiaceae	
	<i>H. obovatus</i>	<i>T. solanifolia</i>	<i>P. rigida</i>	<i>T. formosa</i>
Vermelho de rutênio	+	+	+	+
Azul de alcian	+	-	+	+
Ácido tânico/cloreto férrico	+	-	+	-

Reações: (+) positiva; (-) negativa.

Todos os corantes reagiram positivamente com a região da parede celular e lamela média das células epidérmicas e parenquimáticas (Fig. 55-56, 60-64), quando comparados aos controles (Fig. 54, 59), sendo que a reação com vermelho de rutênio foi muito fraca na parede das células epidérmicas e das camadas mais externas do parênquima em *Tabernaemontana solanifolia* (Fig. 55-57).

No citoplasma, regiões mais claras, correspondentes aos vacúolos, não reagiram (Fig. 55-57, 60-61). As células parenquimáticas, em geral, se mostraram muito mais vacuoladas do que a epiderme em paliçada (Fig. 55-56, 61, 63). O restante do citoplasma reagiu de modo semelhante aos resultados apresentados para as secreções (Tabela 2). A coloração foi mais intensa no citoplasma das células epidérmicas do que das parenquimáticas, exceto nas reações com vermelho de rutênio (Fig. 57-58, 62, 64).





**Figuras 54-64.** Resultados dos testes histoquímicos das glândulas adultas das quatro espécies analisadas. **54-57.** *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson: controle (54), azul de alcian (55), ácido tânico com cloreto férrico (56) e vermelho de rutênio (57). **58.** *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. em teste com vermelho de rutênio. **59-62.** *Palicourea rigida*: controle (59), azul de alcian (60), ácido tânico com cloreto férrico (61) e vermelho de rutênio (62). **63-64.** *Tocoyena formosa*: azul de alcian (63) e vermelho de rutênio (64). **Setas:** indicam secreção. Abreviações: **EP:** epiderme em paliçada, **Pa:** parênquima. **Escalas:** 54= 85µm; 55= 40µm; 56= 80µm, 57, 63=50µm, 58=70µm; 59, 62=130µm, 60-61= 60µm; 64= 100µm.

## Discussão

As glândulas das quatro espécies estudadas correspondem a coléteres, conforme as evidências morfológicas, micromorfológicas, anatômicas e histoquímicas aqui reunidas. O termo coléter refere-se a glândulas que produzem secreção viscosa, de natureza variável, porém com polissacarídeos presentes em grande quantidade, recobrando regiões meristemáticas em diversas plantas, estruturalmente formadas e organizadas segundo os tipos definidos por Lersten (1974), com base em estudos sobre espécies de Rubiaceae. A morfologia das estruturas analisadas (Fig. 2-5, 9-13, 16-19, 23-25, 26-37, 50-59) corresponde à de coléteres tipificados por este autor.

A presença de compostos de natureza mucilaginosa, que conferem aspecto viscoso à secreção glandular, tem sido considerada como a característica decisiva para identificação das estruturas secretoras denominadas de coléter (Rio *et al.* 2002), tendo em vista que a classificação de tais estruturas é baseada no tipo de secreção que produzem (Thomas 1991). Testes histoquímicos, como vermelho de rutênio e ácido tânico com cloreto férrico, têm sido usados para evidenciar mucilagens nas secreções dos coléteres em muitos vegetais (Gregory & Bass 1989; Thomas & Dave 1990; Klein *et al.* 2004; Demarco 2005; Paiva & Machado 2006), o que também foi realizado no presente trabalho (Tabela 2). Desta forma, tanto a morfologia, como a caracterização de mucilagens permitiram a identificação das glândulas analisadas como sendo coléteres.

Os coléteres muitas vezes são confundidos morfológicamente com nectários extraflorais (Mohan & Inamdar 1986, Thomas 1991), sendo assim, testes histoquímicos são usados para complementar sua caracterização morfo-anatômica. Os nectários produzem glicídios abundantes no meio intra e extracelular, mas eles são oligossacarídeos (Fahn 1979). Glicídios de natureza mucilaginosa são típicos dos coléteres (Thomas 1991). A natureza das secreções analisadas foi confirmada por meio dos três testes histoquímicos utilizados. Estes testes se complementam, na medida em que detectam grupos diferentes de compostos mucilaginosos.

Coléteres podem ser constituídos por emergências ou tricomas (Fahn 1979, Thomas 1991), sendo que a maioria daqueles aqui estudados se encaixa no primeiro caso, com uma exceção, em que se constatou glândula formada por epiderme em paliçada situada diretamente sobre a estípula de *Palicourea rigida* (Fig. 53). A morfologia desta glândula parece corresponder mais a uma redução do coléter, constituindo uma condição derivada, do que um remanescente relictual. Conforme a evolução dos tipos de coléter em

Rubiaceae, apresentada por Lersten (1974a), epiderme pouco desenvolvida é uma condição mais basal, enquanto coléteres mais derivados apresentam epiderme em paliçada com células mais altas, até a supressão do tecido parenquimático, formando um tufo de tricomas secretores.

Propõe-se aqui denominar como "simples" estes coléteres constituídos por epiderme em paliçada diretamente situada na superfície do órgão, uma vez que não têm a complexidade das emergências, pois não possuem parênquima distinto, nem vascularização, tampouco constituem tricomas.

Os coléteres encontrados nas quatro espécies se encaixam no tipo padrão ("standard"), conforme a classificação apresentada por Lersten (1974), e adotada parcialmente por Gonzáles (1998). Estes dois autores propuseram classificações morfo-anatômicas para coléteres em espécies de Rubiaceae e Turneraceae, respectivamente. Seus sistemas não são conflitantes, mas complementares, embora o trabalho de Lersten (1974) tenha sido mais amplamente usado em outras famílias.

O formato padrão dos coléteres em *H. obovatus* e *T. solanifolia* confirma os demais estudos sobre Apocynaceae, como exemplo, *Allamanda cathartica*, *A. violacea*, *Aganosma caryophyllata*, *Carissa congesta*, *Nerium indicum*, *Plumeria alba*, *Tabernaemontana divaricata*, *Thevetia neriifolia*, *Vallaris solanaceae* (Subramanian *et al.* 1989), *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002), *Mandevilla illustris* e *Mandevilla velutina* (Appezato-da-Glória & Estelita 2000), *Temnadenia violacea* (Martins *et al.* 2010) sendo que o tipo padrão é o único formato encontrado para coléteres desta família até o momento.

O formato dos coléteres do tipo padrão em *H. obovatus* foi o mais peculiar entre os coléteres observados. Embora tenha apresentado os tecidos típicos, ele é mais achatado em relação aos das outras espécies, inclusive quanto a *T. solanifolia*, que é da mesma família. Sua altura não é muito maior que a largura. Neste sentido, seu formato se encaixa no tipo sésil proposto por Gonzáles (1998).

O tipo padrão observado nas espécies de Rubiaceae corrobora os resultados encontrados para diversas espécies da mesma família: *Psychotria carthagenensis* (Vitarelly & Santos 2009), *Simira glaziovii*, *S. pikia*, *S. rubra* (Klein *et al.* 2004), *Bathysa nicholsonii* (Miguel *et al.* 2006), *Mitragyna parvifolia* (Thomas & Dave 1990), *Neorosea andogense*, *N. odoratissima*, *N. roseoidea*, *N. testue*, e a maioria das espécies de *Psychotria* estudadas (Lersten 1974a). Este último gênero pertence à mesma subfamília de *Palicourea rigida*, sendo, portanto mais próximos filogeneticamente. Ainda que para a família tenham sido encontrados outros tipos anatômicos, como o dendróide, e o escova,

os mesmos não foram observados nas duas espécies. Entre as duas espécies da mesma família aqui investigadas, os coléteres se diferem principalmente pelas suas dimensões; os coléteres em *P. rigida* chegam a ter quatro vezes a altura dos coléteres de *T. formosa* e seus ápices são mais agudos (Tabela 2).

Os coléteres de *Tocoyena formosa* apresentam menores dimensões, sendo os únicos a geralmente apresentarem pedúnculo.

As estípulas são descritas como caducas ou persistentes em *Tocoyena formosa* (Delprete & Rizzo 2010) e observou-se no campo que elas se destacam muito facilmente, mas são mais persistentes em *Palicourea rigida*. A secreção em *P. rigida* é tão abundante, que parece auxiliar na fixação das estípulas, retardando sua queda.

Já nas duas espécies de Apocynaceae estudadas, não ocorrem estípulas e os coléteres têm posição mais nodal que peciolar, uma vez que permanecem nos ramos após a abscisão das folhas (Fig. 7, 13). A permanência dos coléteres em *H. obovatus* e *T. solanifolia* corrobora os estudos em outras espécies de Apocynaceae. Tal permanência pode estar relacionada a algum papel ecológico destas estruturas, pois em *H. obovatus* estas regiões são constantemente visitadas por formigas, muito embora se tenha constatado que não se trata de nectários extraflorais. Estudos suplementares são requeridos para estabelecer que tipo de recompensa é fornecida a estas formigas.

A presença de cristais é uma modificação estrutural nos coléteres, aqui constatada em *Palicourea rigida* (Fig. 55-56), e que também foi relatada em outras espécies de Rubiaceae, particularmente na subfamília Rubioideae, onde coléteres com ráfides são apontados como uma característica típica da subfamília (Lersten 1974; Thomas 1991). O número de idoblastos contendo cristais por glândula é muito grande nesta espécie (Fig. 46-47), o que dificultou a microtomia, assim como aqueles situados nas estípulas. *Tocoyena formosa* também apresentou numerosas drusas no mesofilo das estípulas, mas não os tem nos coléteres, portanto não há relação direta entre presença de cristais nos coléteres e no restante da planta.

A composição química dos cristais em plantas é identificada por meio de testes com ácidos fortes, que possibilitam a distinção dos carbonatos de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em relação aos oxalatos de cálcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ) (Johansen 1940; Kraus & Arduin 1997). Estes dois compostos são amplamente apontados como os constituintes dos cristais que ocorrem nas plantas (Fahn 1979; Meric & Dane 2004; Navarro *et al.* 2007; Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2009).

A análise em EDS realizada no presente trabalho identificou elementos químicos antes não relatados na constituição química dos cristais em plantas, quais sejam níquel,

nióbio e alumínio (Fig. 38 C-E). Esta metodologia permite a identificação dos elementos químicos constituintes dos cristais, em contraposição à reação com ácidos, que apenas distingue os carbonatos dos oxalatos de cálcio. O significado biológico da presença destes elementos está por ser melhor esclarecido, assim como a função fisiológica desses cristais nos coléteres.

No caso do alumínio, sabe-se que *Palicourea rigida* é uma espécie acumuladora deste elemento, que é abundante nos solos do Cerrado (Haridasan 2008). Em plantas de *Fogopyrum esculentum* Moench (trigo sarraceno), o acúmulo de alumínio se dá na forma de oxalatos de alumínio, sendo que associações complexas entre silicatos e alumínio também foi relatada, como forma de acumulação deste último elemento (Haridasan 2008). Tal como estas plantas, provavelmente o elemento cálcio pode estar relacionado a mecanismos de imobilização do alumínio nas plantas aqui estudadas.

Chama a atenção o fato de que o nióbio está presente nas ráfides, mas não nos cristais prismáticos dos coléteres de *Palicourea rigida* (Fig. 38 C). O nióbio é pouco assinalado em plantas, mas está entre 26 elementos listados como traços (menos de 1ppm) no caule da planta medicinal *Achyranthes aspera* L., Amaranthaceae (Shendkar *et al.* 2011). É preciso um estudo mais apurado para determinar se sua ocorrência é esporádica, ou se não tem sido detectado em cristais por falta de adequação metodológica. O acúmulo nas ráfides pode ser um indicador de que o solo teria quantidades expressivas deste elemento. A confirmar isto, tem-se que esta é uma informação valiosa, dada a importância industrial do nióbio.

A presença de cristais em células vegetais costuma ser relacionada ao metabolismo e equilíbrio iônico do cálcio e também como meio de remoção de acúmulos tóxicos de oxalatos (Dickison 2000). Em folhas de *Pistia stratiotes* L., o excesso de cálcio no meio induz seu armazenamento na forma de cristais no mesofilo das folhas, sendo que a deficiência do elemento induz a remobilização do cálcio para utilização metabólica (Volk *et al.* 2001). Outra função também comumente associada aos cristais é a defesa contra herbivoria, devido às suas propriedades tóxicas (Molano-Flores 2001).

A vascularização foi outra modificação estrutural observada nos coléteres em *Palicourea rigida* (Fig.46 e 48), a qual também foi relatada para coléteres de outras plantas (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002). Em *P. rigida*, os coléteres são os maiores entre as espécies estudadas (Tabela 1), sendo possivelmente isso um fator relevante. Na hipotética ausência de vascularização, o tamanho destas glândulas poderia dificultar a distribuição de materiais precursores da secreção até as células epidérmicas. Já a presença dos mesmos tornaria tal processo mais eficiente. Em



contraposição, foi observada vascularização em coléteres posicionados no rumo dos feixes vasculares do caule, mas coléteres fora deste alinhamento são avasculares em *M. illustris*, *M. velutina* e *P. coalita* (Apezato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002).

A ausência do procâmbio indicou que se trata de glândulas adultas, conforme era proposta deste estudo analisar.

Outro fator relevante é a presença combinada de vasos xilemáticos e cristais de cálcio nos coléteres de *Palicourea rigida*. É sabido que o transporte desse íon na planta na forma do cátion  $\text{Ca}^{++}$  é feita quase exclusivamente pelo xilema, já que é um íon pouco móvel no floema (Caines & Shennan 1999; Larcher 2000; Tomaz *et al.* 2003) e seu transporte na planta é feito principalmente via apoplasto. Possivelmente seu acúmulo nos coléteres de *P. rigida* seja facilitado devido à presença dos elementos de vaso, o que explicaria a formação dos cristais como uma forma de armazenamento do excesso de cálcio.

A observação de elementos de vaso, elementos de tubo crivado e cristais foi facilitada pelo uso de cortes seriados, que permitem a construção tridimensional das glândulas, possibilitando a análise de toda a sua largura.

Em especial, os elementos de tubo crivado são difíceis de serem identificados nos coléteres. Na literatura, apenas no trabalho de Rio *et al.* (2002) estão descritos coléteres vascularizados em que a presença de floema foi identificada. Floema isolado e subepidérmico também não parece ser uma ocorrência comum nos órgãos vegetais (Fig. 47-48); possivelmente constitui uma especificidade destas estruturas secretoras, que facilita a distribuição de compostos orgânicos para a síntese das secreções na epiderme em paliçada.

A ausência de poros e de indícios por onde a secreção é liberada externamente não esclarece o modo secretor nos coléteres das espécies estudadas. O enrugamento e escurecimento, muito comuns no ápice dos coléteres (Fig. 4, 10, 12, 23), bem como a presença de secreção em regiões mais altas na planta do que onde se localizam as glândulas são evidências que parecem apontar para uma espetacular ejeção das secreções. No entanto, as regiões antes novas eram cobertas por secreção de outros primórdios foliares que os encobria. O mais provável é que a secreção situada nessas regiões tenha essa origem. Esses mesmos resultados foram observados em plantas onde não há evidências sobre o mecanismo secretor, como *Temnadenia violacea* (Martins *et al.* 2010), *Psychotria nuda* (Miguel *et al.* 2009), *Bathysa stipulata*, *B. gymnocarpa* (Miguel *et al.* 2010), *B. nicholsonii* (Miguel *et al.* 2006), *Simira rubra*, *S. pikia* e *S. glaziovi* (Klein *et al.* 2004).

Contrários a essas observações são os resultados para *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1990), *Psychotria kirkii* (Miller *et al.* 1983), *Mitragyna parvifolia* (Thomas & Dave 1990) e *Caryocar brasiliense* (Paiva & Machado 2006), nos quais os autores sugerem que a secreção alcança o meio externo por ruptura da cutícula, que seria causada pela pressão nela exercida pela secreção acumulada entre as paredes anticlinais da epiderme e no espaço periplasmático.

A quantidade e o tamanho dos coléteres variam muito entre as espécies e dentro de cada uma (Tabela 1). Variações dentro de um mesmo nó, entre os nós e entre os indivíduos também são observados em outros vegetais estudados (Lersten 1974a; Barreiro & Machado 2007). As repercussões dessa variação não são discutidas na literatura. As variações de tamanho podem estar relacionadas à posição geográfica, uma vez que a média do comprimento declina da América do Sul, América Central, Oceania até a África, esta última com os menores coléteres em espécies de *Psychotria* (Lersten 1974b).

O vermelho de rutênio identificou pectinas nas secreções dos coléteres das quatro espécies (Fig. 57, 58, 62, 64 Tabela 2). Este corante é um cátion hexavalente complexo, utilizado em microscopia ótica desde 1890 para identificar os mucopolissacarídeos ácidos, e sua clássica reação por interação iônica com as pectinas é mais típica do que específica (Luft 1971). As pectinas são polissacarídeos ramificados mucilaginosos, constituídos principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose (BeMiller 1986), sendo um dos importantes constituintes da lamela média e parede celular dos vegetais (Apezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2009). A reação positiva ao vermelho de rutênio revelou que as secreções de todas as espécies apresentam, portanto, mucopolissacarídeos ácidos.

O azul de alcian identificou os glicosaminoglicanos, que são polissacarídeos heterogêneos, com longas cadeias não ramificadas, formados por polímeros dissacarídeos com uma hexosamina (açúcar de 6 carbonos com grupo amina, como a N-acetilglicosamina) ligada a um monossacarídeo não nitrogenado, em geral um ácido urônico (Rodríguez & Gallego 1999). O azul de alcian é um corante catiônico, que possui afinidade pelos grupos aniônicos dessas moléculas, possibilitando determinar que as secreções analisadas possuem estas substâncias em sua composição, exceto *T. solanifolia* (Fig. 58, Tabela 2).

Por fim, o teste com ácido tânico e cloreto férrico é menos específico para a detecção de mucilagens em plantas (Pizzolato & Lillie 1973), mas tem sido recomendado

por vários autores (Gregory & Bass 1989; Thomas & Dave 1990; Klein *et al.* 2004; Demarco 2005; Paiva & Machado 2006).

O teste com ácido tânico e cloreto férrico se mostrou menos eficiente para detecção de mucilagens nas espécies estudadas do que o vermelho de rutênio (Fig. 56, 61, Tabela 2), o que também ocorreu em outros trabalhos (Sant'Anna-Santos *et al.* 2006). Situação oposta foi encontrada na análise de mucilagens em outras plantas (Viana 2009). As mucilagens em *T. solanifolia* só foram detectadas por meio do vermelho de rutênio (Tabela 2). Estes fatos referendam a necessidade de que sejam utilizados mais de um teste para identificar este grande grupo de compostos que são as mucilagens vegetais.

As mucilagens dos coléteres são constituídas por polissacarídeos formados por monoses, tais como glicose, galactose, arabinose, ácidos urônicos, xilose, ramnose e fucose, entre outros (Gregory & Bass 1989). Esses polissacarídeos conferem a propriedade de viscosidade à secreção dos coléteres tão relatada em literatura. No entanto, outros compostos tais como taninos e proteínas associados a estes polissacarídeos são referidos (Gregory & Bass 1989). Testes histoquímicos realizados por diversos autores têm revelado outras substâncias, como lipídios (Barreiro & Machado 2007); portanto a secreção das glândulas investigadas pode ter natureza mais complexa do que aqui foi estabelecido.

Aos compostos mucilaginosos são arrojadas principalmente as funções de proteção contra a dessecação em células vegetais (Gregory & Bass 1989). A redução da transpiração ocorreria graças à formação de uma espécie de malha, ou camada gelatinosa, que o vapor de água deve atravessar antes de alcançar o meio externo (Gregory & Bass 1989). Também são atribuídos a estes compostos a propriedade de reflexão da luz que incide em partes fotossintéticas de vegetais, como tecidos parenquimáticos que possuem cloroplastos, para proteção das mesmas contra alta radiação solar (Dell 1977; Gregory & Bass 1989).

Uma última questão a ser apontada para as substâncias liberadas dos coléteres é a proteção contra microorganismos causadores de doenças em plantas. Os polissacarídeos pécnicos abundantes na parede celular, em especial os homogalacturonanos, quando hidrolisados pela ação de enzimas dos patógenos, liberam oligossacarídeos que, por sua vez, induzem à síntese de fitoalexinas, as quais atuam na resposta da planta à infecção (Silva & Braga 2004). Estas constatações inferidas de polissacarídeos formadores de parede celular podem também ocorrer nos carboidratos presentes nas secreções dos coléteres.

As hipóteses acima procuram esclarecer o papel das mucilagens dos coléteres nos vegetais, mas carecem de embasamento experimental. São necessárias experiências específicas, delineadas objetivamente para comprovar ou não estas funções.

## Conclusões

As glândulas presentes no pecíolo e região axilar de *Himatanthus obovatus* e *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae), bem como na face adaxial das estípulas de *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) são coléteres.

Os coléteres das quatro espécies estudadas são do tipo padrão, conforme as tipificações propostas por Lersten (1974), sendo que os de *H. obovatus* se encaixam na descrição de coléter sésil proposta por Gonzáles (1998). Foi assinalado um novo tipo de coléter, denominado "simples", por não ter parênquima distinto.

As dimensões dos coléteres variam no mesmo indivíduo e entre os indivíduos, sendo que os maiores foram os de *P. rigida*, e somente os de *T. formosa* e *T. solanifolia* apresentam pedúnculo.

Todos os coléteres analisados são emergências secretoras constituídas por parênquima e epiderme em paliçada. Coléteres de *P. rigida* apresentam elementos de vasos, elementos de tubo crivado, cristais prismáticos e ráfides, enquanto que estas estruturas não ocorrem nas demais espécies analisadas. O floema diverge do feixe vascular e ocorre também isolado, sob a epiderme em paliçada em coléteres de *P. rigida*.

Os cristais dos coléteres analisados apresentam cálcio, níquel, nióbio e alumínio em sua constituição, podendo ser a ocorrência destes três últimos elementos químicos uma especificidade dos mesmos, ou os cristais vegetais não têm tido uma análise mais precisa de sua constituição.

Não foram constatados poros na superfície dos coléteres nas quatro espécies estudadas.

A secreção em todas as espécies estudadas é viscosa, brilhante e recobre as gemas, quando recém-secretada.

Estudos suplementares que investiguem o modo pelo qual as secreções alcançam o meio externo, bem como experiências que testem as funções que lhes são atribuídas são necessários para o integral conhecimento das estruturas secretoras chamadas coléteres.

## Referências bibliográficas

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. (2009). Anatomia Vegetal (2ª ed.). Viçosa: UFV. 438p.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M. M. (2000). Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 23(2), pp. 113-120.

ASCENSÃO, L. (2003). Técnicas histoquímicas convencionais e de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 21p.

BARREIRO, D. P. & MACHADO, S. R. (2007). Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. *Revista Brasileira de Botânica* 30(3), pp. 387-399.

BEMILLER, J. N. (1986) An Introduction to pectin: structure and properties. In: Chemistry and functions of pectin. Fishman, M. L.; Jen, J. J., eds., American Chemical Society: Washington DC, ACS Symposium Series, 310, pp. 2-12.

CAINES, A.M.; SHENNAN, C. (1999). Growth and nutrient composition of Ca<sup>2+</sup> use efficient and Ca<sup>2+</sup> use inefficient genotypes of tomato. *Plant Physiology. Biochem*, 37: 559-567.

DEDAVID, B. A., GOMES, C. I. & MACHADO, G. (2007). Microscopia Eletrônica de Varredura-Aplicação e preparação de amostras. Porto Alegre: Editora PUCRS. 60 p.

DELL, B. (1977). Distribution and function of resins and glandular hairs in Western Australian plants. *Journal of the Royal Society of the Western Australia*, 59 (4), pp. 119-123.

DEMARCO, D. (2005). Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de Cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae l.s.). Dissertação de Mestrado, 226 p. Campinas: Unicamp.

DICKISON, W. C. (2000). Integrative Plant Anatomy. San Diego, California, USA: Academic Press. 532 p.

GONZÁLES, A. (1998). Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean*, 128, pp. 215-228.

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

HARIDASAN, M. (2008). Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, C. H. B. A.; Casali, C. A. (Editores). Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri, Editora Manole. pp 1-17.

INAMDAR, J. A., BAGAVATHI SUBRAMANIAN, R. & MOHAN, J. S. (1986). Studies on the resin glands of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). Annals of Botany, 58, pp. 425-429.

JOHANSEN, D. A. (1940). Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill. 523p.

KLEIN, D. E., GOMES, V. M., DA SILVA-NETO, S. J. & DA CUNHA, M. (2004). The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). Annals of Botany, 94, pp. 733-740.

KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: Seropédica. 194 p.

LARCHER, W. (2000). A utilização dos elementos minerais. In: LARCHER, W. (Ed.). Ecofisiologia vegetal. São Carlos: Editora RiMa. capítulo 3: 183-230.

LERSTEN, N. R. (1974). Colleter morphology in *Paveta*, *Neorosea* and *Tricalysia*. Botany Journal Linnean Society, pp. 125-136.

LUFFT, J. H. (1971). Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. The Anatomical Record, 171, pp. 347-368.

MARTINS, F. M., KINOSHITA, L. S. & CASTRO, M. D. (2010). Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violacea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. Revista Brasileira de Botânica, 33(3), pp. 489-500.

MAUSETH, J. D. (1988). Plant Anatomy. Califórnia: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

MAYER, J. L., GUSTAVSON, P. C. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. (2011). Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. Flora, 206, pp. 185-190.

MERIC, C. & DANE, F. (2004). Calcium oxalate crystals in floral organs of *Helianthus annuus* L. and *H. tuberosus* L. (Asteraceae). Acta Biologica Szegediensis, 48(1-4), pp. 19-23.

MIGUEL, E. DE C. KLEIN, D. E. OLIVEIRA, M. A., CUNHA, M. DA. (2010) Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). Revista Brasileira de Botânica, 33 (3): 425-436.

MIGUEL, E. C., GOMES, V. M., OLIVEIRA, M. A. & CUNHA, M. (2006). Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae). Ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology*, 8, pp. 715-722.

MIGUEL, E. C., MORAES, D. G. & CUNHA, M. (2009). Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra. *Acta Botanica Brasilica*, 23(4), pp. 1034-1039.

MILLER, I. M., SCOTT, A. & GARDNER, I. C. (1983). The development, structure and function of dendroid colleters in *Psychotria kirkii* Hiern (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 51, pp. 621-630.

MOHAN, J. & INAMDAR, J. (1986). Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany*. 57(3), pp. 389-401.

MOLANO-FLORES, B. (2001). Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany*, 88, pp. 387-391.

NAVARRO, L. A.; DUARTE, L.; KLEIN, R.C. & HEUSER, E. D. (2007). caracterização dos cristais de oxalato de cálcio nas partes reprodutivas e vegetativas aéreas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(supl. 1), pp. 762-764.

PAIVA, E. A. & MACHADO, S. R. (2006). Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology*, 66(1), pp. 301-308.

PAIVA, É. A. & MACHADO, S. R. (2006). Ontogenesis, structure, and ultrastructure of *Hymenaea stignocarpa* (Fabaceae: Caesalpinoideae) colleters. *Revista de Biología Tropical*, 54(3), pp. 943-950.

Paiva, J. G. A. de, Fank-de-Carvalho, S. M., M, M. P., & Graciano-Ribeiro, D. (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica*, 20(2): 257-264.

PIZZOLATO, T. D. & LILLIE, R. D. (1973). Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 21, pp. 56-64.

RIO, M. S., CASTRO, M. M. & KINOSHITA, L. S. (2002). Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 25(3), pp. 339-349.

RODRÍGUEZ, M. H. & GALLEGU, A. S. (1999). Tratado de nutrición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1496 p.



- SANT'ANNA-SANTOS, B. M.; THADEO, M.; MEIRA, R. M. S. A. & ASCENSÃO, L. (2006). Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*, 30(3), pp. 481-489.
- SILVA, C. & BRAGA, M. R. (2004). Liberação e atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em rubiáceas. *Revista Brasileira de Botânica*, 27(2), pp. 379-393.
- SIMÕES, A. O. & KINOSHITA, L. S. (2002). The Apocynaceae *s. str.* of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. *Darwiniana*, 40(1-4), pp. 127-169.
- SHENDKAR, C. D.; CHANDRACHOOD, P. S.; PAWAR, A. B.; LAVATEI, S. M. & DESHPANDE, N. R. (2011). Quantitative estimation of macro, micro nutrients and trace elements by X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) from *Achyranthes aspera* Linn. *International Journal of Chemical Technology Research*, 3(2), pp. 610-613.
- SPINA, A. P. (2004). Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. *ex* Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae). (Tese de Doutorado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 197p.
- SUBRAMANIAN, R., MURUGAN, V., MOHAN, J. & INAMDAR, J. (1989). Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Plant Science*, 99(5), pp. 423-429.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. (1990A). Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton Annales Rei Botanicae*, 30 (2), pp. 209-336.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. (1990B). Structure and necrosis of stipular colleters in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). *Belgian Journal of Botany*, 123, pp. 67-72.
- THOMAS, V., DAVE, Y. & MENON, A. (1989). Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata*. *Nordic Journal of Botany*, 8(5), pp. 493-496.
- THOMAS, V. (1991). Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany*, 68, pp. 287-305.
- TOMAZ, M. A., SILVA, S. R., SAKIYAMA, N. S. & MARTINEZ, H. (2003). Eficiência de absorção, translocação e uso de cálcio, magnésio e enxofre por mudas de *Coffea arabica*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27, pp. 885-892.
- VIANA, J. S. (2009). Caracterização anatômica, morfológica e química de quimiotipos de *Ocimum gratissimum* Lineu. (Dissertação de Mestrado). Brasília: Universidade de Brasília. 78p.
- VITARELLI, N. C. & SANTOS, M. (2009). Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 23(4), pp. 923-928.

VOLK, G. M., LYNCH-HOLM, V. J., KOSTMAN, T. A., GOSS, L. J. & FRANCESCHI, V. R. (2002). The role of druse and raphide calcium oxalate crystals. *Plant Biology*, 4, pp. 34-45.

## CAPÍTULO 2

**Caracterização das secreções dos coléteres de *Himatanthus obovatus*, *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae), *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (Rubiaceae), quantificação dos compostos secretados por três espécies e evidências de seu papel ecológico**

**Resumo.** Coléteres são estruturas que secretam mucilagem, entre outras substâncias. Lubrificar gemas e combater herbívoros e patógenos são funções apontadas para suas secreções, mas com poucas evidências experimentais que as comprovem. Estas glândulas são encontradas na face adaxial dos pecíolos de *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.) Woodson e *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), bem como em estípulas de *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K. Schum. (Rubiaceae). O objetivo do presente trabalho é buscar evidências experimentais do papel dos coléteres, por meio de observações ecológicas, identificando a natureza química e quantidade das secreções e, quando possível, testar sua ação biológica. Para tanto, observações de campo foram anotadas e registradas em fotografias e filmes, especialmente em *H. obovatus*. Foram realizados testes histoquímicos em cortes das glândulas obtidos em micrótomo. Ramos de três indivíduos de quatro espécies foram coletados. As secreções foram removidas das glândulas e liofilizadas. A matéria seca foi pesada e foram realizados os testes bioquímicos para proteínas totais, para açúcares solúveis totais e análise em cromatografia de troca iônica de alto desempenho. Realizaram-se bioensaios com secreções de duas espécies de plantas e os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* (Mart.) Sacc and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Os testes histoquímicos revelaram a presença de pectinas, substâncias lipídicas e proteínas nas secreções dos coléteres das quatro espécies. Açúcares redutores foram verificados em *H. obovatus* e *T. solanifolia* e alcalóides em *P. rigida* e compostos fenólicos em *T. solanifolia*. A metodologia de obtenção das secreções foi muito satisfatória, sendo vantajoso seu uso em estudos fitoquímicos. As maiores quantidades de secreção obtidas foram de 500 mg para *T. formosa*. As quantidades médias de matéria seca das secreções, seus açúcares solúveis totais e proteínas foram, respectivamente, para cada espécie: *H. obovatus* – 0,68 mg/pecíolo, 69,2 µg/mg e 82,9 µg/mg; *P. rigida* – 162,6 mg/gema, 76,8 µg/mg e 1,09 µg/mg; *T. formosa* – 13,8 mg/gema, 174,2 µg/mg e 89 µg/mg (quantidades por mg de secreção). Os monossacarídeos detectados foram fucose nas três espécies analisadas e manose, arabinose e xylose em *H. obovatus*. Os bioensaios mostraram diferenças discretas, mas significativas entre o controle e o tratamento com as secreções. Formigas foram encontradas nos pecíolos de *H. obovatus*, onde permaneceram paradas e secreção foi constatada em seu aparelho bucal. Defesa do território também foi um comportamento observado. Os resultados indicam que as secreções dos coléteres estudados são de natureza química complexa, onde mucilagens, lipídios, proteínas e açúcares solúveis estão presentes. Os coléteres encontrados em *H. obovatus*, cujas secreções apresentaram as menores quantidades de açúcares solúveis e as maiores quantidades de fucose, estabelecem relações interespecíficas entre esta planta e várias espécies de formigas, que podem estar utilizando

suas secreções como fonte alimentar, ou outra finalidade. O significado ecológico e evolutivo dos resultados é discutido.

**Palavras-chave:** açúcares solúveis, proteínas, fucose, ecologia, formigas, secreções.

**Abstract.** Colleters are structures which secrete mucilage, among other substances. Lubrication of buds and combat to herbivores and pathogens are functions attributed for their secretions, but with few experimental evidences that testified them. These glands are found on the adaxial side of the petioles of *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson and *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), as well as in stipules of *Palicourea rigida* Kunth and *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K. Schum. (Rubiaceae). The objective of this study is to find experimental evidences of the function of the colleters through ecological observations, identifying the chemical nature and quantifying the secretions and, when it's possible, testing their biological action. To this end, field observations were noted and recorded in photographs and films, especially in *H. obovatus*. Histochemical tests were performed on sections of glands obtained in microtome. Branches of four individuals from three species were collected. The secretion of the glands were removed and lyophilized. The dry matter was weighed and biochemical tests were performed: for total protein, for total soluble sugars and analysis on ion exchange chromatography of high-performance. Bioassays were made with secretions from two species of plants and the phytopathogenic fungi *Fusarium solani* (Mart.) Sacc and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Histochemical tests revealed the presence of pectins, lipid substances and proteins in the secretions of the colleters of the four species. Reducing sugars were found in *H. obovatus* and *T. solanifolia*, lignins and alkaloids in *P. rigida* and phenolic compounds in *T. solanifolia*. The methodology of obtaining secretion was very satisfactory and its use advantageous use in phytochemical studies. The largest amounts of discharge were obtained 500 mg of *T. formosa*. The average quantities of dry matter of the secretions, their total soluble sugars and proteins were, respectively, for each species: *H. obovatus* – 0.68 mg/petiole, 69.2 µg/mg and 82.9 µg/mg; *P. rigida* – 162.6 mg/gema, 76.8 µg/mg and 1.09 µg/mg; *T. formosa* – 13.8 mg/gema, 174,2 µg/mg and 89 µg/mg (mg quantities by secretion). Fucose in the three analyzed species and mannose, arabinose and xylose in *H. obovatus* were the detected monosaccharides. The bioassays showed slight and significant differences between control and the treatment with the secretions. Ants were found on the petioles of *H. obovatus*, where they remained stopped and secretion was found in its mouthparts. Territorial defense behavior was also observed. The results indicate that secretions from the studied colleters have complex chemical nature, where mucilages, lipids, proteins and soluble sugars are present. Colleters found in *H. obovatus*, whose secretions had the lowest amounts of soluble sugars and higher amounts of fucose, establish interspecific relationships between this plant and several ant species that may be using their secretions as a food source, or other purpose. The evolutionary and ecological significance of all results is discussed.

**Key words:** ants, ecology, fucose, glands, mutualism, secretions, soluble sugars, proteins.

## Introdução

Diversas são as substâncias presentes nas secreções de glândulas vegetais. Testes histoquímicos ajudam a identificar o composto mais abundante, possibilitando relacionar a estrutura secretora com sua possível função no corpo do vegetal (Rio *et al.* 2002). Isto é essencial para o estabelecimento da identidade da glândula.

No caso dos coléteres, análises químicas identificaram mucilagem para quase todas as espécies investigadas e isto é o que tipifica estas estruturas secretoras, conforme Thomas (1991) salientava. Adicionalmente, têm sido assinalados outros compostos nas secreções dos coléteres, tais como proteínas, lipídios (Mohan & Inamdar 1968, Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1990; Miguel *et al.* 2006), látex (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000) e sais (Thomas 1991). A predominância de carboidratos mucilaginosos é o aspecto crítico na identificação destas glândulas (Rio *et al.* 2002; Martins *et al.* 2010).

Mucilagens são heteropolissacarídeos com dois ou mais monômeros diferentes incluindo ácidos urônicos, que produzem diversos compostos após hidrólise, tais como glicose, galactose, manose, arabinose, xylose, ramnose, ácido galacturônico (Gregory & Bass 1988). Presente em grande número de vegetais, as mucilagens estão relacionadas com a retenção de água nos órgãos vegetais que as apresentam (Fahn 1979). Identificar os compostos químicos que ocorrem nas secreções é uma forma de esclarecer o papel real destas glândulas para a planta e para outros organismos com os quais elas interagem em seu hábitat.

A função de proteção contra herbivoria e microorganismos patogênicos é citada para os coléteres (Thomas 1991). As funções são atribuídas devido às características das mucilagens; não existem experiências delineadas para comprovar ou refutar estas funções postuladas na literatura.

Uma forma de avaliar a ação de uma substância sobre um organismo vivo é através da realização de bioensaios. Os bioensaios, também chamados ensaios biológicos, ou biotestes, consistem em um experimento científico que procura investigar os efeitos de uma substância em um órgão isolado ou em um organismo vivo.

Testes biológicos com microorganismos são muito usados no estudo de produtos químicos (Zacaroni *et al.* 2009), assim como extratos vegetais, como uma alternativa ao uso de agrotóxicos, visando identificar seu potencial no combate a doenças em plantas, humanos e outros animais. Eles foram usados na análise da atividade antimicrobiana de extratos de espécie de Lythraceae frente a bactérias multiresistentes (Porfirio *et al.* 2009), na avaliação do efeito fungitóxico do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre os fungos fitopatogênicos



*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum* (Marques *et al.* 2002), e ainda no estudo do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Zacaroni *et al.* 2009).

No capítulo 1, glândulas presentes em *Himatanthus obovatus*, *Tabernaemontana solanifolia* (Apocynaceae), *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) foram caracterizadas como coléteres. Estudos suplementares podem contribuir para o aprofundamento do papel ecológico destas glândulas

## Objetivos

Os objetivos deste trabalho são aprofundar o conhecimento sobre os coléteres encontrados em *Himatanthus obovatus* (Mull. Arg.). Woodson, *Palicourea rigida* Kunth, *Tabernaemontana solanifolia*. A. DC. e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum por meio de estudos ecológicos, bioensaios, identificação da composição das secreções e quantificação dos açúcares e proteínas que as constituem.

## Materiais e métodos

Os estudos foram feitos com plantas situadas no Cerrado do Centro Olímpico da Universidade de Brasília (UnB) coordenadas geográficas, 15°77'62'' de latitude sul, 47°79'66'' de longitude oeste a 1012m de altitude. Exsicatas testemunhas foram confeccionadas e tombadas no Herbário da UnB (UB) com os seguintes números de coleta: *Himatanthus obovatus* coletor R. G. Leite nº de coleta 6, *Palicourea rigida* coletor R. G. Leite nº de coleta 8, *Tabernaemontana solanifolia* coletor R. G. Leite nº de coleta 10 e 11 e *Tocoyena formosa* R. G. Leite nº de coleta 12 e 13. As espécies foram identificadas por comparação com exemplares do acervo UB e consulta à especialista Dra. Sueli Maria Gomes.

## Observações ecológicas

Observações sistemáticas efetuadas no campo com as espécies vegetais em análise revelaram a presença frequente de formigas na espécie *H. obovatus*. Desta forma escolheu-se esta espécie para observação mais detalhada acerca do comportamento destes insetos em plantas da espécie. As observações foram feitas na área de estudo por três dias (23/11/2011;

17/01/2012 e 05/03/2012), no horário de 9-12h da manhã, em 11 indivíduos aleatórios de *H. obovatus*. Os aspectos observados no campo: presença ou não de secreção nos coléteres, presença ou ausência de insetos ou outros animais visitantes próximos às estruturas secretoras e observações sobre seus comportamentos.

Foi feita uma experiência sobre o comportamento das formigas nativas, que naturalmente frequentam as glândulas, frente a formigas domésticas. Para tanto formigas foram coletadas na cozinha do departamento de Botânica usando-se como isca a sacarose, sendo estas recolhidas em sacos de papel e levadas imediatamente ao campo. Os sacos de papel foram abertos, libertando as formigas diretamente sobre os ramos das plantas de *H. obovatus* contendo formigas nativas.

Também foi realizada uma experimentação introduzindo-se uma vareta de madeira na região peciolar contendo secreção, em horários de visitação de formigas.

As observações foram anotadas em caderneta e documentadas em imagens e vídeos, realizados com câmera digital (marca Nikon D3100 18-25 mm). As imagens foram capturadas dos filmes para registrarem a sequência de eventos do comportamento dos insetos. Os filmes foram gravados em CD e anexados a presente dissertação.

Os insetos observados foram coletados, mortos e montados de acordo com as técnicas entomológicas de rotina, no Laboratório de Entomologia do departamento de Zoologia da UnB, com auxílio do Dr. Antônio José Camillo de Aguiar, sendo enviados para identificação pelo especialista Dr. Rodrigo dos Santos Machado Feitosa do Museu Zoológico da Universidade de São Paulo.

### **Caracterização histoquímica das secreções**

Amostras do pecíolo ou estípula foram coletadas de ao menos quatro indivíduos por espécie de *Himatanthus obovatus*, *Palicourea rigida*, *Tabernaemontana solanifolia* e *Tocoyena formosa*, sendo estocadas em água destilada em geladeira por até uma semana. Os coléteres foram isolados sob lupa, seccionados em micrótomo tipo Ranvier, colocados sobre vidro relógio e submetidos aos testes histoquímicos baseados nos manuais de Kraus & Arduim (1997) e Ascenção (2003). Alguns cortes foram utilizados como branco. Os testes realizados encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Testes histoquímicos realizados em coléteres adultos de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.) K. Schum. (Rubiaceae) e respectivos grupos de compostos que identificam.

Testes	Compostos identificados	Autor
Vermelho de rutênio	substâncias pécticas	Luft 1971
Sudan IV	compostos lipídicos	Gerlach 1984
Vanilina clorídrica	taninos	Mace e Howell, 1974
Azul brilhante de Coomassie	proteínas totais	Gahan 1984
Reagente de Dittimar	alcalóides	Furr & Mahlberg 1981
Fehling	Açúcares redutores	Purvis <i>et al.</i> 1964

Os cortes pertencentes a pelo menos quatro indivíduos foram submetidos a cada teste, foram confeccionadas quatro lâminas de cada um dos quatro indivíduos para cada espécie vegetal sendo feitos os brancos de cada indivíduo, sendo todos os cortes montados com glicerina aquosa 50%, para observação e registro imediato das imagens sob fotomicroscópio (marca Zeiss Axioscop), acoplado a microcomputador com sistema de captura de imagens do programa LA EZ 2.0.

## Composição química e quantificação das secreções

### Obtenção e quantificação das secreções

Os Ramos das quatro espécies foram coletados na área de estudo. Foram utilizados ao menos quatro indivíduos de cada espécie. As regiões contendo coléteres foram lavadas em água destilada e o material foi recolhido em béquer. As secreções não removidas pela água, que se mantiveram retidas nos coléteres, foram lavadas com acetona e o material foi recolhido. Em *P. rigida*, as estruturas foram deixadas de molho em água destilada por 24h, para amolecimento e remoção das secreções. A escolha dos solventes foi baseada em experiências prévias acerca do solvente mais eficiente e menos tóxico e com base em trabalhos que avaliam a solubilidade da secreções dos coléteres.

As secreções recolhidas pela lavagem com água foram transferidas para tubos falcon, e congeladas para posterior processamento. As porções recolhidas em acetona também foram transferidas para tubos falcon, identificadas, cobertas com gazes e colocadas em repouso no interior de capela de fluxo laminar para secagem da acetona, sendo suspensas depois em água Mili-Q. As duas porções foram misturadas e liofilizadas por 48h, pesadas e armazenadas em eppendorfs em geladeira, até o momento das análises bioquímicas. A secreção liofilizada gerou um pó seco, que foi pesado, e dele foram retirados 10 mg referentes a cada um dos três indivíduos, para cada uma das espécies.

### **Quantificação de proteínas totais**

A quantificação de proteínas contidas nas secreções foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Misturou-se 10 mg de cada uma das três amostras liofilizadas de cada espécie com 2 mL de água Mili-Q. A mistura foi homogeneizada em vortex por 2 min. Retirou-se 50  $\mu$ L de cada solução-amostra e adicionou-se 750  $\mu$ L de água Mili-Q e 200  $\mu$ L de solução de Bradford.

A curva padrão foi elaborada com albumina de soro bovino aquosa ("bovine serum albumin", BSA), a partir de solução estoque de 1 mg/mL, com seis diluições sucessivas até a concentração zero: 160, 80, 40, 20, 10, 5, 0  $\mu$ g/mL. Misturou-se 800  $\mu$ L destas soluções com 200  $\mu$ L de solução de Bradford.

A leitura destas soluções foi feita em espectrofotômetro (marca Genesys 2). Como branco, foi utilizada uma solução com 800  $\mu$ L de água milli-Q e 200  $\mu$ L de solução de Bradford. Após comparação com a curva padrão, calculou-se a quantidade de proteínas por amostra.

### **Quantificação de açúcares solúveis totais**

A extração dos açúcares solúveis totais (AST) foi realizada segundo a metodologia modificada de Dubois *et al.* (1956). As amostras foram novamente liofilizadas para retirada da água e posteriormente adicionaram-se 500  $\mu$ L de etanol 80%, em banho Maria a 50°C por 15 min, em seguida centrifugaram-se as amostras a 13000 rpm por 10 min (centrífuga marca Eppendorf Centrifuge 5415 R) e coletou-se o sobrenadante. Repetiu-se o procedimento por quatro vezes, completando assim 2 mL de sobrenadante, que corresponde à fração solúvel em etanol. Os sobrenadantes foram secos em concentrador rotativo à vácuo (marca Eppendorf AG 22331) e ressuspensos em 2 mL de água Mili-Q. Posteriormente, empregando-se 40  $\mu$ L

de solução aquosa e 460 µL de água Mili-Q, adicionou-se 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro (marca Genesys 2), com comprimento de onda igual a 490 nm. Elaborou-se uma curva padrão comparativa a partir de solução de glicose de 1 mg/mL com concentrações crescentes (0, 5, 20, 40, 80 e 160 µL/mL) utilizando a mesma metodologia empregada para as amostras com as secreções.

### **Análise qualitativa de monossacarídeos por cromatografia**

Os açúcares insolúveis das amostras foram analisados quanto à qualidade e quantidade de monossacarídeos, a partir das frações das amostras não solúveis em álcool, obtidas no teste AST. Para tanto, procedeu-se novamente a liofilização das secreções, seguida pela hidrólise ácida dos açúcares não solúveis segundo metodologia modificada de Saeman *et al.* (1945).

A hidrólise ácida consistiu de adição de 0,1 mL de ácido sulfúrico 72% às amostras. O material foi mantido em banho Maria a 30°C, por 45 min. As amostras foram diluídas a 4% adicionando 1,7 mL de água, transferidas para tubos de ensaio vedados com bolas de gude, sendo hidrolisadas por 1 h em autoclave a 120°C. Terminado o processo de hidrólise, as amostras foram neutralizadas usando hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M até alcançar o pH 7 e congeladas para serem liofilizadas.

Após a neutralização das amostras, elas foram purificadas em colunas de troca iônica, utilizando-se a resina catiônica Dowex 50x8 100-200 mesh e aniônica Dowex 1x8 52-100 mesh para retenção dos sais e recolhimento das secreções em tubos falcon. Após a purificação, as amostras foram liofilizadas por 48h e ressuspensas em 500 µL de água MilliQ.

A composição dos açúcares insolúveis foi determinada por cromatografia de troca iônica de alto desempenho, com detector de pulso amperométrico HPAEC-IPAD modelo ICS3000 (marca Dionex Sunnyvale, Califórnia, USA), com pós-coluna CarboPac™ PA10 2 X 250 mm (marca Dionex Corp, Sunnyvale, , USA), usando-se gradiente de eluição com 200 mM de NaOH em água (20 min). Foram utilizadas alíquotas de 500 µL de cada amostra. As respostas do detector foram comparadas com os padrões para fucose, arabinose, ramnose, galactose, glicose, xilose e manose. A curva-padrão para cada tipo de açúcar foi usada para calcular os conteúdos de carboidratos nas amostras com o programa Chromeleon Software 7.1

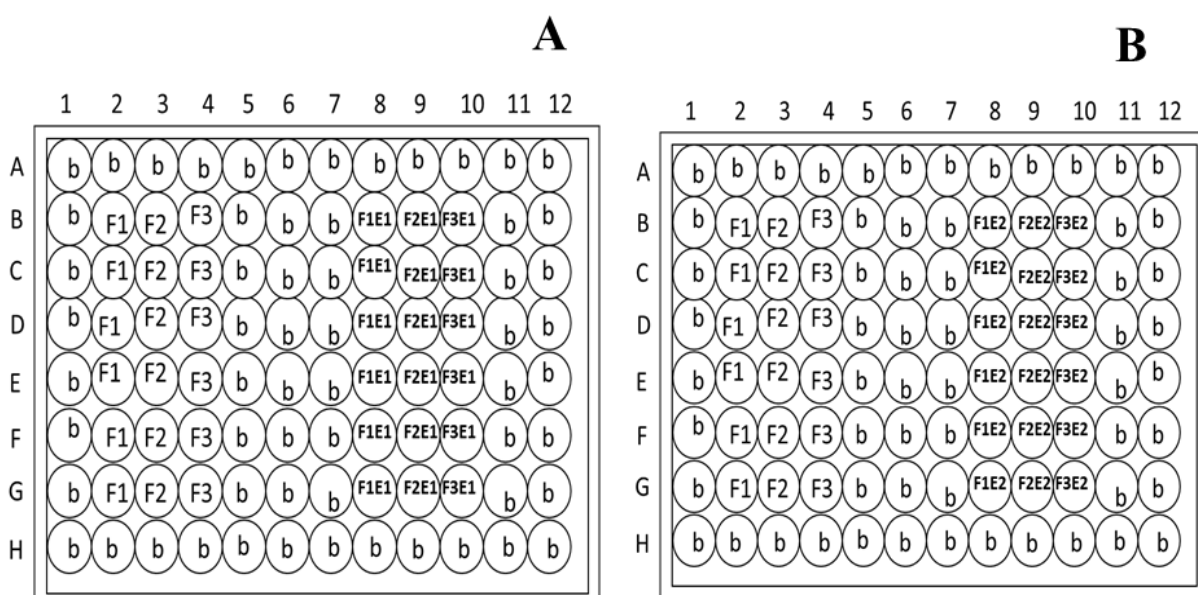
### **Bioensaios com as secreções de *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa***

A quantidade de secreções obtida a partir dos coléteres de *Palicourea rigida* e de *Tocoyena formosa* possibilitou a realização de bioensaios. A metodologia usada baseou-se em Alves & Faria (2010) e Broekaert *et al.*(1989).

As colônias puras dos fungos fitopatogênicos utilizadas foram obtidas a partir da Coleção Micológica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados. Foram selecionadas as seguintes espécies de fungos: *Fusarium solani* identificado como (F1) e duas cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* isoladas de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. e *Stylosanthes* sp., identificadas como fungos F2 e F3, respectivamente.

A suspensão de cada fungo foi feita colocando-se 3 mL de solução salina sobre as colônias, que foram raspadas com auxílio de espátula esterilizada. A mistura obtida foi filtrada com gaze adaptada a um béquer. As suspensões foram homogeneizadas e efetuou-se a contagem do número de esporos por mL de solução com auxílio de câmara de Neubauer, examinada sob microscópio óptico. As concentrações dos esporos foram ajustadas para  $1,9 \cdot 10^7$  (F1),  $2 \cdot 10^6$  (F2) e  $1,9 \cdot 10^7$  (F3) conídios por mL de solução salina.

Dois ensaios biológicos foram realizados. O primeiro foi feito com a secreção de *P. rigida*, identificada como extrato 1, e o segundo, com a secreção de *T. formosa*, identificada como extrato 2. Eles foram montados em placas de Elisa retangulares, contendo 96 poços redondos. Cada três fileiras de cada placa foram preenchidas com tratamento controle contendo somente alíquota de 50 µL de da suspensão de fungos em solução salina e 50 µL de solução salina; outras três fileiras foram preenchidas cada uma com 50 µL de suspensão de fungos em solução salina de cada fungo e 50 µL de secreção aquosa; os demais poços constituíram de solução salina apenas, conforme esquematizado na Figura 1. Foram seis repetições de cada um dos três fungos, com cada uma das secreção das duas espécies, e os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando  $6 \times 1 \times 2 \times 3 \times 3 = 108$  unidades experimentais analisadas. Tal procedimento foi efetuado no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo dos bioensaios com extratos de coléteres testados frente aos fungos. **A.** Extratos de *Palicourea rigida*. **B.** Extratos de *Tocoyena formosa*. Abreviações: **b**= branco (solução salina); **E1**= extrato de *P. rigida*; **E2**= extrato de *T. formosa*; **F1**= *Fusarium solani*; **F2**= *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Arachis pintoi*; **F3**= *C. gloeosporioides* isolado de *Stylosanthes* sp. **b**= branco (solução salina).

As características dos fungos usados estão indicadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fungos utilizados nos bioensaios e suas características.






Espécie	Identificação	Algumas doenças causadas pelos fungos
<i>Fusarium solani</i>	F1	Podridão radicular em <i>Hancornia speciosa</i> Gomes (Anjos <i>et al.</i> 2007)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	F2/F3	Antracnose em <i>Carica papaya</i> L.(Dikman & Alvarez 1983), <i>Persea americana</i> Mill L (Soares <i>et al.</i> 2008) e <i>Stylosanthes</i> spp. (Vieira <i>et al.</i> 2007).

# Resultados

## Observações ecológicas

A região peciolar dos indivíduos de *Himatanthus obovatus*, onde os coléteres estão presentes, recebeu a visita constante de diferentes tipos de himenópteros, conforme listado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Características das espécies de insetos visitantes dos ramos de *Himatanthus obovatus* e da espécie introduzida.

Insetos	Nº da espécie	Cor	Comprimento
			Cabeça/ abdômen
	Formiga <i>Ectatomma brunneum</i> F. Smith sp. 1	preta	Ligeiramente menor
	Formiga sp. 2	preta	semelhante
	Formiga sp. 3	cinzenta (prateada)	semelhante
	Formiga <i>Camponotus blandus</i> Fr. Smith sp.4	Corpo castanho- claro e cabeça preta	menor
	Formiga sp. 5	vermelha	maior

\*Espécie introduzida durante o experimento.

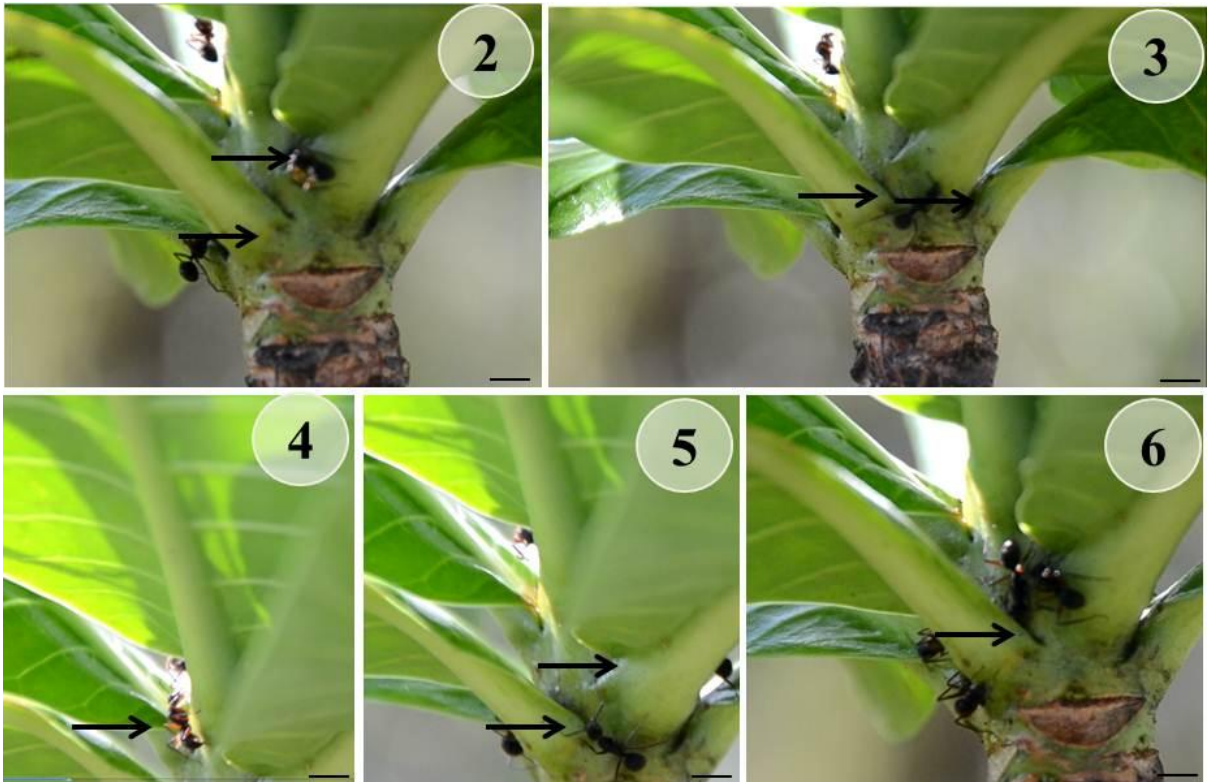
O comportamento, número de tipos diferentes de himenópteros e a quantidade de plantas observadas estão mostrados na Tabela 4.

As formigas representadas como espécie 1 e 4 (sp. 1 e sp. 4) foram identificadas como *Ectatomma brunneum* F. Smith, subfamília: Ectatomminae tribo: Ectatommini e *Camponotus blandus* Fr. Smith subfamília: Formicinae Tribo: Camponotini, respectivamente.

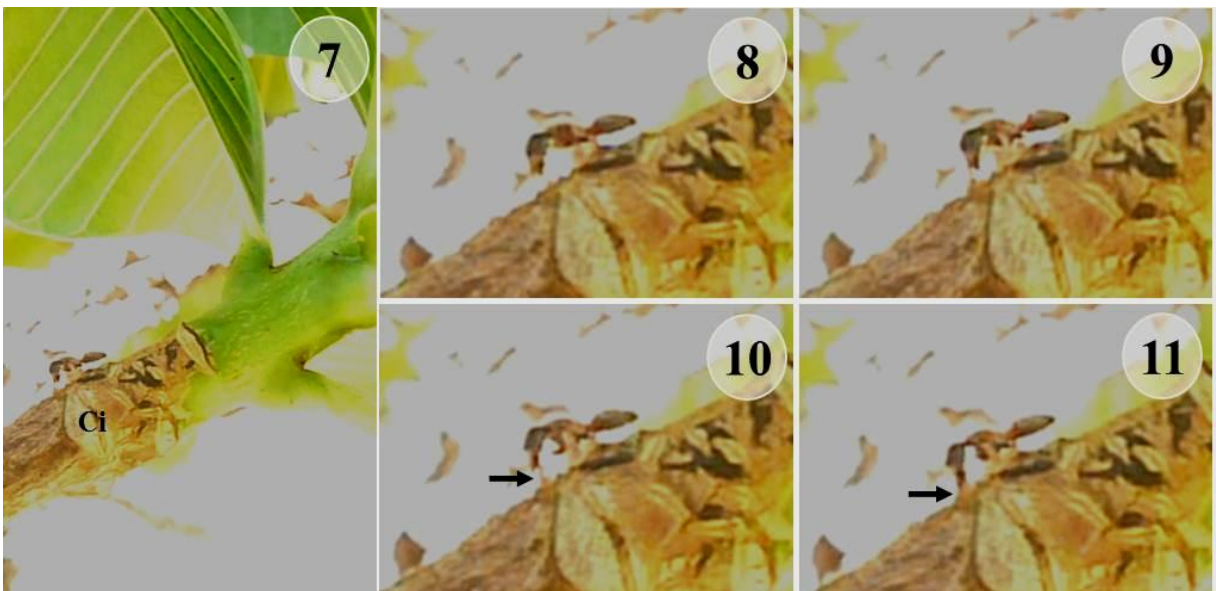


**Tabela 4.** Comportamentos de diferentes tipos de formigas que visitaram 11 indivíduos de *Himatanthus obovatus* observados em três dias diferentes.

<b>Data: 23/11/2011 (9h20min-12h)</b>	<b>Tipos de formigas</b>	<b>Nº de indivíduos de <i>H. obovatus</i> observados</b>
<b>Comportamentos</b>		
Aproximam-se dos coléteres e das secreções com aparelho bucal e ficam paradas.	<b>2</b>	<b>5</b>
Lutam na região peciolar.	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Data: 17/1/2012 (9h20min-12h)</b>	<b>Tipos de formigas</b>	<b>Nº de indivíduos de <i>H. obovatus</i> observados</b>
<b>Comportamentos</b>		
Aproximam-se dos coléteres e das secreções com aparelho bucal e ficam paradas.	<b>3</b>	<b>7</b>
Andam pelas folhas.	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Data: 5/3/2012 (9h20min-12h)</b>	<b>Tipos de formigas</b>	<b>Nº de indivíduos de <i>H. obovatus</i> observados</b>
<b>Comportamentos</b>		
Aproximam-se dos coléteres e das secreções com aparelho bucal e ficam paradas.	<b>3</b>	<b>7</b>
Andam pelas folhas.	<b>1</b>	<b>1</b>
Expulsam organismos diferentes que se aproximam da região peciolar.	<b>1</b>	<b>1</b>



**Figuras 2-6.** Formiga sp. 1 visitando a região peciolar de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. **Setas** indicam as formigas e a região visitada. As formigas que permanecem paradas ao lado dos coléteres aparentemente raspam a região com seu aparelho bucal (**Fig. 2-6**). Filmado em 5/04/2012, às 11h00 min, duração: 47s.



**Figuras 7-11.** Formiga sp. 4 raspando secreções dos coléteres em *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. **7.** Vista geral do ramo com formiga parada perto da cicatriz foliar (Ci). **8-11.** Sequência de movimentos: formiga levanta a cabeça (**8**), abaixa-a (**9**), fecha o aparelho bucal, levantando a secreção (**10**, seta) e abaixa a cabeça novamente, raspando mais secreção (**11**, seta). Filmado em 17/01/2012, às 9h40min, duração: 4min.



**Figuras 12-14.** Formigas nas secreções dos coléteres na região da gema de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. Formiga sp. 3 na secreção (**12, seta branca**). Outra formiga semelhante à sp. 3 aproxima-se (**13, seta azul**), as duas formigas, próximas, permanecem imóveis na secreção (**14**). Filmado em 17/01/2012, às 9h51min, duração: 1min33s. Abreviação. **Sec:** secreção.

Outros comportamentos, como a movimentação ao longo da planta, sobretudo na lâmina foliar, a luta entre formigas e a presença de formigas cortadeiras também foram notados (Tabela 4, Fig.15-36).



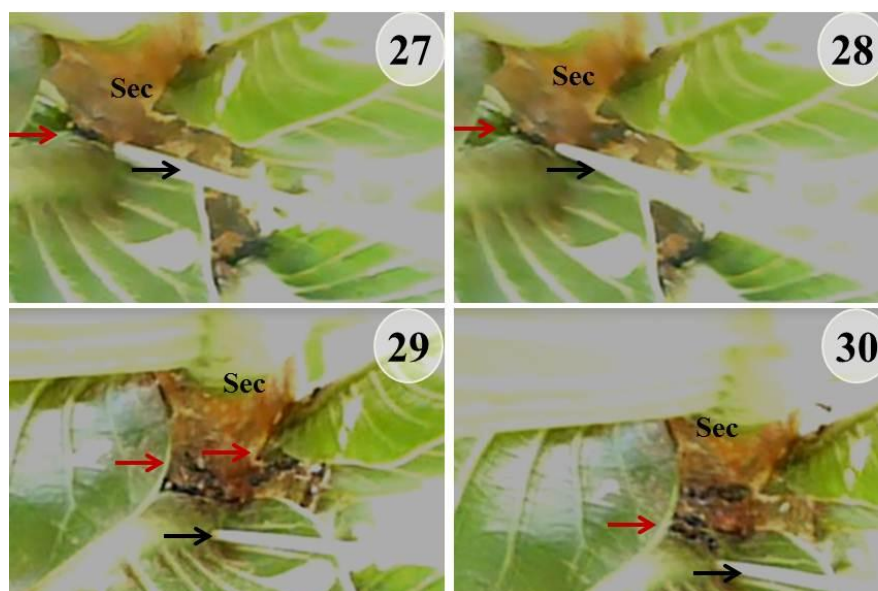
**Figuras 15-17.** Formiga sp. 2 anda pela lâmina da folha de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. A formiga (**seta preta**) subiu e desceu na folha. Filmado em 5/03/2012 às 10h00min, duração: 20s.

Na experiência em que formigas domésticas foram colocadas na região peciolar de *H. obovatus*, constatou-se que as formigas nativas lutaram e mataram as formigas introduzidas (Fig. 18-26).

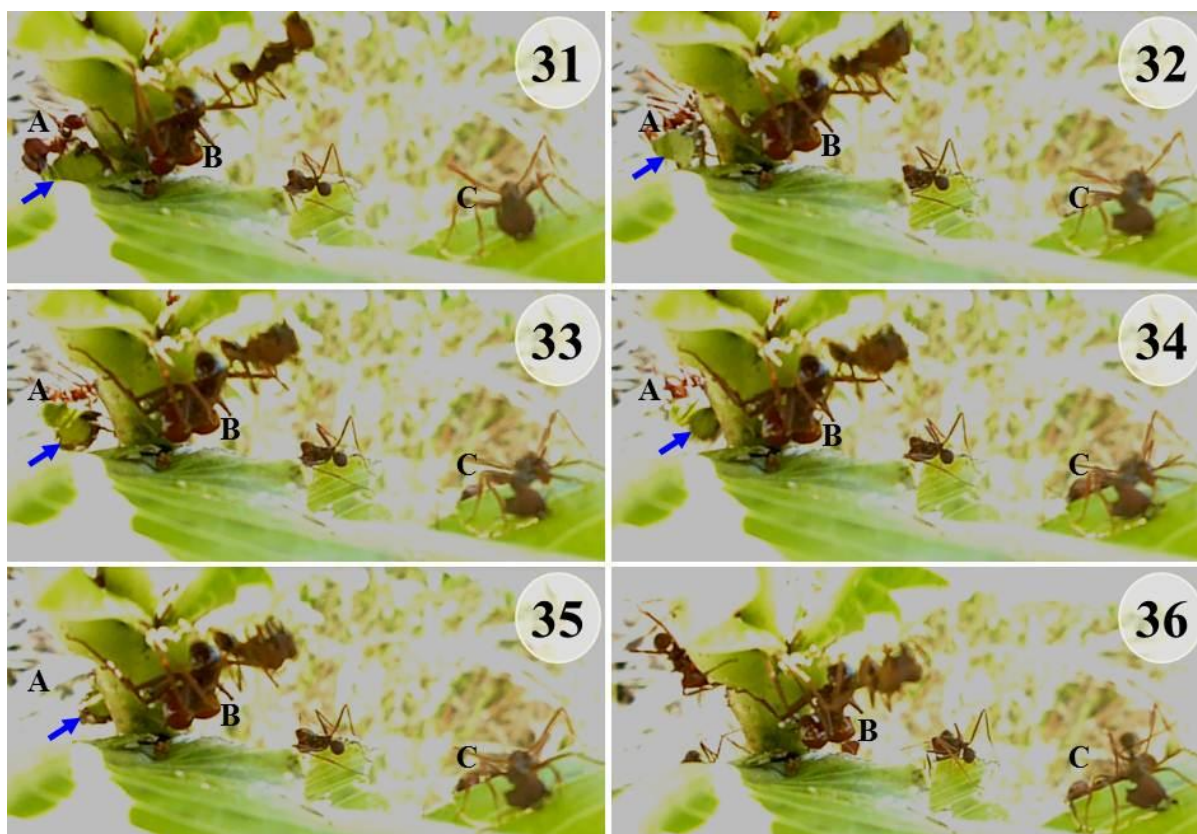




**Figuras 18-26.** Formigas lutam em ramo de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. Formiga A (sp. 4) aproxima-se da formiga B, que é a espécie doméstica introduzida no ramo (sp. 6), estica rapidamente o corpo (19), ataca e domina a formiga B (20-21). Formiga C (sp. 2) surge (22) e foge rapidamente (23-24), acompanhada pelo movimento de cabeça da formiga A, que abandona o corpo da formiga B (22). Formiga B jaz na folha, enquanto a formiga A vasculha freneticamente a região (25-26). Filmado em 05/03/2012, às 10h32min (21s).



**Figuras 27-30.** Formigas não recuam diante do objeto introduzido na secreção (Sec) de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. A vareta (27, **seta preta**) é inserida perto da secreção e da formiga sp. 3 (**seta vermelha**). As formigas não recuam diante do movimento da vareta e avançam várias vezes contra a mesma (28-30). Filmado em 23/11/2011 às, 9h: 21 min, 1 min 44s.



**Figuras 31-36.** Formigas da sp. 5 cortam folhas e raspam secreções em *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson. Formiga A corta um pedaço da lâmina foliar (31, seta azul), e o transporta para outra região (32-35). A formiga B, de maior tamanho, fica parada, com sua cabeça voltada para região peciolar (35-36), onde estão as glândulas e sem lâmina foliar ao seu alcance. A formiga C efetua corte semi-circular na folha com dificuldade. Filmado em 05/03/2012, às 10h 32 min, 21s.

### Testes histoquímicos

Os coléteres de três espécies reagiram positivamente ao reagente de sudan IV para detecção de lipídios (Tabela 5), estas foram: *Himatanthus obovatus* (Fig. 37-38), *Palicourea rigida* (Fig.39-40) e *Tocoyena formosa* (Fig. 42-43). O resultado foi mais intenso em *P. rigida* e *H. obovatus* onde as gotículas coradas de alaranjado se mostram evidentes em células do tecido central parenquimático e na epiderme. Nas espécies *H. obovatus* e *T. formosa* o teste se fez evidente na cutícula e em porções no interior das células formadoras das estruturas (Fig. 37, 42). Em *Tabernaemontana solanifolia* (Fig.41) a reação com sudan IV não se fez evidente. As figuras 44-47 mostram os tratamentos controle para as quatro espécies.

Foi evidenciada a presença de mucilagem pelo reagente vermelho de rutênio Fig. (48-51) em todas as espécies. Sendo que o centro dos coléteres com células parenquimáticas

reagiu de forma mais positiva (Fig. 49-51). O teste para proteínas com azul de coomassie foi positivo para todas as espécies (Fig. 52-55), sobretudo, e de forma mais evidente na epiderme em paliçada em *H. obovatus* (Fig. 52).

Os demais testes executados foram positivos em *H. obovatus* e *T. solanifolia* para açúcares redutores pelo teste de Fehling (Fig. 56-57), de forma que as estruturas apresentaram coloração rósea e ainda em *T. formosa* foi satisfatório o teste para compostos fenólicos, apresentando-se esverdeadas as estruturas (Fig. 58) e em *P. rigida* o teste para alcalóides pelo reagente de Dittimar (Fig. 59).

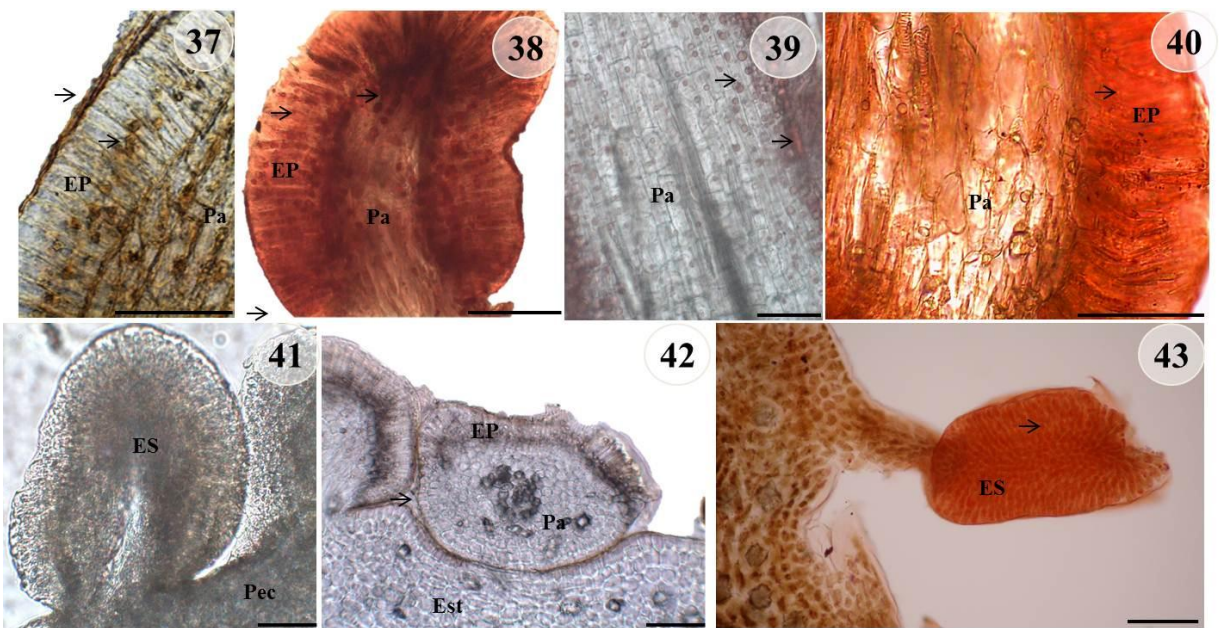
A tabela 5 apresenta os compostos presentes nas estruturas pelos testes histoquímicos realizados.

**Tabela 5.** Resultados dos testes histoquímicos realizados nas glândulas adultas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson, *Tabernaemontana solanifolia* A. DC. (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltld.) K. Schum. (Rubiaceae).

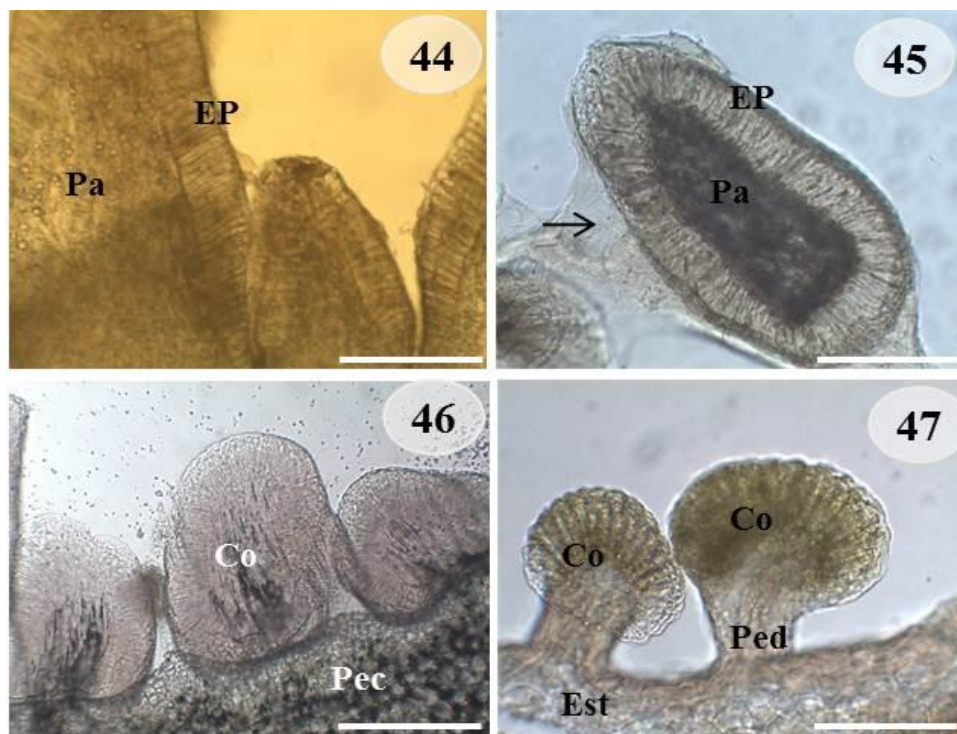
Teste histoquímico	Apocynaceae		Rubiaceae	
	<i>H. obovatus</i>	<i>T. solanifolia</i>	<i>P. rigida</i>	<i>T. formosa</i>
Compostos lipídicos	+	-	+	+
Taninos	-	-	-	-
Substâncias pécticas	+	+	+	+
Proteínas totais	+	+	+	+
Açúcares redutores	+	+	-	-
Compostos fenólicos	-	+	-	-
Alcalóides	-	-	+	-

Reações: (+) positiva; (-) negativa.



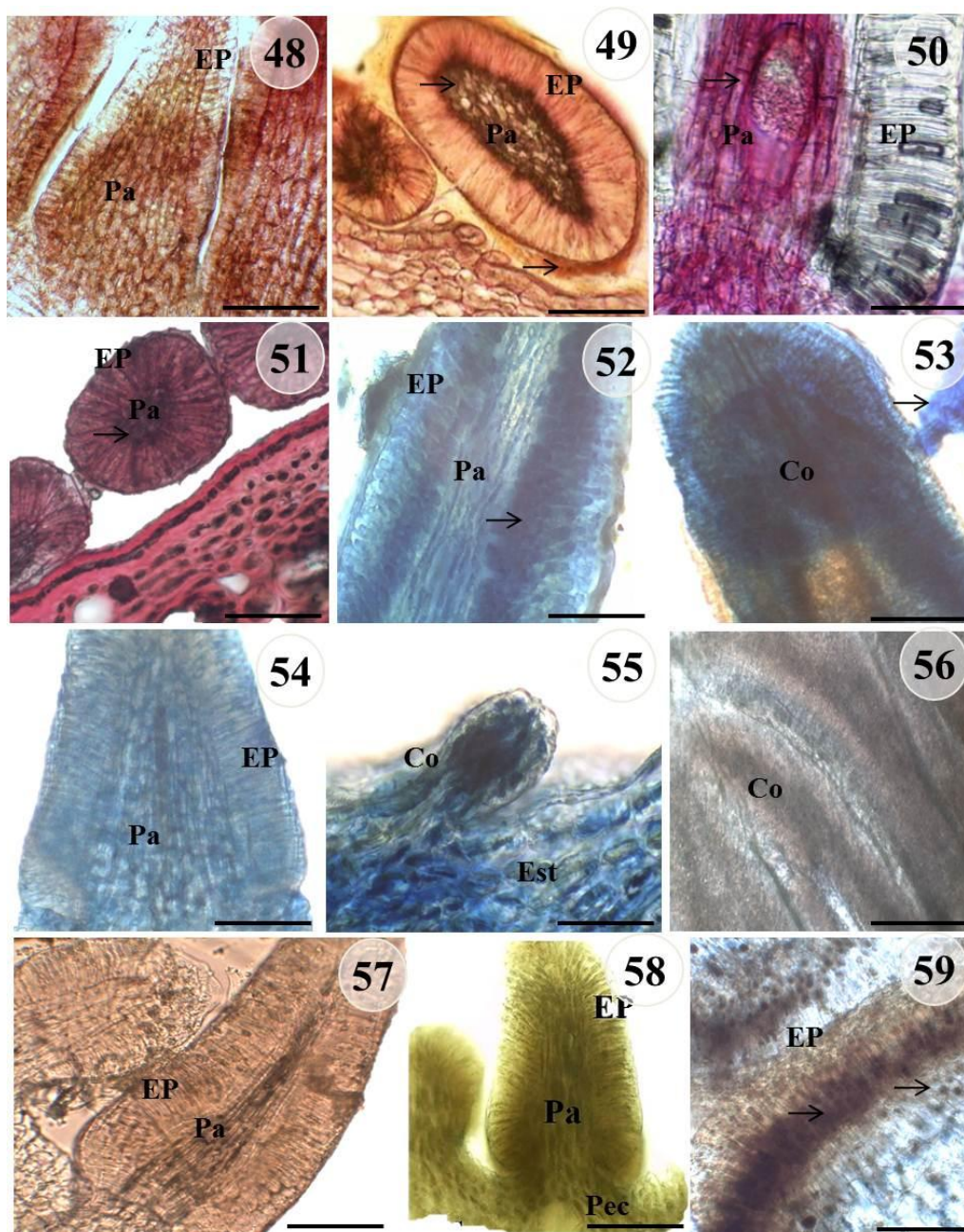


**Figura 37-43.** Testes histoquímicos com sudan IV, realizados nas glândulas. **37-38.** *Himatanthus obovatus*. **39-40.** *Palicourea rigida*. **41.** *Tabernaemontana solanifolia*. **42-43.** *Tocoyena formosa*. Abreviações: **EP:** epiderme em paliçada, **ES:** estrutura secretora, **Est:** estípula, **Pa:** parênquima, **Pec:** pecíolo. **Setas** indicam acúmulo de secreção contendo lipídios. **Escalas:** **37-38=** 70  $\mu\text{m}$ ; **39-40=** 80  $\mu\text{m}$ ; **41=** 100  $\mu\text{m}$ ; **42=** 50  $\mu\text{m}$ ; **43=** 75  $\mu\text{m}$ .



**Figuras 44-47.** Seções transversais e longitudinais das glândulas estudadas, sem coloração (branco). **44.** *Himatanthus obovatus*. **45.** *Palicourea rigida*. **46.** *Tabernaemontana solanifolia*. **47.** *Tocoyena formosa*. Abreviações: **EP:** epiderme em paliçada, **Est:** estípula, **Pa:** parênquima, **Pec:** pecíolo, **Ped:** pedúnculo; **seta=** secreção. **Escalas:** **44=** 150  $\mu\text{m}$ ; **45=** 200  $\mu\text{m}$ ; **46=** 190  $\mu\text{m}$ ; **47=** 100  $\mu\text{m}$ .





**Figuras 48-59.** Testes histoquímicos realizados em coléteres de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum. (Rubiaceae). **48-49** Vermelho de rutênio para compostos pécnicos em *H. obovatus*, *P. rigida*, *T. solanifolia* e *T. formosa*, respectivamente. **50-51.** Vermelho de Rutênio para mucilagem em *T. solanifolia* e *T. formosa*, respectivamente. **52-55.** Azul de coomasie para totais em *H. obovatus*, *P. rigida*, *T. solanifolia* e *T. formosa*, respectivamente. **56.** Fehling para açúcares redutores em *H. obovatus*. **57.** Fehling para açúcares redutores em *T. solanifolia*. **58.** Cloreto férrico para compostos fenólicos em *T. solanifolia*. **59.** Reagente de Dittimar em *P. rigida* para alcalóides. Abreviações: **Co:** Coléter. **EP:** Epiderme em paliçada, **Est:** Estípula, **Pa:** Parênquima, **Pec:** Pecíolo. **Seta** indica reação mais positiva/ secreção. **Escala:** **48=** 50 µm; **49=** 150 µm; **50=** 50 µm; **51=** 150 µm; **52=** 50 µm; **53=** 140 µm; **54=** 70 µm, **55=** 50 µm; **56=** 100 µm; **58-59=** 100 µm.



## Composição química e quantificação das secreções

### Extração das secreções

A metodologia executada para extração de secreção para análises químicas e os bioensaios se mostrou eficiente com o uso de água e acetona.

**Tabela 6.** Quantidade das secreções das glândulas adultas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae).

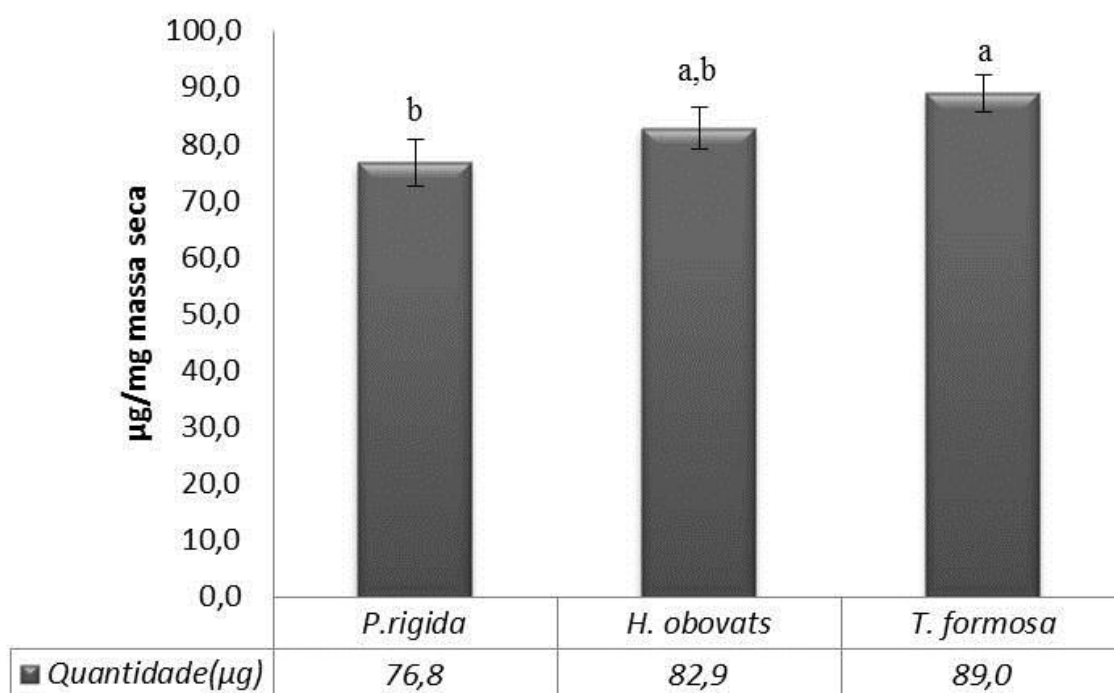
Espécies*	Quantidade de secreção (mg)	Nº regiões analisadas	Quantidade relativa (mg/gema)
<i>H. obovatus</i>	36	54 pecíolos	0,66 mg/pecíolo
<i>P. rigida</i>	500	100 gemas	5 mg/gema
<i>T. formosa</i>	500	36 gemas	13,8 mg/gema

\* *Tabernaemontana solanifolia* A. DC.: quantidade de secreção insuficiente para análise.

Quanto ao aspecto e solubilidade, as secreções de *P. rigida* e *H. obovatus* apresentaram pouca solubilidade em água, sendo um pouco mais solúveis em acetona, sobretudo a secreção de *H. obovatus*. Em *P. rigida*, a melhor técnica foi deixar as estruturas de molho em água para facilitar a soltura da secreção da planta e remoção mecânica das mesmas. A espécie *T. formosa* aparentemente apresenta secreção totalmente solúvel em água.

### Quantificação de proteínas pelo método de "Bradford Assay"

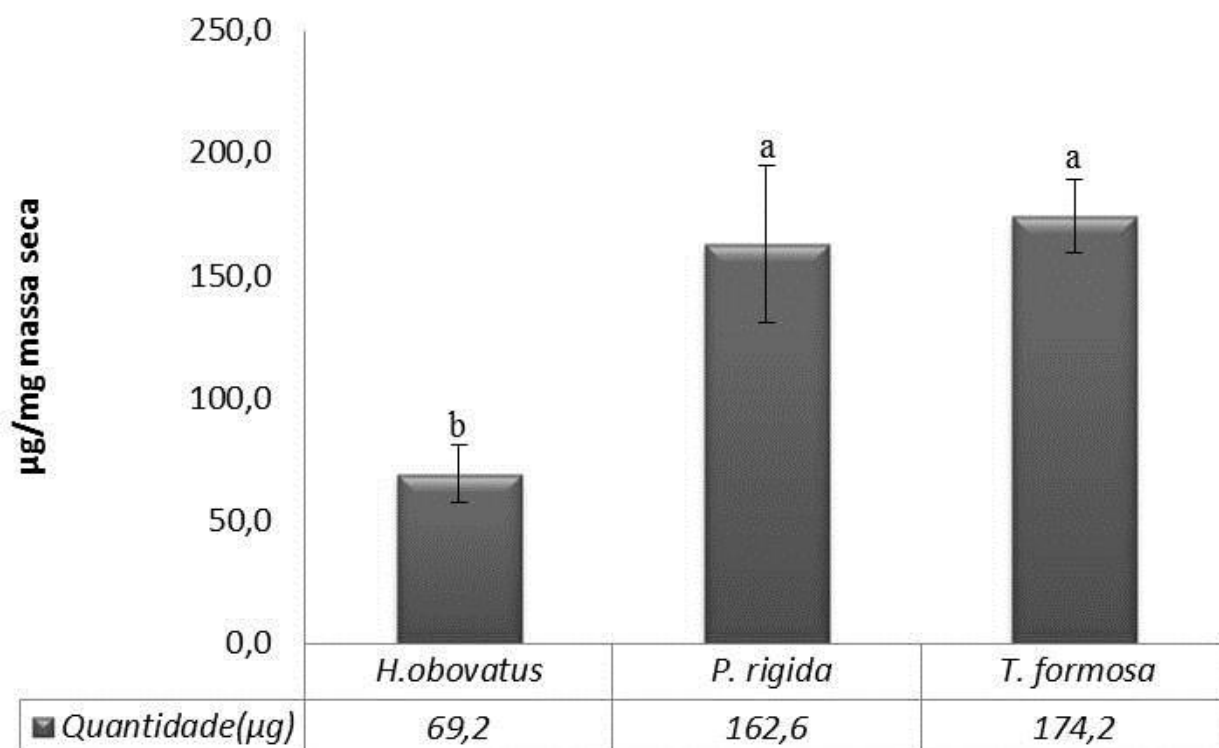
As amostras das secreções dos coléteres das três espécies *Himatanthus obovatus*, *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa* apresentam proteínas. Estes valores corresponderam a 82,9; 76,8 e 89 µg/mg de amostra seca. Considerando-se que o total de massa seca obtida de cada espécie foi 10 mg estes valores corresponderam de 7 a 8% das amostras. O maior valor foi encontrado nas secreções da espécie *T. formosa*. O gráfico da figura 60 ilustra os resultados de proteínas totais obtidas.



**Figura 60.** Quantidade média de proteínas totais obtidas nas secreções glandulares extraídas de *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.). Woodson (Apocynaceae), *Palicourea rigida* Kunth e *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum. (Rubiaceae). Médias com mesma letra são semelhantes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### Quantificação de açúcares solúveis totais

O ensaio de açúcar solúveis totais pelo método fenol-sulfúrico mostrou presença significativa dos açúcares redutores nas amostras das três espécies estudadas. Os valores estão mostrados na figura 61; para *T. formosa* e *P. rigida* os valores foram superiores aos encontrados para proteínas, representando mais de 10% das amostras. Já em *H. obovatus* a quantidade encontrada foi à inferior quantidade de proteínas totais para esta espécie sendo também inferior à quantidade de açúcares solúveis detectada para as demais espécies.



**Figura 61.** Quantidade média de açúcares solúveis obtidas nas secreções glandulares extraídas de *Himatanthus obovatus*, *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa*. Médias com mesma letra são semelhantes pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

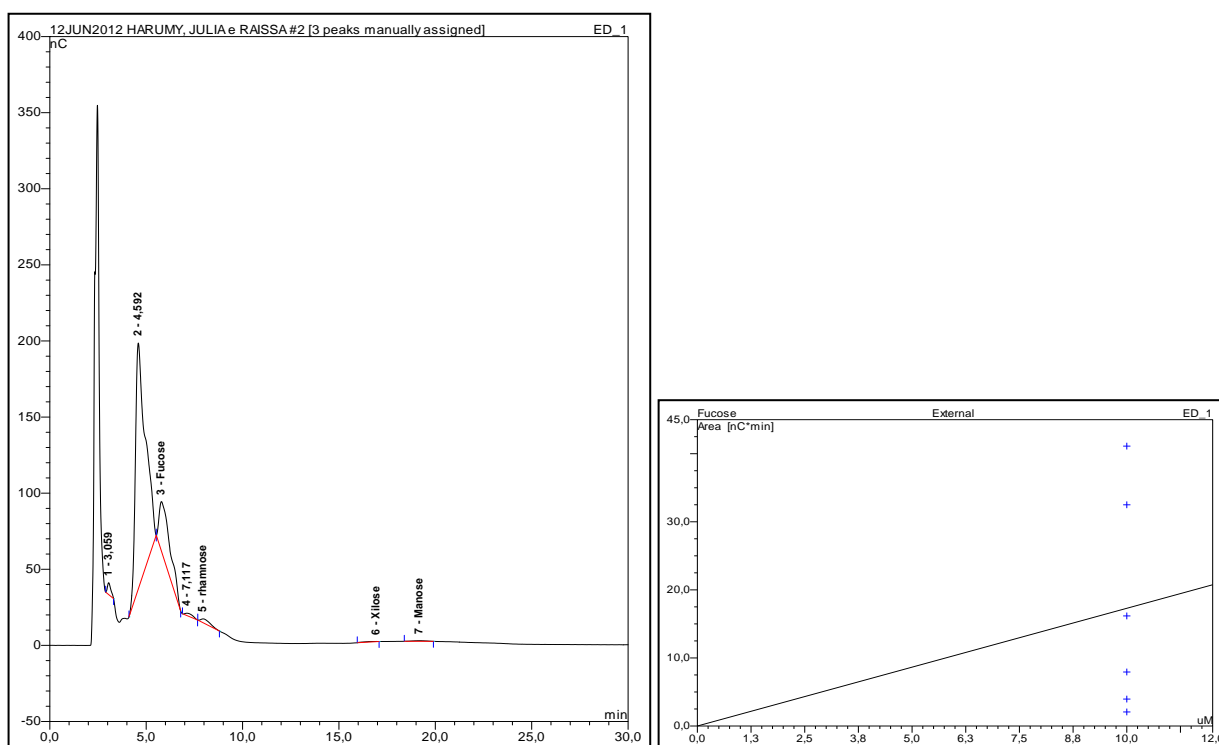
### **Análise qualitativa de monossacarídeos por cromatografia**

Análises de cromatografia indicaram monossacarídeo fucose (Tab. 7) na secreção das três espécies analisadas. Em uma amostra de *H. obovatus* também foi verificada xilose, ramnose e manose (Fig. 62). As maiores quantidades de fucose foram verificadas para *H. obovatus* (Tab. 7).

**Tabela 7.** Quantidade de monossacarídeo fucose detectado por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho.

Espécies e amostras*	Quantidade (nmol/mg massa seca)**
<i>H. obovatus</i> (HO1)	5,766 ( $\pm$ 3,05)
<i>H. obovatus</i> (HO2)	5,242( $\pm$ 3,05)
<i>H. obovatus</i> (HO3)	0,225( $\pm$ 3,05)
<i>P. rigida</i> (PR1)	0,17( $\pm$ 0,015)
<i>P. rigida</i> (PR2)	0,192( $\pm$ 0,015)
<i>P. rigida</i> (PR3)	0,200( $\pm$ 0,015)
<i>T. formosa</i> (TF1)	0,135( $\pm$ 0,006)
<i>T. formosa</i> (TF2)	0,144( $\pm$ 0,006)
<i>T. formosa</i> (TF3)	0,148( $\pm$ 0,006)

\* As identificação dada às amostras está entre parênteses. \*\* Desvio padrão entre parênteses.

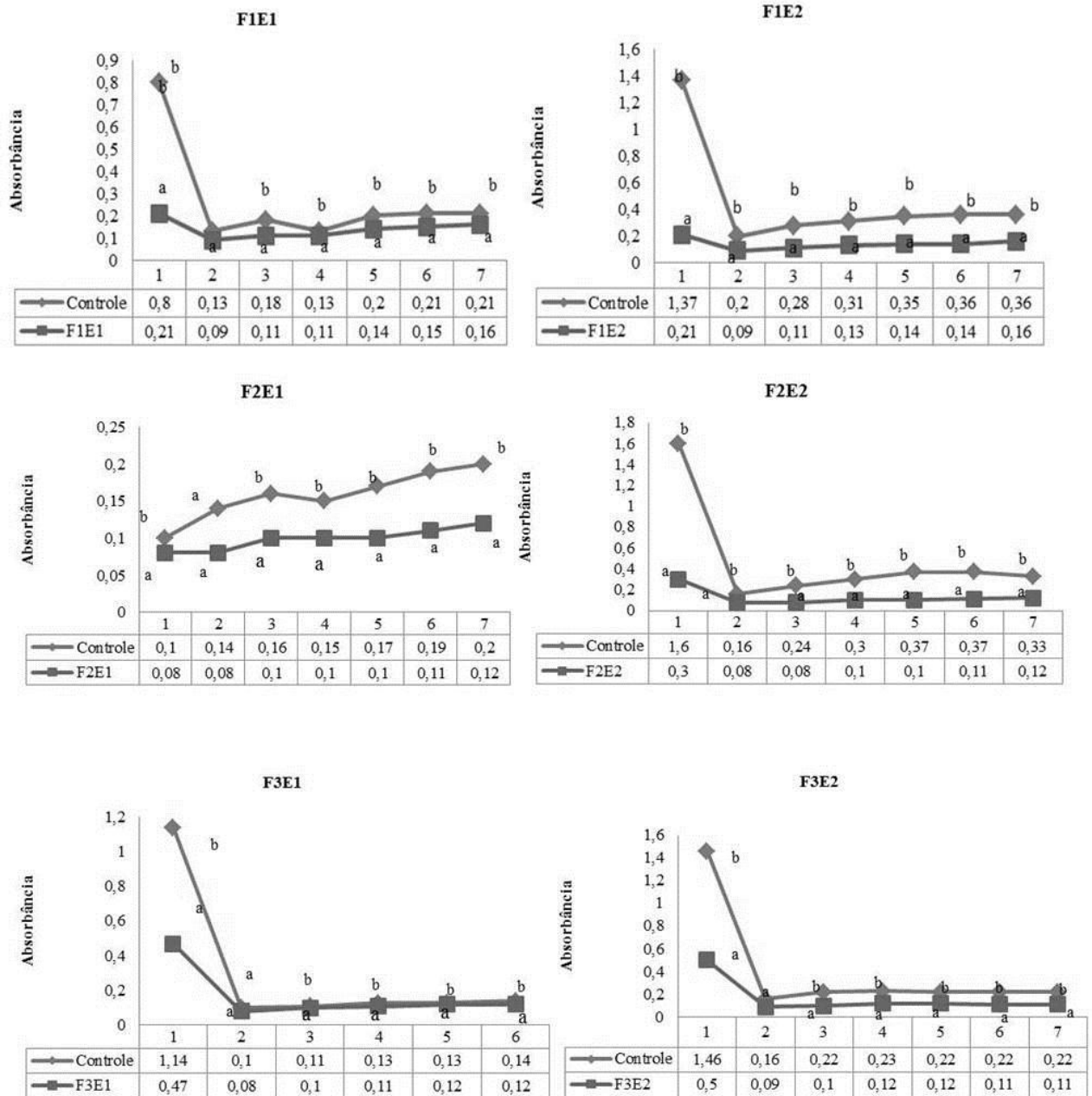


**Figura 62.** Análise cromatográfica de troca iônica de alto desempenho em amostra de *Himantanthus obovatus*.

## **Bioensaios**

Os ensaios biológicos realizados apresentaram médias de absorvância diferentes entre o controle e o tratamento com as secreções para todas as espécies e para as duas secreções utilizadas nas 7 leituras realizadas (Fig. 63). Em todos os casos, a primeira leitura de absorvância foi elevada e a segunda bem inferior, a partir da qual se observaram absorvâncias crescentes. Esse comportamento só não foi observado com o fungo 2 e o extrato 1.

Os fungos apresentaram absorvâncias semelhantes e com a seguinte ordem decrescente de absorvância: F1, F3, F2 para o extrato 1 (*P. rigida*) e para o extrato 2 (*T. formosa*).



**Figura 63.** Bioensaios com as secreções de *Palicourea rigida* e *Tocoyena formosa*. Abreviações dos fungos: **F1**= *Fusarium solani*; **F2** e **F3**= *Colletotrichum gloeosporioides*; secreção das glândulas das espécies: **E1**= *Palicourea rigida*; **E2**= *Tocoyena formosa*. Absorbâncias com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## Discussão

Não há dúvida que as estruturas secretoras aqui analisadas são coléteres, pois sua morfologia e a presença de mucilagem em suas secreções são condizentes com as características destas glândulas (cap. 1).

As observações ecológicas efetuadas permitiram constatar a presença de formigas na face adaxial e axilar do pecíolo em *Himatanthus obovatus*, região em que se situam as glândulas estudadas (Fig.2-6). O comportamento mais comum de ao menos 3 espécies destes insetos foi sua permanência perto dos coléteres, com o aparelho bucal posicionado em direção aos mesmos (Fig.2-6, 7-14). Tal comportamento pode estar relacionado à coleta de secreção para uso posterior pelas formigas, ou para sua alimentação diretamente. O registro de secreções aderidas ao aparelho bucal de formigas visitantes (Fig. 8-11) sustenta estas duas hipóteses, assim como o longo tempo de permanência destes insetos no local.

Esse resultado difere da maioria dos trabalhos sobre coléteres, que atribuem a estas glândulas a função de proteção dos vegetais, por meio da diminuição da herbivoria (Thomas & Dave 1989, 1990; Thomas 1991; Klein *et al.* 2004). O fato de os coléteres em *H. obovatus* estarem atraindo as formigas, e não repelindo-as, sustenta que suas secreções não atuam como dissuasivas de herbívoros, ao menos nesta planta.

Outras funções dos coléteres seriam a lubrificação das gemas e proteção contra microorganismos (Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1989, Thomas 1991). Estas funções são hipóteses levantadas na literatura, sustentadas nas características das secreções, mas sem evidências experimentais que as comprovem. O presente trabalho reuniu evidências que apontam que as funções destas glândulas podem ser mais amplas, e possivelmente variam conforme a espécie vegetal em questão.

A herbivoria afeta muito as folhas de *Palicourea rigida*, o que também ocorre em *P. padifolia* (Roem. & Schult.) C. M. Taylor & Lorence, em que o percentual de folhas danificadas pode ultrapassar 80% (Ornelas *et al.* 2004). Conforme observações no campo, em plantas de *P. rigida* não foram constatados insetos pastejando em seus coléteres. Nesta planta, ocorrem os maiores coléteres (cap. 1) e grandes quantidades de secreção (Tabela 6). Secreção abundante não condiz com a aventada função anti-herbivoria nesta planta tão intensamente predada. A fauna presente em *P. padifolia* também não coaduna com a função dissuasiva de herbívoros apontada para os coléteres. Esta espécie apresentou riqueza igual a 58 espécies de artrópodes associados a cada indivíduo, com uma abundância de 345 artrópodes/planta, conforme Santana & Sousa (2009), predominando espécies de Hymenoptera.

Os resultados encontrados refutam a hipótese anti-herbivoria para a *H. obovatus* e possivelmente em *P. rigida*, mas não para outras espécies. Eles referendam a necessidade de se reunirem mais evidências experimentais para que se possa ter dimensão do papel ecológico dos coléteres na natureza.

As secreções dos coléteres de *H. obovatus* parecem exercer função importante no estabelecimento de relações ecológicas entre formigas e esta planta. Estas relações variam inclusive intraespecificamente, pois a mesma espécie de formiga sp. 5 (cortadeira vermelha) parece ter indivíduos que predam as folhas, enquanto outros permanecem raspando as secreções dos coléteres (Fig.31-36 ). Já as formigas sp. 1 e sp. 4 defendem seu território sem predação as folhas desta planta, tendo como recompensa possível as secreções dos coléteres, conforme constatado na experiência com formigas domésticas introduzidas sobre as folhas (Fig.18-26 ) e com o uso da vareta agitada perto dos coléteres (Fig.27-30 ). Estas duas últimas espécies combatem a presença de intrusos, enquanto colhem as secreções ofertadas pela planta, caracterizando uma relação mutualística.

É peculiar o longo tempo de permanência dos insetos visitantes, pois eles podem ficar parados no mesmo local, perto dos coléteres, por quase um minuto ou mais (Fig. 7-11).

Coléteres muitas vezes são confundidos com nectários extraflorais (Mohan & Inamdar 1986, Thomas 1991), que são estruturas secretoras presentes em partes vegetativas de plantas, cuja função é produzir compostos nutritivos ricos em carboidratos, aminoácidos, vitaminas, água e outros compostos orgânicos. Tais nutrientes são responsáveis por atrair e manter formigas que ali forrageiam e, por sua vez, protegem a planta da ação de herbívoros, expulsando-os do local, tendo-se aí uma associação ecológica mutualística (Dáttilo *et al.* 2009). Dentre os carboidratos presentes nos nectários extraflorais, os açúcares solúveis tais como glicose, frutose, e sacarose, são os que mais se destacam. Verificou-se açúcares solúveis nas secreções dos coléteres de *H. obovatus*, mas em menor quantidade do que em *P. rigida* e *T. formosa*, cujos coléteres não são forrageados. Em nectários de *Merremia aegyptia* (L.) Urb., a quantidade de açúcares redutores chega a 0,375mg/μl de secreção (Pereira *et al.* 2011). Considerando a alíquota de 400μl, utilizada para o teste fenol-sulfúrico, em *H. obovatus* tem-se 11,54 μl de açúcares solúveis, sendo, portanto, uma quantidade muito inferior à encontrada em nectários, as glândulas de *H. obovatus* aparentemente não se encaixam nesta categoria. Em algumas espécies de Apocynaceae, não foram detectados açúcares redutores pelo teste de Fehling (Subramanian *et al.* 1989). Glândulas de *Plumeria rubra* L. foram denominadas nectários extraflorais (Mohan & Inamdar 1985), talvez por apresentarem insetos associados, no entanto, estas estruturas são atualmente consideradas coléteres (Thomas 1991).



Outro resultado importante é a presença de lipídios nas secreções de coléteres das quatro espécies vegetais, o que foi identificado pelo teste de sudan IV (Fig. 37-43). Esta reação se faz mais evidente em *P. rigida*, onde numerosas gotículas são observadas, sobretudo no tecido epidérmico (Fig.38, 40). Provavelmente a presença deste grupo de compostos orgânicos seja mais abundante nas secreções dos coléteres desta espécie e isso explicaria sua pouca solubilidade em água.

A presença de lipídios em secreções de coléteres também foi observada em *Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall (Curtis & Lersten 1974), *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1989), várias espécies de Apocynaceae (Subramanian *et al.* 1989), *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth. (Thomas & Dave 1990), *Azadirachta indica* A. Juss. (Inamdar *et al.* 1986), *Alibertia sessilis* (Barreiro & Machado 2007), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Apezato-da-Glória & Estelita). Nas duas últimas espécies, glóbulos lipídicos também se concentram nas células epidérmicas dos coléteres. Muitos autores têm usado o termo glândulas resinosas para designar estruturas semelhantes aos coléteres e que secretam lipídios.

As proteínas encontradas pelo reagente de Bradford nas amostras das secreções de *H. obovatus*, *P. rigida* e *T. formosa* representaram de 7-8% das amostras analisadas. Essa quantidade foi maior em *T. formosa* e menor em *P. rigida* (Fig. 60). As proteínas nas secreções de vegetais podem exercer ação antimicrobiana e contra herbivoria. Dentre as proteínas vegetais que atuam na defesa, podem-se destacar as lectinas, inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, polifenoloxidasas, peroxidases e fenilalanina amônia liase (Pinto *et al.* 2010).

A presença expressiva de proteínas e sua frequente ação antimicrobiana apontam para a necessidade de se fazerem bioensaios com as secreções, onde se constatou diferenças significativas entre as absorvâncias do controle e dos tratamentos com os fungos *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Os resultados indicam absorvâncias maiores para o tratamento controle, direcionando as interpretações para um crescimento fúngico maior nesse tratamento. A inibição do crescimento fúngico na presença das secreções glandulares foi sutil, mas estatisticamente significativa (Fig. 63).

No entanto, deve-se considerar que aqui se trabalhou com extrato vegetal bruto, retirado diretamente das estruturas e posteriormente liofilizados. Devido a isso, é possível que possa ter havido diferenças de textura e viscosidade entre o tratamento com a secreção e com a solução salina e, portanto, isso pode ter influenciado nas leituras das absorvâncias. Sendo assim, estudos complementares que utilizem extrato purificado podem produzir resultados mais confiáveis acerca da atividade biológica das secreções de coléteres das espécies estudadas.

Bioensaios com proteínas isoladas de secreções de coléteres de *Bathysa nicholsonii* K. Schum., testados com *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum lindemuthianum*, mostraram discretas diferenças de absorvâncias entre os fungos com e sem secreção, onde as maiores absorvâncias foram observadas no tratamento controle (Miguel *et al.* 2006). Isso indica indiretamente um maior crescimento fúngico no tratamento controle devido ao maior valor nas absorvâncias. Em secreções de coléteres de *Simira glaziovii* (K. Schum.) Steyerl., a quantidade de proteínas detectadas pelo método de Bradford foi de 45µg/mg de massa seca (Klein *et al.* 2004), representando um valor menor, comparado com os das três espécies aqui estudadas.

O monômero fucose detectado na porção insolúvel da secreção dos coléteres das três espécies estudadas indica a presença de mucilagem. As mucilagens são polissacarídeos complexos, de natureza ácida ou neutra, com elevado peso molecular. Quando hidrolisadas, elas podem apresentar diversas unidades, tais como glicose, ácido galacturônico, arabinose, xylose, ramnose, galactose e manose (Fahn 1979). Em mucilagens produzidas por células da raiz do milho, foram encontrados monômeros como xylose, arabinose e fucose (Junipe & Pask 1973).

Dentre os monômeros de polissacarídeos em secreções de coléteres, já foram encontrados ramnose, em *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989), *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1990) e *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987). A arabinose ocorre em *Nerium indicum* (Thomas & Dave 1989), enquanto glicose foi assinalada em *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989). Estes carboidratos indicaram de forma indireta a presença de mucilagens nas espécies citadas. A fucose não foi relatada em secreções de coléteres anteriormente estudados, sendo sua ocorrência aqui registrada pela primeira vez.

Os maiores valores de açúcares solúveis foram encontrados nas secreções dos coléteres de *T. formosa*, enquanto *H. obovatus*, que é comumente visitada por formigas, apresenta as menores quantidades destes compostos (Fig. 61). Sabe-se que entre os componentes do néctar estão os açúcares solúveis, tais como glicose, frutose e sacarose, e que nectários extraflorais atraem formigas. Desta forma, os açúcares presentes nos coléteres das demais espécies deveriam atrair formigas, como em *H. obovatus*.

Dadas as composições das secreções de coléteres identificadas pelos testes histoquímicos, pode-se afirmar que nas três espécies há compostos orgânicos das três classes (lipídios, proteínas e carboidratos), sendo que os açúcares solúveis representam em algumas amostras até cerca de 17%. A quantificação dos lipídios não constitui escopo do presente trabalho, mas as evidências apontam que sua presença pode ser significativa nas secreções,

conforme revelado pela histoquímica (Tabela 5, Fig.37-43), sobretudo em *P. rigida*, assim como a pouca solubilidade em água das secreções de *P. rigida* e *H. obovatus*.

Os coléteres encontrados em *H. obovatus* estabelecem relações interespecíficas, entre esta planta e várias espécies de formigas, que podem estar utilizando suas secreções como fonte alimentar, ou outra finalidade. As secreções dos coléteres desta espécie apresentam açúcares solúveis, proteínas, e monômeros de fucose, xilose, ramnose e manose, sendo a presença de açúcares solúveis de menor quantidade (Fig.62). Os compostos identificados representam recompensa que é buscada pelas formigas. Esta recompensa possivelmente é de natureza alimentar, sendo altamente nutritiva dado seu teor proteico.

A presença de mucilagem nas secreções foi identificada por meio de testes histoquímicos (cap. 1), mas também pode ser inferida a partir dos carboidratos típicos destes compostos, como a fucose, que foi constatada em todas as secreções (Tabela 7, Fig. 62).

A composição das secreções pode ser o ponto chave para o entendimento sobre o fato de que as formigas sp. 1 e sp. 4 não predam as folhas de *H. obovatus*. A riqueza nutricional das secreções é alta, pois têm elevado percentual de carboidratos, lipídeos e proteínas, conforme evidenciados no presente trabalho. Para saber se as secreções são mais nutritivas do que as folhas, não é necessária nenhuma análise química das mesmas. Assim, o pastejo das secreções pode ser mais vantajoso para as formigas, do que herbivoria. A longa duração do pastejo das formigas pode evidenciar dificuldade de raspagem da secreção, ou que ela é continuamente liberada em pequenas quantidades, o que carece ser melhor esclarecido em futuros estudos.

## Conclusões

As secreções dos coléteres de *H. obovatus*, *P. rigida* e *T. formosa* possuem natureza química complexa, onde compostos dos três grupos de substâncias orgânicas estão presentes: lipídios, proteínas e carboidratos.

Açúcares redutores foram verificados em *H. obovatus* e *T. solanifolia* e alcalóides em *P. rigida* e compostos fenólicos em *T. solanifolia*, sendo que os coléteres de *T. formosa* produzem maior quantidade de secreção entre as quatro espécies estudadas. O monômero fucose, que é indicador da presença de mucilagem, foi encontrado nas secreções de *H. obovatus*, *P. rigida* e *T. formosa*. Outros monossacarídeos detectados foram manose, arabinose e xylose em *H. obovatus*.

A metodologia usada foi eficiente para obtenção das secreções em todas as espécies testadas.

Os bioensaios realizados mostram diferenças de absorbâncias entre o tratamentos com as secreções e os respectivos controles, estas diferenças podem indicar inibição fúngica. Estudos futuros mais aprofundados ajudarão a esclarecer a possível ação biológica das secreções.

As secreções dos coléteres de *H. obovatus* não são dissuasivas de herbívoros; elas possibilitam relações ecológicas mutualísticas entre esta planta e diferentes espécies de formigas, que delas se alimentam, apresentando comportamento de defesa de território.

## Referências bibliográficas

- ALVES, R. T. & FARIA, M. (2010). Pequeno manual sobre fungos entomológicos. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados. Documentos/286. 55p.
- ANJOS, J. N.; CHARCHAR, M. J. D'AVILA; SILVA, S. M & ANJOS, S. S. N. (2007). Influência dos fatores bióticos e abióticos em podridão de raízes de mudas de mangabeira. Documentos 194. Planaltina-DF, Embrapa Cerrados.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M. M. (2000). Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica, 23(2), pp. 113-120.
- ASCENSÃO, L. (2003). Técnicas histoquímicas convencionais e de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 21p.
- BARREIRO, D. P. & MACHADO, S. R. (2007). Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (vell.) K. Schum. Revista Brasileira de Botânica, 30(3), pp. 387-399.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, pp. 248-254.
- BROEKAERT, W. F., TERRAS, F. R. G., CAMMUE, B. P. A. & VANDERLEYDEN, J. (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. FEMS Microbiology letters 69, pp. 55-60.
- CURTIS, J. & LERSTEN, N. R. (1974). Morphology, seasonal variation and function resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). American Journal of Botany, 61(8), pp. 835-845.
- DAVE Y., THOMAS V., KURIACHEM P. M. (1987). Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata*. Pakistan Journal of Botany 19, pp. 243-248.
- DICKMAN, M. B.; ALVAREZ, A. M. (1983). Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease, 67, pp. 748-750.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Biochemistry, 28 (3) pp. 350-356.
- FAHN, A. (1979). Secretory tissues in Plants. London: Academic Press INC.588p.

- GREGORY, M. & BAAS, P. (1989). A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany*, 38, pp. 125-174.
- INAMDAR, J. A., BAGAVATHI SUBRAMANIAN, R. & MOHAN, J. S. (1986). Studies on the resin glands of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *Annals of Botany*, 58, pp. 425-429
- JUNIPER, B. E. & PASK, G. (1973). Directional secretion by the Golgi bodies in maize root cells. *Planta*, 109( 3 ), pp. 225-231.
- KLEIN, D. E., GOMES, V. M., DA SILVA-NETO, S. J. & DA CUNHA, M. (2004). The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany*, 94, pp. 733-740
- KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: Seropédica. 194p.
- MARQUES, M. C. S.; CARDOSO, M. DAS G.; SOUZA, P. E.; GAVILANES, M. L.; SOUZA, J. A.; PEREIRA, N. E.; NEGRÃO, I. O. (2002). Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciência e Agrotecnologia*, 26, pp. 1410-1419.
- MARTINS, F. M., KINOSHITA, L. S. & CASTRO, M. D. (2010). Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violacea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. *Revista Brasileira de Botânica*, 33(3), pp. 489-500.
- MIGUEL, E. D., GOMES, V. M., OLIVEIRA, M. A. & DA CUNHA, M. (2006). Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae). Ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology*, 8, pp. 715-722.
- MOHAN, J. & INAMDAR, J. (1986). Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57 (3) pp. 389-40
- ORNELAS, J. F.; GONZÁLEZ, C.; JIMÉNEZ, L.; LARA, C. & MARTÍNEZ, A. J. (2004). Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. ii. Attracting and rewarding mutualistic and antagonistic visitors. *American Journal of Botany*, 91(7): 1061–1069.
- PEREIRA, D. N. SOUSA, R. M., MARACAJÁ, P. B., NETO, A. A. DA S., SAKAMOTO, S. M., OLIVEIRA, A. M. DE. (2011). Produção de néctar da *Merremia aegyptia* e comportamento da *Apis mellifera* spp durante o forrageamento. *Acta Veterinaria Brasilica*, 5(2) pp.168-177.
- PINTO, M. DOS S. T., RIBEIRO, J.M. & OLIVEIRA, E. A. G. (2011). O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(2), pp. 241-248.

- PORFÍRIO, Z., MELO-FILHO, G. C., LIMA, M. R. F. & SANT'ANA, A. E. G. (2009). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St. -Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(3), pp. 785-789.
- RIO, M. S., CASTRO, M. M. & KINOSHITA, L. S. (2002). Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 25(3), pp. 339-349.
- SAEMAN, J.F.; BUHL, J.L. & HARRIS, E.E. (1945). Quantitative saccharification of wood and cellulose. Production of Wood Sugar in Germany and Its Conversion to Yeast and Alcohol 17, pp. 35-37.
- SANTANA, R. C. & SOUSA, A. C. (2009). Influência da complexidade estrutural de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae) na diversidade de artrópodes. *Revista Brasileira de Zoociências* 11 (2), pp. 161-165.
- SOARES, ANA R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. (2008). Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. *Tropical plant pathology*, 33 (4), pp. 265-272.
- SUBRAMANIAN, R., MURUGAN, V., MOHAN, J. & INAMDAR, J. (1989). Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Plant Science*, 99(5), pp. 423-429.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. (1990). Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton Annales Rei Botanicae*, 30(2), pp. 209-336.
- THOMAS, V. (1991). Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany*, 68, pp. 287-305.
- THOMAS, V., DAVE, Y. & MENON, A. (1989). Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata*. *Nordic Journal of Botany*, 8(5), pp. 493-496.
- VIEIRA, E. A., CHARCHAR, M. J. D'AVILA, S., M. S., & ANJOS, J. R. N. (2007). Virulência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de populações selvagens de *Stylosanthes* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(5), pp. 661-667.
- ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E; PIMENTEL, A. F.; GUIMARÃES, L. G. DE L. & SALGADO, A. P. S. P. (2009). Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta amazônica*, 39(1), pp. 193 – 198.

## **ANEXOS**



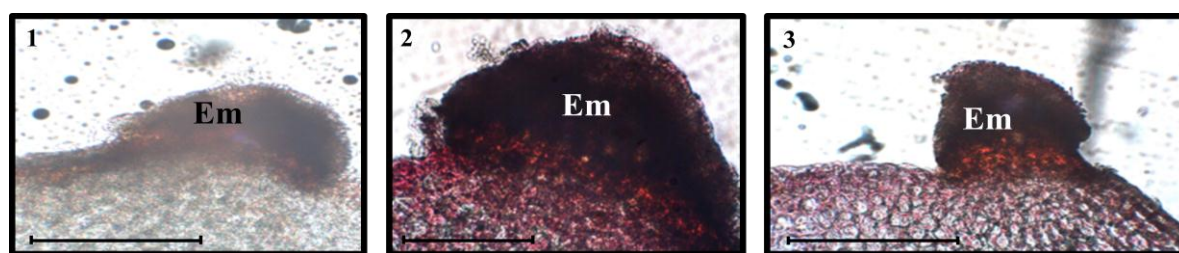
## ANEXO 1

### Anatomia e MEV realizados em *Cuphea* sp. e *Mandevilla novocapitalis* Markgr.

O presente anexo é constituído por resultados incompletos obtidos, que aqui são registrados a fim de que não se percam. São imagens anatômicas e obtidas sob MEV, feitas com espécimes de *Mandevilla novocapitalis* Markgr. (Apocynaceae), que inicialmente foram coletados, mas que depois sumiram no campo, não se localizando plantas em fase vegetativa em tempo para a conclusão das análises.

Também são apresentadas glândulas semelhantes à coléteres, encontradas em *Cuphea* sp. (Lythraceae). Thomas (1991) cita que espécies de Lythraceae têm coléteres, mas não menciona a espécie, nem se foram feitos testes histoquímicos com a mesma, por isto procurou-se investigar estas plantas. A estrutura observada em *Cuphea* sp. é uma emergência, mas na maioria das vezes se encontrava seca, dificultando as análises.

Nas duas espécies, a quantidade de amostras obtidas e suas secreções foram irrisórias, não tendo sido possível completar seus estudos.

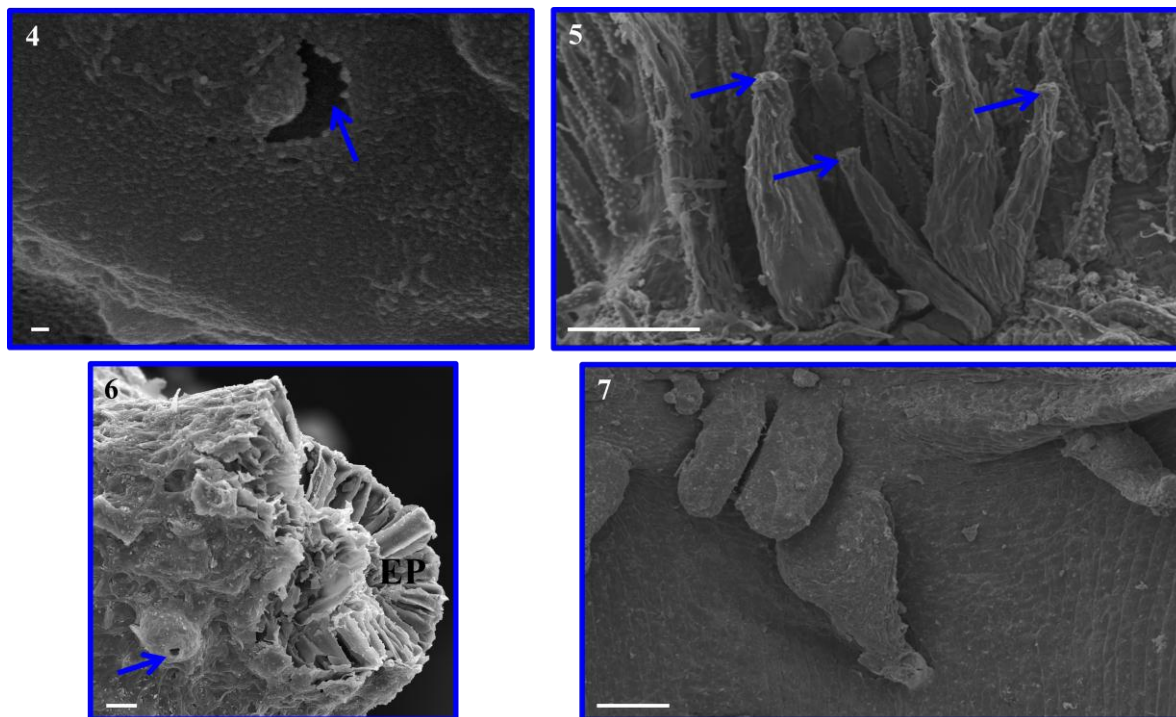


**Figura 1-3.** Coléteres sob teste histoquímico com vermelho de rutênio em *Mandevilla novocapitalis* (Apocynaceae). Escalas: 1, 3= 530 $\mu$ m; 2= 210 $\mu$ m. Legendas: Em= emergência.

As estruturas analisadas encontram-se na base da lâmina foliar e pecíolo em *M. novocapitalis* e na base da lâmina foliar em *Cuphea* sp. Tratam-se de emergências secretoras sem pedúnculo, que estruturalmente apresentam um núcleo formado por células parenquimáticas, revestido por células altas, que constituem uma epiderme em paliçada. A microscopia eletrônica de varredura foi particularmente útil na caracterização estrutural destas emergências em *M. novocapitalis*, cujo seccionamento é difícil por serem muito curtas (Fig. 1-3).

O teste histoquímico com vermelho de rutênio evidenciou a presença de mucilagem em secreções produzidas nas emergências de *M. novocapitalis*. Em *Cuphea* sp., não foi

detectada a presença de compostos pécnicos nas secreções, mesmo após os testes serem repetidos.



**Figuras 4-7.** Emergências sob microscopia eletrônica de varredura em *Cuphea* sp., Lythraceae (4-5) e *Mandevilla novocapitalis*, Apocynaceae (6-7). Escalas: 4= 100nm; 5, 7= 100 $\mu$ m; 6= 10 $\mu$ m. Legendas: setas= poros ou aberturas dos coléteres; EP= epiderme em paliçada; Pa= parênquima.

Com base na estrutura e no tipo de secreção que produzem, as emergências secretoras na base da lâmina foliar e pecíolo de *M. novocapitalis* constituem coléteres, que foram identificados como sendo do tipo padrão.

Constatou-se a presença de poro ou abertura nas emergências de *Cuphea* sp. (Fig. 4) e de *M. novocapitalis* (Fig. 6), possivelmente relacionada ao modo de liberação das secreções, o que pode constituir um mecanismo diferente daqueles relatados na literatura (ruptura da cutícula ou microporos que a atravessam). A constatação da presença de poros evidencia a existência de mais de um tipo de mecanismo de liberação de secreções em coléteres.