

Universidade Estadual de Campinas



Diego Demarco

ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS E COLÉTERES  
FOLIARES EM ESPÉCIES DE CERRADO DE *ASPIDOSPERMA*  
MART. E *BLEPHARODON* DECNE. (APOCYNACEAE S.L.)

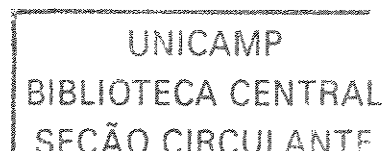
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>DIEGO DE MARCO</u> <u>[Assinatura]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
---

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

Co-orientadora: Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita

Campinas  
2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	1/UNICAMP
	D391e
V	EX
TOMBO BC/	63793
PROC.	16.P000605
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	18/05/05
Nº CPD	

libr-id 350078

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**D391e**

**Demarco, Diego**

Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.) /  
Diego Demarco. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Marília de Moraes Castro.

Co-orientadora: Luiza Sumiko Kinoshita.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Coléteres. 2. Glândulas florais. 3. Anatomia vegetal.
4. Histoquímica. 5. *Blepharodon*. 5. *Aspidosperma*.
6. *Apocynaceae* s.l. I. Marília de Moraes Castro. II. Luiza Sumiko Kinoshita. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- IV. Título.



Campinas, 21 de fevereiro de 2005

**BANCA EXAMINADORA**

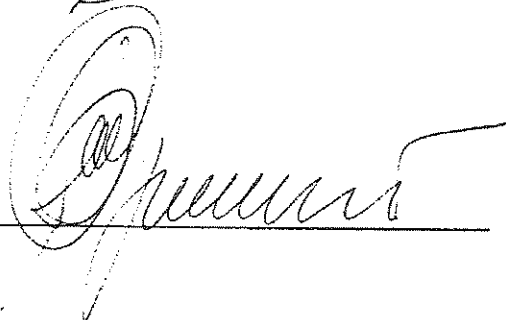
1. Profa. Dra. Marília de Moraes Castro



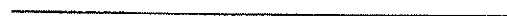
2. Profa. Dra. Jane Elizabeth Kraus



3. Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro



4. Prof. Dr. Washington Marcondes-Ferreira Neto



Em memória de meu pai, Antonio Luiz Demarco Filho,  
que sempre cumpriu seu trabalho com dedicação  
e perfeição, e pelos bons momentos vividos.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida no primeiro mês de meu mestrado e à FAPESP durante o restante da tese (proc. nº 02/11881-3; vinculado ao temático Biota/FAPESP proc. nº 00/12469-3). Ao laboratório de Anatomia vegetal e ao Tião, por terem fornecido os subsídios necessários para que desenvolvesse meu trabalho e ao laboratório de Taxonomia, pelo uso do microscópio estereoscópico SMZ-U (adquirido no projeto proc. nº 96/12345-5).

À minha mãe, Maria Aparecida, sem a qual eu não teria chegado até aqui. Por toda a sua imensa dedicação, por tudo o que passou para me criar, por sua força inabalável por ser uma mãe exemplar e maravilhosa, por sua luta diária no trabalho e em casa e por sempre ter feito de tudo para criar da melhor maneira possível minha irmã e eu. Agradeço à minha irmã, Daniela, por tudo o que já passamos e por me mostrar que nunca devemos desistir de nossos sonhos, mesmo parecendo impossível realizá-los.

À minha namorada, Ana Paula, por sempre estar ao meu lado, dar seu apoio e por tudo o que tem me ensinado neste tempo em que estamos juntos; por ser esta pessoa maravilhosa que é, por ter me ajudado no meu trabalho e na minha vida, por todo seu amor e por todos os momentos maravilhosos que vivemos.

Aos meus amigos Gláucia e Shesterson, por serem amigos tão queridos e terem participado de ótimos momentos de minha vida e aos demais amigos e colegas de departamento, pela amizade e companheirismo nestes anos de trabalho.

À minha orientadora, Marília, por ter me ensinado praticamente tudo o que sei na área em que trabalho, por sempre estar pronta a me ajudar e a me desenvolver no fascinante conhecimento da anatomia das plantas.

À minha co-orientadora, Luiza, e aos membros da pré-banca, Jane, Sandra e Washington, pelas sugestões para melhorar esta tese. A todos os demais professores que direta ou indiretamente participaram de minha formação e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À Luiza, ao André e à Giovana pelas identificações realizadas para esta tese.

# ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	3
Introdução geral	5
Estruturas secretoras em <i>Apocynaceae s.l.</i>	5
Estrutura floral	8
Objetivos	11
<b>Capítulo 1. Distribuição e estrutura dos coléteres foliares e calicinais de espécies de <i>Apocynaceae s.l.</i> de cerrado</b>	
Introdução	13
Material & métodos	15
Resultados	17
<i>Aspidosperma</i>	17
<i>Blepharodon</i>	18
Ilustrações	23
Discussão	44
Conclusões	50
Referências bibliográficas	52
<b>Capítulo 2. Ontogênese e histoquímica dos coléteres foliares e calicinais de <i>Blepharodon bicuspidatum</i> Fourn. (<i>Apocynaceae s.l.</i>) de cerrado</b>	
Introdução	57
Material & métodos	58
Ontogênese	60
Histoquímica	60
Resultados	61

Ontogênese dos coléteres foliares	62
Ontogênese dos coléteres calicinais	64
Histoquímica	65
Ilustrações	67
Discussão	90
Conclusões	94
Referências bibliográficas	95
<b>Capítulo 3. Estruturas secretoras florais de <i>Aspidosperma australe</i> Müll Arg. (Apocynaceae s.l. – Rauvolfioideae)</b>	
Introdução	99
Material & métodos	101
Resultados	102
Epiderme da cabeça dos estiletos	103
Laticífero	104
Epiderme da placenta	106
Tricomas corolinos	107
Ilustrações	107
Discussão	122
Conclusões	129
Referências bibliográficas	130
<b>Capítulo 4. Caracterização anatômica das glândulas florais de <i>Blepharodolobicuspidatum</i> Fourn. (Apocynaceae s.l. – Asclepiadoideae) de cerrado</b>	
Introdução	137
Material & métodos	139
Resultados	140
Epiderme secretora da ala da antera	142
Epiderme secretora da cabeça dos estiletos	143

Laticífero	144
Epiderme secretora da câmara estigmática	147
Epiderme secretora da corona estaminal	148
Ilustrações	149
Discussão	174
Conclusões	181
Referências bibliográficas	183
Discussão e conclusões gerais	191
Referências bibliográficas	206

## Resumo

De acordo com o conceito vigente, Apocynaceae *s.l.* é composta por cinco subfamílias. No presente trabalho, foram estudadas duas espécies de *Aspidosperma*, uma de *Blepharodon*, que integram, respectivamente, as subfamílias mais basal e mais derivada. As espécies foram anatomicamente investigadas quanto à ocorrência e caracterização de coléteres em órgãos vegetativos e florais, e com relação à estrutura floral, com ênfase nas estruturas secretoras.

A ausência de coléteres em órgãos vegetativos e flores de *A. australe* Müll. Arg. e *A. tomentosum* Mart. comprovou que esta estrutura não é universal na família. Coléteres foliares e florais foram encontrados em *B. bicuspidatum* Fourn. Eles variam em número e são polimórficos. Todos os tipos descritos são inéditos para a família. Os foliares ocupam posição interpeciolar e peciolar, têm origens distintas e desenvolvimento assincrônico, são caducos e a fase secretora varia sazonalmente; os florais são alternos às sépalas, formam-se no início do desenvolvimento floral, são persistentes e secretam até a flor estar em pós-antese.

A secreção dos coléteres é heterogênea e produzida em uma única fase. Nos foliares, ela é constituída por mucilagem e compostos fenólicos, enquanto nos calicinais é composta por mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos. Além de proteger os meristemas vegetativos e florais contra o dessecamento, os coléteres têm função de defesa contra fitófagos nos ramos vegetativos e contra fungos nas flores.

Apenas duas estruturas secretoras foram encontradas na flor de *A. australe*: a epiderme da cabeça dos estiletos e os laticíferos, além de tricomas corolinos com estrutura intermediária entre secretores e tectores e um possível obturado placentário. A cabeça dos estiletos é do tipo mais simples presente na família e os laticíferos são articulados anastomosados. Embora as flores possuam aroma, os osmóforos não foram localizados; tecido nectarífero também não foi encontrado.

Em *B. bicuspidatum*, há seis sítios secretores nas flores: a epiderme da ala da antera, a epiderme da cabeça dos estiletes, a epiderme da câmara estigmática, a epiderme da coroa estaminal, os coléteres e os laticíferos articulados anastomosados. Com exceção da epiderme da ala da antera, as demais estruturas permanecem secretando até a antese floral.

A estrutura floral de *A. australe* e de *B. bicuspidatum* é bastante distinta, mas algumas estruturas secretoras de ocorrência universal na família evidenciam a relação das duas espécies, como a epiderme da cabeça dos estiletes e o mesmo tipo de laticífero. A restrita variedade de estruturas secretoras florais de *A. australe* corrobora a posição basal do gênero na subfamília e na tribo; a grande diversidade de glândulas florais de *B. bicuspidatum* e sua complexa estrutura floral confirmam sua posição derivada na família e na subfamília.



## Abstract

The current consensus amongst scientists is that the Apocynaceae s.l. is subdivided into five subfamilies. This paper presents a study of two *Aspidosperma* species and one *Blepharodon* species. The *Aspidosperma* and the *Blepharodon* belong to the most basal and the most derivative subfamilies respectively. An anatomical study of the species was carried out in order to look into the characterization and occurrence of colleters in vegetative and floral organs. Also, the same study was made in relation to the floral structure, focusing on the secretory structures.

The absence of colleters in vegetative organs and flowers of the *A. australe* Müll. Arg. and the *A. tomentosum* Mart. proved that this structure is not universal in the family. Foliar and floral colleters were found in the *B. bicuspidatum* Fourn. They are polymorphic and they vary in number. The described colleters are new in the family. The foliar colleters occupy an interpetiolar position, and they have distinct origins and asynchronous developments. Also, they are deciduous and the secretory phase varies seasonally. The floral colleters alternate with the sepals. They are formed at the beginning of the floral development. They are persistent and they secrete until the flower is in postanthesis.

The secretion of the colleters is heterogeneous and it is produced in a single phase. In the foliar colleters, it is made up of the mucilage and the phenolic compounds. But in the calycine, it is composed of the mucilage, fatty acids and phenolic compounds. Besides protecting the vegetative and floral meristems from desiccation, the colleters also protect against phytophagous insects in vegetative branches and against fungi in flowers.

Only two secretory structures were found in the *A. australe* flower: the style head epidermis and the laticifers, besides the corolline trichomes with an intermediate structure between glands and tector trichomes, and possibly a

obturator from the placenta. The style-head is one of the simplest structures in the family, and the laticifers are unbranched articulated. Although the flowers have an scent, the osmophores were not found, nor was the nectariferous tissue.

In the *B. bicuspidatum*, there are six glands in the flowers: the anther wing epidermis, the style-head epidermis, the stigmatic chamber epidermis, the staminal corona epidermis, the colleters, and the unbranched articulated laticifers. Except for the anther wing epidermis, the other structures continue secreting until the floral anthesis.

The floral structure of the *A. australe* and the *B. bicuspidatum* is very distinct, but some secretory structures that are universal (in the family) show the relationship between the two species, such as the style-head epidermis and the same type of laticifer. The restricted variety of floral secretory structures of the *A. australe* confirm the basal position of the genera in the subfamily and in the tribe, a wide variety of floral glands of the *B. bicuspidatum* and its complex floral structure confirm its derivative position in the family and subfamily.

## INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as Gentianales, as Apocynaceae e Asclepiadaceae estão mais intimamente relacionadas entre si do que com qualquer outra família da ordem e a sua proximidade taxonômica deve-se, principalmente, à presença de laticíferos e glicosídeos cardiotônicos (Cronquist 1981). Seus limites têm sido melhor compreendidos com a utilização de dados moleculares através dos quais as duas famílias juntas mostraram constituir um grupo monofilético (Judd *et al.* 1994; Struwe *et al.* 1994; Endress *et al.* 1996; Sennblad & Bremer 1996, 2002). Endress e Bruyns (2000) propuseram uma nova classificação para a família Apocynaceae *s.l.*, que agora inclui as Asclepiadaceae. Com isso, Apocynaceae *s.l.* ficou constituída por 424 gêneros agrupados em cinco subfamílias: Rauvolfioideae Kostel. (=Plumerioideae), Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R.Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R.Br. ex Burnett. Os representantes de Apocynaceae *s.l.* possuem importância econômica ou medicina devido à presença de algumas classes de metabólitos secundários (Rizzini & Morici 1976; Joly 1977; Judd *et al.* 1999; Simões *et al.* 2004). Estruturas secretoras podem estar envolvidas na produção dos diferentes compostos do metabolismo secundário tanto em órgãos vegetativos quanto em reprodutivos; em Apocynaceae, elas podem ser tricomas, idioblastos, cavidades, laticíferos, coléteres, cabeça dos estiletes, nectário e osmóforos (Solereder 1908; Woodson & Moore 1938; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1983; Fallen 1986; Kunze 1991, 1995, 1997; Thomas 1991; Endress 1994).

### **Estruturas secretoras em Apocynaceae *s.l.***

Os tricomas glandulares ocorrem na base da lâmina e no pecíolo de muitos membros da família; já os idioblastos com conteúdo granuloso semelhante a látex estão presentes no mesofilo das folhas, formando uma camada abaixo do parênquima paliádico, e os idioblastos taníferos nos raios medulares e medula de caules jovens de

umas poucas espécies (Metcalf & Chalk 1950). Cavidades mucilaginosas foram encontradas no parênquima e tecido vascular do caule e parênquima foliar de algumas espécies (Solleder 1908).

Os laticíferos têm ocorrência universal em Apocynaceae *s.l.* (Metcalf & Chalk 1950). Embora existam estudos anatômicos sobre laticíferos de espécies desta família, incongruências quanto a identificação do tipo e sua ontogênese podem ser encontradas na literatura (Mahlberg 1961, 1963; Milanez 1977; Stockstill & Nessler 1986). Eles estão presentes em órgãos vegetativos (Metcalf & Chalk 1950; Milanez 1959, 1960-1, 1966, 1977; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997) e reprodutivos (Murugan & Inamdar 1987a,b; Thomas & Dave 1994; Aguiar 2003). A cor do látex varia de acordo com o gênero ou espécie, podendo ser branca leitosa, esverdeada, amarela brilhante ou vermelha pálida (Metcalf & Chalk 1950). Segundo Farrell *et al.* (1991), as plantas produtoras de látex e resina têm sido mais bem sucedidas que os grupos relacionados que não os produzem. As funções atualmente reconhecidas para laticíferos são as de proteção contra herbivoria, impedir a proliferação e ataque de microorganismos, e selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrell *et al.* 1991; Hunter 1994).

Os coléteres estão particularmente bem representados nas Gentianales, onde ocorrem em 228 gêneros (Thomas 1991). Em Apocynaceae *s.l.*, os coléteres foram registrados para 74 dos 424 gêneros (Woodson 1935; Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Pereira & Silva 1974; Silva *et al.* 1975; Morillo 1978, 1995; Arekal & Ramakrishna 1980; Fjell 1983; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989 a,b,c, 1990, 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004) e mencionados nas descrições taxonômicas de membros das cinco subfamílias (Endress & Bruyns 2000).

A semelhança estrutural entre coléteres e outras estruturas secretoras levou alguns pesquisadores a confundi-los com nectários extraflorais e glândulas de resina (Arekal & Ramakrishna 1980; Inamdar *et al.* 1985; Mohan & Inamdar 1986; Subramanian *et al.* 1989; Thomas 1991). O que diferencia os coléteres das demais estruturas secretoras é a sua secreção que lubrifica e protege gemas (Fahn 1979; Thomas 1991). Esta secreção pode ser constituída apenas por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990).

Nesta família, eles são emergências ou glândulas persistentes que podem estar presentes nas folhas, brácteas, bractéolas e cálice (Thomas 1991). A maioria dos coléteres já descritos para as Apocynaceae é do tipo padrão (Thomas 1991); recentemente, tipos inéditos foram observados em *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio 2001), *Forsteronia glabrescens* Müll. Arg. (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla pycnantha* (Steud.) Woodson, *M. scabra* (R & S) K. Schum., *M. tenuifolia* (J.C. Mikan) Woodson e *Mesechites mansoana* (A.DC.) Woodson (Simões 2004). Os coléteres destacam-se não só pela função, como pela importância taxonômica (Woodson & Moore 1938, Thomas 1991); a posição, o número e o aspecto dos coléteres foram considerados de valor taxonômico para Apocynaceae por Woodson e Moore (1938) e sua presença foi utilizada como caráter distintivo em chaves de identificação em nível de gênero e espécie (Barroso 1986; Rio 2001).

Poucas pesquisas foram efetuadas por pesquisadores brasileiros a respeito dos coléteres em espécies de Apocynaceae, podendo ser citados os trabalhos realizados em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000), *Forsteronia glabrescens* (Rio *et al.* 2005), *Prestonia coalita* (Rio 2001; Rio *et al.* 2002), *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg., *Mandevilla pycnantha*, *M. scabra*, *M. tenuifolia*, *Mesechites mansoana*, *Secondatia densiflora* A.DC. e *S. floribunda* A.DC. (Simões 2004).

## Estrutura floral

As Apocynaceae s.l. possuem flores com diferentes graus de complexidade e dentre estas destacam-se as Asclepiadoideae, por apresentarem as flores mais complicadas e elaboradas de todas as dicotiledôneas; apenas com a avaliação conjunta das demais subfamílias, é possível compreender como elas chegaram a este grau de complexidade (Endress 1994). O trabalho mais abrangente envolvendo a estrutura floral de espécies de Apocynaceae s.l. foi realizado por Woodson e Moore (1938), com o estudo da vascularização e da morfologia comparativa das flores de 39 gêneros e 59 espécies. Trabalhos posteriores também se destacaram, como os de Rao e Ganguli (1963), Fallen (1986), Kunze (1991, 1995, 1997), Galetto (1997), Torres e Galetto (1998) e Lin e Bernardello (1999).

As estruturas secretoras florais relatadas são: epiderme que reveste a cabeça dos estiletos, nectários, osmóforos, laticíferos e coléteres.

A **cabeça dos estiletos** é coberta por epiderme secretora (Walker 1975; Fallen 1986; Kunze 1993, 1994; Galetto 1997; Lin & Bernardello 1999). Fallen (1986) estudou a estrutura floral de 65 espécies de Apocynaceae s.s. e de quatro de Asclepiadaceae e descreveu tipos básicos de cabeça dos estiletos, definindo uma progressão de complexidade estrutural dentro da família com base na morfologia, histologia e função. Esta estrutura é responsável pela produção de uma substância viscosa que retém os grãos de pólen nas Rauvolfioideae e Apocynoideae; nas demais subfamílias, ela produz o translador, que juntamente com as polínias forma o polinário (Kunze 1993, 1994; Endress 1994).

Os **nectários** formam um anel basal ao redor do ovário nas Rauvolfioideae e Apocynoideae, freqüentemente lobado na porção apical (Woodson & Moore 1938), sendo considerado de natureza receptacular (Galetto 1997). Em *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht., este anel é inconspícuo e não secretor e nectários não estruturados foram mencionados no cálice e na corola (Lin & Bernardello 1999). Nas

Asclepiadoideae, a posição dos nectários também é controversa. A localização primária dos tecidos nectaríferos é no tubo estaminal, alternando às anteras (Kunze 1991, 1997) ou o néctar pode ser acumulado na corola (Galil & Zeroni 1965, Eisikowitch 1986) ou na base da corola (Kunze 1991). O tecido nectarífero pode ocorrer também na corola e na região em que os lobos da corola estão conectados ao ginostégio (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Kunze 1991, 1995, 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). O néctar pode ser encontrado na câmara estigmática (nectário primário) e na corola estaminal (nectário secundário). Em geral, assume-se que apenas o nectário primário é secretor e o néctar flui através de um intrincado sistema capilar até o nectário secundário (Galil & Zeroni 1965; Kunze 1997); todavia, o tecido nectarífero na corola foi descrito (Woodson 1954; Kunze 1995, 1999).

**Osmóforos** são referidos para flores de algumas espécies de Apocynaceae (Endress 1994; Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999), mas nunca foram anatomicamente ilustrados.

### **Justificativa da presente investigação**

O presente trabalho está inserido em uma ampla pesquisa que está sendo realizada por um grupo composto por professores e alunos do Departamento de Botânica/IB/UNICAMP, cujo objetivo é estudar aspectos morfológicos e histoquímicos das estruturas secretoras de espécies brasileiras de Apocynaceae. Como produtos desta pesquisa, referimos as teses de Rio (2001), Aguiar (2003), Simões (2004) e o artigo publicado por Rio *et al.* (2002) efetuados em espécies de Apocynoideae.

Este trabalho também está vinculado ao temático intitulado "Estudo morfológico, anatômico, histoquímico e ultra-estrutural em plantas de cerrado (*sensu lato*) do estado de São Paulo" (Biota/FAPESP proc. n.º 00/12469-3) que

pesquisa espécies representativas de cerrado, pertencentes a dez famílias de angiospermas incluindo as Apocynaceae.

Os gêneros *Aspidosperma* (Rauvolfioideae) e *Blepharodon* (Asclepiadoideae; Endress & Bruyns 2000) foram contemplados nesta investigação. Esta escolha se deve à ampla ocorrência de espécies destes gêneros nos cerrados paulistas; por *Aspidosperma* ser um dos gêneros brasileiros mais basais de Apocynaceae s.l. (Kinoshita com. pess.), enquanto *Blepharodon* um dos mais derivados. Espécies de Apocynoideae estão sendo estudadas por Rio (2001-2004) e Martins (2003-2007). Desta forma, o grupo está pesquisando espécies das três subfamílias que ocorrem no Brasil contribuindo assim, para o melhor entendimento da família e suas relações.

De acordo com o novo conceito, Apocynaceae s.l. passou a ser constituída por cerca de 4800 espécies (Mabberley 1997) de distribuição principalmente tropical e subtropical e, em menor escala, nas regiões temperadas (Barroso 1986). A família agora possui 86 gêneros de três subfamílias ocorrendo no Brasil (Barroso 1986); entretanto, apesar de sua grande ocorrência, poucos estudos anatômicos são encontrados na literatura sobre espécies brasileiras, incluindo as dos gêneros *Aspidosperma* e *Blepharodon*.

*Aspidosperma* é constituído por 44 espécies de distribuição neotropical, a maioria no Brasil (Marcondes-Ferreira 1991, 1999; Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Gomes & Cavalcanti 2001). O gênero se destaca dentro da família pela grande importância econômica no uso da madeira, como a peroba (Joly 1977), e química, pela freqüente ocorrência de alcalóides indólicos (Bolzani *et al.* 1987). Estudos químicos sobre estes compostos do metabolismo secundário foram desenvolvidos por Banerjee e Lewis (1953), Gilbert (1966), Lyon *et al.* (1972), Garcia e Brown (1976); estas substâncias foram utilizadas para avaliar a evolução das espécies do gênero (Bolzani *et al.* 1987) e auxiliar na sua posição sistemática (Allorge & Poupat 1991). A maior parte dos poucos trabalhos anatômicos publicados sobre espécies do gênero foi realizada por



pesquisadores brasileiros; eles estão relacionados à anatomia de madeira (Milane 1938, 1939; Rebollar & Quintanar 2000), anatomia foliar (Morretes & Ferri 1955; Santos & Grisi 1976; Ferraz & Pimenta 1988; Isaías *et al.* 2000; Formiga *et al.* 2001; Christiano 2002), desenvolvimento de ápices vegetativos (Valente & Carvalho 1973; Prazeres & Alves 1980) e estrutura floral (Lin & Bernardello 1999). Por outro lado, embora *Blepharodon* ocorra em vários tipos de vegetação brasileira (Pereira & Silva 1973; Ferreira & Pereira com. pes.), nenhum trabalho anatômico sobre suas espécies foi encontrado. Há grande divergência sobre o número de espécies deste gênero. Segundo Mabberley (1997), ele é composto por 45 espécies; Ferreira e Pereira (com. pess.) consideram aproximadamente 34 e Morillo (1997) apenas 20, dentre as quais cerca de dez ocorrem no Brasil (Rapini *et al.* 2001).

Tendo em vista a escassez de dados anatômicos para as espécies brasileiras da Apocynaceae e, principalmente, de *Aspidosperma* e *Blepharodon*, este trabalho visa estudar tanto órgãos vegetativos quanto reprodutivos, contribuindo assim, para melhor conhecimento destes gêneros, das relações entre as subfamílias, da complexidade estrutural exclusiva das flores deste grupo e de ampliar os dados sobre espécies dos cerrados paulistas.

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo investigar a estrutura floral de espécies de *Aspidosperma* e *Blepharodon*, com ênfase nas estruturas secretoras, e efetuar um estudo comparado dos coléteres. As espécies estudadas foram *Aspidosperma australe* Müll. Arg., *Aspidosperma tomentosum* Mart. e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn.

### Objetivos específicos

A proposta da presente investigação foi:

- verificar a ocorrência de coléteres em órgãos vegetativos e florais de *Aspidosperma australe*, *Aspidosperma tomentosum* e *Blepharodon bicuspidatum*;
- identificar os tipos, descrever a estrutura, definir a distribuição dos coléteres e avaliar o seu potencial taxonômico para as Apocynaceae s.l.;
- estudar a ontogênese, histoquímica e função da secreção dos coléteres foliares e florais de *B. bicuspidatum*;
- caracterizar anatomicamente as estruturas secretoras florais de *A. australe* e *B. bicuspidatum* e definir os estádios de desenvolvimento em que estas estruturas estejam em fase secretora.

# CAPÍTULO 1

## Distribuição e estrutura dos coléteres foliares e calicinais de espécies de *Apocynaceae s.l.*

### Introdução

Os coléteres são estruturas que produzem uma secreção viscosa que lubrifica e protege meristemas em início de desenvolvimento (Thomas 1991); a secreção pode ser constituída apenas por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e compostos lipofílicos (Fahn 1979, 1990). Em termos estruturais, os coléteres podem ser tricomas ou emergências (vascularizadas ou não); eles são encontrados nos órgãos vegetativos e/ou reprodutivos (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991) de 58 famílias de dicotiledôneas (Thomas 1991). Estas estruturas são particularmente bem representadas nas Gentianales, onde estão presentes em 228 gêneros (Thomas 1991).

Em *Apocynaceae s.l.* (Endress & Bruyns 2000), os coléteres foram registrados para 74 dos 424 gêneros (Woodson 1935; Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Pereira & Silva 1974; Silva *et al.* 1975; Morillo 1978, 1995; Arekal & Ramakrishna 1980; Fjell 1983; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989 a,b,c, 1990, 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2005; Rio *et al.* 2002; Simões 2004) e mencionados nas descrições taxonômicas de membros das cinco subfamílias (Endress & Bruyns 2000).

Para as *Apocynaceae s.l.*, os coléteres são emergências ou glândulas persistentes (Thomas 1991) que podem estar presentes na margem da lâmina foliar (Sennblad *et al.* 1998), pecíolo, brácteas, bractéolas e cálice (Thomas 1991). Apesar de sua ampla

distribuição na família, poucos trabalhos foram publicados sobre estrutura, distribuição, ontogênese e histoquímica de coléteres, podendo ser citados os estudos de Ramayya e Bahadur (1968), Dave *et al.* (1987), Thomas *et al.* (1989) e Thomas e Dave (1989 a,b,c); Thomas e Dave (1990) estudaram o modo de secreção dos coléteres de *Alstonia scholaris* L. e Thomas e Dave (1991), os aspectos filogenéticos dos coléteres em Apocynaceae. Apenas os trabalhos realizados em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stedelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000), *Forsteronia glabrescens* Müll. Arg. (Rio *et al.* 2005), *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio *et al.* 2002), *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg., *Mandevilla pycnantha* (Steud.) Woodson, *M. scabra* (R & S) K. Schum., *M. tenuifolia* (J.C. Mikan) Woodson e *Mesechites mansoana* (A.DC.) Woodson, *Secondatia densiflora* A.DC. e *S. floribunda* A.DC. (Simões 2004) foram efetuados por pesquisadores brasileiros.

*Aspidosperma* pertence à tribo Alstonieae G. Don (Endress & Bruyns 2000). Nas descrições taxonômicas, o gênero e a tribo são desprovidos de coléteres calicinais (Allorge & Poupat 1991; Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Endress & Bruyns 2000), embora coléteres foliares e florais já tenham sido observados em *Alstonia scholaris* (Mueller 1985; Thomas & Dave 1989a,b, 1990, 1991) e coléteres foliares em *Vallesia* Ruiz & Pav. (Mirabella 1897 *apud* Thomas 1991), que são representantes de Alstonieae (Endress & Bruyns 2000).

*Blepharodon* pertence à tribo Asclepiadeae (R. Br.) Duby. Nesta tribo são encontrados coléteres foliares agrupados na face adaxial do pecíolo próximo à lâmina foliar. Os membros da subfamília possuem poucos a muitos coléteres calicinais na superfície adaxial das sépalas e são mais ou menos alternisépalos (Endress & Bruyns 2000). Há registro macromorfológico de coléteres peciolares e calicinais (Pereira & Silva 1974; Morillo 1978, 1995), mas nenhum dado anatômico sobre estas estruturas foi encontrado na literatura.

Dada a falta de informações anatômicas sobre estas estruturas secretoras nestes dois gêneros, o presente estudo objetivou verificar a ocorrência de coléteres em órgãos vegetativos e florais de *Aspidosperma australe* Müll. Arg., *Aspidosperma tomentosum* Mart. e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn., com ênfase na estrutura e distribuição. Além disso, teve também o propósito de ampliar o conhecimento sobre estas espécies dos cerrados paulistas e avaliar o potencial taxonômico destas estruturas para as Apocynaceae s.l.

### Material & métodos

O material de estudo foi coletado em quatro áreas de cerrado do estado de São Paulo (Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, Estação Experimental de Itirapina e fragmentos situados nos municípios de Campinas e Pratânia) e uma área urbana (*campus* da Universidade Estadual de Campinas). As coletas foram realizadas de novembro de 2002 a outubro de 2003 e as plantas identificadas pela Profa. Dr. Luiza S. Kinoshita e pelo Dr. André O. Simões. Materiais testemunha com flores e frutos de 14 indivíduos foram herborizados: *A. australe*: Brasil, São Paulo, Campinas, 08/V/2003, D. Demarco 10; *A. tomentosum*: Brasil, São Paulo, Moji-Guaçu, 25/IX/2003, D. Demarco 12; 01/X/2004, D. Demarco 19, D. Demarco 20, D. Demarco 21; Pratânia, 30/IX/2003, D. Demarco 13; *B. bicuspidatum*: Brasil, São Paulo, Moji-Guaçu, 18/XI/2002, D. Demarco 7; Pratânia, 05/III/2003, D. Demarco 8; Itirapina, 19/III/2003, D. Demarco 9; Campinas, 29/VIII/2003, D. Demarco 11; 08/V/2004, D. Demarco 14, D. Demarco 15; 04/VIII/2004, D. Demarco 16, D. Demarco 17; 23/IX/2004, D. Demarco 18. Todas as exsicatas serão incorporadas ao Herbário UEC.

Ápices vegetativos de indivíduos de sol (borda de trilha) e de sombra (interior da vegetação) de *B. bicuspidatum* foram coletados e fixados na primavera (setembro-outubro), verão (fevereiro e março), outono (maio e junho) e inverno (agosto). A contagem dos nós de cada material coletado foi realizada a partir do ápice do ramo

Na coleta do material botânico, os ramos foram cortados com lâmina aquecida para coagular e manter o látex dentro dos laticíferos.

Ramos vegetativos e reprodutivos portando botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e flores adultas de um indivíduo de *A. australe*, quatro de *A. tomentosum* e 13 de *B. bicuspidatum* foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 h (Johansen 1940) e em FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 h (Lillie 1948 in Clark 1973) e estocados em etanol 70%. Devido à fácil visualização a olho nu dos coléteres de *B. bicuspidatum*, todos os nós abaixo do ápice caulinar que apresentavam coléteres também foram coletados e receberam os mesmos tratamentos dos ramos para fixação.

Ramos, vegetativo fresco e florido fixado, foram utilizados para a caracterização morfológica dos coléteres. A família do inseto fitófago -Aphididae - encontrado no ramo vegetativo de *B. bicuspidatum* foi identificada pela MS. Giovanna G. Fagundes.

Para o estudo anatômico, ápices caulinares vegetativos, nós subseqüentes com as respectivas folhas, botões florais e flores adultas dos indivíduos das três espécies foram isolados, desidratados em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídos em "paraplast" e seccionados transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo Microm HM340E. A espessura das secções variou de 8 a 40 µm dependendo da espécie. Os ápices e botões florais das espécies de *Aspidosperma* foram corados com a tripla coloração de Flemming (Johansen 1940) e as flores adultas de *A. australe*, ápices, botões florais e flores adultas de *B. bicuspidatum*, com azul de astra e safranina (CI 50240; Gerlach 1969 modificado); as lâminas foram montadas em resina sintética.

As fotografias foram obtidas em microscópio estereoscópico Nikon SMZ-U e as fotomicrografias, em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak Pro Image asa 100. As escalas das figuras foram obtidas através de régua e lâmina micrométrica, fotografadas nas respectivas condições ópticas das demais ilustrações.

A análise biométrica dos coléteres foi efetuada com a utilização de paquímetro digital. As medidas foram obtidas a partir de ampliações fotográficas e desenhos em câmara clara; 120 mensurações foram realizadas em coléteres foliares e 80 em calicinais de nove indivíduos. 39 flores adultas foram observadas para se verificar eficiência da secreção dos coléteres calicinais contra fungos.

## Resultados

### *Aspidosperma*

Muitos ápices caulinares vegetativos de *A. australe* e *A. tomentosum* foram seccionados transversal e longitudinalmente a procura de coléteres. No entanto, estas estruturas não foram encontradas em nenhum dos indivíduos estudados (Fig. 1-5).

Ambas as espécies de *Aspidosperma* apresentam as folhas alternas e congestas nos ápices e cerca de 20 nós podem ser observados em um mesmo ápice isolado da planta. Grandes quantidades de tricomas multicelulares unisseriados estão presente nos primórdios foliares e folhas jovens das duas espécies (Fig. 1-2, 4-5; cabeça de seta); porém, nenhum tricoma glandular foi encontrado nesta região. Todos os tricomas observados são tectores, geralmente com parede não lignificada nos primórdios foliares (Fig. 1-2, 4-5; cabeça de seta). A partir do quinto ou sexto nó em *A. tomentosum* (Fig. 5; seta) e cerca do vigésimo em *A. australe*, as folhas já apresentam a maior parte dos tricomas com as paredes lignificadas.

Botões florais em vários estádios de desenvolvimento e flores adultas foram investigados à procura de coléteres através de cortes seriados transversais longitudinais. Em *A. australe* e *A. tomentosum*, nenhum coléter foi encontrado nas flores das duas espécies analisadas (Fig. 6-11).

Embora ambas as espécies não possuam tricomas na face adaxial das sépalas, muitos tricomas tectores de paredes não lignificadas foram observados na face abaxial do tubo da corola de botões em início de desenvolvimento (Fig. 6-7, 10-11; cabeça de seta); raramente foram encontrados na face abaxial da base da corola de flores em antese (Fig. 8-9).

### *Blepharodon*

*B. bicuspidatum* possui coléteres foliares e calicinais observáveis a olho nu. Os **coléteres foliares** são encontrados nas regiões nodais ocupando posição interpeciolar e peciolar (Fig. 12-20, 27-41), produzem uma secreção de aspecto viscoso e de cor branca que permeia o ápice, os primórdios foliares e as folhas jovens enquanto estas estão junto ao caule (Fig. 12-15). Esta secreção lubrifica os meristemas protegendo-os contra o dessecamento e, por ser tão profusa e viscosa, imobilizou um afídeo (Aphididae) junto ao ápice (Fig. 20).

Os **coléteres calicinais** de *B. bicuspidatum* (Fig. 21) são observados retirando-se a corola, corona e ginostégio, ocupando posição alterna às sépalas (Fig. 22-26). Grande quantidade de fungos foi encontrada apenas em duas flores em pós-antese (Fig. 24-26) e estiveram ausentes em todas as demais.

### Número

Os coléteres interpeciolares geralmente aparecem em três pares por nó (Fig. 31); entretanto, este número pode variar entre diferentes nós de um mesmo indivíduo (Fig. 13-17), sendo observados seis ou sete coléteres (Fig. 27). Mais de sete coléteres interpeciolares são encontrados em um mesmo nó, quando o indivíduo está florido (Fig. 20) e, neste caso, o número pode variar muito, pois para cada ramo floral há pelo menos três pares de coléteres.



Em cada pecíolo geralmente é encontrado um par de coléteres (Fig. 19); contudo eventualmente, observa-se um terceiro coléter extremamente reduzido em posição intermediária junto à base dos outros dois (Fig. 28).

Os coléteres calicinais ocorrem na base do cálice, nas cinco regiões alternas às sépalas (Fig. 22-26, 42-43). Em cada um destes locais, um a três coléteres podem ser encontrados (Fig. 22-26). Essa variação numérica foi observada entre indivíduos de diferentes áreas, entre flores de um mesmo indivíduo e até em uma mesma flor (Fig. 22-23).

### Estrutura

Os **coléteres foliares** são cônicos, íntegros (raramente bífidos) e caducos. Não há diferenças quanto à estrutura destes coléteres entre indivíduos de sol e de sombra, nem entre indivíduos coletados nas diferentes estações. Os interpeciolares (Fig. 13-17, 33-35, 37-40) são, inicialmente retilíneos (Fig. 13-16) e, em sua fase final curvos (Fig. 17). Os peciolares situam-se na face adaxial do pecíolo junto à lâmina foliar, têm a base alargada (Fig. 19), posicionam-se paralelos ao pecíolo em folhas jovens (Fig. 33-34, 36) e levemente inclinados em folhas adultas (Fig. 19).

Os coléteres foliares são verdes em sua fase inicial (Fig. 13-14), depois se tornam amarelados e o pedúnculo permanece verde (Fig. 15-16); conforme senescem do ápice para a base, as regiões necrosadas ficam acastanhadas (Fig. 15-18), sendo encontrados até o sétimo nó visível a olho nu (Fig. 13-19).

Os coléteres interpeciolares e peciolares são de tipos distintos. Os interpeciolares são formados por um pedúnculo e uma parte secretora alongada (Fig. 33-35, 37) e podem ter de 700 a 1300  $\mu\text{m}$  de comprimento por 190 a 400  $\mu\text{m}$  de largura. Eventualmente, pode ser observada uma bifurcação no ápice da cabeça do coléter central (Fig. 31-32); portanto, os coléteres interpeciolares marginais são íntegros e os centrais podem ser íntegros ou bífidos.

O pedúnculo destes coléteres é constituído por epiderme com células quadradas secretoras e não secretoras e um parênquima central. A face abaxial possui células epidérmicas não secretoras e a adaxial tem células secretoras na região distal (Fig. 29, 35) e não secretoras na proximal (Fig. 34-35). As células parenquimáticas têm formato irregular ou levemente alongado e não apresentam atividade secretora (Fig. 35). Estes coléteres se inserem em uma estrutura em arco, que interconecta os pecíolos de um mesmo nó; ela possui cerca de 20  $\mu\text{m}$  e é formada por epiderme e parênquima não secretores (Fig. 30).

A parte secretora é formada por epiderme secretora e um eixo parenquimático central não secretor (Fig. 33-35, 37-38, 40). A epiderme é unisseriada, composta por células secretoras em paliçada com paredes finas, citoplasma de aspecto denso e são recobertas por uma fina cutícula (Fig. 34-35, 38, 40). O núcleo dificilmente pode ser observado devido à secreção acidófila que preenche todo o citoplasma. Espaços periplasmáticos são observados (Fig. 38; seta); eles são formados pela retração do citoplasma e/ou distensão da parede periclinal externa e é o local onde a secreção se acumula antes de ser liberada para o exterior. Rompimento de cutícula nunca foi observado nestes coléteres. O eixo parenquimático é formado por células não secretoras alongadas longitudinalmente em relação ao coléter e se afunila em direção ao ápice (Fig. 33-35, 37). Nenhum dos coléteres interpeciolares possui vascularização (27, 29-35, 37-40).

Os coléteres peciolares, ao contrário dos interpeciolares, não são pedunculados (Fig. 33-34, 36, 41) e podem ter de 600 a 1100  $\mu\text{m}$  de comprimento por cerca de 720  $\mu\text{m}$  de largura. Eles são formados apenas por um eixo parenquimático recoberto por uma epiderme secretora (Fig. 33-34, 36, 41). Assim como nos coléteres interpeciolares, a epiderme é unisseriada, composta por células em paliçada com paredes finas, citoplasma com secreção acidófila de aspecto denso e recoberta por uma fina cutícula (Fig. 34, 36, 40). Os núcleos também não podem ser observados, pois

possuem afinidade pela safranina e apresentam a mesma cor que a secreção. Espaços periplasmáticos podem ser observados; entretanto, rompimento de cutícula não foi observado nestes coléteres. O eixo parenquimático é formado por células não secretoras alongadas no sentido longitudinal do coléter e se afunila em direção ao ápice (Fig. 33-34, 36). Eles não apresentam vascularização (Fig. 28, 33-34, 36, 41).

Idioblastos cristalíferos foram encontrados no parênquima de alguns coléteres interpeciolares. Todos os coléteres que os apresentaram estavam em fase secretora e os cristais são sempre drusas (Fig. 37-39). Com ocorrência bem mais freqüente laticíferos foram observados entremeando as células parenquimáticas de todos os coléteres interpeciolares e peciolares (Fig. 40-41).

Os coléteres calicinais são laminares (Fig. 22-26, 42-44), podem ser inteiros ou partidos e são persistentes (Fig. 22-26). As suas dimensões variam muito e o comprimento é diferente até entre os coléteres de um mesmo grupo, mas, em geral são menores que os coléteres foliares. Eles podem ter de 340 a 650  $\mu\text{m}$  de comprimento; quando em número de três, geralmente o central é maior (Fig. 22-25). A largura varia de acordo com o número de coléteres e se eles são inteiros ou partidos podendo ter de 150 a 820  $\mu\text{m}$ .

O nível de segmentação dos coléteres partidos variou entre os indivíduos das diferentes localidades (Tabela 1). As flores do indivíduo de Moji-Guaçu apresentam coléteres que se partem no ápice (Fig. 26, 43). Porém, as flores dos indivíduos de Campinas, Pratânia e Itirapina possuem coléteres que se partem na base, próximo a sua inserção com o cálice (Fig. 42) e, geralmente, em três ou, às vezes, em dois. Os tripartidos no ápice são trilobados na face abaxial da porção unida (Fig. 43). Eles são sésseis sendo formados apenas por uma epiderme secretora e um eixo parenquimático não secretor (Fig. 44).

**Tabela 1.** Coléteres encontrados em flores adultas de indivíduos provenientes das diferentes localidades de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn.

	Campinas	Pratânia	Itirapina	Moji-Guaçu
<b>Tipo</b>	I ou P	I ou P	I ou P	P
<b>Número*</b>	1 ou 3	1 ou 3	1 ou 3	1
<b>Partição</b>	basal	basal	basal	apical

**Legenda:** I = inteiro; P = partido; \* = número de coléteres em cada região entre as sépalas.

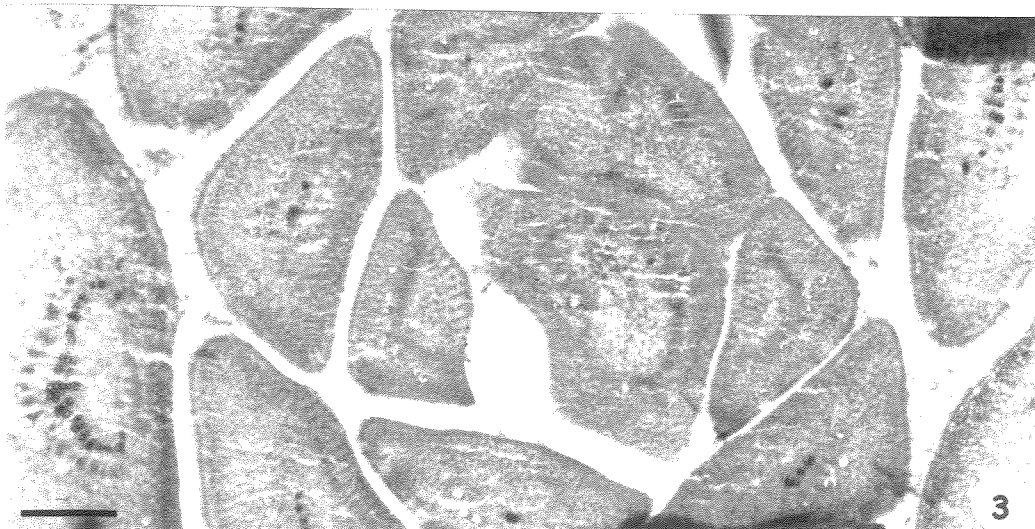
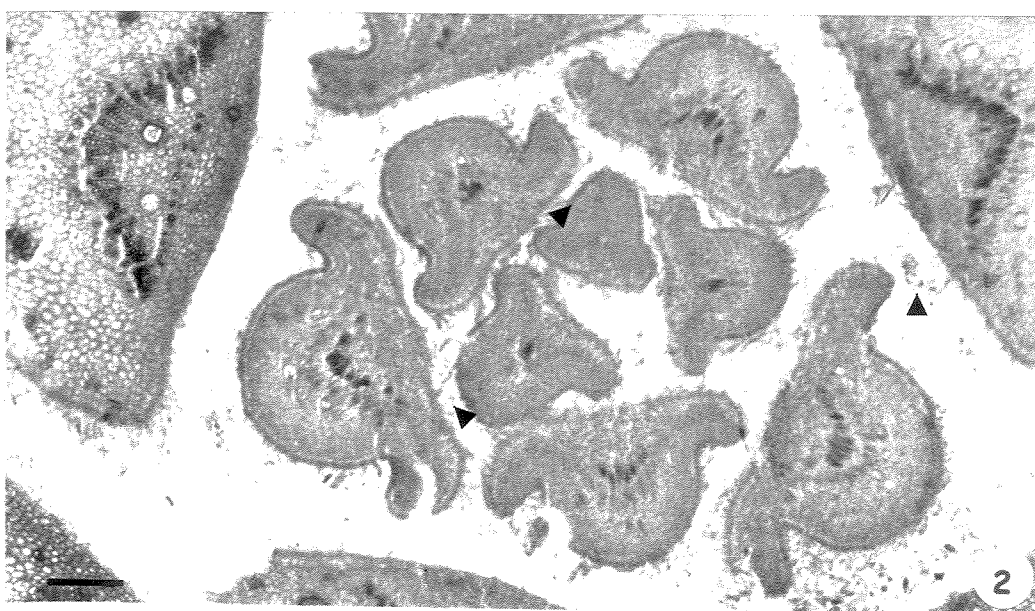
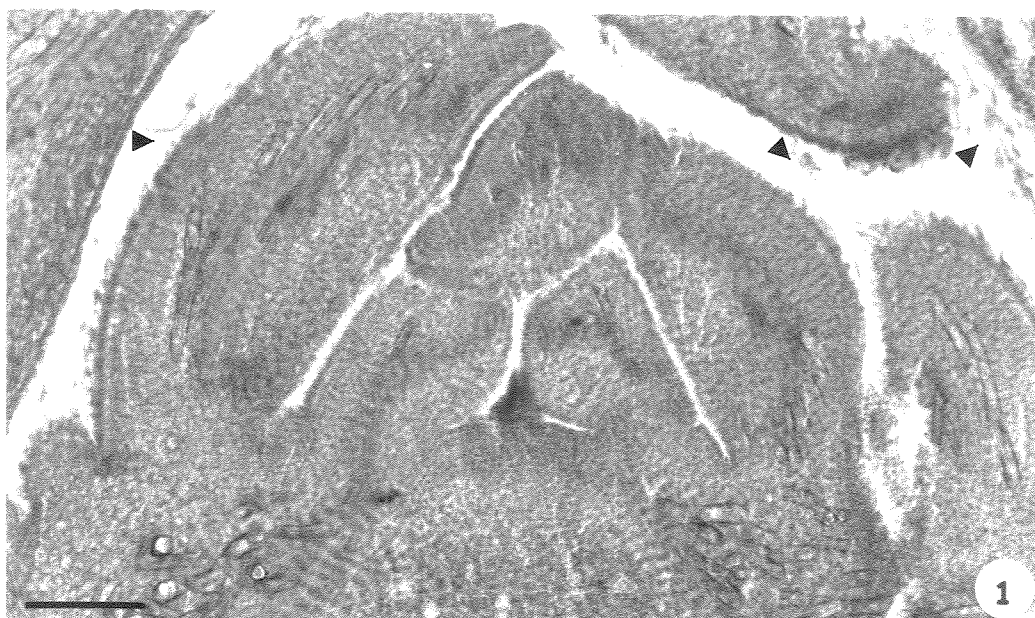
A epiderme é unisseriada, composta por células alongadas dispostas em paliçada e recoberta por uma fina cutícula. As células possuem paredes finas e citoplasma contendo uma secreção acidófila de aspecto denso. O núcleo dificilmente está evidente devido a sua coloração ser semelhante à da secreção; porém, quando ele é observado, ocupa preferencialmente posição mediana na célula. Espaços periplasmáticos, formados pela retração do citoplasma e/ou distensão da parede periclinal externa, são observados na maioria das células (Fig. 44); neste local, a secreção é acumulada antes de ser liberada para o exterior. Não foi observado rompimento de cutícula para liberação da secreção.

O parênquima é formado por células não secretoras alongadas longitudinalmente. O número de camadas de células varia imensamente dependendo do plano de seccionamento e da região do coléter analisada, principalmente quando se compara um coléter inteiro e um partido. O parênquima sempre se afunila em direção ao ápice (Fig. 44).

Os coléteres calicinais não apresentam vascularização (Fig. 42-44) e laticíferos de pequeno calibre, às vezes, são observados entre as células parenquimáticas.

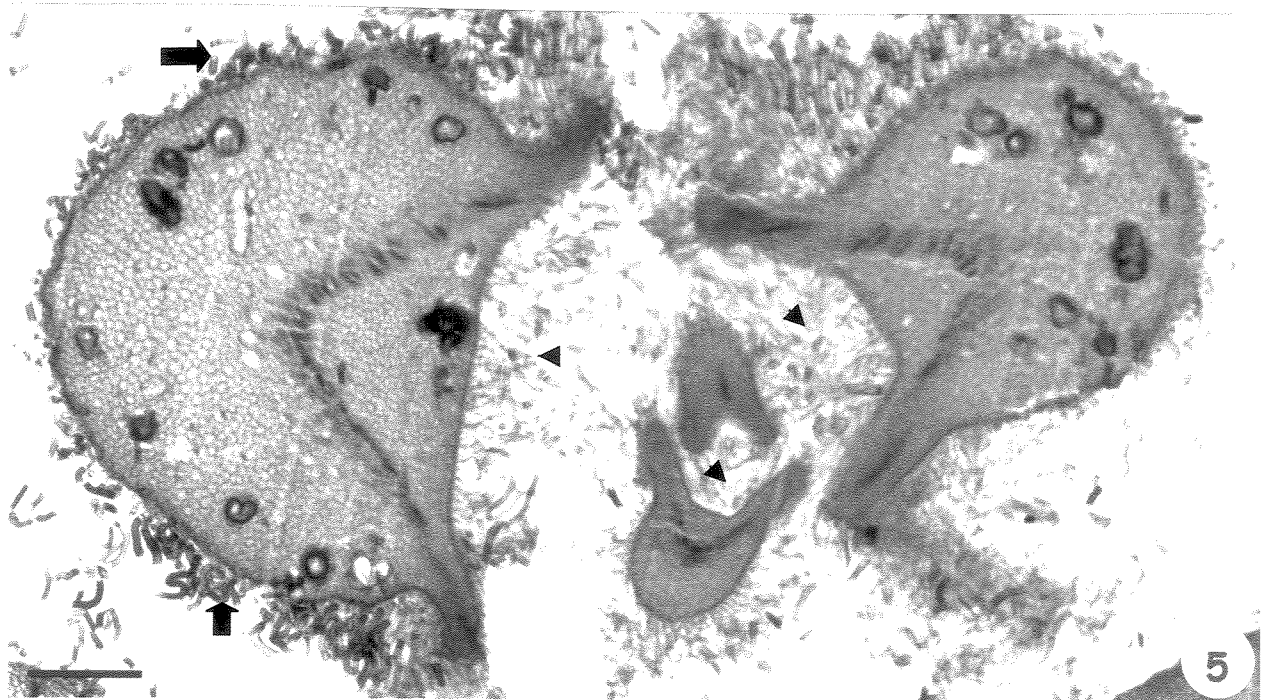
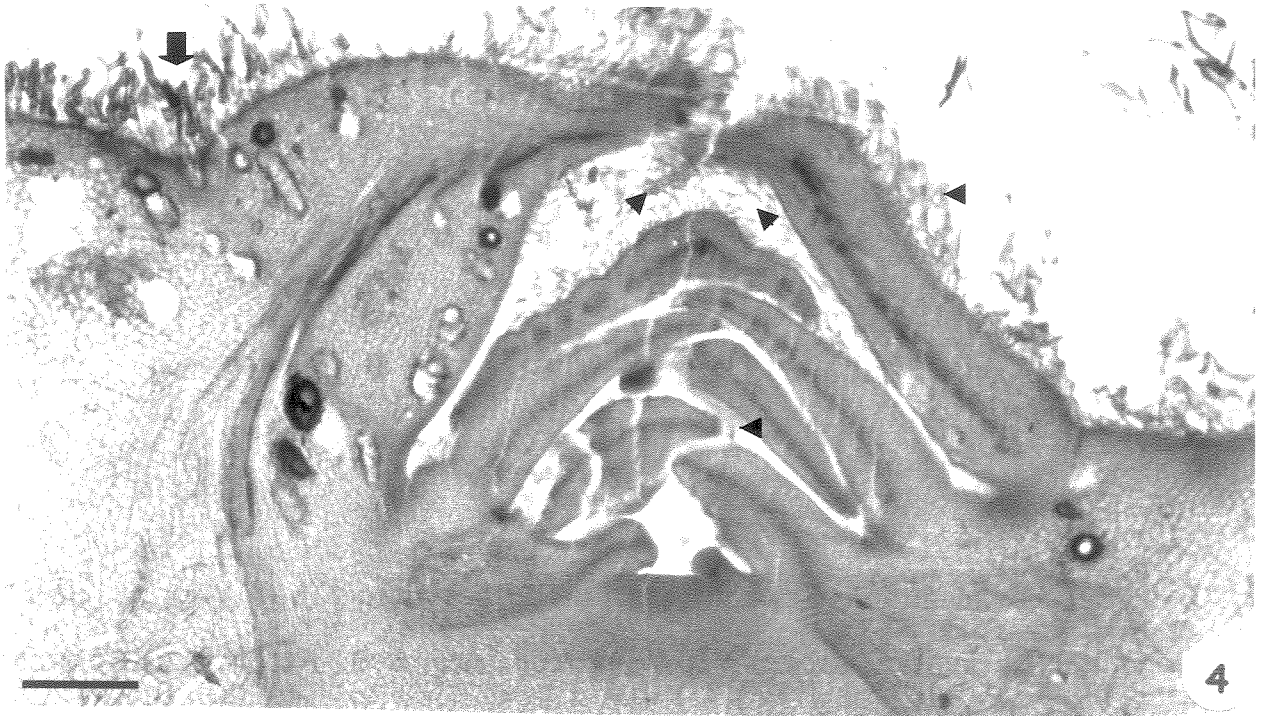
ILUSTRAÇÕES

Fig. 1-3. Secções longitudinal (1) e transversais (2-3) de ápices caulinares vegetativos de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. 1-3. Ausência de coléteres e presença de grande quantidade de tricomas tectores não lignificados (cabeça de seta) nos primórdios foliares. Escalas: 1. 75  $\mu\text{m}$ ; 2-3. 150  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 4-5.** Secções longitudinal (4) e transversal (5) de ápices caulinares vegetativos de *Aspidosperma tomentosum* Mart. 4. Ausência de coléteres e presença de grande quantidade de tricomas tectores não lignificados nos primórdios foliares. 5. Tricomas tectores lignificados presentes em folhas jovens do quinto e sexto nós. cabeça de seta = tricomas não lignificados; seta = tricomas lignificados. Escalas: 4-5. 300 µm.





**Fig. 6-8.** Secções longitudinal e transversal de botões florais (6-7) e longitudinal de flor adulta (8) de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. 6-8. Ausência de coléteres calicinais. 6-7. Presença de tricomas tectores não lignificados (cabeça de seta) na face abaxial da base do tubo da corola. 8. Ausência dos tricomas tectores na base da corola. **Ca** = cálice; **S** = sépala; **TC** = tubo da corola. **Escala:** 6. 150  $\mu\text{m}$ ; 7. 300  $\mu\text{m}$ ; 8. 250  $\mu\text{m}$ .

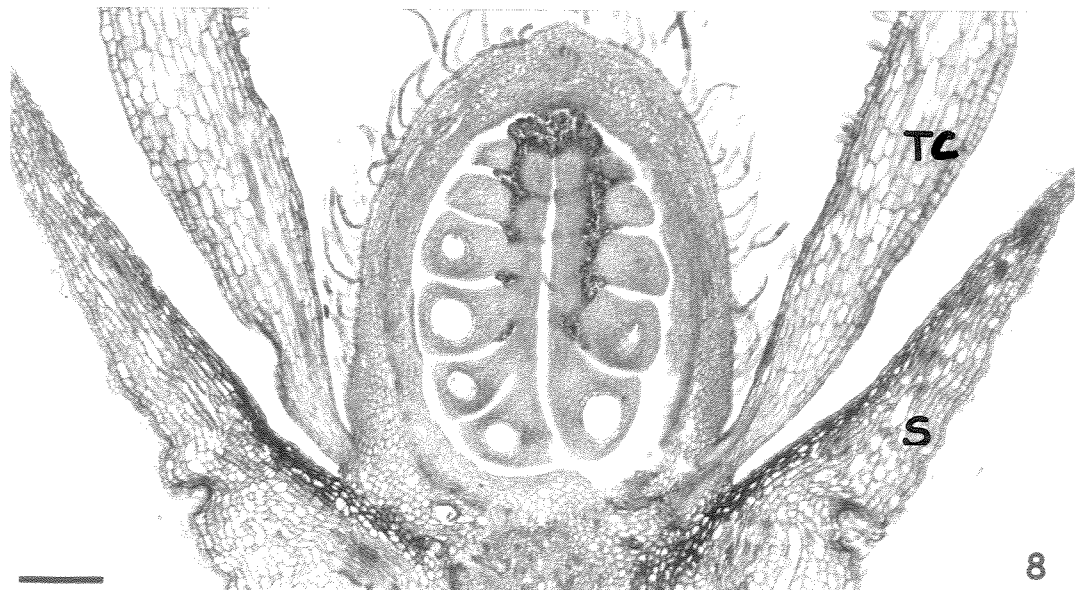
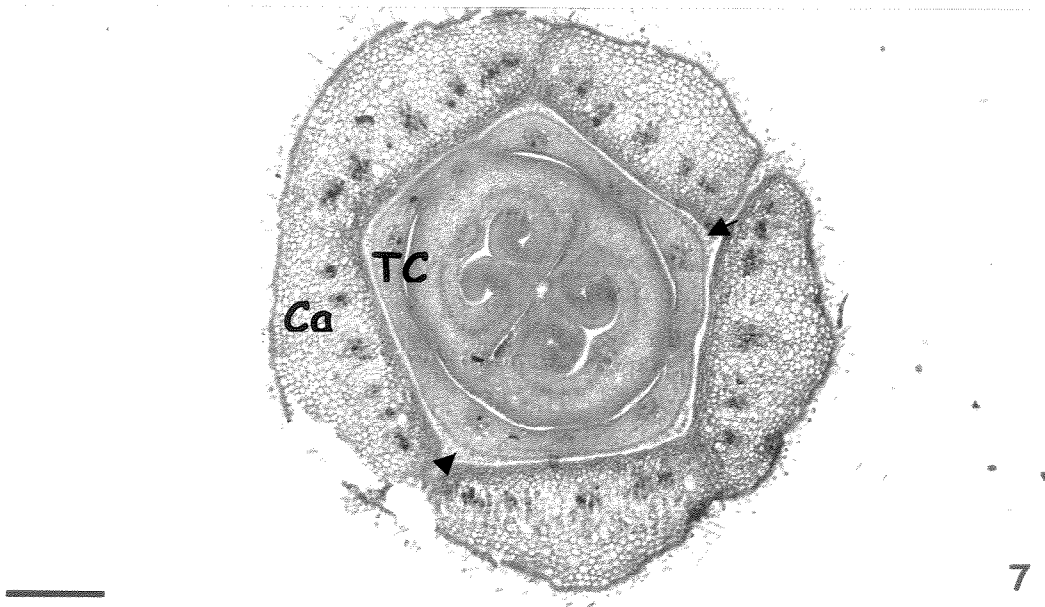
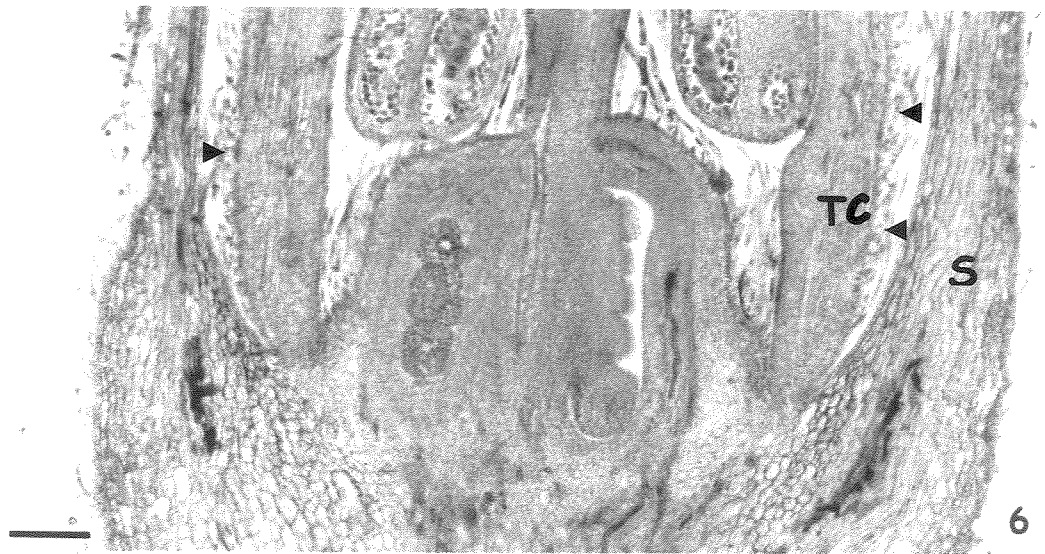
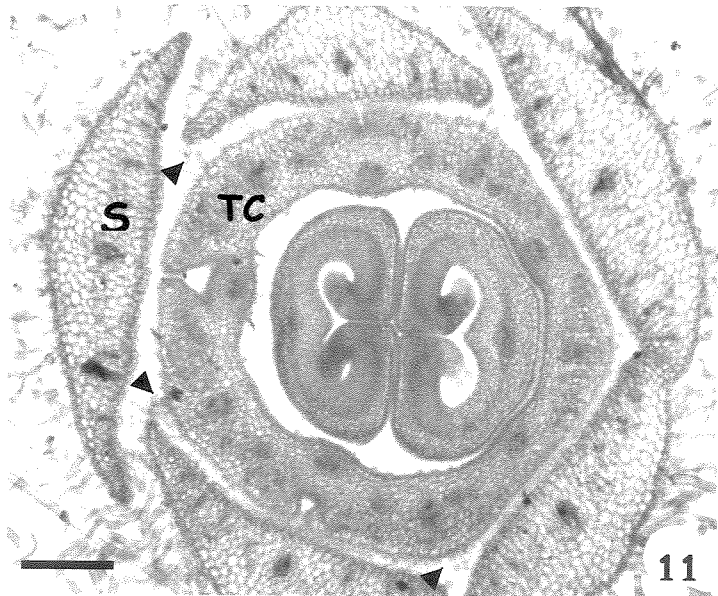
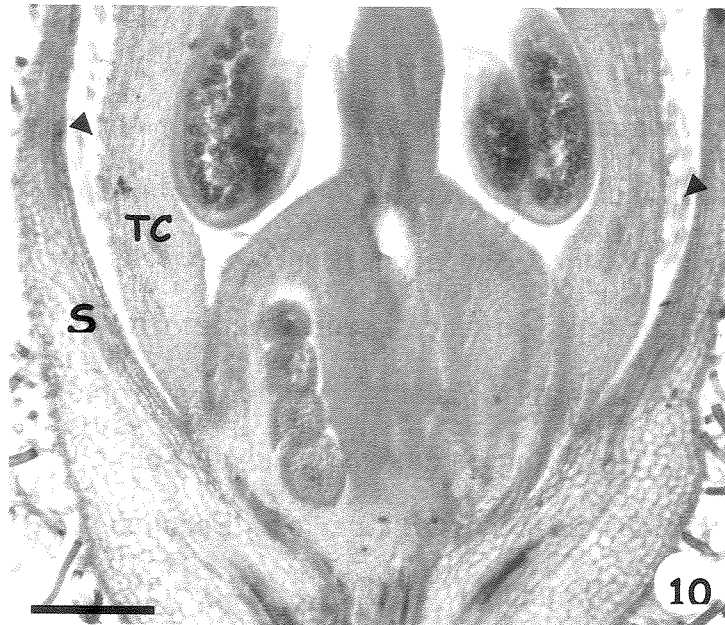
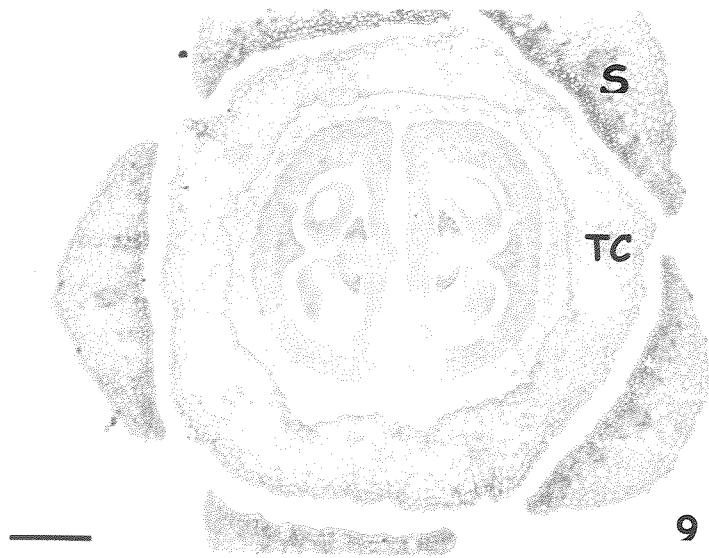
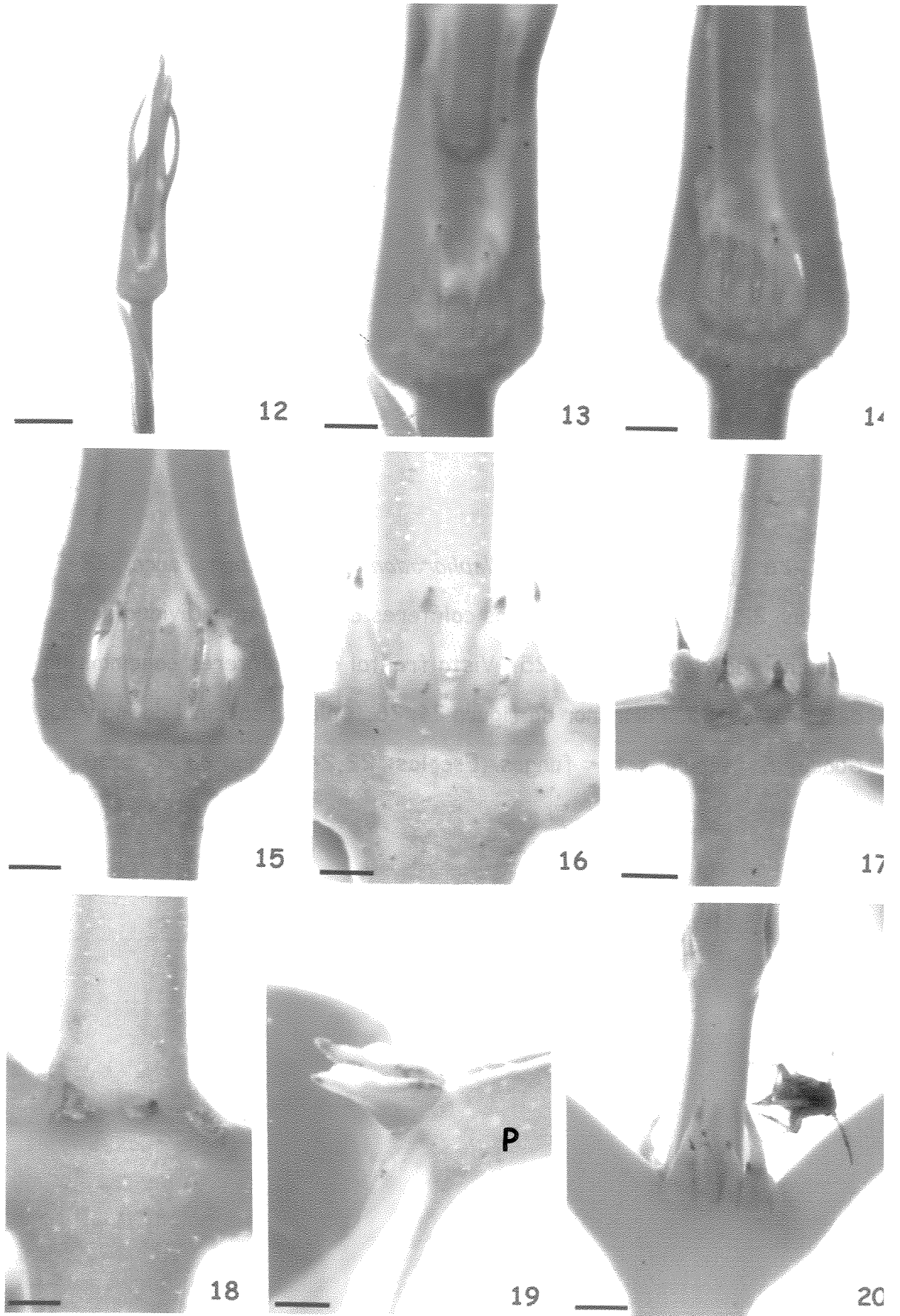


Fig. 9-11. Secções transversal de flor adulta de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. (9) e longitudinal e transversal de botões florais de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (10-11). 9-11. Ausência de coléteres calicinais. 9. Ausência de tricomas na face externa do tubo da corola. 10-11. Presença de tricomas tectores não lignificados (cabeça de seta) na face externa da base do tubo da corola. S = sépala; TC = tubo da corola. Escalas: 9. 300 µm; 10. 75 µm; 11. 150 µm.



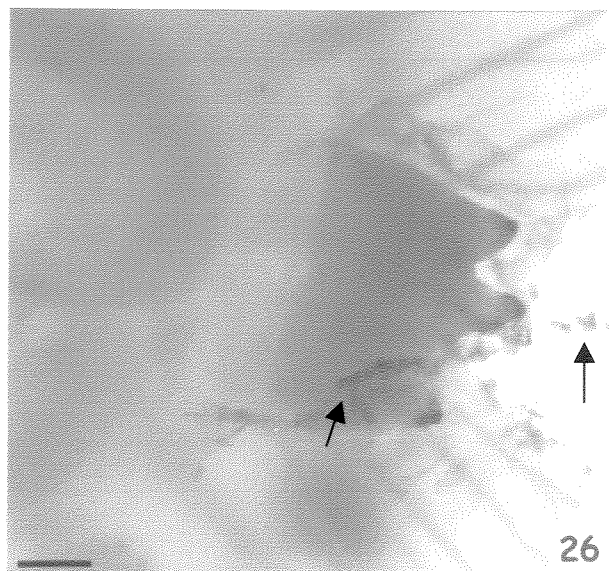
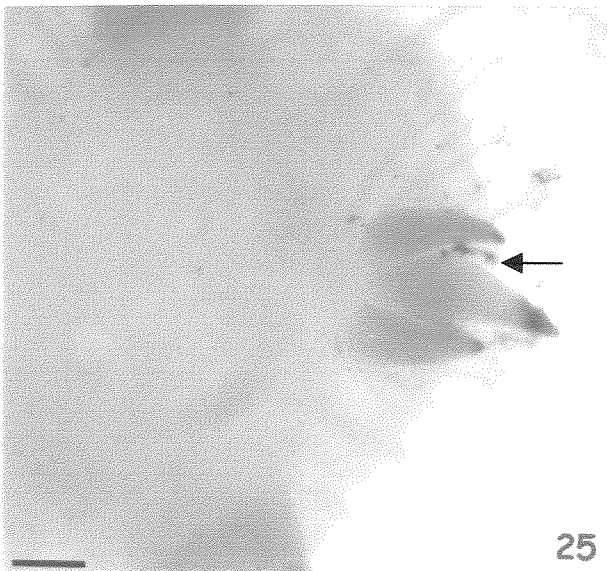
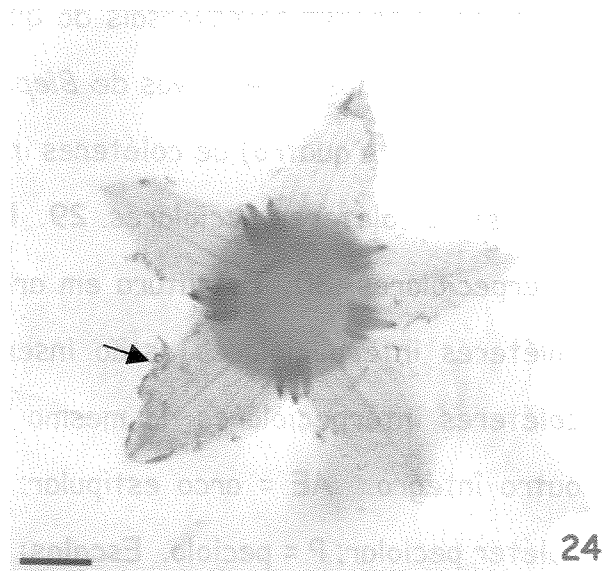
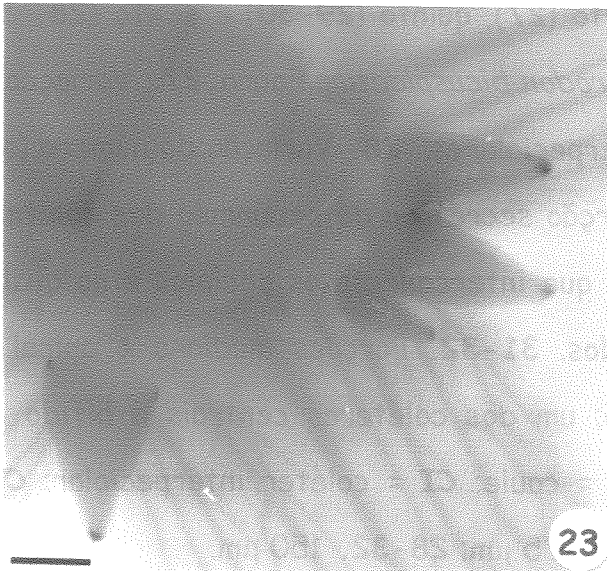
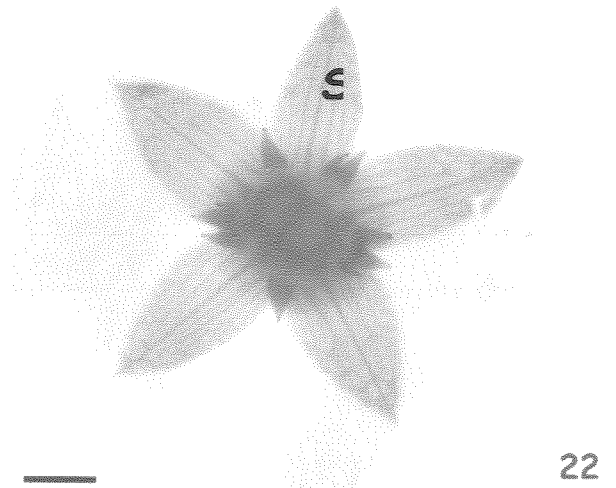
**Fig. 12-20.** Ramos vegetativo fresco de indivíduo de cerrado de Campinas (12-19) e florido fixado de indivíduo de Moji-Guaçu (20) de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 12-15, 19. Presença de secreção branca e viscosa secretada pelos coléteres foliares. 12. Vista geral do ápice caulinar vegetativo. 13. Pormenor da figura 12. 14-18. Segundo, terceiro, quarto, quinto e sétimo nós visíveis a olho nu, respectivamente. 19. Folha do sexto nó visível a olho nu. 20. Afídeo (Aphididae) preso à secreção dos coléteres. P = pecíolo. Escalas: 12. 1,5 mm; 13,16,19. 400  $\mu\text{m}$ ; 14-15,18,20. 500  $\mu\text{m}$ ; 17. 750  $\mu\text{m}$ .



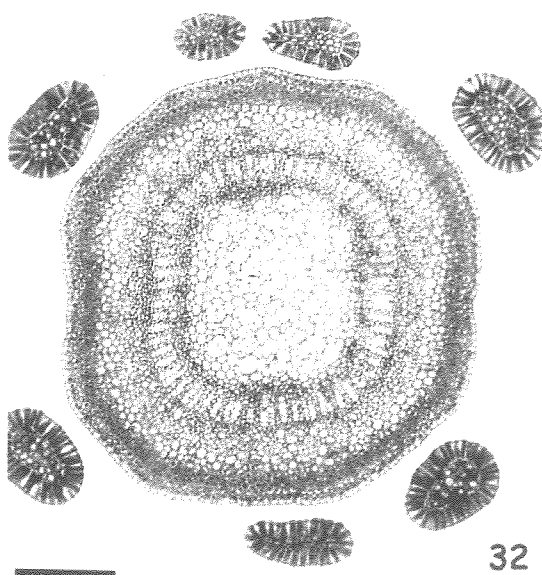
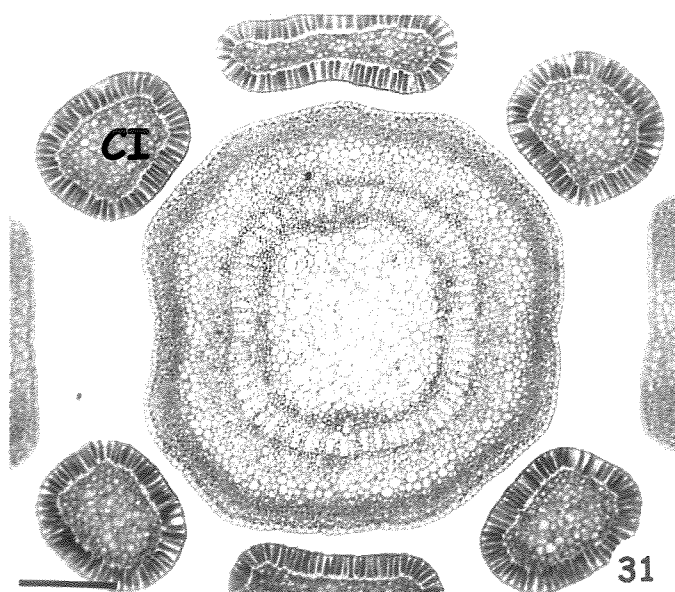
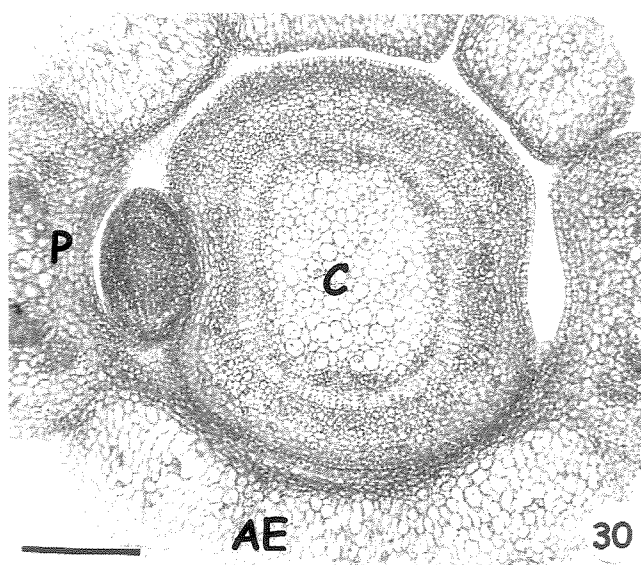
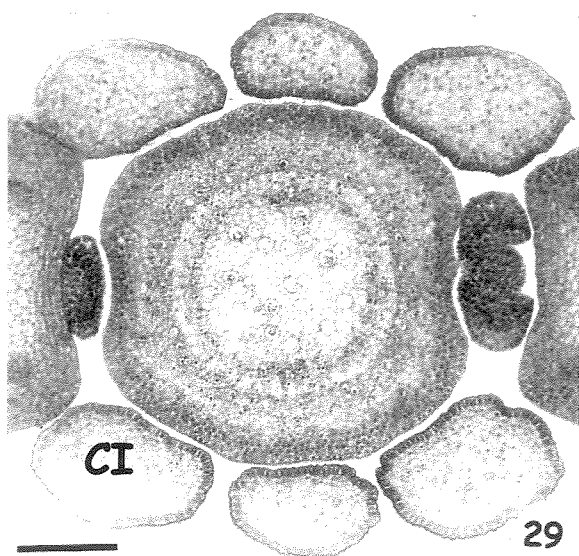
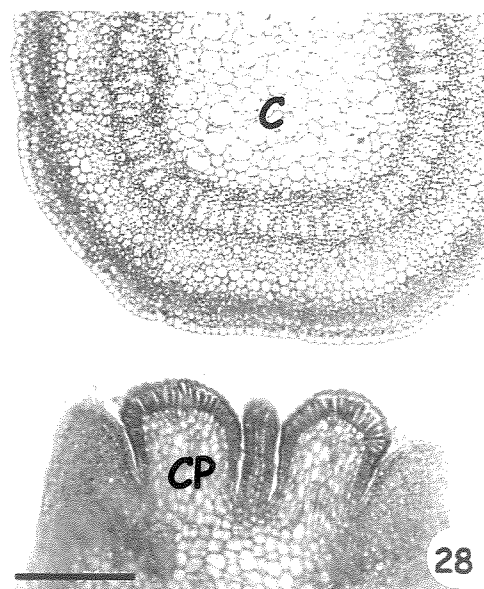
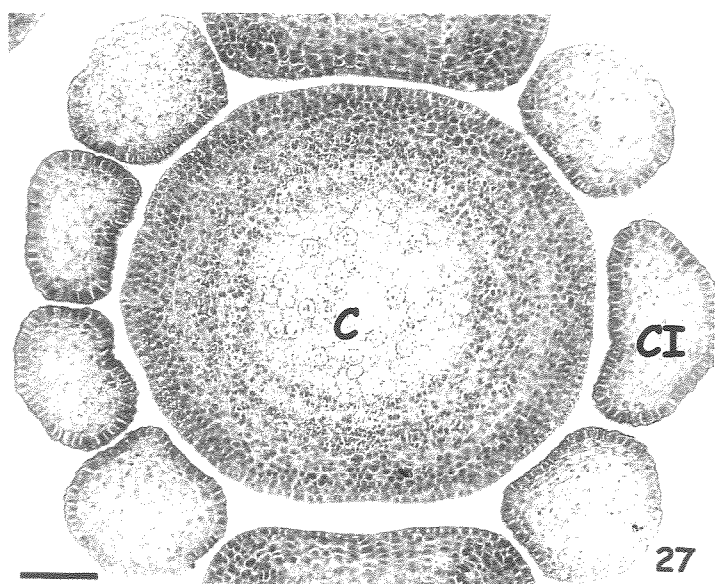


**Fig. 21-26.** Flores adultas de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 22-26. Flores fixadas. 22-23. Vista frontal dos coléteres calicinais do indivíduo de Pratânia. 23. Pormenor da figura 22. 24-25. Vista frontal dos coléteres calicinais do indivíduo de Itirapina. 25. Pormenor da figura 24. 26. Coléter calicinal do indivíduo de Moji-Guaçu. S = sépala; seta = fungos. Escalas: 22,24. 1 mm; 23,25. 250  $\mu\text{m}$ ; 26. 200  $\mu\text{m}$ .

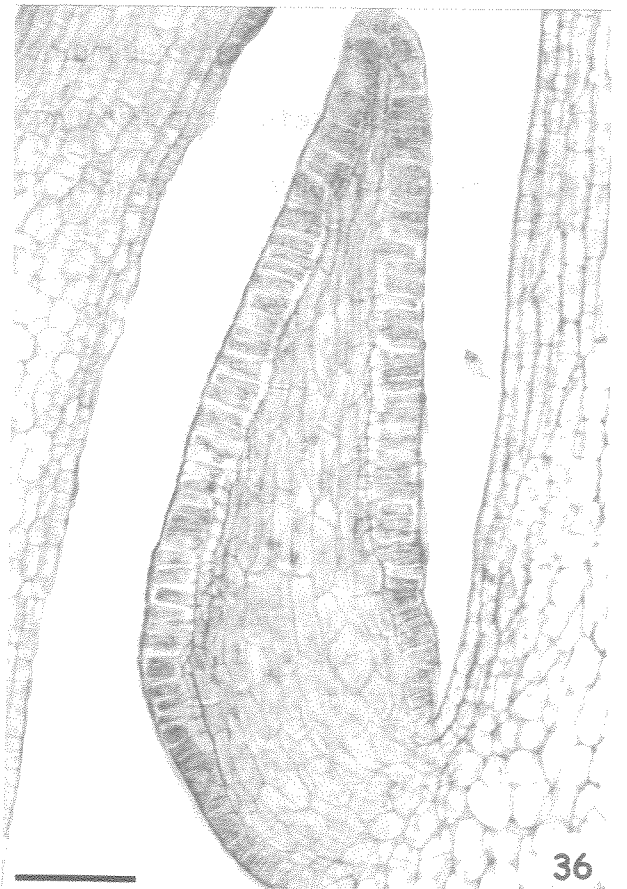
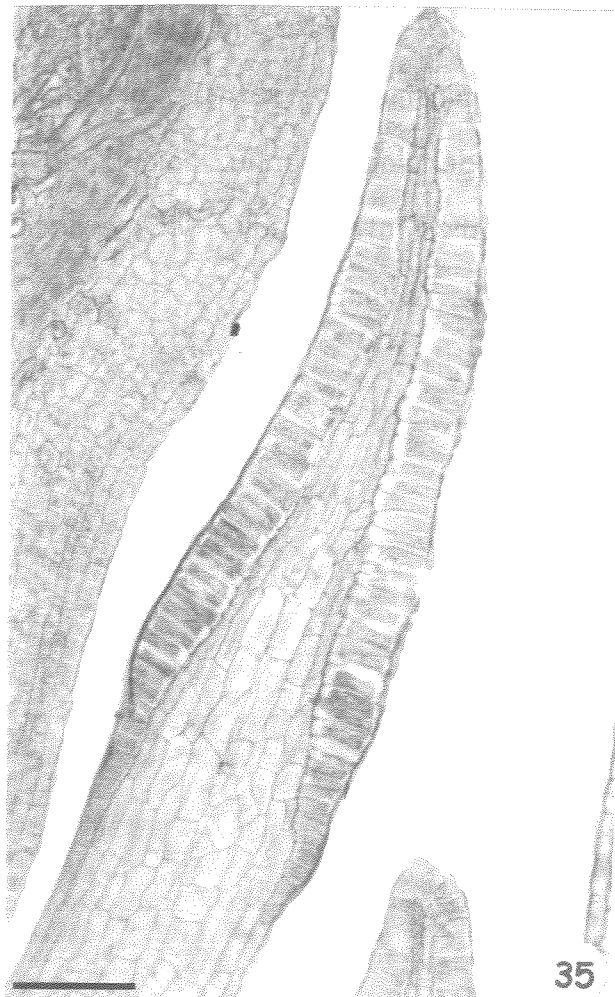
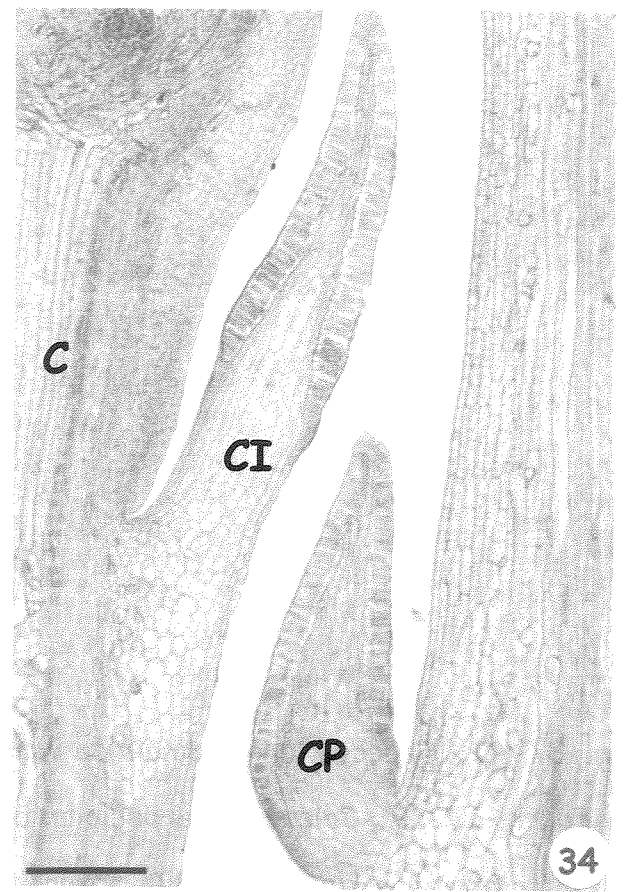




**Fig. 27-32.** Secções transversais do quarto (27), quinto (29-30) e sexto (28, 31-32) nós de ramos vegetativos de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 27. Variação do número (três a quatro) de coléteres interpeciolares. 28. Variação do número (dois a três) de coléteres peciolares. 29. Porção secretora do pedúnculo dos coléteres interpeciolares. 30. Estrutura em arco que interconecta os pecíolos e na qual os coléteres interpeciolares estão inseridos. 31-32. Porções mediana e apical de coléteres interpeciolares do mesmo nó; um dos coléteres centrais é bífido e o outro íntegro. AE = arco estipular; C = caule; CI = coléter interpeciolar; CP = coléter peciolar; P = pecíolo. Escalas: 27. 75 µm; 28-32. 150 µm.

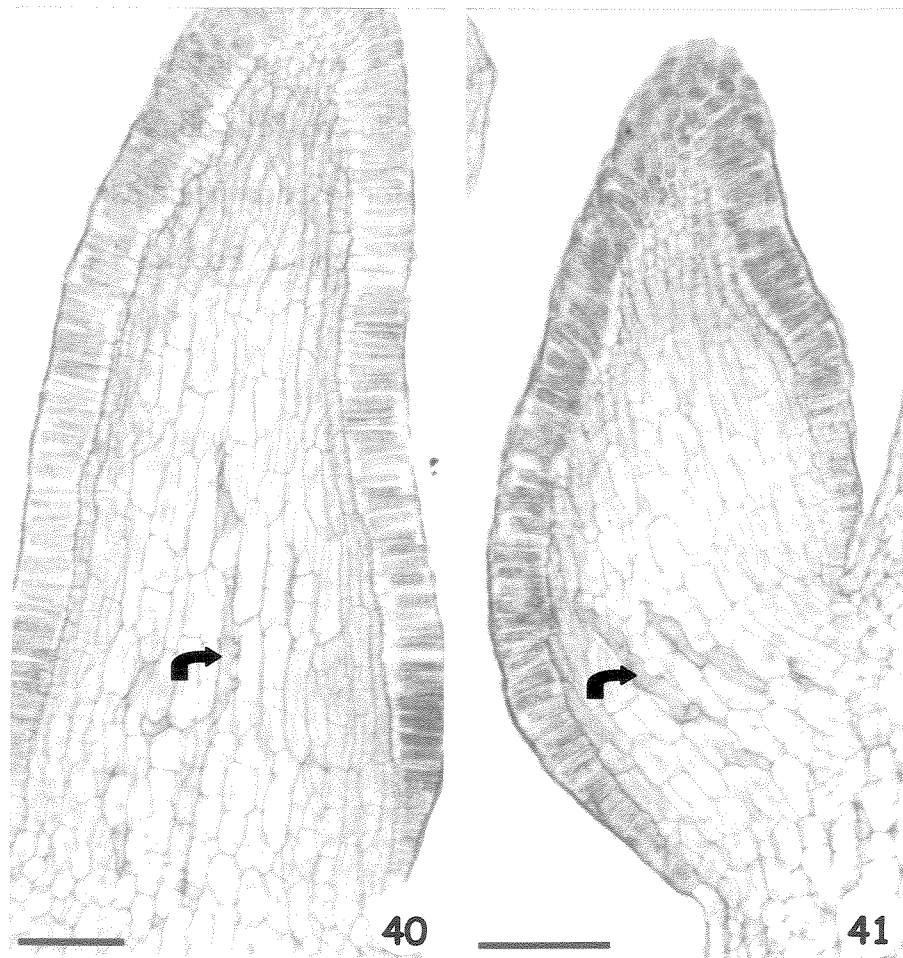
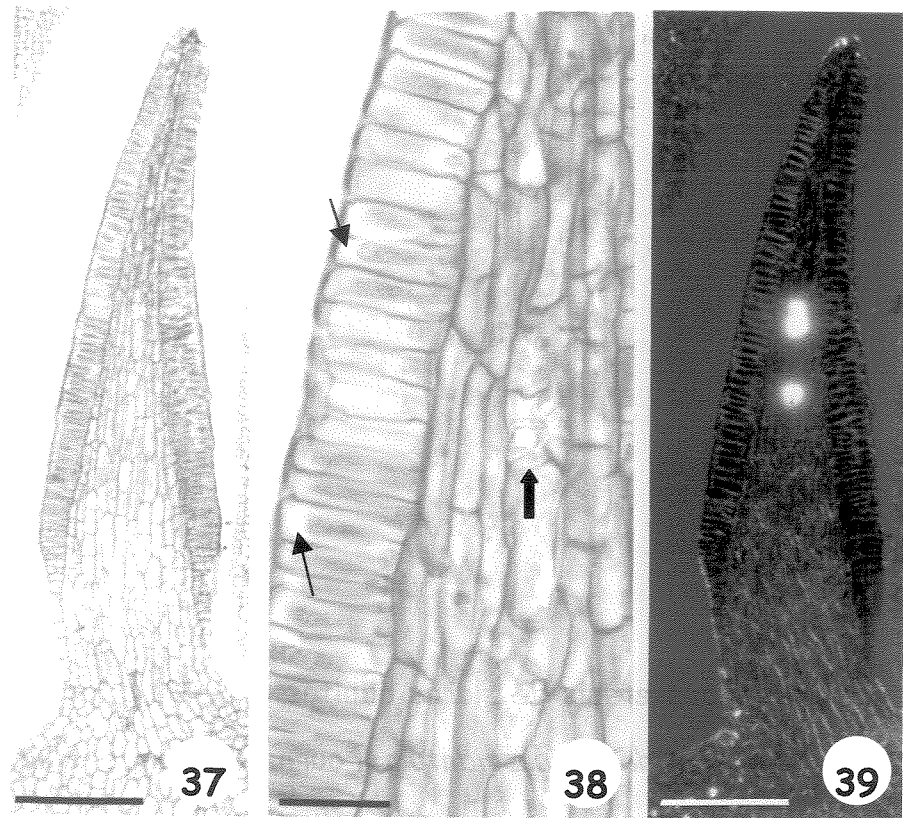


**Fig. 33-36.** Secção longitudinal do ápice caulinar vegetativo de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **33.** Vista geral do ápice. **34-36.** Pormenores da figura 33. **34.** Coléteres interpeciolar pedunculado do quarto nó e peciolar séssil do quinto. **35.** Detalhe do coléter interpeciolar. **36.** Detalhe do coléter peciolar. **C** = caule; **CI** = coléter interpeciolar; **CP** = coléter peciolar. Escalas: **33.** 250  $\mu\text{m}$ ; **34.** 150  $\mu\text{m}$ ; **35-36.** 75  $\mu\text{m}$ .



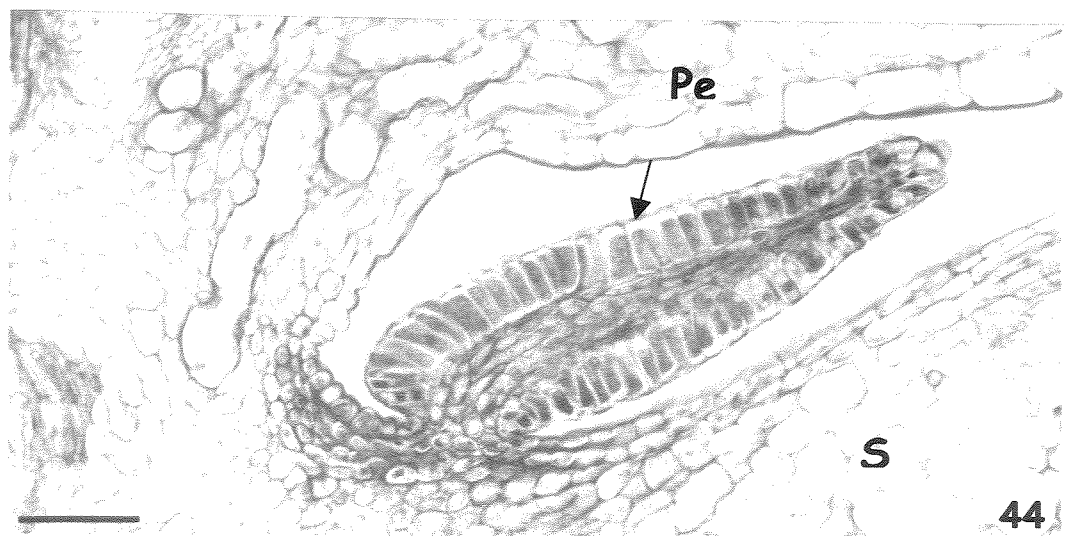
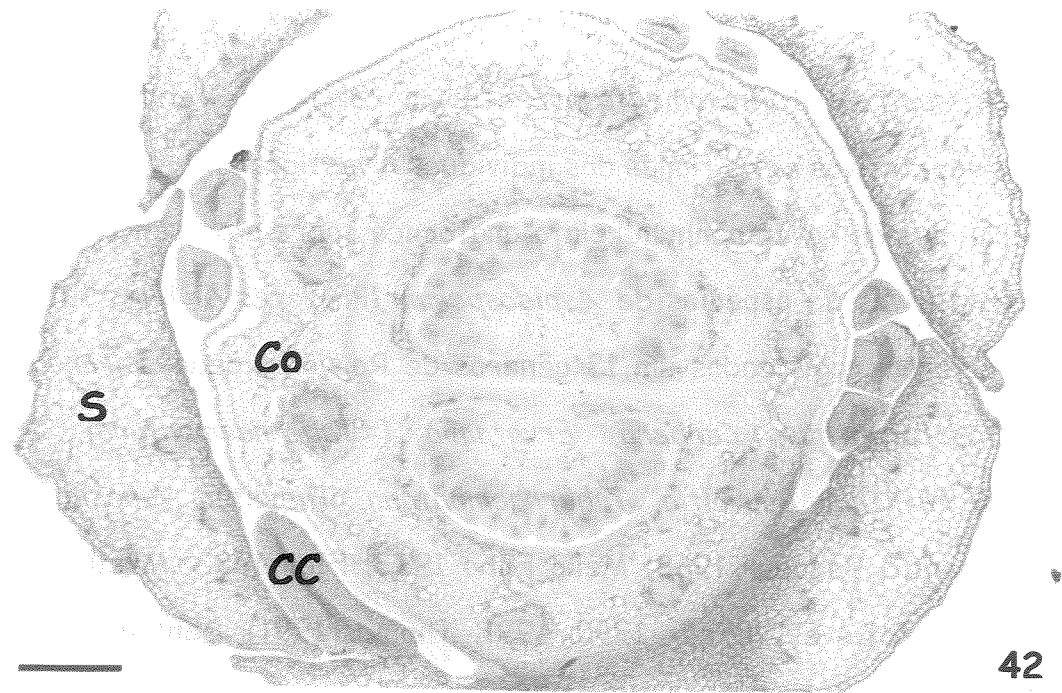
**Fig. 37-41.** Secções longitudinais de ramos vegetativos de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **37-39.** Coléter interpeciolar do quinto nó. **37.** Coléter em fase secretora. **38.** Pormenor da figura 37; notar espaço periplasmático (*seta*) e drusa (*seta larga*). **39.** Cristais no parênquima do coléter evidenciados por luz polarizada. **40-41.** Laticíferos (*seta*) no parênquima dos coléteres interpeciolar (**40**) e peciolar (**41**). **Escala:** 37,39. 150  $\mu\text{m}$ ; 38. 30  $\mu\text{m}$ ; 40-41. 75  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 42-44.** Secções transversais de flores adultas (41-42) e longitudinal de botão floral (43) de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. Coléteres calicinais em fase secretora. **41.** Coléteres tripartidos na base (indivíduo do cerrado de Campinas); os coléteres se inserem na base do cálice. **42.** Coléteres tripartidos no ápice (indivíduo de Moji-Guaçu); coléteres trilobados na face abaxial da porção unida. **43.** Detalhe de um coléter calicinal séssil; notar espaço periplasmático (seta). CC = coléter calicinal; Co = corola; Pe = pétala; S = sépala. Escalas: 41-42. 300 µm; 43. 75 µm.





## Discussão

Em *A. australe* e *A. tomentosum*, nenhum coléter foi encontrado nos ápices caulinares vegetativos e nas flores dos indivíduos investigados.

Apesar de não haver nenhum relato anatômico sobre a presença de coléteres em órgãos vegetativos de espécies de *Aspidosperma* (Prazeres & Alves 1980), coléteres foliares já foram registrados em 13 gêneros de Rauvolfioideae: *Allamanda*, *Alstonia*, *Carissa*, *Catharanthus*, *Cerbera*, *Ervatamia* (= *Tabernaemontana*), *Himatanthus*, *Landolphia*, *Plumeria*, *Rauvolfia*, *Tabernaemontana*, *Thevetia*, *Vallesia* e *Vinca* (Mia 1960; Ramayya & Bahadur 1968; Mello Filho 1973; Fjell 1983; Mueller 1985; Barros 1989; Thomas & Dave 1989a,b, 1990, 1991; Thomas 1991). Dentre estes, *Alstonia* e *Vallesia* pertencem à mesma tribo - Alstonieae - que *Aspidosperma* (Endress & Bruyns 2000).

Embora o gênero e a tribo sejam citados como desprovidos de coléteres calicinais nas descrições taxonômicas (Allorge & Poupat 1991; Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Endress & Bruyns 2000), coléteres florais já foram anatomicamente descritos em *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989b, 1990). Além disso, membros de outras tribos de Rauvolfioideae também caracterizadas pela ausência de coléteres calicinais (Endress & Bruyns 2000) já tiveram sua presença registrada na revisão de Thomas (1991) em flores de *Catharanthus*, *Chilocarpus*, *Condylocarpon*, *Kopsia*, *Rauvolfia*, *Rhazia* (= *Amsonia*) e *Vinca*. Esse fato mostra que, a anatomia pode contribuir com caracteres relevantes para os estudos taxonômicos. Além disso, os coléteres podem ser caducos, não sendo encontrados em flores adultas, como verificaram Koch e Kinoshita (1999) em *Rhodocalyx rotundifolius*, que havia sido erroneamente descrita como desprovida de coléteres calicinais.

*B. bicuspidatum* possui coléteres foliares e calicinais. Em Asclepiadoideae (Endress & Bruyns 2000), esses coléteres já foram observados em 20 gêneros: *Acerates* (= *Asclepias*), *Asclepias*, *Blepharodon*, *Calotropis*, *Ceropegia*, *Cosmostigma*,

*Cynanchum*, *Daemia* (= *Pergularia*), *Dischidia*, *Ditassa*, *Gonioanthela*, *Grisebachiella*, *Marsdenia*, *Oianthus* (= *Heterostemma*), *Oxystelma*, *Pentatropis*, *Pergularia*, *Sarcostemma*, *Stapelia*, *Stephanotis* (= *Marsdenia*), *Telosma*, *Tylophora* e *Wattakak* (hoje *Dregea*; Woodson 1935; Metcalfe & Chalk 1950; Pereira & Silva 1974; Silva *et al.* 1975; Morillo 1978, 1995; Arekal & Ramakrishna 1980; Kuriachen & Dave 1989; Thomas 1991; Farinaccio 2000).

Os coléteres foliares de *B. bicuspidatum* produzem uma secreção que *in vivo* tem aspecto viscoso e cor branca que permeia o ápice, os primórdios foliares e folhas jovens enquanto estes estão junto ao caule; sua presença pode ser notada também em muitos nós abaixo do ápice. A secreção viscosa dos coléteres geralmente é incolor, mas também pode ser amarelada (Thomas 1991) ou branca (Thomas *et al.* 1989), como em *B. bicuspidatum*.

A principal função atribuída aos coléteres é a de proteger os meristemas (Thomas 1991) do dessecação e esta função protetora tem sido bem estabelecida em Apocynaceae (Thomas & Dave 1989a,b). Em ramos vegetativos de *B. bicuspidatum*, além da função de proteção contra o dessecação, a secreção viscosa dos coléteres foliares também protege contra fitófagos, através de sua imobilização. Os coléteres calicinais desta espécie permanecem secretores mesmo depois da flor estar em pós-antese e, somente neste último estágio, quando os coléteres estão cessando sua atividade secretora, algumas flores são encontradas com grande quantidade de fungo; portanto, mesmo não havendo mais regiões meristemáticas, os coléteres continuam secretando, não mais para lubrificar, mas para proteger as flores contra a proliferação de fungos. Além disso, através de análise histoquímica se detectou a constante produção de compostos fenólicos ao longo de toda a fase secretora dos coléteres de *B. bicuspidatum* (capítulo 2); os compostos fenólicos são conhecidos, dentre outras propriedades, por inibirem o crescimento de fungos (Simões *et al.* 2004). De acordo com estes dados, os coléteres de *B. bicuspidatum* possuem uma maior amplitude

funcional que os demais coléteres descritos para a família, funcionando como estruturas de proteção externa contra o dessecação, imobilizando fitófagos ou impedindo a proliferação de fungos.

Os coléteres de *B. bicuspidatum* são facilmente observáveis. Os foliares localizam-se em posição interpeciolar e peciolar e os calicinais, solitários ou em grupos, alternos às lacínias do cálice. Segundo Woodson e Moore (1938), os coléteres calicinais podem ser alternos, opostos ou contínuos às sépalas. Os coléteres alternos foram considerados uma característica basal e os coléteres opostos, derivada.

Coléteres alternos foram registrados em *Aganosma*, *Vallaris* (Rao & Ganguli 1963), *Holarrhena*, *Wrightia* (Rao & Ganguli 1963; Sennblad *et al.* 1998), *Periploca*, *Secamone* e *Stephanostema* (Sennblad *et al.* 1998); opostos em *Cerbera*, *Nerium* (Rao & Ganguli 1963), *Tabernaemontana* (Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968) e *Prestonia* (Sennblad *et al.* 1998; Rio 2001); contínuos em *Mascarenhasia*, *Nerium*, *Picralima*, *Thevetia*, *Trachelospermum* (Sennblad *et al.* 1998).

Embora os coléteres calicinais tenham sido considerados de importância taxonômica por terem posição, forma e número suficientemente constantes (Woodson & Moore 1938), *B. bicuspidatum* apresentou coléteres com estruturas distintas num mesmo nó e numa mesma flor; eles variam em número entre indivíduos, em diferentes nós e em um mesmo nó, em flores de um mesmo indivíduo e até em uma mesma flor (mantendo constante apenas as posições).

*B. bicuspidatum* possui de seis a sete coléteres interpeciolares, de dois a três peciolares e de cinco a 15 coléteres calicinais. Variações quanto ao número também já foram registrados em *Allamanda cathartica* L. (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas & Dave 1989a) e em *Thevetia* (Hifny Saber *et al.* 1969 *apud* Thomas 1991; Fjell 1983), quanto ao número e posição em *Beaumontia grandiflora* Wall., *Funtumia elastica* Stapf, *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson e *Strophanthus emini* Aschers. *ex Pax* e quanto a sua presença ou ausência em *Baissea leonensis* Benth. e *Parsonsia heterophylla* A. Cunn.

(Sennblad *et al.* 1998). Em *Blepharodon*, dois coléteres são encontrados nos pecíolo de *B. colombianum* Morillo, *B. cuatrecasii* Morillo, *B. julianii* Morillo (Morillo 1978), *B. hatschbachii* Font. e Marq. (Pereira & Silva 1974), dois a três peciolares e numerosos coléteres interpeciolares diminutos em *B. polydori* Morillo (Morillo 1995); nesta espécie, os coléteres calicinais mantêm a posição alterna, mas o número de colétere em cada região pode variar de um a dois em *B. hatschbachii* Font. *et* Marq. (Pereira & Silva 1974) e *B. colombianum* (Morillo 1978).

Os coléteres foliares de *B. bicuspidatum* são totalmente verdes no início de seu desenvolvimento, possuem o pedúnculo verde e a parte secretora amarelada durante toda a fase secretora e tornam-se acastanhados conforme senescem do ápice para base. Em *Allamanda cathartica* (Ramayya & Bahadur 1968), o pedúnculo do colétere permanece verde e fotossintético, enquanto a cabeça torna-se amarelada e de natureza secretora. Posteriormente, os coléteres senescem do ápice para a base mudando do amarelado para o acastanhado. A senescência do ápice para a base já foi observada em *Aganosma caryophyllata* G. Don. (Dave *et al.* 1987), *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), *Roupelia grata* Wall. (Thomas *et al.* 1989), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Em geral, os coléteres tornam-se castanhos conforme senescem (Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

Após a senescência, usualmente os coléteres retêm sua forma (Thomas 1991). Coléteres foliares persistentes já foram registrados em *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Porém, em *B. bicuspidatum*, assim como em *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), os coléteres diminuem de volume e desconectam-se dos respectivos órgãos.

Com relação à estrutura dos coléteres, sete tipos já foram descritos (Thomas 1991): 1. padrão (S); 2. padrão reduzido (SR); 3. semelhante a pincel (B); 4. dendrítico

(D); 5. intermediário (entre S e D); 6. alado (W) e 7. filiforme (F). Embora estes tipos tenham sido descritos para coléteres de Rubiaceae (Lersten 1974; Thomas 1991), esta terminologia tem sido empregada na descrição de coléteres de diversas famílias. A maioria dos coléteres de Apocynaceae *s.l.* é descrita como do tipo padrão (digitiforme pedunculado; Thomas 1991, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Rio 2001, Rio *et al.* 2002). Recentemente, tipos inéditos de coléteres foram descritos para *Prestonia coalita* (Rio 2001), *Forsteronia glabrescens* (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla pycnantha*, *M. scabra*, *M. tenuifolia* e *Mesechites mansoana* (Simões 2004). *B. bicuspidatum* possui quatro tipos: o cônico pedunculado (íntegro ou bífido), o cônico séssil e os laminares sésseis inteiro e (bi-) tripartido (na base ou no ápice). Coléteres partidos próximo à base também já foram descritos em *Holarrhena antidysenterica* Wall. (Rao & Ganguli 1963) e como fimbriado em *Prestonia coalita* (Rio 2001).

A existência de um arco interconectando os pecíolos e do qual partem coléteres que ocupam posição interpeciolar observado em *B. bicuspidatum*, só foi registrado para *Mandevilla bridgesii* (Muell. Arg.) Woods (Woodson & Moore 1938; prancha 3, figura 3), sendo considerados apêndices estipulares.

A parte secretora dos coléteres interpeciolares, peciolares e calicinais é formada por epiderme unisseriada em paliçada e um eixo de células parenquimáticas não secretoras. Os coléteres em geral possuem uma epiderme unisseriada (Thomas 1991), mas em *Roupelia grata*, ocasionalmente algumas células se dividem periclinamente (Thomas *et al.* 1989). Em *Prestonia coalita*, os coléteres calicinais também não possuem pedúnculo; porém, ao contrário de *B. bicuspidatum*, as células epidérmicas da base do coléter não apresentam atividade secretora (Rio 2001). Em *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br., apenas a cabeça dos coléteres calicinais está diferenciada (Ramayya & Bahadur 1968).

Nos coléteres de *B. bicuspidatum*, a secreção se acumula em um espaço periplasmático (capítulo 2) antes de ser liberada para o meio externo através da

parede e da cutícula. Normalmente, a secreção é liberada por ruptura da cutícula (Fahn 1990), o que não foi observado no presente estudo. Em *Allamanda neriifolia* Hook., *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Fjell 1983) e *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), a secreção se acumula sob a cutícula e em *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000), a secreção é liberada em fendas formadas pela dissolução da lamela média das paredes radiais das células epidérmicas. Os coléteres de *Alstonia* apresentam um mecanismo de exsudação não usual: em coléteres do terceiro ou quarto nó, algumas células centrais abaixo da epiderme expandem devido ao acúmulo de material e quanto maior a quantidade de material acumulado nestas células, maior é a pressão exercida sobre as células epidérmicas, até que ambas se desloquem e rompam (Thomas & Dave 1990).

Nenhum dos coléteres de *B. bicuspidatum* possui vascularização. A presença de tecido vascular pode variar até mesmo entre os diferentes tipos de coléteres encontrados nos órgãos vegetativos. Em *Mandevilla*, os coléteres interpeciolares não possuem vascularização e os coléteres foliares podem ter ou não dependendo da sua proximidade do traço vascular (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Em *Prestonia coalita*, apenas os coléteres intercalares possuem vascularização (Rio *et al.* 2002). Embora Woodson e Moore (1938) tenham descrito os coléteres calicinais de Apocynaceae como sendo normalmente desprovidos de vascularização, coléteres calicinais vascularizados já foram observados em *Funtumia elastica*, *Strophanthus gratus* Baill. (Woodson & Moore 1938), *Holarrhena antidysenterica*, *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. , *Wrightia tinctoria* R. Br. (Rao & Ganguli 1963), *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987) e *Nerium indicum* Mill. (hoje *N. oleander*, Thomas & Dave 1989c).

Idioblastos portando cristais do tipo drusa foram encontrados no parênquima de coléteres interpeciolares durante sua fase secretora em *B. bicuspidatum*. Cristais

também já foram registrados em coléteres de *Allamanda* (Ramayya & Bahadur 1968), *Calotropis* (Arekal & Ramakrishna 1980), *Thevetia* (Fjell 1983; Subramanian *et al.* 1989), *Alstonia* (Thomas & Dave 1989b) e *Aganosma* (Subramanian *et al.* 1989).

Laticíferos foram observados no parênquima de todos os coléteres de *B. bicuspidatum* e sua presença foi considerada uma das modificações estruturais que alguns coléteres de Apocynaceae apresentam (Thomas 1991). Laticíferos também já foram registrados em coléteres de *Plumeria alba* Linn., *Vallaris solanacea* (Murugan & Inamdar 1987a,b), *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *A. violacea* Gard. (Subramanian *et al.* 1989), *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1991), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, 2000). Tricomas unicelulares também já foram observados em coléteres de *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987) e multicelulares em *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002), células subepidérmicas alongadas radialmente em *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989) e *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1989c). Todas essas características foram consideradas como um passo evolutivo entre os coléteres de Apocynaceae por Thomas e Dave (1991).

## Conclusões

A anatomia já contribuiu com caracteres relevantes para a taxonomia das Apocynaceae, registrando a presença de coléteres em espécies de tribos nas quais os coléteres calicinais foram considerados ausentes segundo as descrições taxonômicas (Endress & Bruyns 2000). O presente estudo provou anatomicamente que os coléteres não ocorrem em órgãos vegetativos e reprodutivos de duas espécies de *Aspidosperma*, confirmando que a presença de coléteres não é universal na família.

Segundo Woodson e Moore (1938), há uma similaridade de posição dos coléteres calicinais em relação às sépalas e dos apêndices dos nós vegetativos em relação aos



pecíolos. Em *B. bicuspidatum*, isso é válido apenas para os coléteres interpeciolares, já que os coléteres calicinais são alternos às sépalas.

O número de coléteres foliares e calicinais variou independentemente da localização geográfica, ao contrário do proposto por Thomas (1991). Em diferentes nós de um mesmo indivíduo, num mesmo nó, em diferentes flores ou numa mesma flor foi encontrada variação no número de coléteres.

Considerando que a grande maioria dos coléteres de Apocynaceae *s.l.* descritos é do tipo padrão, *B. bicuspidatum* possui uma considerável variedade de tipos. Quatro tipos inéditos de coléteres foram encontrados nos órgãos vegetativos e florais desta espécie: 1. coléter cônico pedunculado (inteiro ou bifido); 2. cônico séssil; 3. laminar séssil inteiro e 4. laminar séssil partido (próximo à base ou no ápice). Os interpeciolares são pedunculados, enquanto os peciolares e calicinais são sésseis.

Embora o tipo (forma) do coléter calicinal tenha valor taxonômico para Apocynaceae (Woodson & Moore 1938) e sua presença seja utilizada como caráter distintivo em chaves de identificação em nível de gênero e espécie (Barroso 1986; Rio 2001), em *B. bicuspidatum*, os coléteres podem ser inteiros ou partidos no ápice ou na base e o único caráter constante é a posição.

A parte secretora de todos os coléteres é formada por epiderme secretora composta por células em paliçada dispostas em uma única camada e parênquima central formado por células não secretoras alongadas longitudinalmente. Eles não possuem vascularização; laticíferos foram encontrados no parênquima de todos os tipos de coléteres e drusas, apenas nos interpeciolares. Tanto nos coléteres foliares quanto nos calicinais, a secreção é acumulada em um espaço periplasmático antes de ser liberado para o meio externo através da parede e da cutícula. Rompimento natural de cutícula não foi observado em nenhum coléter.

Além da função de proteger as regiões meristemáticas contra o dessecação, os coléteres de *B. bicuspidatum* também protegem os ramos vegetativos imobilizando fitófagos e as flores, impedindo a proliferação de fungos.

Ao contrário dos coléteres de todas as Apocynaceae s.l. descritos até o momento, *B. bicuspidatum* se destaca pelo polimorfismo destas estruturas e sua amplitude funcional. Diante deste fato, estudos incluindo mais representantes de Asclepiadoideae seriam desejáveis, no sentido de se obter maiores informações sobre os coléteres e assim verificar se o número e tipo de coléter possuem valor taxonômico para este grupo.

### Referências bibliográficas

- ALLORGE, L & POUPAT, C 1991 Position systématique et revision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trios Guyanes. Le point sur leur etude chimique. Bulletin de la Societe Botanique de France (Lettres Botaniques) 138:267-301.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. Phytomorphology 30:303-306.
- BARROS, CF 1989 *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae). Anatomia foliar. Rodriguesia 38-40:25-31.
- BARROSO, GM 1986 Sistemática de angiospermas do Brasil. Vol. III, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária.
- CLARK, G 1973 Staining procedures. 3<sup>rd</sup> ed., Baltimore, The Williams & Wilkins Co.

- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae s.l. The Botanical Review 66:1-56.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press Inc.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FARINACCIO, MA 2000 Asclepiadoideae (Apocynaceae) do Parque Nacional de Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. São Paulo, Dissertação de Mestrado Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- FJELL, I 1983 Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.
- GERLACH, D 1969 Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Stuttgart, Georg Thieme.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- KOCH, I & KINOSHITA, LS 1999 A família Apocynaceae na região de Bauru, SP, Brasil. Acta Botanica Brasilica 13:61-86.
- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.
- LERSTEN, NR 1974 Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). American Journal of Botany 61:973-981.
- MARCONDES-FERREIRA, W & KINOSHITA, LS 1996 Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 19:203-214.
- MELLO FILHO, LE de 1973 Novas observações sobre as espécies americanas do gênero *Rauvolfia* (Plum.) L. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Biologia 33:507

520.

- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Vol. II, Oxford, Claredon Press.
- MIA, AJ 1960 Structure of the shoot apex of *Rauwolfia vomitoria*. Botanical Gazette 122:121-124.
- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- MORILLO, G 1978 Tres especies nuevas de *Blepharodon* Dcne. Acta Botanica Venezuelica 13:75-80.
- MORILLO, G 1995 Tres nuevas especies en las Asclepiadaceae sudamericanas. Caldasia 17:413-418.
- MUELLER, RJ 1985 Determinate branch development in *Alstonia scholaris* (Apocynaceae): the plagiotropic module. American Journal of Botany 72:1435-1444.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 97:25-31.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.
- PEREIRA, JF & SILVA, NMF 1974 Estudos em Asclepiadaceae. V. Uma nova espécie de *Blepharodon* Decne. Boletim do Museu Botânico Municipal 18:1-3.
- PRAZERES, S do M & ALVES, JL de H 1980 Alguns aspectos do desenvolvimento estrutural e fisiológico de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae). Brasil Florestal 43:35-46.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squameae" in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963 Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae.

- Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. Br. nom. cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell. Woodson) (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.
- RIO, MCS do; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2005 Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Submetido à Revista Brasileira de Botânica em janeiro/2005.
- SENNBLAD, B; ENDRESS, ME & BREMER, B 1998 Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. American Journal of Botany 85:1143-1158.
- SILVA, NMF; VALENTE, M da C; ALENCASTRO, FMMR de; PEREIRA, JF & SUCRE BD 1975 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. - X. Estudo taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35:745-756.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas.
- SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP de; MENTZ, LA & PETROVICK, PR 2004 Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.

- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contactor* 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989c Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton* 30:209-212.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1991 Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. *Feddes Repertorium* 102:23-28.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- WOODSON, RE Jr 1935 The floral anatomy and probable affinities of the genus *Grisebachiella*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 62:471-478.
- WOODSON, RE Jr & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65:135-165.

## Capítulo 2

### Ontogênese e histoquímica dos coléteres foliares e calicinais de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. (Apocynaceae s.l.)

#### Introdução

A semelhança estrutural entre coléteres e outras estruturas secretoras levou alguns autores a confundi-los com nectários extraflorais e glândulas de resina (Arekal & Ramakrishna 1980; Inamdar *et al.* 1985; Mohan & Inamdar 1986; Subramanian *et al.* 1989; Thomas 1991). Por isso, é necessário efetuar estudos histoquímicos para analisar as principais classes químicas dos metabólitos que compõem o exsudato, uma vez que a identificação das estruturas secretoras é baseada no tipo de substância que predomina no secretado (Fahn 1979). Radford *et al.* (1974) também consideraram importante utilizar testes histoquímicos ou análises químicas na identificação dos tecidos secretores para complementar os caracteres morfológicos, estruturais e de desenvolvimento.

O que diferencia os coléteres das demais estruturas secretoras é a sua secreção que lubrifica e protege gemas (Fahn 1979; Thomas 1991). Esta secreção pode ser constituída apenas por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990). Algumas substâncias detectadas no exsudato produzido pelos coléteres de espécies de Apocynaceae são resina (Ramayya & Bahadur 1968; Subramanian *et al.* 1989), lipídios (Thomas & Dave 1989a, 1990; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000), proteínas (Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a, 1990; Thomas 1991) e monossacarídeos (Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,c, 1990; Thomas 1991).

Poucos trabalhos apresentam dados sobre a ontogênese e/ou histoquímica de coléteres, podendo ser citados os estudos em *Allamanda cathartica* L. (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas & Dave 1989 a), *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. (Ramayya & Bahadur 1968), *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986), *Aganosma caryophyllata* G. Don. (Dave *et al.* 1987), *Alstonia scholaris* L., *Nerium indicum* Mill. (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1989b,c, 1990), *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), *Roupelia grata* Wall. (Thomas *et al.* 1989), *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000) e *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio 2001; Rio *et al.* 2002).

Dada a escassez de informações sobre a composição da secreção dos coléteres de Apocynaceae e a ausência de qualquer estudo anatômico em espécies de *Blepharodon*, o presente estudo teve por objetivo analisar a ontogênese e histoquímica da secreção dos coléteres foliares e florais de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn., evidenciando as principais classes químicas dos metabólitos que o compõem o exsudato produzido por estas estruturas e sua função.

## Material & métodos

O material de estudo foi coletado em quatro áreas de cerrado: Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, Estação Experimental de Itirapina e fragmentos situados nos municípios de Campinas e Pratânia. As coletas foram realizadas de novembro de 2002 a outubro de 2003 e as plantas identificadas pela Profa. Dra. Luíza S. Kinoshita e pelo Dr. André O. Simões. Materiais testemunha com flores de nove indivíduos foram herborizados: *B. bicuspidatum*: Brasil, São Paulo, Moji-Guaçu, 18/XI/2002, D. Demarco 7; Pratânia, 05/III/2003, D. Demarco 8; Itirapina, 19/III/2003, D. Demarco 9; Campinas, 29/VIII/2003, D. Demarco 11; 08/V/2004, D. Demarco 14, D. Demarco 15; 04/VIII/2004, D. Demarco 16, D.



Demarco 17; 23/IX/2004, D. Demarco 18. Todas as exsicatas serão incorporadas ao Herbário UEC.

Ramos vegetativos de indivíduos de sol (borda de trilha) e de sombra (interior da vegetação) foram coletados e fixados na primavera (setembro e outubro), verão (fevereiro e março), outono (maio e junho) e inverno (agosto). A contagem dos nós de cada material coletado foi realizada a partir do ápice do ramo.

Ramos vegetativos portando ápices caulinares de 9 indivíduos de *B. bicuspidatum* e florais de quatro foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%. 1:1:18 v/v) por 24 h (Johansen 1940), em FNT (formalina neutra tamponada: tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v; Lillie 1948 *in* Clark 1973) e SFF (solução de sulfato ferroso, formalina, 9:1 v/v) por 48 h (Johansen 1940) e estocados em etanol 70%. Devido à fácil visualização a olho nu dos coléteres de *B. bicuspidatum*, todos os nós abaixo do ápice que apresentavam coléteres também foram coletados e receberam os mesmos tratamentos dos ramos para fixação.

Para o estudo ontogenético e histoquímico, foram isolados ápices caulinares vegetativos, todos os nós que possuíam coléteres foliares (um a seis ou sete no outono/inverno e um a 12 ou 13 na primavera/verão), botões florais e flores. Três estádios do desenvolvimento floral com seus comprimentos medidos a partir da base do receptáculo foram utilizados: Estádio 1 - botões florais até 0,9 mm; Estádio 2 - botões florais de 1 a 5 mm; Estádio 3 - flores adultas em pré-antese (6 mm), antese e com as pétalas reflexas. Todas estas peças foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídas em "paraplast" e seccionadas transversal e longitudinalmente com 10 a 14  $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo Microm HM340E.

## Ontogênese

Materiais fixados em FAA e FNT foram usados no estudo estrutural. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (CI 50240; Gerlach 1969 modificado) e as lâminas montadas em resina sintética.

## Histoquímica

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

Os tratamentos realizados para evidenciar as principais classes químicas dos componentes da secreção dos coléteres foram:

- a) Vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989)
- b) Ácido tânico/ cloreto de ferro III para mucilagem (Pizzolato & Lillie 1973)
- c) Azul de Alcião (CI 74240) para mucopolissacarídeos ácidos (Pearse 1985)
- d) Reação PAS (Periodic-Acid-Schiff's reagent; pararosanilina CI 42510) para polissacarídeos gerais (McManus 1948)
- e) Reagente de Lugol para amido (Johansen 1940)
- f) Azul mercúrico de bromofenol para proteínas totais (Mazia *et al.* 1953)
- g) Azul brilhante de Comassie (CI 42660) para proteínas totais (Fisher 1968)
- h) Preto de amido B (Aniline Blue Black; CI 20470) para proteínas (Fisher 1968)
- i) Preto de Sudão B (CI 26150) para lipídios totais (Pearse 1985)
- j) Vermelho de Sudão IV (CI 26105; alcoólico e glicerinado) para lipídios totais (Pearse 1985)

- k) Sulfato azul do Nilo (CI 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947; Jensen 1962)
- l) Reagente de Nadi para essências e ácidos resiníferos (David & Carde 1964)
- m) Acetato de cobre/ ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970)
- n) Cloreto de ferro III para compostos fenólicos (Johansen 1940)
- o) Dicromato de potássio para compostos fenólicos (Gabe 1968)
- p) Reagente de Wagner para alcalóides (Furr & Mahlberg 1981)

Os testes foram aplicados em coléteres interpeciolares e peciolares de primórdios foliares e folhas adultas e em coléteres calicinais em diferentes estádios do desenvolvimento floral.

As lâminas do material fixado em SFF e do material do teste com preto de amido B foram montadas em resina sintética e as demais, em gelatina glicerizada.

Para o controle dos testes para substâncias lipofílicas, foram utilizados ápices caulinares e botões florais colocados em solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v; High 1984) por 48 h. Após este período, os materiais foram fixados em FNT e receberam o mesmo tratamento das demais peças. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas, exceto para proteína, foram realizados conforme as respectivas técnicas.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak Pro Image asa 100. As escalas das figuras foram obtidas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

## Resultados

## Ontogênese dos coléteres foliares

### Fase meristemática

A formação dos coléteres foliares não varia sazonalmente nem entre indivíduos de sol e de sombra. A ontogênese dos coléteres interpeciolares e peciolares ocorre de forma assincrônica. Os **coléteres interpeciolares** começam a se formar no primeiro nó. Nesta região, grupos de células meristemáticas projetam-se das margens da base do primórdio foliar em direções opostas (Fig. 1; seta). A partir do segundo nó, os grupos de células meristemáticas se fundem formando uma estrutura em arco que interconecta os pecíolos. Nesta fase, o início da diferenciação dos coléteres marginais e do central pode ser observado (Fig. 2; seta); os marginais começam a se formar pouco antes do central. O fato destes coléteres serem formados a partir de uma estrutura em arco que se projeta das margens da base foliar demonstra que eles são de origem estipular. No terceiro nó, os coléteres ainda estão em fase meristemática; as células protodérmicas são quadradas sem secreção em seu interior e o eixo parenquimático ainda não atingiu suas dimensões finais (Fig. 3).

Os **coléteres peciolares** começam a se formar no terceiro nó e dois grupos distintos de células meristemáticas são observados na face adaxial do pecíolo próximo à lâmina foliar (Fig. 3; seta). As células meristemáticas tanto dos coléteres interpeciolares quanto dos peciolares dividem-se segundo planos definidos: as células protodérmicas dividem-se anticlinalmente aumentando a superfície; as células do meristema fundamental dividem-se em vários planos formando o eixo parenquimático e o coléter aumenta em altura e diâmetro. No quarto nó, os coléteres peciolares ainda estão meristemáticos com as células protodérmicas quadradas sem secreção e um eixo central reduzido (Fig. 4).

### Fase secretora

No quarto nó, os **coléteres interpeciolares** estão totalmente formados, com as células epidérmicas alongadas e em atividade secretora (Fig. 4). Esta fase prossegue até 12 nós.

A partir do quinto nó, em ramos mais desenvolvidos (entrenós maiores), os **coléteres peciolares** começam a secretar (Fig. 5), mas em alguns casos, em ramos menos desenvolvidos, eles ainda estão meristemáticos (Fig. 6) e somente no sexto nó começam a secretar (Fig. 7). Eles podem ser observados em folhas até o 13º nó.

A duração da fase secretora dos coléteres foliares não varia entre indivíduos de sol e de sombra, mas varia entre as estações. Nos indivíduos coletados no outono/inverno, os coléteres interpeciolares secretaram do quarto ao sétimo e os peciolares do quinto ao sétimo nó; nos indivíduos coletados na primavera/verão, os coléteres interpeciolares secretaram do quarto ao décimo segundo e os peciolares do quinto ao décimo segundo nó.

A secreção dos coléteres é liberada para o meio externo sem que haja rompimento de cutícula.

### Fase pós-secretora

Difícilmente é observado um coléter foliar em fase pós-secretora, pois esta fase é muito breve e todo o coléter necrosa, contraindo-se do ápice para a base até desconectar do respectivo órgão (Fig. 13-14). Todos os coléteres foliares são caducos.

Alguns poucos coléteres foram encontrados em fase pós-secretora e os encontrados, geralmente, foram os peciolares, já que estes senescem depois dos interpeciolares e podem ser observados um ou dois nós abaixo do último nó que apresenta coléteres interpeciolares. Na fase pós-secretora, os coléteres

apresentam células epidérmicas sem secreção em seu interior (Fig. 13-14) e os núcleos ocupam, preferencialmente, posição mediana na célula.

A senescência do coléter não está relacionada com o nó em que se localiza ou se o indivíduo é de sol ou de sombra, mas sim, com a fase de desenvolvimento dos órgãos deste nó. Os ramos coletados durante o outono e inverno possuíam de seis a sete nós com coléteres, já os ramos coletados durante a primavera e verão possuíam de 12 a 13 nós. Em ambos, as folhas do último nó que possui coléteres estavam totalmente ou quase totalmente distendidas (7 a 8 cm de comprimento).

## **Ontogênese dos coléteres calicinais**

### Fase meristemática

Os coléteres calicinais, assim como os foliares, se formam precocemente durante o desenvolvimento do órgão em que se inserem. Eles começam a se formar em botões com menos de 1 mm de comprimento (Estádio 1). Nesta fase, coléteres são totalmente meristemáticos (Fig. 8; seta) com as células protodérmicas dividindo-se anticlinalmente aumentando a superfície e as do meristema fundamental, em vários planos formando o eixo parenquimático. O coléter aumenta em altura e largura em decorrência deste acréscimo de células. Em alguns botões deste estágio, coléteres ainda em formação já possuem células epidérmicas variando de quadradas a ligeiramente alongadas com secreção em seu interior (Fig. 9; seta).

### Fase secretora

Botões com cerca de 1 mm de comprimento, ainda recobertos pelo cálice (Estádio 2), já possuem coléteres totalmente diferenciados com as células epidérmicas alongadas e em atividade secretora (Fig. 10). Os coléteres permanecem

secretores até a flor estar formada (Fig. 10-12, 15) e com as pétalas reflexas (Estádio 3).

O modo de secreção dos coléteres não pôde ser determinado, pois não foi observado rompimento de cutícula ou estrutura para liberação dos exsudato ao meio externo.

#### Fase pós-secretora

Os coléteres calicinais são persistentes e são encontrados em fase pós-secretora em flores adultas com as pétalas reflexas. Eles apresentam células epidérmicas sem secreção com os núcleos ocupando posição mediana ou apical e células parenquimáticas contendo substância acidófila (Fig. 16). Apesar de serem observadas células senescentes no ápice de coléteres de botões e flores (Fig. 12, 15), nenhuma seqüência deste processo foi observada.

#### **Histoquímica**

Os resultados obtidos nos testes para detecção de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis estão apresentados na tabela 1.

Através dos testes com preto de Sudão B e sulfato azul do Nilo, pode-se verificar que a cutícula dos coléteres nunca distende (Fig. 41, 51) e, portanto, o espaço onde a secreção se acumula antes de ser liberada para o meio exterior é periplasmático (Fig. 15, 25, 27, 32, 36, 38, 40, 50, 59; setas), formado pela distensão da parede periclinal externa e/ou retração do protoplasto. Rompimento natural de cutícula para liberação do exsudato não foi observado em nenhum coléter.

Tabela 1. Resultados da aplicação dos testes histoquímicos em coléteres foliares e florais de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn.

Tratamentos histoquímicos	Substância detectada	Coléteres foliares	Coléter calicinal
Vermelho de rutênio	Mucilagens ácidas	+++ (Fig.17-19,22-23)	+++ (Fig. 20-21)
Ácido tânico/ cloreto de ferro III	Mucilagem	++ (Fig. 24-25)	+++ (Fig. 26-28)
Azul de Alciano	Mucopolissacarídeos ácidos	-	-
PAS	Polissacarídeos gerais	+++ (Fig. 29-32)	+++ (Fig. 33)
Reagente de Lugol	Amido	-	-
Azul mercúrico de bromofenol	Proteínas	-	-
Azul brilhante de Comassie	Proteínas	+ (Fig. 34-35)	+++ (Fig. 36-37)
Preto de amido B	Proteínas	+++ (Fig. 39)	+++ (Fig. 38)
Vermelho de Sudão IV	Lipídios totais	-	-
Preto de Sudão B	Lipídios totais	++ (Fig. 40-43)	++ (Fig. 44-45)
Acetato de cobre / ácido rubeânico	Ácidos graxos	-	++ (Fig. 46)
Sulfato azul do Nilo	Lipídios ácidos	+++ (Fig. 47-51)	+++ (Fig. 52-54)
Reagente de Nadi	Terpenos	-	-
Cloreto de ferro III	Compostos fenólicos	+	+++ (Fig. 58-60)
Sulfato ferroso em formalina	Compostos fenólicos	+++ (Fig. 55-57)	+++
Dicromato de potássio	Compostos fenólicos	-	-
Reagente de Wagner	Alcalóides	-	-

Legenda: + = fracamente positivo; ++ = positivo; +++ = fortemente positivo

Mucilagem (Fig. 17-33) e compostos lipofílicos (Fig. 40-60) estão presentes na secreção de todos os coléteres de *B. bicuspidatum* e proteínas foram detectadas no interior das células secretoras epidérmicas (Fig. 34-39). Há um predomínio na



produção de mucilagem durante toda a fase secretora dos coléteres foliares e florais; a sua presença só foi detectada no meio extracelular no material fixado em FNT (Fig. 33; cabeça de seta).

O exsudato dos coléteres apresentou resultado positivo para cloreto de ferro III somente quando o material foi fixado em FNT. Isso mostra que os compostos fenólicos encontrados na secreção são lipofílicos. Além disso, os melhores resultados foram obtidos com o material fixado em sulfato ferroso em formalina.

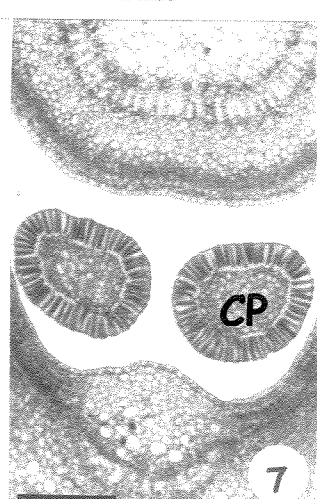
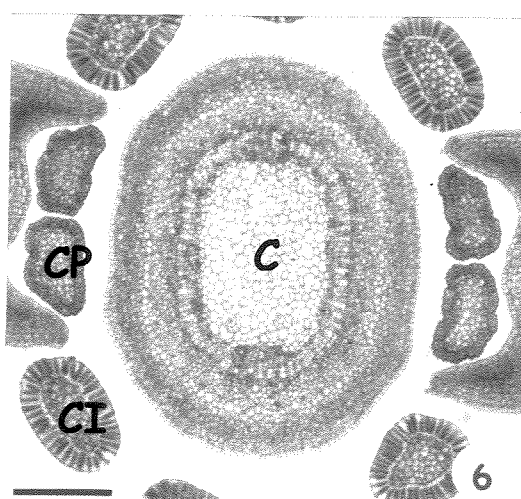
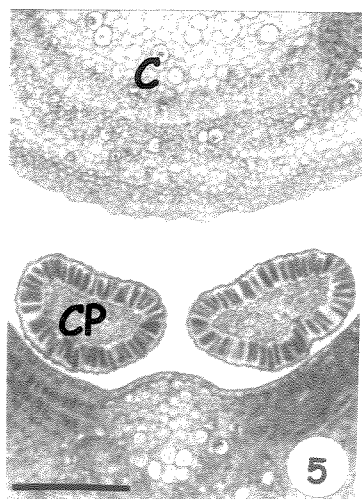
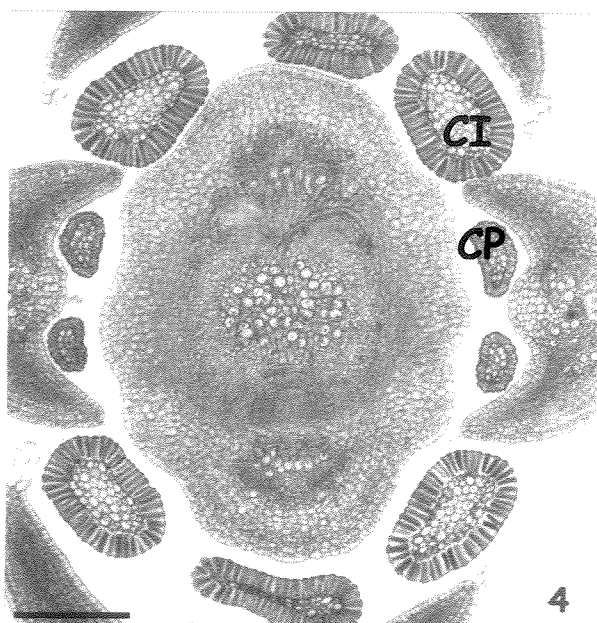
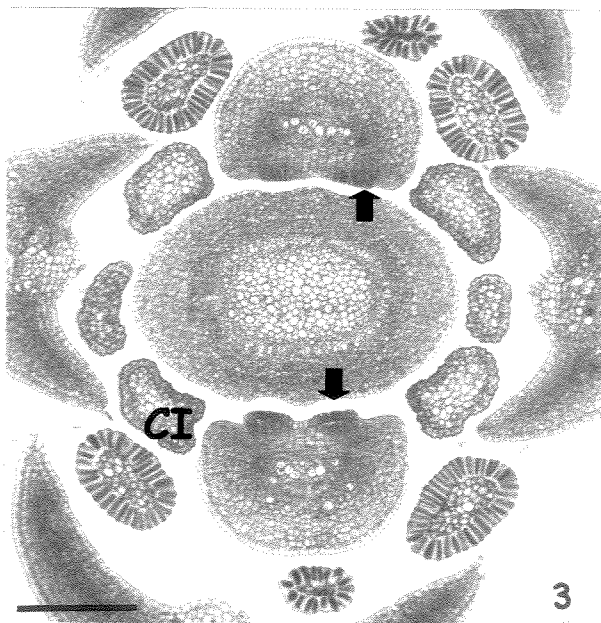
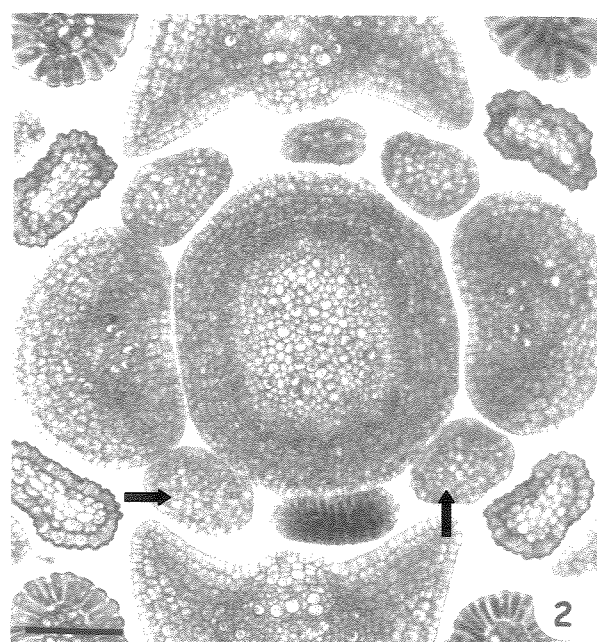
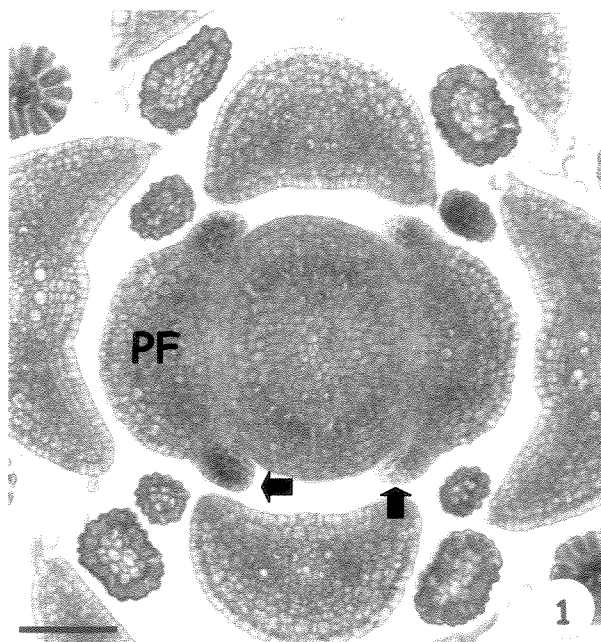
O teste com dicromato de potássio pode estar apresentando resultado negativo, pois um fraco positivo seria ocultado pela cor amarelada do material fixado sem tratamento.

A secreção dos coléteres interpeciolares e peciolares é semelhante, mas difere quanto aos ácidos graxos da composição do exsudato dos coléteres calicinais. Os coléteres foliares secretam mucilagem e compostos fenólicos lipofílicos. Os coléteres calicinais possuem uma secreção composta por mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos lipofílicos.

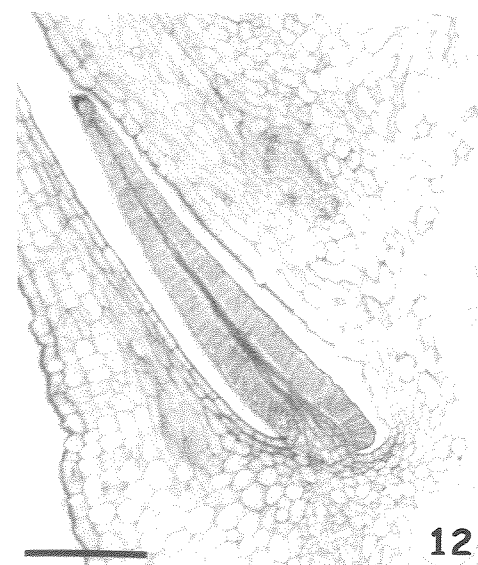
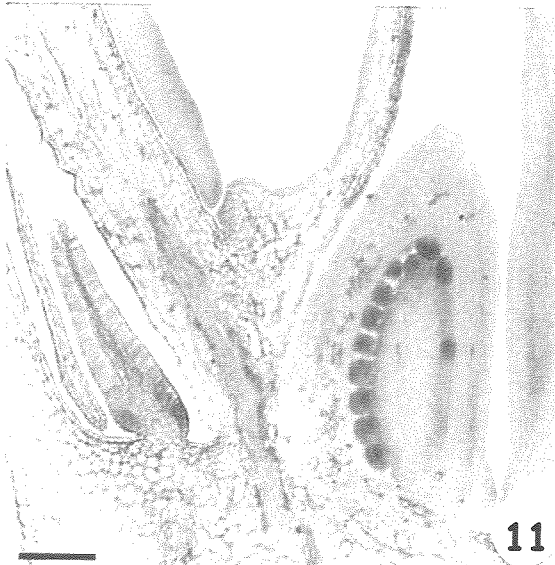
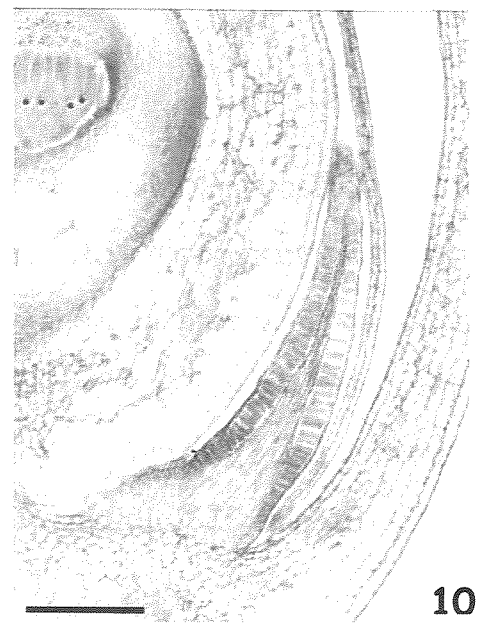
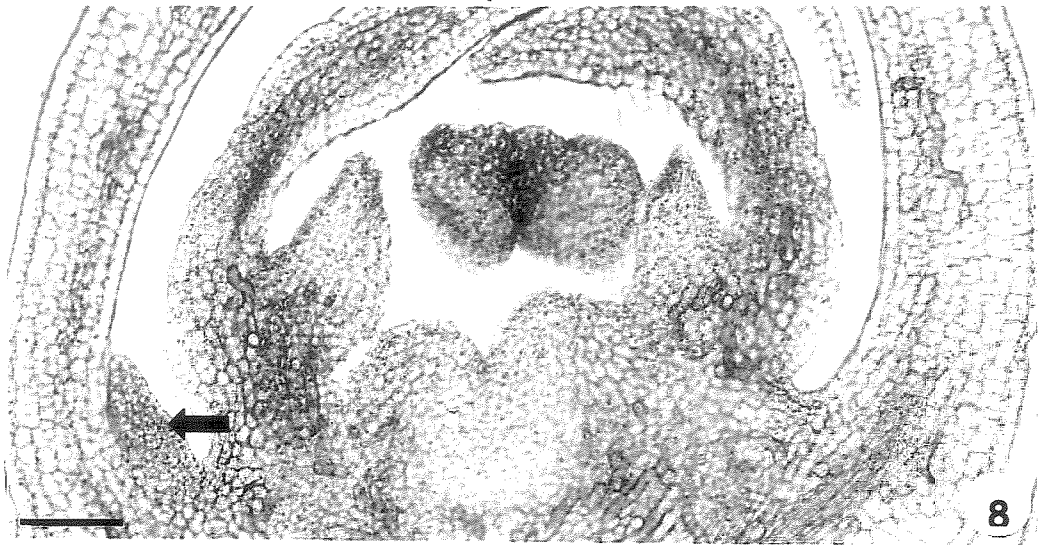
Embora os coléteres foliares e calicinais exsudem um material de composição heterogênea e produzam os respectivos compostos em uma única fase de secreção, a predominância de cada substância variou nos diferentes tratamentos, sendo mais fraca nas fases iniciais da atividade secretora. Em geral, os coléteres atingem o auge de sua atividade secretora na fase intermediária: em coléteres foliares do sexto ao nono nó e em calicinais de botões no estágio 2 (1 a 5 mm de comprimento).

## ILUSTRAÇÕES

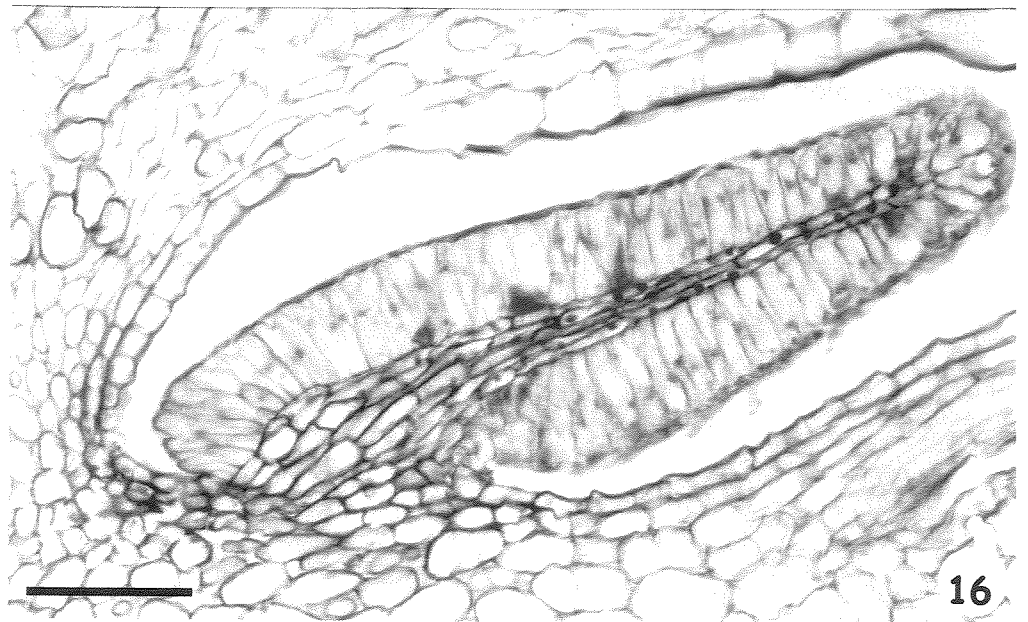
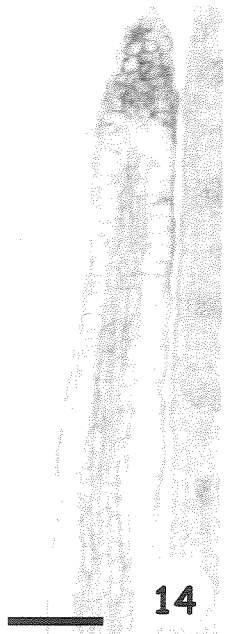
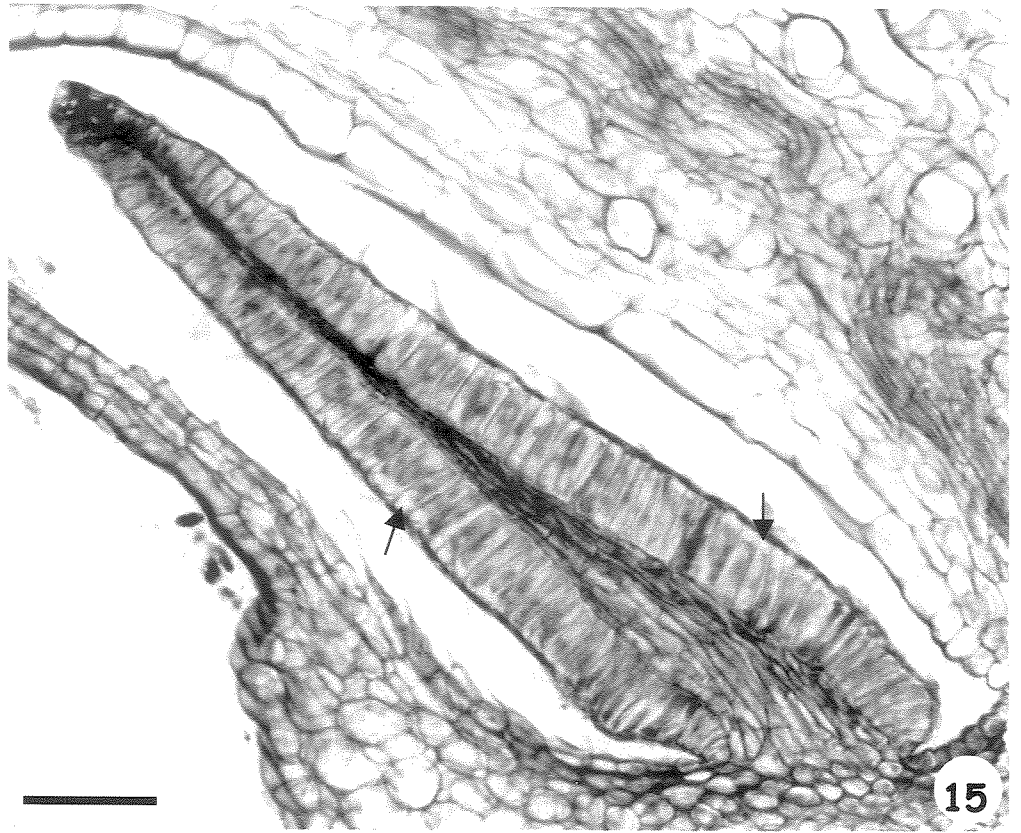
**Fig. 1-7.** Secções transversais de ápices caulinares vegetativos de *B. bicuspidatum* Fourn. 1. Células meristemáticas da base do primórdio foliar (estípulas; **seta**) do primeiro nó. 2. Início da formação dos coléteres interpeciolares (**seta**) no segundo nó. 3. Coléteres interpeciolares e peciolares em formação no terceiro nó; notar células meristemáticas no pecíolo (**seta**). 4. Quarto nó. 5. Coléteres peciolares do primórdio foliar do quinto nó. 6. Coléteres interpeciolares e peciolares do quinto nó. 7. Coléteres peciolares do primórdio foliar do sexto nó. **C** = caule; **CI** = coléter interpeciolar; **CP** = coléter peciolar; **PF** = primórdio foliar. Escalas: 1-2. 75  $\mu\text{m}$ ; 3-7. 150  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 8-12.** Secções longitudinais de botões florais de *B. bicuspidatum* Fourn. 8-9. Botões no estágio 1. 8. Coléter meristemático (*seta*) de botão com 0,5 mm de comprimento. 9. Coléter na fase final de diferenciação (*seta*) de botão com 0,7 mm de comprimento. 10-12. Coléteres em fase secretora em botões no estágio 2. 10. Botão com 1 mm de comprimento. 11. Botão com 2 mm de comprimento. 12. Botão com 3 mm de comprimento. Escalas: 8. 75  $\mu\text{m}$ ; 9-12. 150  $\mu\text{m}$ .



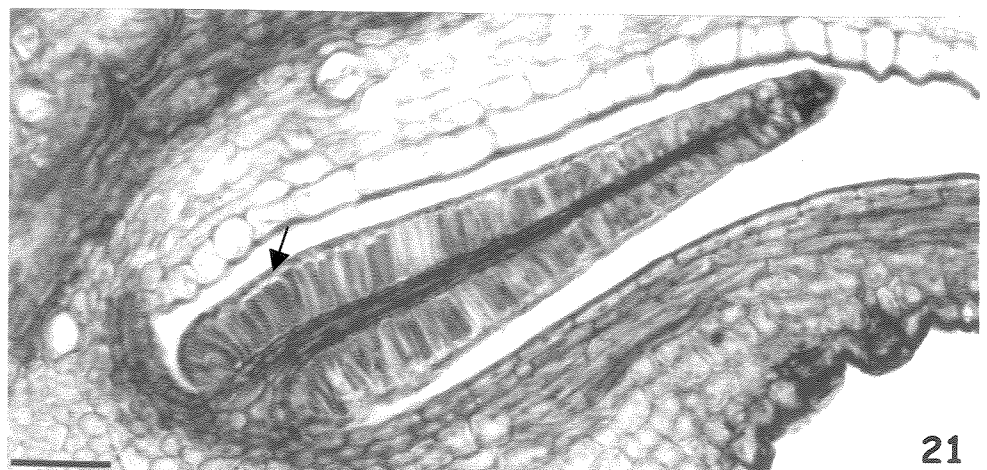
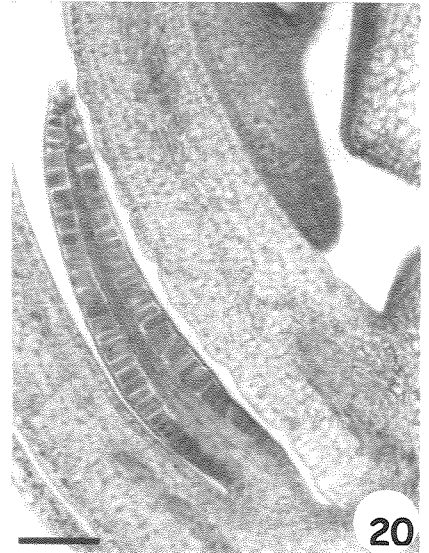
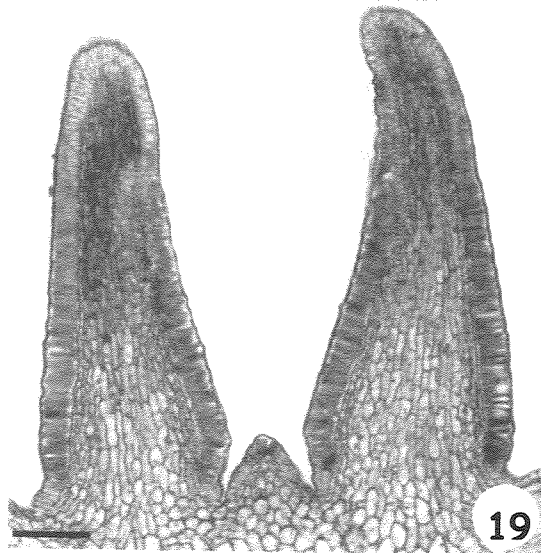
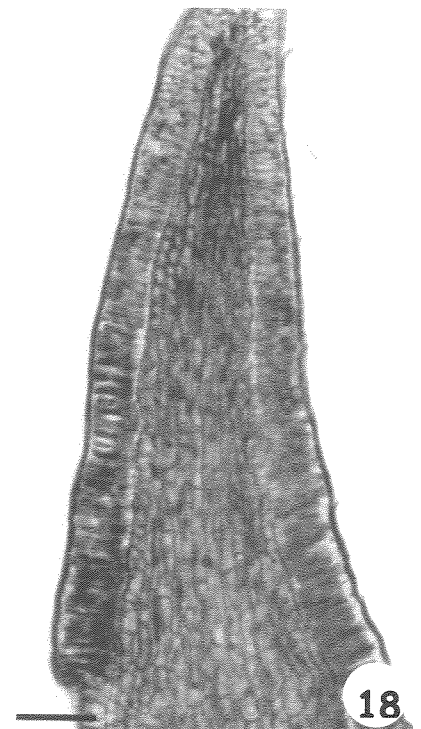
**Fig. 13-16.** Secções longitudinais de coléteres foliares (13-14) e calicinais (15-16) de *B. bicuspidatum* Fourn. **13.** Coléter interpeciolar senescente do sexto nó, necrosando do ápice para a base. **14.** Coléter peciolar senescente do sétimo nó **15.** Coléter calicinal em fase secretora da flor em antese (estádio 3); notar espaço periplasmático (seta). **16.** Coléteres em fase pós-secretora da flor em pós-antese (estádio 3). **Escala:** 13. 150  $\mu\text{m}$ ; 14-16. 75  $\mu\text{m}$ .



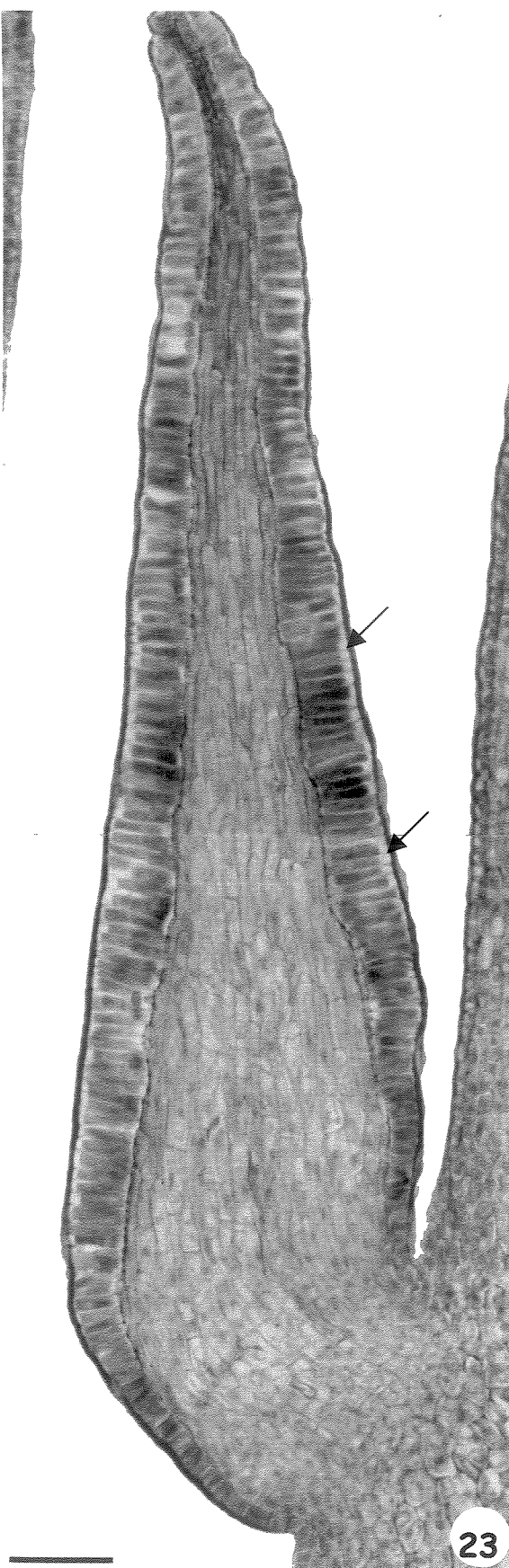
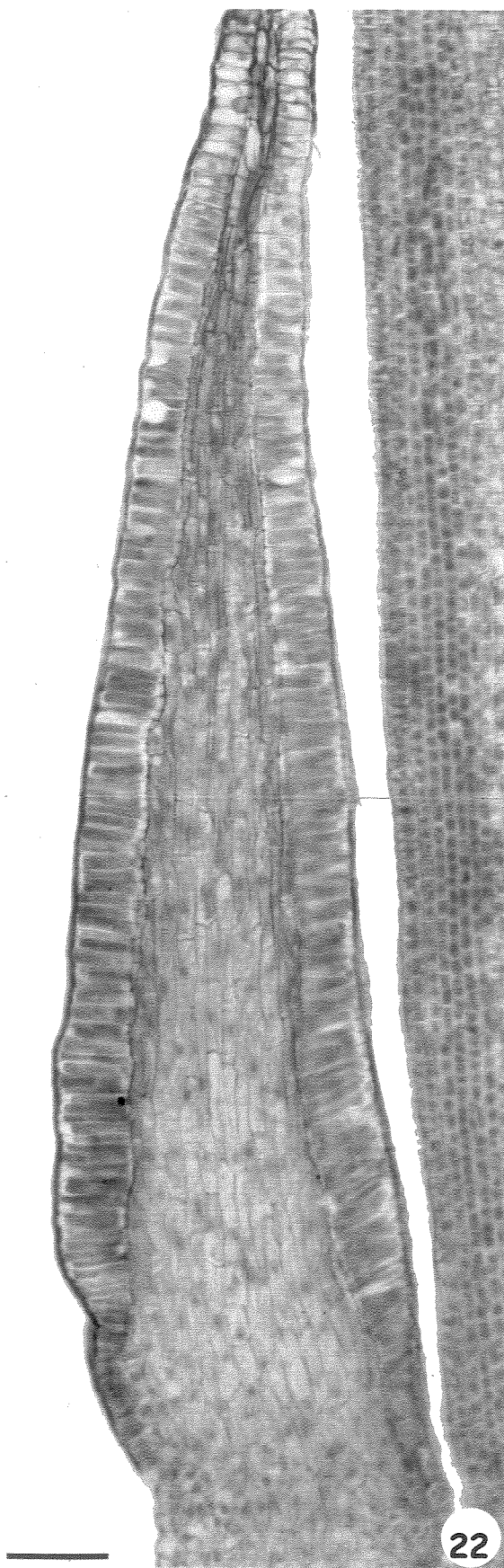


**Fig. 17-21.** Secções longitudinais de coléteres foliares (17-19) e calicinais (20-21) de *B. bicuspidatum* Fourn. em fase secretora tratados com vermelho de rutênio. 17. Coléter interpeciolar do quarto nó. 18. Coléter interpeciolar do décimo segundo nó. 19. Coléteres peciolares do décimo segundo nó. 20. Coléter calicinal de botão com 1 mm de comprimento (estádio 2). 21. Coléter calicinal de flor em pós-antese (estádio 3); notar espaço periplasmático (seta). CI = coléter interpeciolar. Escalas: 17-18,20-21. 75  $\mu$ m; 19. 150  $\mu$ m.

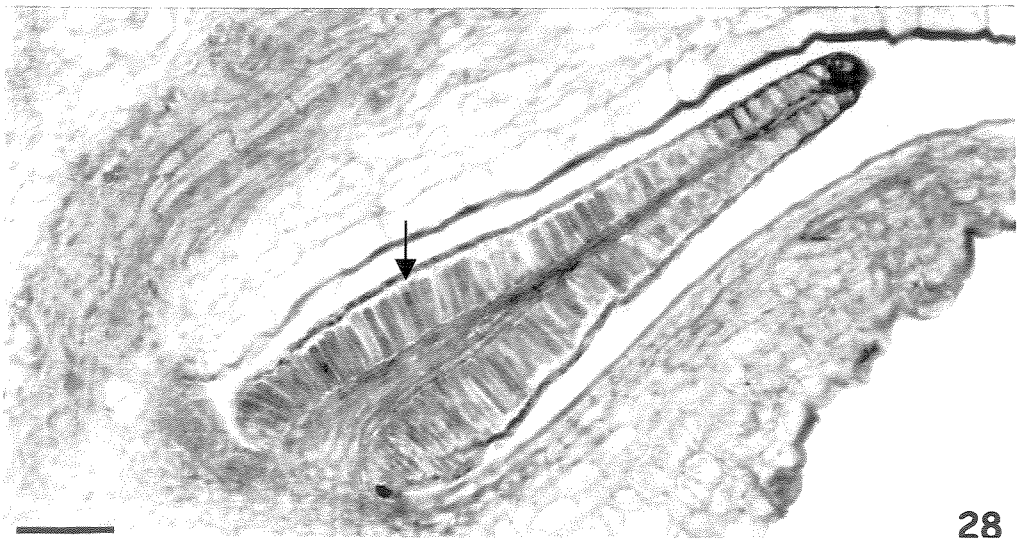
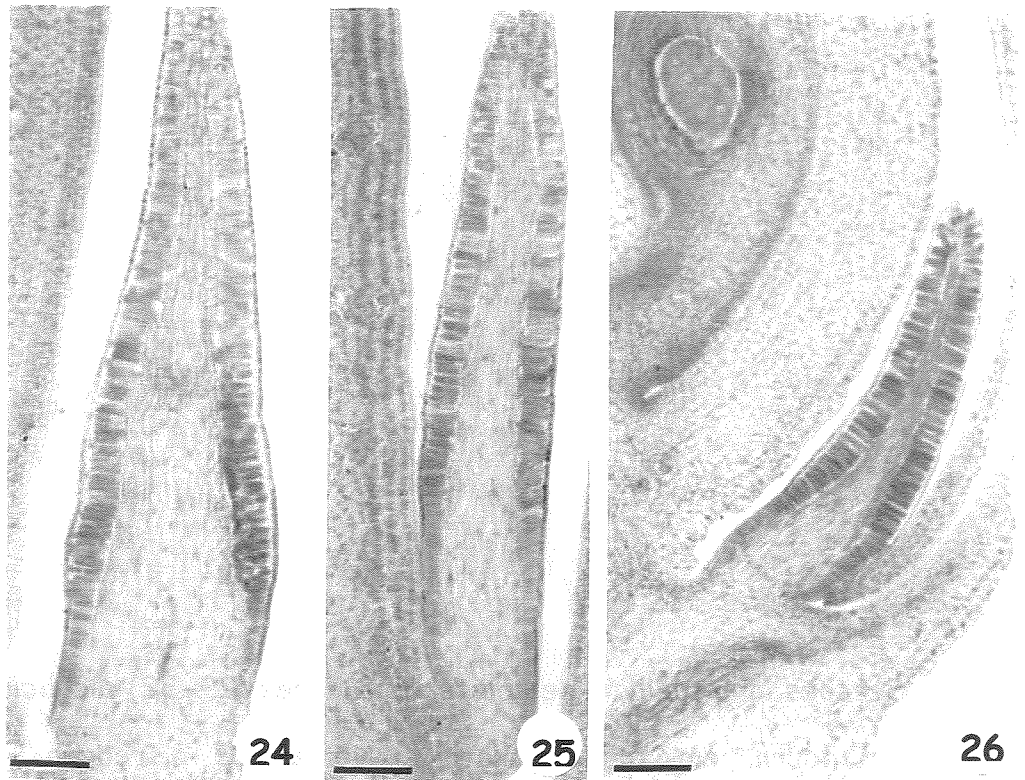




**Fig. 22-23.** Secções longitudinais de coléteres foliares de *B. bicuspidatum* Fourn. tratados com vermelho de rutênio. 22-23. Coléteres interpeciolar (22) e peciolar (23) do sétimo nó em fase secretora; notar espaço periplasmático (seta). Escalas: 22-23. 75  $\mu\text{m}$ .

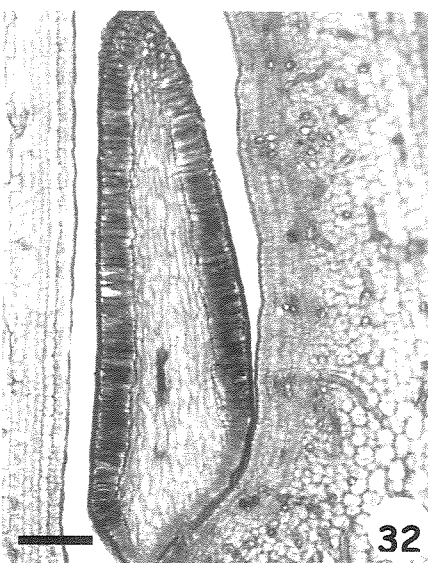
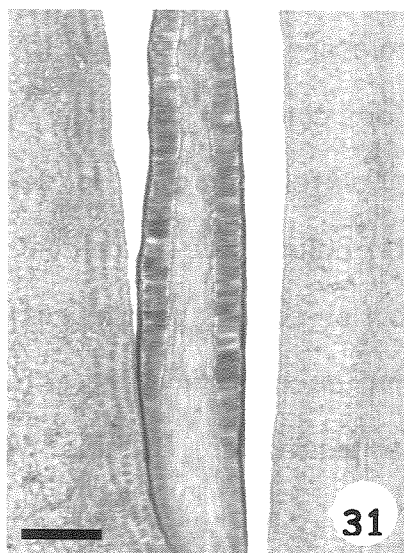
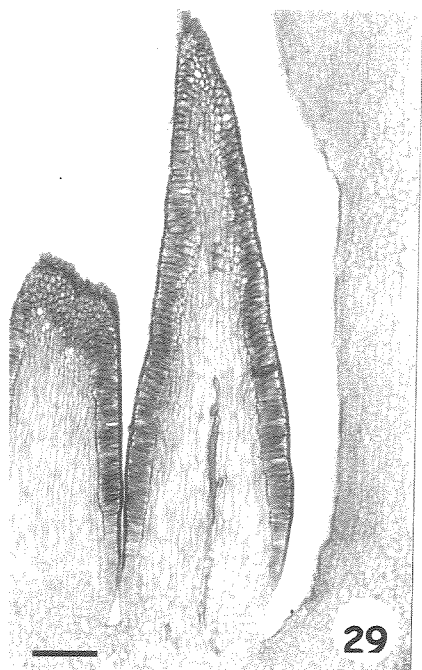


**Fig. 24-28.** Secções longitudinais de coléteres foliares (24-25) e calicinais (26-27) de *B. bicuspidatum* Fourn. tratados com ácido tânico/ cloreto de ferro III. 24-25. Coléteres interpeciolar e peciolar do sexto nó. 26-27. Coléteres calicinais de botões com 1 e 5 mm de comprimento (estádio 2), respectivamente. 28. Coléter calicinal de flor com as pétalas reflexas (estádio 3); notar espaço periplasmático (seta). Escalas: 24-28. 75  $\mu$ m.



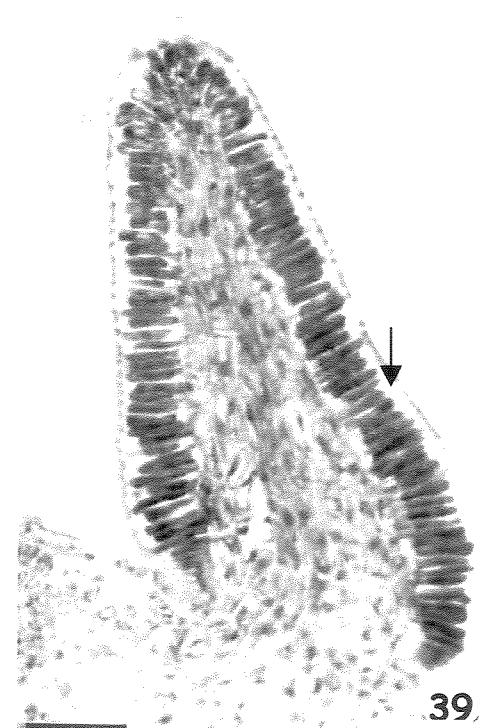
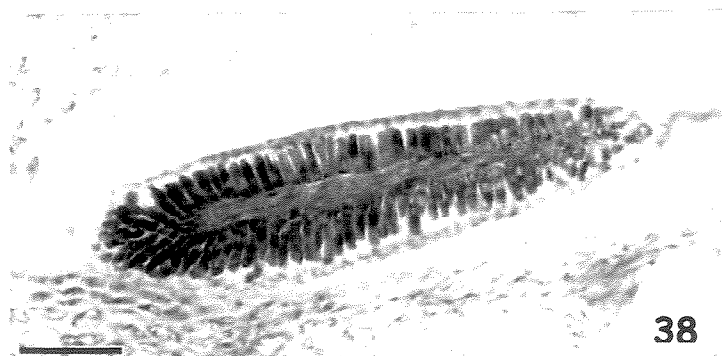
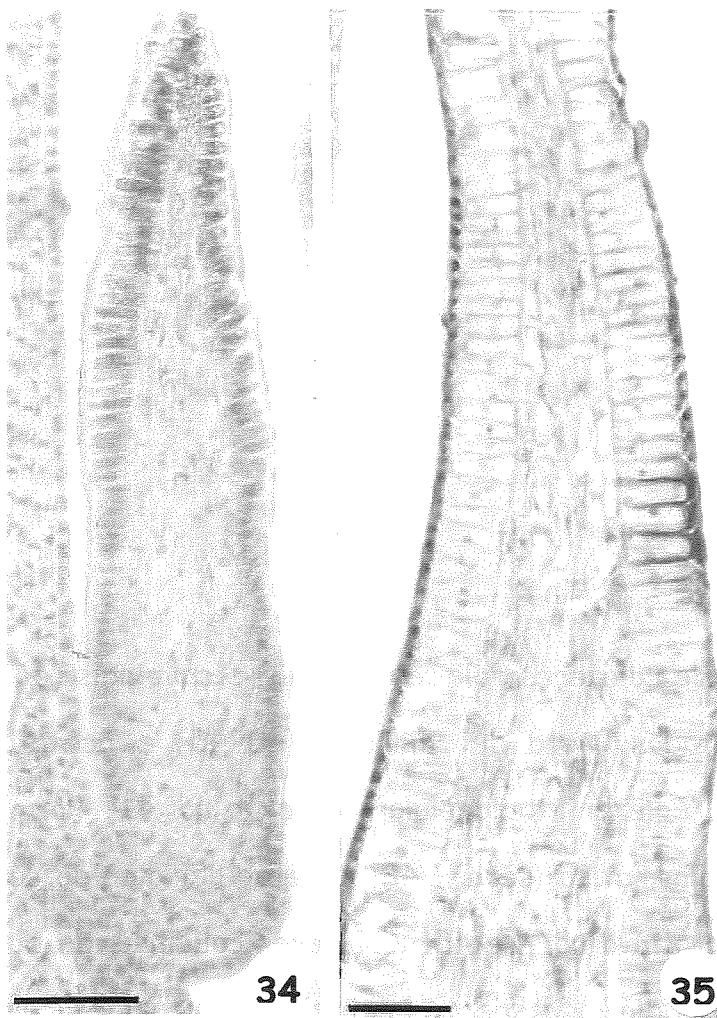
**Fig. 29-33.** Secções longitudinais de coléteres foliares (29-32) e calicinal (33) de *B. bicuspidatum* Fourn. em fase secretora submetidos à reação PAS. 29-32. Materiais fixados em FAA. 29. Coléter interpeciolar do quinto nó. 30. Coléter interpeciolar do sexto nó. 31. Coléter peciolar do quinto nó. 32. Coléter peciolar do sexto nó. 33. Coléter calicinal de botão com 5 mm de comprimento (estádio 2) fixado em FNT; secreção no meio extracelular (cabeça de seta). Escalas: 29-33. 75  $\mu$ m.



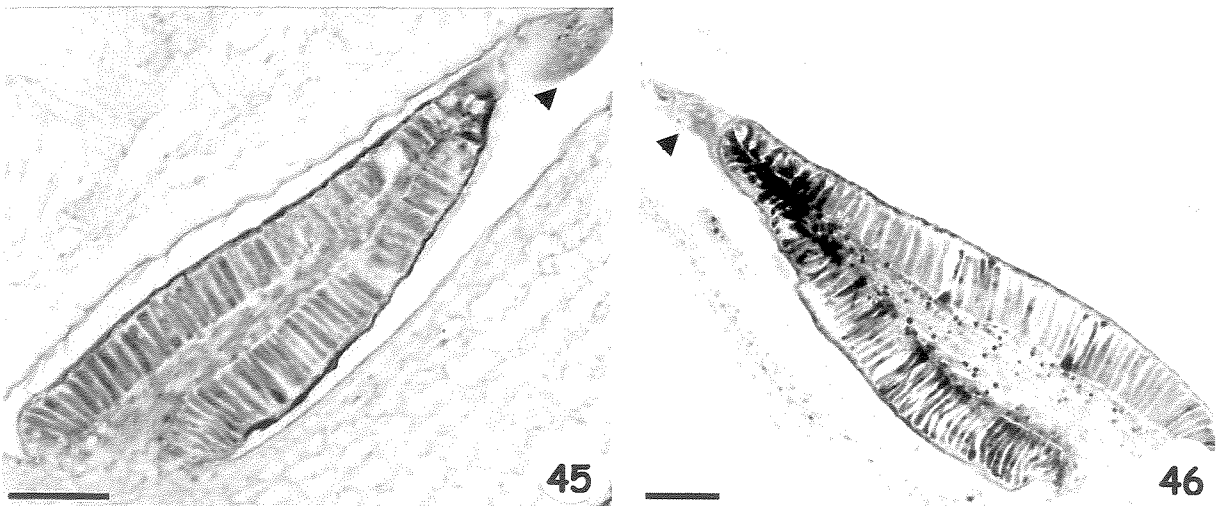
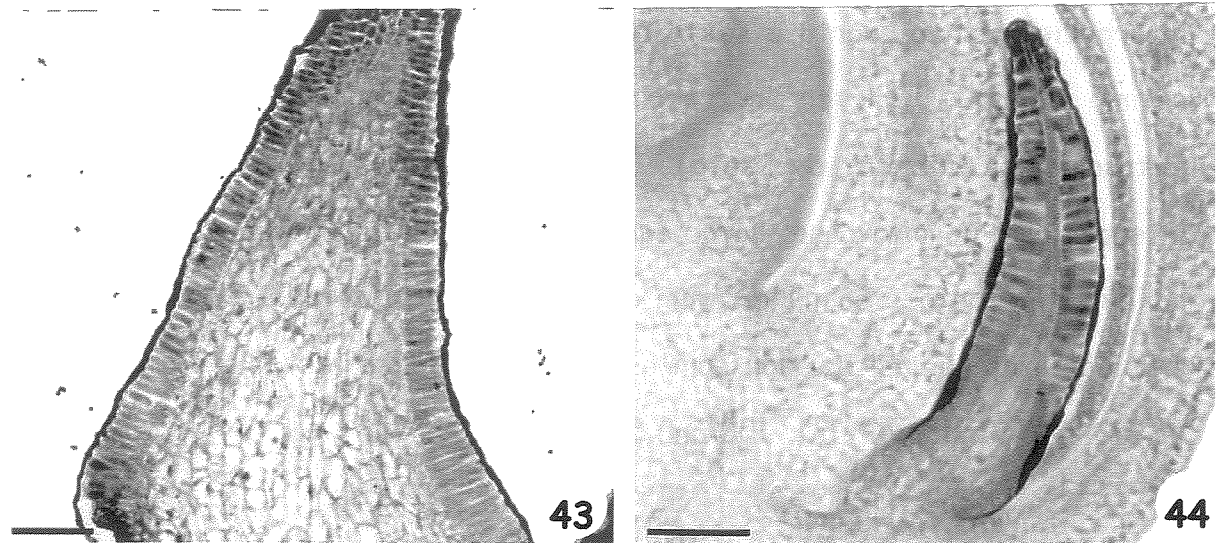
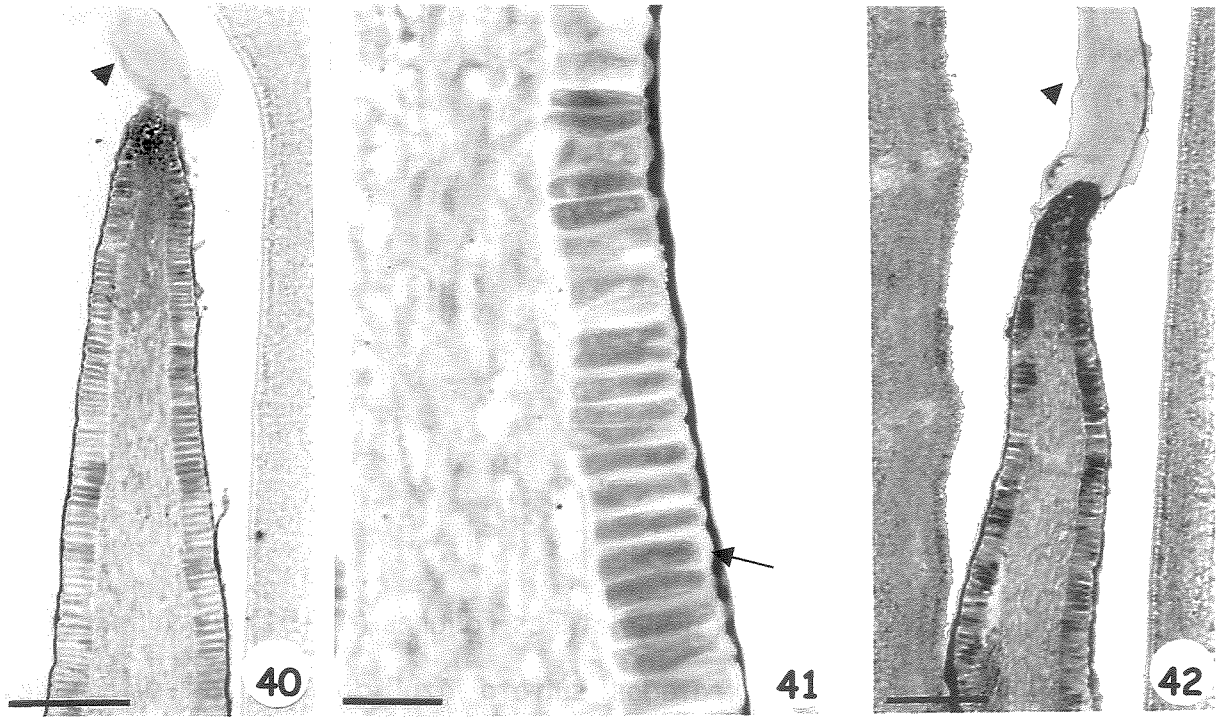


**Fig. 34-39.** Secções longitudinais de coléteres foliares (34-35, 39) e calicinais (36-38) de *B. bicuspidatum* Fourn. tratados com azul brilhante de Comassie (34-37) e preto de amido B (38-39). 34. Coléter peciolar do sexto nó. 35. Coléter interpeciolar do oitavo nó. 36. Coléter calicinal de botão com 1 mm de comprimento (estádio 2). 37. Coléter calicinal de flor com as pétalas reflexas (estádio 3). 38. Coléter calicinal de botão com 2 mm de comprimento (estádio 2). 39. Coléter foliar do oitavo nó. seta = espaço periplasmático. Escalas: 34,36-39. 75  $\mu\text{m}$ ; 35. 50  $\mu\text{m}$ .

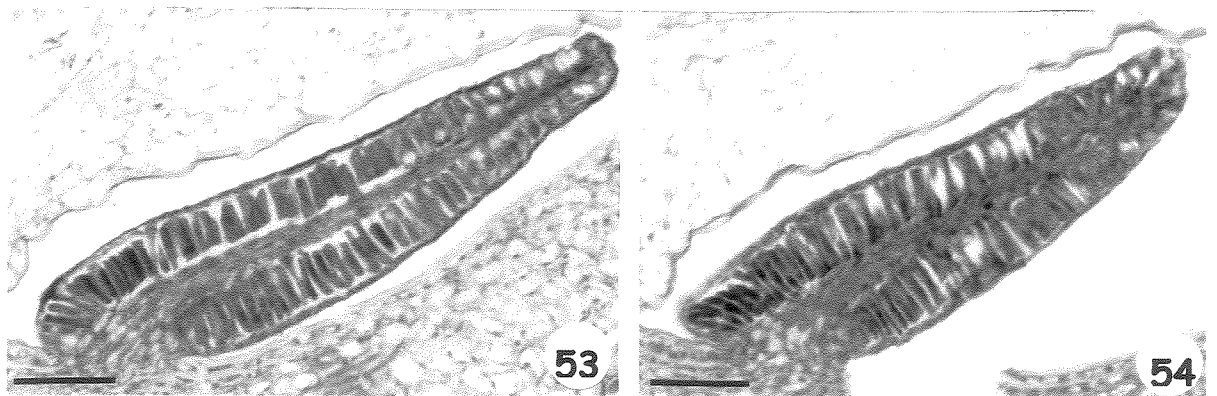
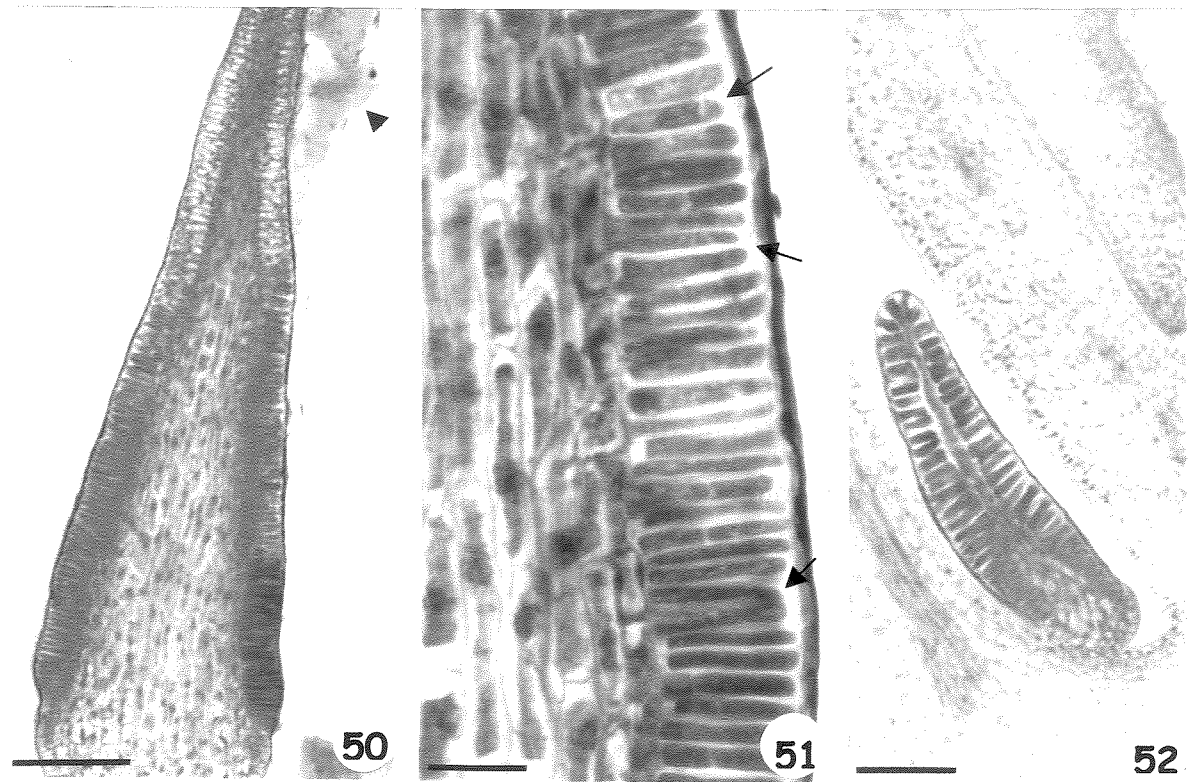
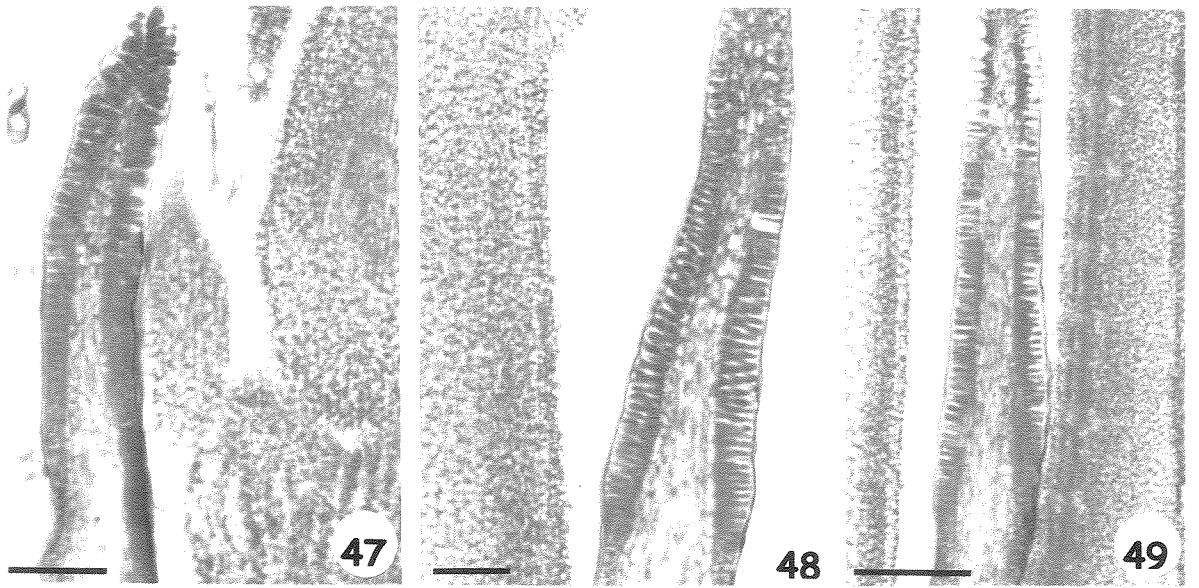




**Fig. 40-46.** Secções longitudinais de coléteres foliares (40-43) e calicinais (44-46) de *B. bicuspidatum* Fourn. tratados Preto de Sudão B (40-45) e acetato de cobre/ácido rubeânico (46). 40. Coléter interpeciolar do sexto nó. 41. Pormenor da figura 40; notar espaço periplasmático (seta). 42. Coléter peciolar do sétimo nó. 43. Coléter interpeciolar do oitavo nó. 44-45. Coléteres calicinais de botões com 1 e 4 mm de comprimento (estádio 2), respectivamente. 46. Coléter calicinal de botão com 5 mm de comprimento (estádio 2). cabeça de seta = secreção no meio extracelular. Escalas: 40,42. 150  $\mu\text{m}$ ; 41. 30  $\mu\text{m}$ ; 43-46. 75  $\mu\text{m}$ .

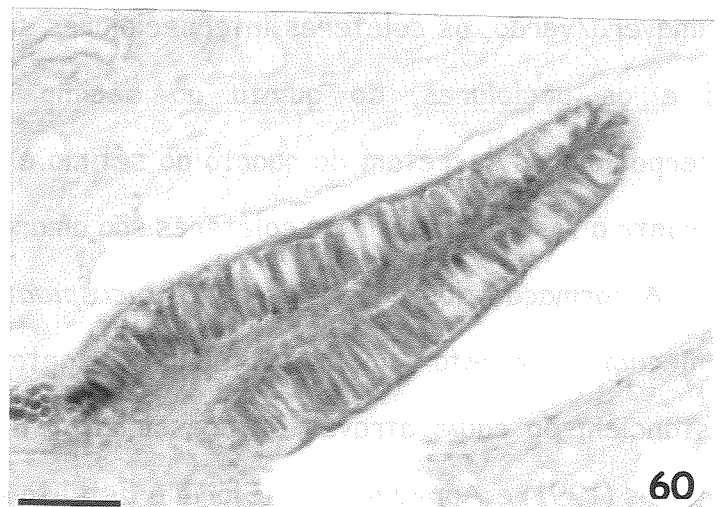
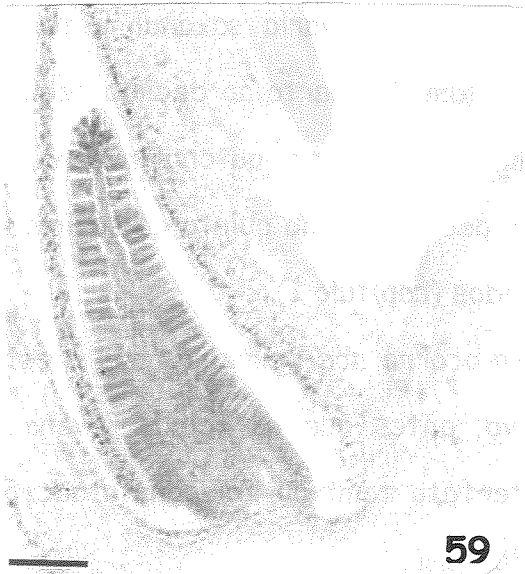
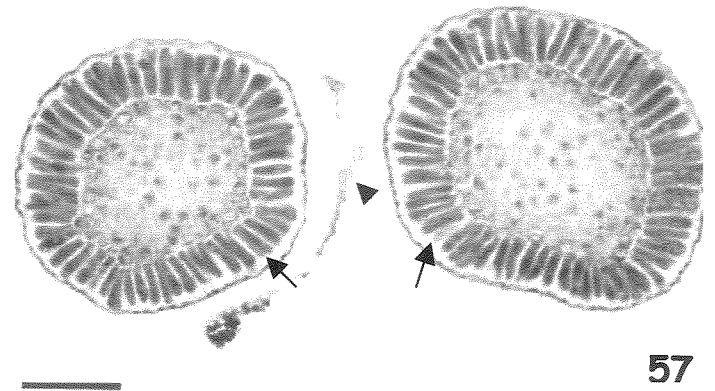


**Fig. 47-54.** Secções longitudinais de coléteres foliares (47-51) e calicinais (52-54) de *B. bicuspidatum* Fourn. tratados sulfato azul do Nilo. 47-48. Coléteres interpeciolares do quarto e sexto nós, respectivamente. 49. Coléter peciolar do sétimo nó. 50. Coléter interpeciolar do nono nó; notar secreção no meio extracelular (cabeça de seta). 51. Detalhe da epiderme de um coléter interpeciolar do oitavo nó; notar espaço periplasmático (seta). 52-53. Coléteres calicinais de botões com 1 e 5 mm de comprimento (estádio 2), respectivamente. 54. Coléter calicinal de flor com as pétalas reflexas (estádio 3). Escalas: 47-48, 52-54. 75  $\mu\text{m}$ ; 49-50. 150  $\mu\text{m}$ ; 51. 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 55-60.** Secções longitudinais de coléteres foliares tratados com cloreto de ferro III (55-57) e calicinais fixados em SFF (58-60) de *B. bicuspidatum* Fourn. 55. Coléter interpeciolar do quinto nó. 56. Coléter peciolar do quinto nó. 57. Coléteres peciolar do sexto nó; notar espaço periplasmático (**seta**) e secreção no meio extracelular (**cabeça de seta**). 58-59. Coléteres calicinais de botões com 1 e 5 mm (estádio 2), respectivamente. 60. Coléter calicinal de flor com as pétalas reflexas (estádio 3). Escalas: 55-60. 75  $\mu$ m.





## Discussão

Os coléteres foliares de *B. bicuspidatum* têm origens diferentes e se formam assincronicamente. Os coléteres interpeciolares se originam de estípulas que se fundem formando uma estrutura em arco que interconecta os pecíolos e os peciolares se formam a partir de grupos de células meristemáticas da face adaxial do pecíolo próximo à lâmina foliar. Uma estrutura estipular com coléteres interpeciolares semelhante à observada em *B. bicuspidatum* só foi registrada em *Mandevilla bridgesii* (Muell. -Arg.) Woods (Woodson & Moore 1938; prancha 3, figura 3).

A formação dos coléteres interpeciolares se inicia no primeiro nó e prossegue até o quarto, enquanto a dos peciolares começa no terceiro nó e progride até o quinto ou sexto nó. Estes cinco ou seis primeiros nós encontram-se no ápice caulinar vegetativo e, nesta fase, os coléteres são verdes (capítulo 1).

Um padrão de divisões celulares para formação dos coléteres semelhante ao de *B. bicuspidatum* foi registrado em *Allamanda cathartica* (Ramayya & Bahadur 1968), *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1989c), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

A duração da fase secretora dos coléteres foliares varia sazonalmente. Na primavera/verão, os coléteres interpeciolares secretam do quarto ao décimo segundo nó e os peciolares, do quinto ao décimo segundo nó; no outono/inverno, os interpeciolares secretam do quarto ao sétimo e os peciolares, do quinto ao sétimo nó. Durante a fase secretora, os coléteres são amarelados (capítulo 1).

A formação dos coléteres de *B. bicuspidatum* ocorre nos primeiros nós e estes começam a secretar no ápice caulinar vegetativo, antes que as folhas jovens se distanciem do caule através do crescimento. Este fato também foi constatado por Thomas (1991) e Appezzato-da-Glória e Estelita (2000).

Como a secreção foi observada no meio externo (capítulo 1), após ser acumulada no espaço periplasmático, pode-se inferir que ela é liberada através da cutícula sem



danificá-la. Normalmente, a secreção é liberada por ruptura da cutícula (Fahn 1990). Em *Allamanda neriifolia* Hook. (hoje *A. shottii* Pohl), *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Fjell 1983) e *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), a secreção se acumula sob cutícula e em *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da Glória & Estelita 2000), a secreção é liberada em fendas formadas pela dissolução da lamela média das paredes radiais das células epidérmicas. Os coléteres de *Alstonia scholaris* apresentam um mecanismo de exsudação não usual: em coléteres do terceiro ou quarto nó, algumas células centrais abaixo da epiderme expandem devido ao acúmulo de material e quanto maior a quantidade acumulada nestas células maior é a pressão exercida sobre as células epidérmicas, até que ambas se desloquem e se rompan (Thomas & Dave 1990).

A senescência dos coléteres foliares não está relacionada ao nó em que se encontram, mas com o grau de expansão dos órgãos em que se inserem, já que esta característica varia sazonalmente. Após a senescência, usualmente os coléteres retêm sua forma (Thomas 1991); mas em *B. bicuspidatum*, assim como em *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), eles se contraem e necrosam do ápice para a base até se desconectarem dos respectivos órgãos e, por isso, dificilmente são encontrados na fase pós-secretora. Ao contrário dos calicinais, os coléteres foliares de *B. bicuspidatum* são caducos. Células lignificadas não foram observadas, como ocorre na senescência dos coléteres de *Allamanda cathartica*, *Alstonia scholaris*, *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*) e *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c).

Os coléteres calicinais de *B. bicuspidatum* se formam precocemente nas flores em botões com menos de 1 mm de comprimento, já possuem secreção no interior das células epidérmicas; em botões com 1 mm, quando o cálice ainda recobre as peças dos demais verticilos, os coléteres já estão totalmente diferenciados e em atividade secretora. Em *Prestonia coalita* (Rio 2001), os coléteres também começam a secreta

nos estádios iniciais de botões florais com 3 a 4 mm de comprimento. Em *B. bicuspidatum*, estes coléteres continuam secretando até as flores estarem em pós-antese; em algumas destas flores, os coléteres são encontrados em fase pós-secretora. Os coléteres calicinais são persistentes e nenhuma sequência de necrose foi observada, como ocorre nos foliares. Este fato concorda com a afirmação de Thomas (1991) de que os coléteres calicinais em Apocynaceae s.l. são persistentes.

A secreção é acumulada no espaço periplasmático e, posteriormente, liberada para o meio externo através da parede e da cutícula, como observado para os coléteres foliares.

A função atribuída aos coléteres é proteger os meristemas em desenvolvimento (Thomas 1991) do dessecação. Em *B. bicuspidatum*, entretanto, os coléteres possuem uma função mais ampla; além de evitarem o dessecação, também imobilizam fitófagos e impedem a proliferação de fungos (capítulo 1). Estas funções complementares se justificam pela composição do exsudato. Por ser viscosa, a secreção é capaz de imobilizar afídeos e a presença de compostos fenólicos durante toda a fase secretora dos coléteres justifica a sua inibição no crescimento de fungos, já que esta classe de substâncias possui esta propriedade.

Os coléteres têm sido tradicionalmente descritos como estruturas que produzem uma secreção viscosa, composta por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990). O fato da secreção de *B. bicuspidatum* ser encontrada no meio extracelular apenas nos coléteres de materiais fixados em FNT e SFF, indica que este exsudato possui uma importante fração lipossolúvel que o fixador hidrofílico (FAA) não preserva.

Todos os coléteres de *B. bicuspidatum* secretam um exsudato de composição heterogênea. Os foliares produzem mucilagem e compostos fenólicos lipofílicos e os calicinais secretam mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos lipofílicos. Os coléteres de *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986) também secretam

polissacarídeos e compostos lipofílicos em uma única fase secretora, variando apenas a predominância de cada composto ao longo desta fase.

A mucilagem, principal componente da secreção de coléteres, foi detectada em coléteres foliares e calicinais de *Prestonia coalita* (Rio 2001). Polissacarídeo insolúveis foram registrados em coléteres de *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989), *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Alguns monossacarídeos foram identificados através de cromatografia e variaram nos diferentes gêneros: ramnose ocorre na secreção dos coléteres de *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987), *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989), *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1990), glicose e ramnose em *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), além de arabinose em *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave 1989c).

Amido foi detectado no interior das células secretoras em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1990), *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-de-Glória & Estelita 2000) e proteína, em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989) e *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1990). Aminoácidos não foram detectados na secreção dos coléteres das espécies investigadas (Thomas 1991).

A secreção composta exclusivamente por resina anteriormente descrita para *Allamanda cathartica* (Ramayya & Bahadur 1968; Subramanian *et al.* 1989), *Aganosma caryophyllata*, *Allamanda violacea* Gard., *Carissa congesta* Wt. Ieon., *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*), *Plumeria alba* Linn., *Tabernaemontana divaricata*, *Thevetia neriifolia* Juss. e *Vallaris solanacea* (Roth.) O Ktze. (Subramanian *et al.* 1989) não foi confirmada para *Allamanda cathartica* (Thomas & Dave 1989a), *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987), *Nerium indicum* (hoje *N. oleander*; Thomas & Dave

1989c) e os resultados obtidos em *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986) foram distintos dos obtidos em *Plumeria alba* (Subramanian *et al.* 1989). A presença de compostos lipofílicos foi comprovada em *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1990) e *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986). A produção de compostos lipofílicos por coléteres de órgãos vegetativos varia em diferentes espécies: em *Plumeria rubra*, eles são continuamente produzidos do estágio inicial ao final (Mohan & Inamdar 1986); em *Allamanda cathartica*, a secreção da fração lipofílica é máxima em coléteres jovens e cessa nos adultos (Thomas & Dave 1989a); em *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*), eles são secretados em uma segunda fase de secreção, quando os coléteres param de secretar mucilagem (Appezato-da-Glória & Estelita 2000). Esta segunda fase de secreção também foi observada em *Roupelia grata*, onde as células passam a acumular compostos fenólicos (Thomas *et al.* 1989). Os coléteres de *B. bicuspidatum* secretam compostos fenólicos durante toda a fase secretora.

## Conclusões

Os coléteres de *B. bicuspidatum* diferem dos das demais espécies já estudadas em muitos aspectos. Dentre estes, destaca-se o polimorfismo dos tipos levantados em um mesmo indivíduo.

Os coléteres interpeciolares e peciolares se formam assincronicamente nos ramos vegetativos e têm origens distintas. Os interpeciolares têm origem estipular e os peciolares, a partir do pecíolo. Desta forma, a teoria estipular proposta por Woodson e Moore (1938) não é universal para a família.

A duração da fase secretora dos coléteres foliares varia sazonalmente, de acordo com a expansão dos órgãos em que se inserem; eles são encontrados nos nós que possuem folhas quase ou completamente distendidas (sexto ou sétimo no outono/inverno e décimo primeiro a décimo terceiro na primavera/verão).

Os coléteres calicinais se formam em botões até 0,9 mm de comprimento; e botões com 1 mm, eles já estão formados e em estágio ativo de secreção. A fase secretora continua até a flor estar totalmente formada e com as pétalas reflexa (último estágio). Em flores deste estágio, coléteres podem ser encontrados em fase pós-secretora.

Os coléteres foliares são caducos e os calicinais, persistentes. Os foliares senescem do ápice para a base, enquanto os calicinais mantêm sua forma.

A secreção viscosa dos coléteres de *B. bicuspidatum* é branca e de natureza heterogênea. Ao longo de uma única fase secretora dos coléteres, as células epidérmicas produzem mucilagem e compostos lipofílicos variando apenas predominância de cada composto. A secreção dos coléteres calicinais difere da secreção dos foliares pela presença de ácidos graxos. A detecção de proteínas no citoplasma das células epidérmicas indica a intensa síntese de compostos envolvidos na produção do exsudato. A secreção mostrou-se eficiente não só protegendo os meristemas contra o dessecamento, mas, também, na proteção de ramos vegetativo contra fitófagos e de flores, contra fungos (capítulo 1).

## Referências bibliográficas

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae) *Revista Brasileira de Botânica* 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. *Phytomorphology* 30:303-306.
- CAIN, AJ 1947 The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88: 383-392.
- CLARK, G 1973 Staining procedures. 3<sup>rd</sup> ed., Baltimore, The Williams & Wilkins Co.
- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of

- colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.
- DAVID, R & CARDE, JP 1964 Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus de L'Academie des Sciences (Paris), Série D 258: 1338-1340.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press Inc.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FISHER, DB 1968 Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- FJELL, I 1983 Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.
- FURR, M & MAHLBERG, PG 1981 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44: 153-159.
- GABE, M 1968 Techniques histologiques. Paris, Masson & Cie.
- GANTER, P & JOLLÉS, G 1969, 1970 Histologie normale et pathologique. Vols I e II. Paris, Gauthier - Villars.
- GERLACH, D 1969 Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Stuttgart, Georg Thieme.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- HIGH, OB 1984 Lipid histochemistry. New York, Oxford University Press.
- INAMDAR, JA; MOHAN, JSS & SUBRAMANIAN, RB 1985 Extrafloral nectaries of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall ex G. Don. Development, ultrastructure and secretion. Trends in Plant Research. 137-148.
- JENSEN, WA 1962 Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman and Co. San Francisco.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.

- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the collectors of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). *Journal of Phytological Research* 2:7-14.
- MAZIA, D; BREWER, PA & ALFERT, M 1953 The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin* 10: 57-67.
- McMANUS, JFA 1948 Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108.
- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57:389-401.
- PEARSE, AGE 1985 Histochemistry: theoretical and applied. Vol. II, 4 ed. Edinburgh, C. Livingstone.
- PIZZOLATO, TD & LILLIE, RD 1973 Mayer's tannic acid- ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21: 56-64.
- RADFORD, AE; DICKSON, WC; MASSEY, JR & BELL, CR 1974 Vascular plant systematics. New York, Harper & Row.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. *Current Science* 18:520-522.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. Br. nom. cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell. Woodson) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:339-349.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences)* 99:423-429.

- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contactor* 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989c Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton* 30:209-212.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- WOODSON, RE Jr & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65:135-165.



## CAPÍTULO 3

### Estruturas secretoras florais de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. (Apocynaceae s.l. – Rauvolfioideae)

#### Introdução

Atualmente, as Asclepiadaceae integram a família Apocynaceae s.l. que agora apresenta uma grande variação na estrutura floral iniciando em Rauvolfioideae Kostel com as flores menos especializadas da família, e culminando em Asclepiadoideae R. Br ex Burnett, que apresentam as flores mais complexas e elaboradas de todas as dicotiledôneas (Endress 1994; Endress & Bruyns 2000).

Alguns trabalhos analisaram a estrutura floral de espécies de Apocynaceae sob diferentes enfoques, destacando-se as publicações de Woodson e Moore (1938), Rao & Ganguli (1963), Fallen (1986), Galetto (1997), Torres e Galetto (1998) e Lin & Bernardello (1999). Dentre os pesquisadores brasileiros, podem ser citados os trabalhos de Rio (2001) e Simões (2004).

As estruturas secretoras florais relatadas para espécies de Rauvolfioideae são epiderme que reveste a cabeça dos estiletos, laticíferos, nectários, coléteres e osmóforos (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Fallen 1986; Thomas 1991; Lin & Bernardello 1999; Endress & Bruyns 2000). Destas, apenas a epiderme secretora da cabeça dos estiletos e os laticíferos têm ocorrência universal na família (Metcalf & Chalk 1950; Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000).

A cabeça dos estiletos é formada pela fusão posgênita do ápice dos carpelos. Fallen (1986) definiu uma progressão na família que reflete os estádios evolutivos ao estudar 65 espécies de Apocynaceae s.s. e quatro de Asclepiadaceae baseando-se na

morfologia, histologia e função da cabeça dos estiletes. Esta estrutura possui epiderme secretora que é responsável pela produção de um líquido viscoso que retém os grãos de pólen nas Rauvolfioideae e Apocynoideae Burnett (Fallen 1986).

Os laticíferos também estão presentes nos órgãos reprodutivos das Apocynaceae *s.l.* (Murugan & Inamdar 1987a,b; Thomas & Dave 1994; Aguiar 2003). O látex geralmente é leitoso, mas também pode ser avermelhado ou amarelado (Endress & Bruyns 2000); as funções já atribuídas ao látex são proteção contra herbívoros, microorganismos e selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrel *et al.* 1991; Hunter 1994) e a sua presença tornou as plantas latexcentes mais bem sucedidas que os grupos relacionados não latexcentes (Farrell *et al.* 1991).

Os nectários podem ter diversas formas, constituições e localizações nas Apocynaceae *s.l.* Nas Rauvolfioideae, o nectário pode estar presente ou ausente; quando presente, forma um anel basal ao redor do ovário (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Endress & Bruyns 2000). Sua ocorrência e posição são controversas nas espécies de *Aspidosperma* (Lin & Bernardello 1999).

Os coléteres têm ampla ocorrência na família, porém, não estão presentes em todas as espécies (Endress & Bruyns 2000). Eles não foram observados em ápices vegetativos e flores de *Aspidosperma tomentosum* Mart. nem de *A. australe* (capítulo 1). Os coléteres são responsáveis pela proteção dos meristemas contra o dessecação (Thomas 1991) e também dos ramos vegetativos contra fitófagos e das flores impedindo a proliferação de fungos (capítulos 1 e 2).

Dados de literatura referem que as flores de algumas espécies de Apocynaceae são aromáticas, liberando fragrância; porém, os sítios de produção desta fragrância nunca foram anatomicamente ilustrados. No entanto, osmóforos são citados para a família e para o gênero (Endress 1994; Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999).

Embora tenha grande ocorrência no Brasil, as espécies de *Aspidosperma* são pouco estudadas sob o ponto de vista anatômico. Apenas um trabalho foi encontrado sobre a estrutura floral de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. (Lin & Bernardello 1999).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar anatomicamente as estruturas secretoras florais observadas em *Aspidosperma australe* Müll. Arg. com a definição dos estádios do desenvolvimento floral em que estas estruturas estejam em fase secretora, ampliando o conhecimento sobre a estrutura floral das espécies do gênero e contribuindo para o maior conhecimento das espécies brasileiras em relação às demais espécies de Apocynaceae s.l.

## Material & métodos

O material de estudo foi coletado no *campus* da Universidade Estadual de Campinas. As coletas foram realizadas de outubro a novembro de 2003 e a planta foi identificada pela Profa. Dra. Luiza S. Kinoshita. O material testemunha foi herborizado: *A. australe*: Brasil, São Paulo, Campinas, 08/V/2003, D. Demarco 10. As exsiccatas serão incorporadas ao Herbário UEC.

Ramos florais de um indivíduo foram cortados com lâmina aquecida e fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%. 1:1:18 v/v) por 24 h (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v; Lillie 1948 in Clark 1973) por 48 h. Após este período, os materiais foram desidratados e estocados em etanol 70%.

Botões florais e flores foram classificados em três estádios considerando-se o desenvolvimento floral com seus comprimentos medidos a partir da base do receptáculo: Estádio 1 - botões florais com até 3 mm; Estádio 2 - botões florais de 4 a 6 mm; Estádio 3 - flores adultas com cerca de 8 mm (pré-antese, antese e pós-antese). Todas estas peças foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário;

Johansen 1940), incluídas em "paraplast" e seccionadas em séries transversais e longitudinais com 12 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo Microm HM340E . As secções foram coradas com safranina (CI 50240), violeta cristal (CI 42555) e laranja G (CI 16230; Johansen 1940) e as lâminas montadas em resina sintética.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak Pro Image asa 100. As escalas das figuras foram obtidas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

Para verificar a ocorrência de substâncias incrustantes ou adcrustantes nas paredes dos laticíferos foram realizados testes com azul de anilina (CI 42755) para calose (Smith & McCully 1978), preto de Sudão B (CI 26150) e vermelho de Sudão IV (CI 26105) para lipídios totais (Pearse 1985) e floroglucina acidificada para lignina (Johansen 1940).

## Resultados

Apenas dois sítios secretores foram encontrados nas flores de *A. australe* (Fig. 1, 4); a estrutura secretora externa é a epiderme da cabeça dos estiletes e a interna é o laticífero. Coléteres estão ausentes (capítulo 1), nectários e osmóforos não foram localizados.

**Tabela 1.** Estádios do desenvolvimento floral de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. em que as estruturas estão em fase meristemática e secretora.

Estruturas secretores	Botões florais		Flores adultas
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio3
	até 3 mm	4 - 6 mm	ca. 8 mm
Epiderme da cabeça dos estiletes	meristemática	secretora	secretora
Laticífero	secretora	secretora	secretora

## Epiderme da cabeça dos estiletes (Fig. 4-10; tabela 1)

### Estrutura

A flor de *A. australe* possui um estilete formado pela fusão quase integral dos estiletes dos dois carpelos (Fig. 4,6-7,11). Esta fusão ocorre em botões no estágio 1 (até 3 mm); os estiletes ainda estão separados no início do desenvolvimento (Fig. 5; seta) e se fundem após a abertura do cálice (Fig. 6). Na porção apical do estilete, encontra-se a cabeça dos estiletes que possui epiderme secretora (Fig. 1-2, 4). Esta estrutura tem formato cônico e é formada pela união da porção distal dos dois estiletes (Fig. 1-2, 4, 7). Na ponta da cabeça dos estiletes é possível observar os apêndices apicais que não se fundem (Fig. 4, 6-7, 11) e não possuem epiderme secretora (Fig. 11). Não há adnação de qualquer estrutura à cabeça dos estiletes.

A epiderme da cabeça dos estiletes é composta exclusivamente por tricomas unicelulares alongados (Fig. 7, 9-10), com base alargada e que apresenta um vacúolo relativamente grande que é observado nesta região durante toda a fase secretora (Fig. 9-10). Essas células apresentam paredes finas, conteúdo citoplasmático de aspecto denso (Fig. 9) e núcleo, em geral, em posição mediana. Um espaço é observado nestas células, onde a secreção é acumulada antes de ser liberada para o meio externo. O feixe vascular dos estiletes situa-se próximo à superfície e ramificações vasculares em direção à epiderme secretora não foram observadas (Fig. 8, 10).

### Distribuição

A cabeça dos estiletes possui epiderme secretora que a recobre desde sua base até a porção superior (Fig. 4, 7-10), com exceção dos dois apêndices apicais (11).

### Fase secretora

A fase secretora se inicia apenas em botões no estágio 2. Nesta fase, a cabeça dos estiletes já está totalmente formada (Fig. 7) e as células epidérmicas começam a apresentar secreção em seu interior. No estágio seguinte (estágio 3), a flor atinge suas dimensões totais e a secreção é observada no meio extracelular (Fig. 9-10; seta larga). Na flor em antese, a secreção apresenta aspecto denso e recobre tanto a cabeça dos estiletes quanto os tricomas da face interna do tubo da corola que estão a sua volta (Fig. 2-3, 36; seta). *In vivo*, esta secreção tem aspecto viscoso. A secreção e os tricomas corolinos formam uma rede que retém os grãos de pólen (Fig. 2-3, 10-11).

Laticífero (Fig. 12-26; tabela 1)

### Ontogênese e estrutura

Os laticíferos de *A. australe* são facilmente observados nos diferentes órgãos devido, principalmente, ao seu calibre e conteúdo, além das ramificações do sistema (Fig. 12-26). O diâmetro dos laticíferos varia em todas as peças florais de 13 a 31  $\mu\text{m}$ . O comprimento de um laticífero é de difícil mensuração, mas um mesmo laticífero pode ser observado por toda a extensão da flor nos cortes longitudinais.

Os laticíferos possuem paredes primárias espessas, sem substâncias incrustantes ou adcrustantes. Elas não reagiram positivamente aos testes para calose, suberina ou lignina; no entanto, elas apresentam coloração arroxeada nos laticíferos jovens (Fig. 15-16) devido a sua afinidade pelo violeta cristal. Os laticíferos são polinucleados (Fig. 16) por adição de células e cada núcleo possui de um a quatro nucléolos; os núcleos geralmente ocupam posição parietal (Fig. 16; seta).

O laticífero é um dos primeiros tipos celulares a se diferenciar; sua fase meristemática é muito breve e já no estágio 1, enquanto a maioria dos tecidos está

meristemática, os laticíferos já estão diferenciados e em fase secretora (Fig. 14 cabeça de seta).

Os laticíferos de *A. australe* são articulados anastomosados, formados pela adição de células. A dissolução das paredes terminais é rápida e poucas células de se ápice podem ser vistas com estas paredes (Fig. 12-13; seta); logo abaixo, as células estão totalmente unidas, sem vestígios da parede terminal. Nesta região, as paredes dos laticíferos já estão espessadas, embora continuem a crescer em diâmetro posteriormente. No início do desenvolvimento (Estádio 1), a parede dos laticíferos cora em roxo pelo violeta cristal (Fig. 15-16); posteriormente, quando eles estão totalmente diferenciados, a parede cora apenas pelo laranja G (Fig. 24-25). O sistema laticífero tem origem a partir do meristema fundamental e/ou do procâmbio. Os laticíferos crescem em comprimento em regiões meristemáticas, por adição de novas células e posteriormente, por alongamento celular. Em todas estas regiões meristemáticas onde os laticíferos estão se formando, as células apicais dos laticíferos possuem as mesmas dimensões das demais células (Fig. 12-13). Embora rara, a anastomose lateral do laticíferos origina um sistema ramificado. Os laticíferos de maior calibre determinam um arranjo radial das células parenquimáticas à sua volta (Fig. 25). Eles atingem seu diâmetro máximo em botões ainda no estágio 1 (Fig. 16).

### Distribuição

Os laticíferos estão presentes em todas as peças florais (Fig. 12-26). No pedicelo, os laticíferos são encontrados quase exclusivamente no parênquima cortical (Fig. 17, 23-26); alguns podem ser observados no floema externo e raramente no interno (Fig. 24) do sifonostelo anfiflóico. As ramificações são raras e são encontradas principalmente nas pétalas. Há uma maior concentração de laticíferos nas pétalas na altura dos estames, onde aproximadamente um terço do mesofilo é composto por laticíferos (Fig. 19). Os laticíferos também ocorrem na sépala (Fig. 18

no estame (Fig. 20), no ovário (Fig. 21) e no estilete (Fig. 22). Eles são quase exclusivamente retilíneos e raramente apresentam contorno sinuoso. Laticíferos não foram encontrados no parênquima medular do pedicelo (Fig. 23,26) nem nos óvulos (Fig. 21).

#### Fase secretora

O látex é o próprio protoplasto das células laticíferas, sendo observado desde os estádios mais jovens destas células (Fig. 12-16). A secreção possui aspecto denso e preenche todo o laticífero (Fig. 16). Ao seccionar um órgão, imediatamente inicia o extravasamento do látex de aspecto leitoso que, pouco tempo depois, coagula e sela o órgão injuriado. Não foi encontrado nenhum sinal de herbivoria nas flores.

Os laticíferos já apresentam secreção durante a sua diferenciação (Fig. 12-14). A fase secretora só termina quando todo o laticífero e o órgão onde ele ocorre estiverem totalmente diferenciados, não havendo mais adição de novas células. As células aparentemente permanecem vivas e com a secreção em seu interior, que somente será liberada para o meio extracelular se o tecido for injuriado.

#### **Epiderme da placenta (Fig. 21, 27-31)**

##### Ontogênese e estrutura

Epiderme diferenciada também foi observada na placenta de *A. australe* (Fig. 21, 27-31; seta). Ela se forma no estágio 2 através do alongamento das células protodérmicas da placenta em direção à micrópila (Fig. 27-28; seta). No estágio 3, ela está totalmente formada e as células epidérmicas alongadas possuem paredes de composição distinta das demais células, que pode ser observado pela coloração arroxeada (Fig. 21, 29-31; seta) devido a sua afinidade pelo violeta cristal. O



protoplasto destas células tem aspecto denso (Fig. 30) e nenhuma secreção foi observada no meio extracelular.

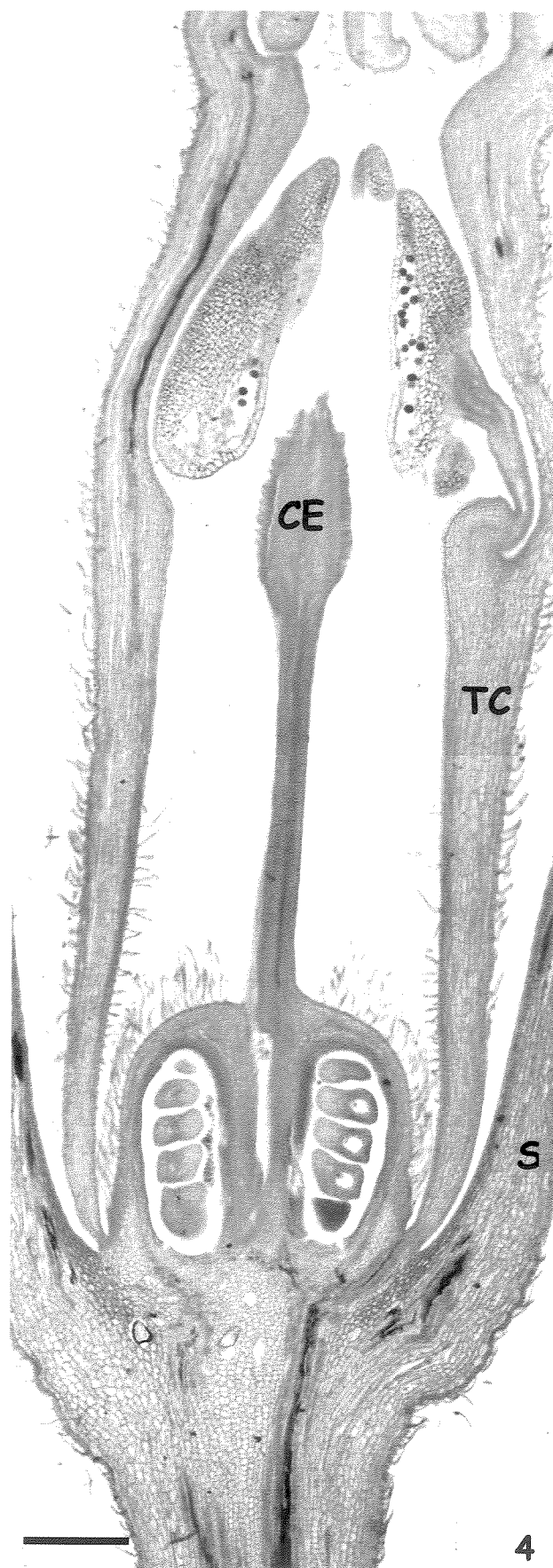
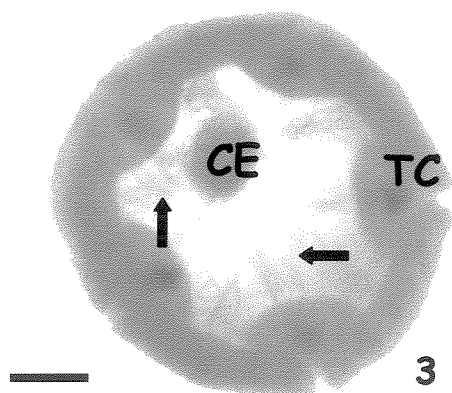
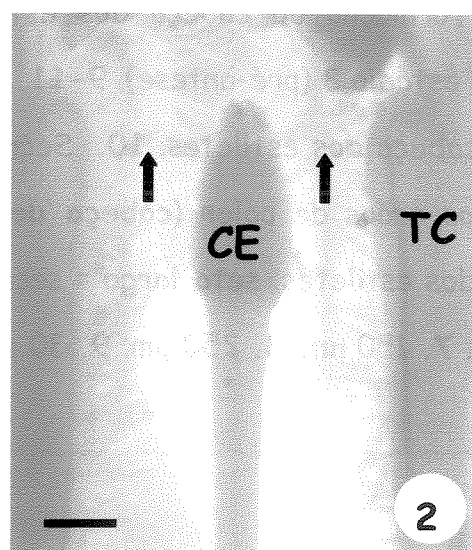
### Tricomas corolinos (Fig. 32-36)

#### Estrutura

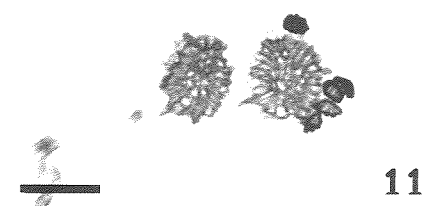
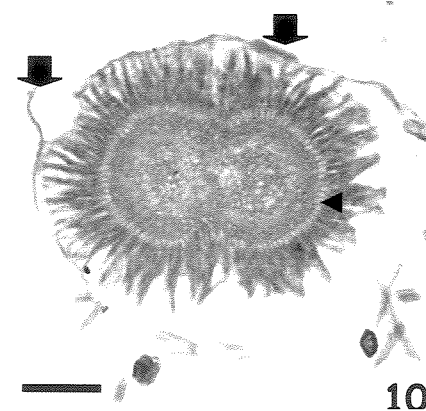
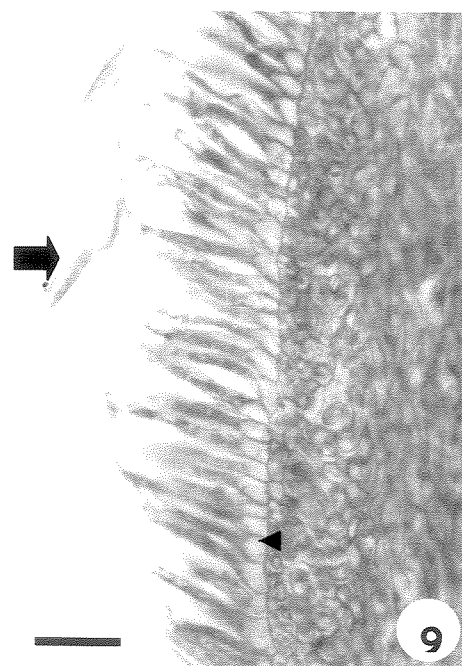
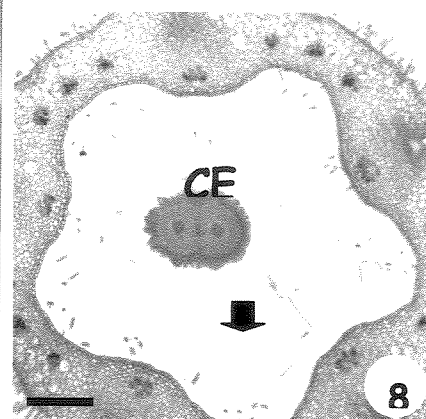
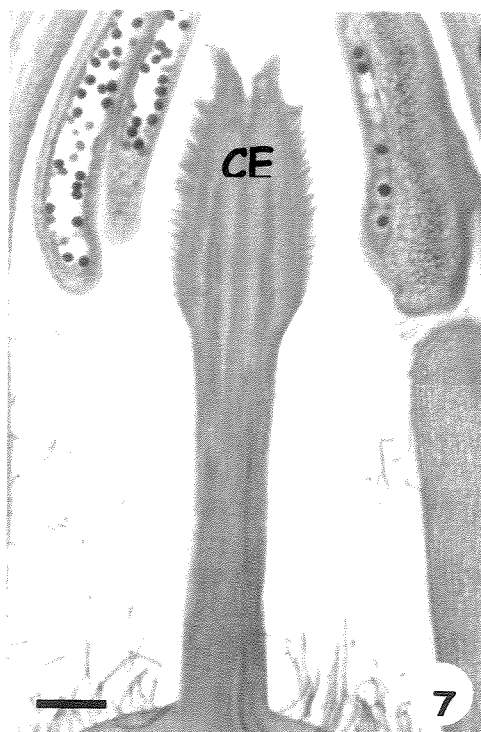
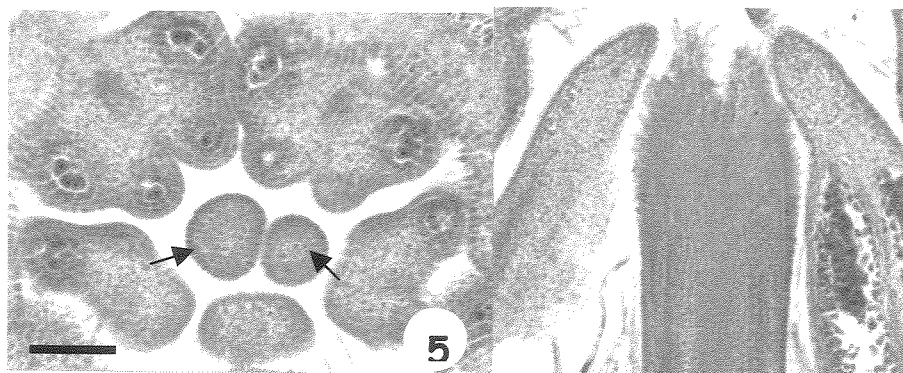
Tricomas com características intermediárias entre glandulares e tectores são encontrados no terço basal da face interna do tubo da corola de *A. australe* (Fig. 32-35). No terço apical do tubo, os tricomas corolinos são tipicamente tectores, de ápice agudo e parede espessa (Fig. 36; seta) e encontram-se próximos à cabeça dos estiletes.

Os tricomas corolinos de estrutura intermediária são unicelulares. O tricoma é alargado no ápice e tem um espaço periplasmático (Fig. 33-34; seta). Entretanto, ele possui cutícula muito espessa e ornamentada (Fig. 35). Estes tricomas têm desenvolvimento assincrônico, sendo observadas diferentes fases de sua formação num mesmo estágio floral; nenhuma secreção foi observada nestes tricomas no materiais fixados em FAA e FNT.

**Fig. 1-4.** Flores adultas e botão floral no final do estágio 2 de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. **1.** Vista geral da flor. **2-3.** Detalhes da cabeça dos estiletes e tricomas corolinos. **4.** Vista geral do botão floral. **CE** = cabeça dos estiletes; **S** = sépala; **TC** = tubo da corola; **seta** = tricomas corolinos. **Escala:** 1. 1 mm; 2,4. 300 µm; 3. 400 µm.

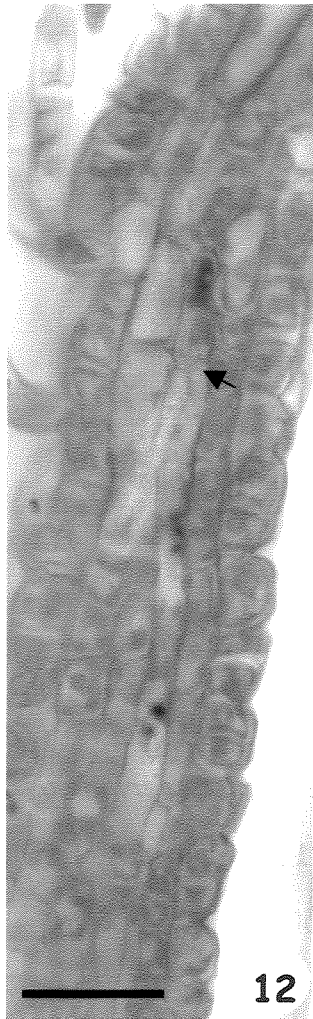


**Fig. 5-11.** Botões florais (5-7) e flores adultas (8-11) de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. 5,8,10-11. Secções transversais. 6-7,9. Secções longitudinais. 5. Estiletes separados no início do estágio 1 (seta). 6. Estiletes fundidos no final do estágio 1. 7. Botão no início do estágio 2; formação da cabeça dos estiletes e alongamento das células epidérmicas. 8. Flor no estágio 3 (pré-antese). 9-11. Flor em antese. 9. Detalhe da epiderme secretora da cabeça dos estiletes. 10. Secreção de aspecto denso no meio extracelular, retendo os grãos de pólen (cabeça de seta = vacúolos). 11. Apêndices apicais. CE = cabeça dos estiletes; seta larga = secreção no meio extracelular. Escalas: 5-6,10-11. 75 µm; 7. 150 µm; 8. 250 µm; 9. 30 µm.

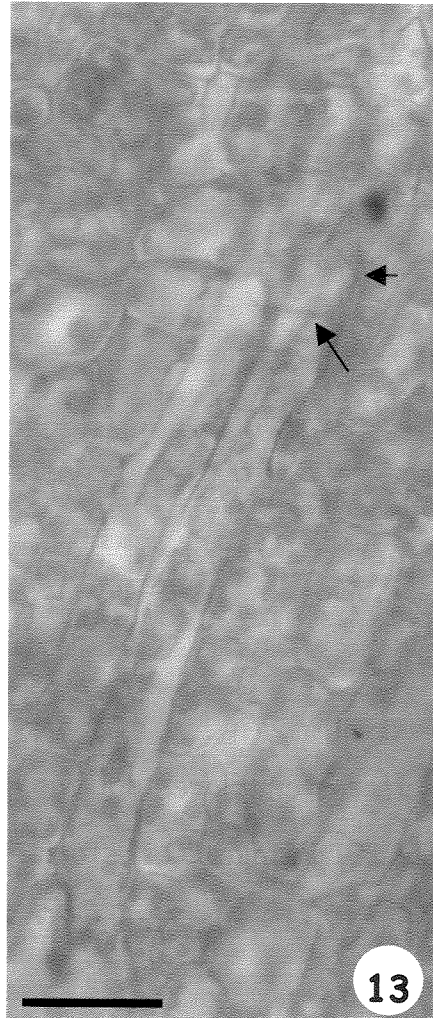


**Fig. 12-16.** Laticíferos em botões florais no estágio 1 de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. **12-13.** Terminações de laticíferos na sépala; notar paredes transversais (seta). **14.** Laticíferos totalmente formados no receptáculo do botão. **15-16.** Laticíferos jovens no pedicelo. **15.** Laticíferos com parede de coloração arroxeada. **16.** Laticíferos com vários núcleos de posição parietal (seta). cabeça de seta = laticífero. Escalas: 12-13. 25 µm; 14. 75 µm; 15-16. 30 µm.





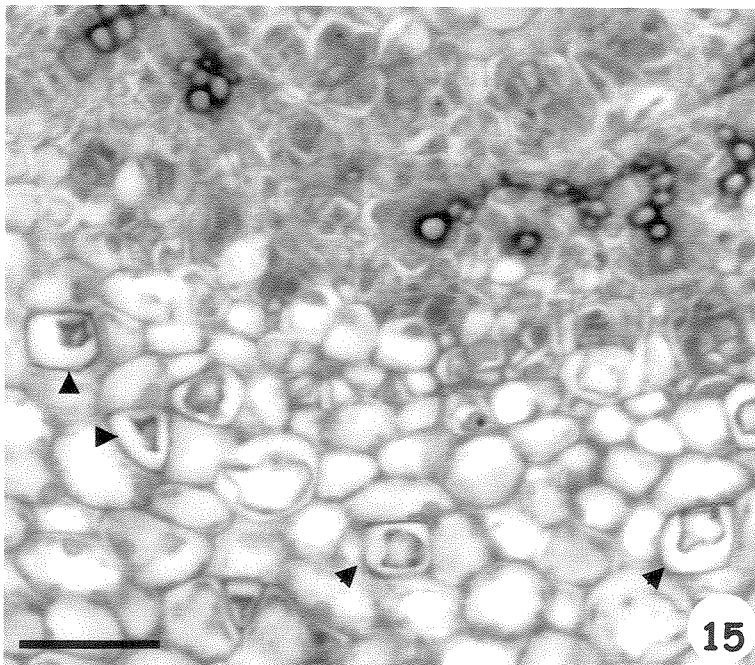
12



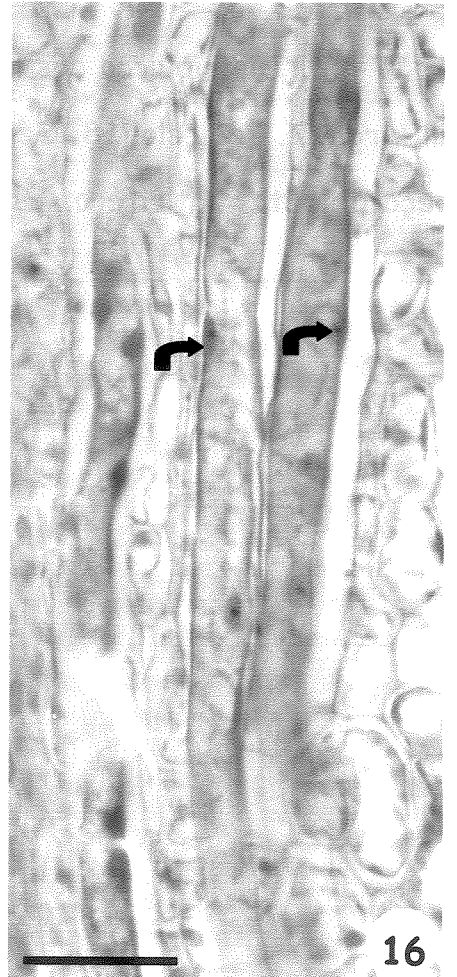
13



14



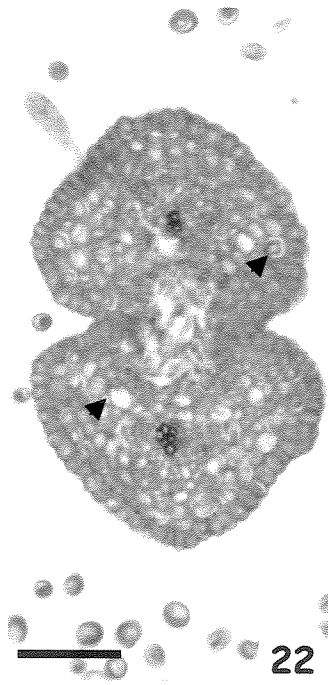
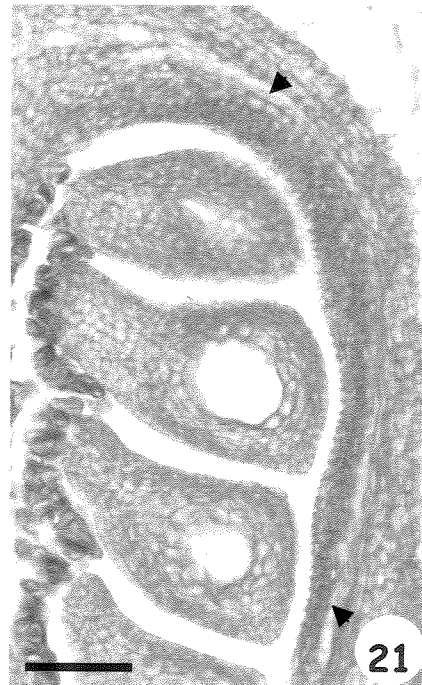
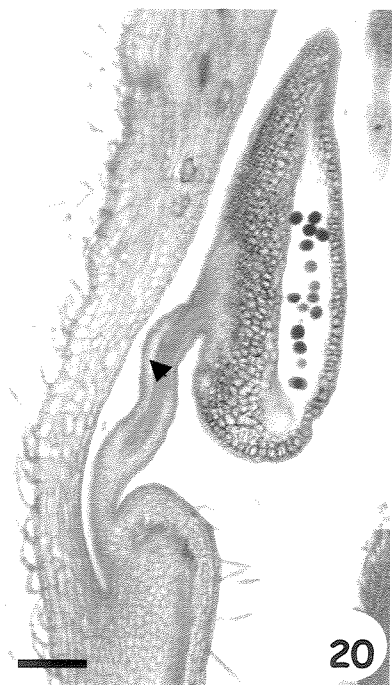
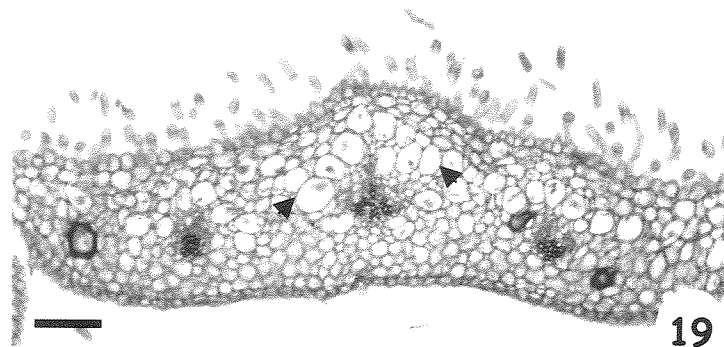
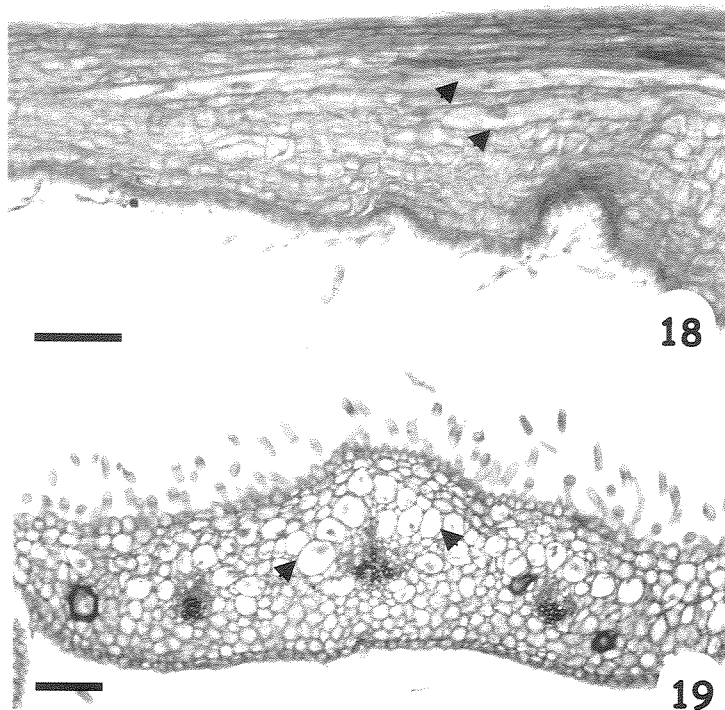
15



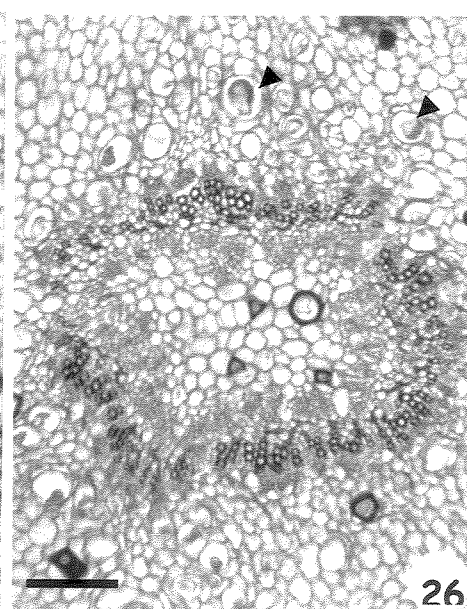
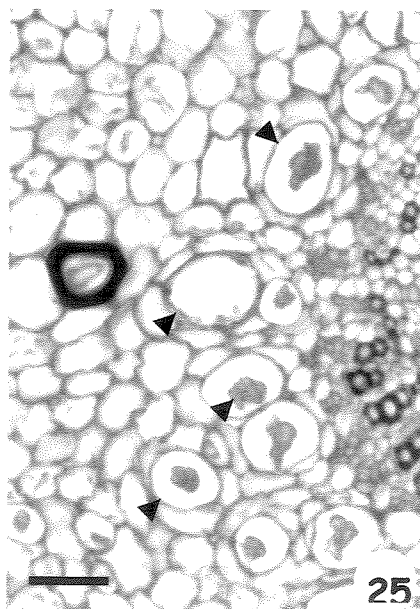
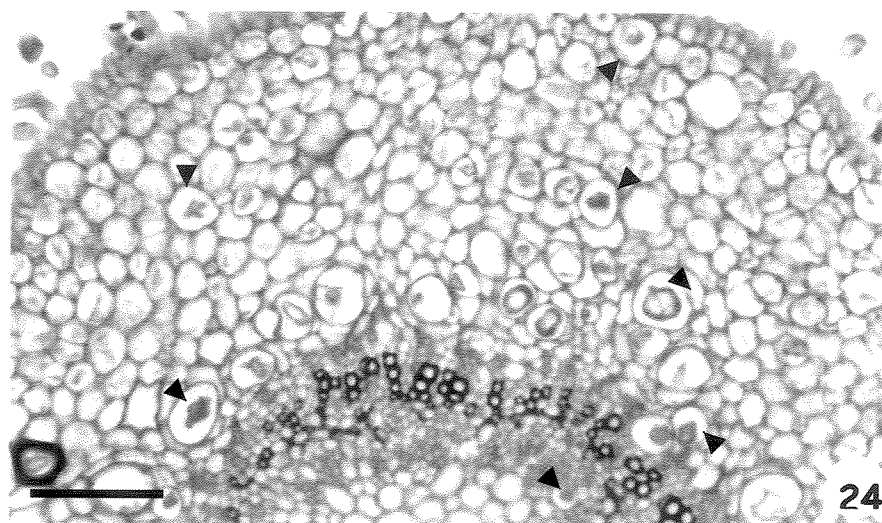
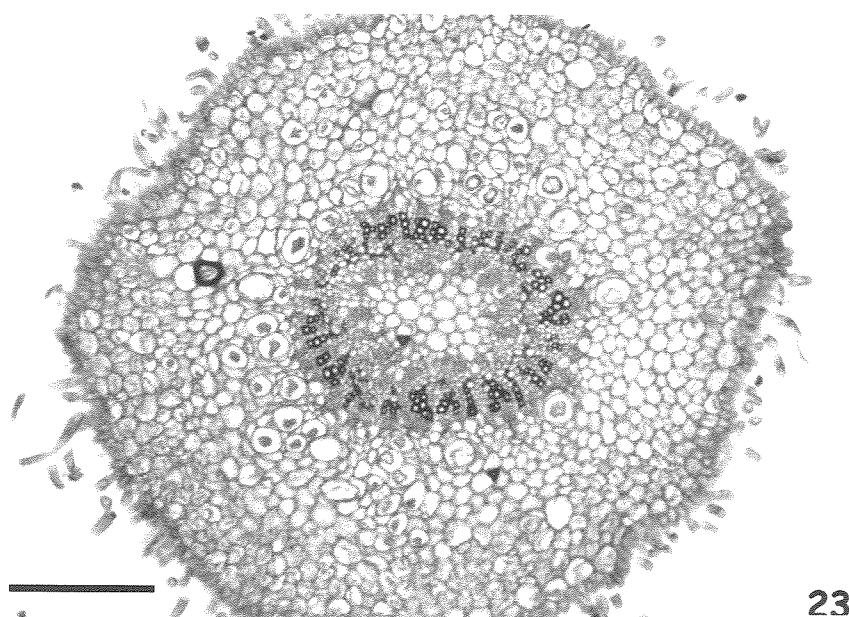
16

**Fig. 17-22.** Distribuição dos laticíferos em flores adultas de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. 17. Pedicelo. 18. Sépala. 19. Pétala. 20. Estame. 21. Ovário. 22. Estilete. cabeça de seta = laticífero. Escalas: 17-19,21. 75  $\mu\text{m}$ ; 20. 150  $\mu\text{m}$ ; 22. 50  $\mu\text{m}$ .

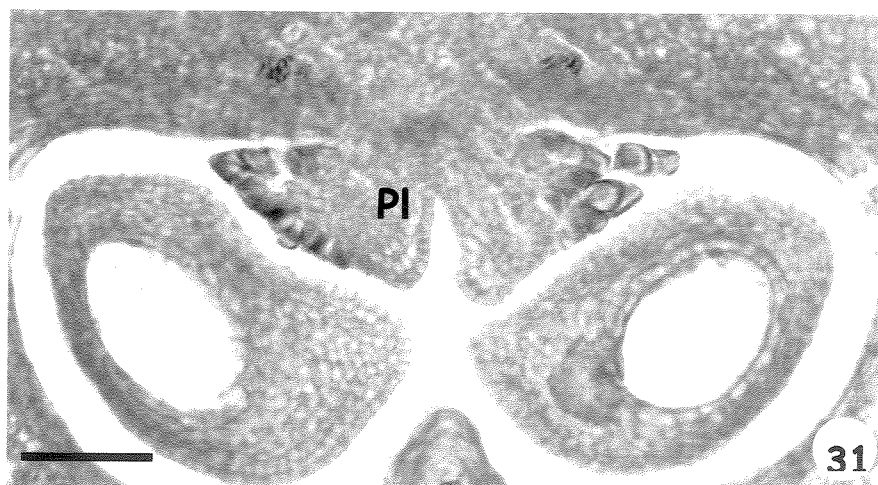
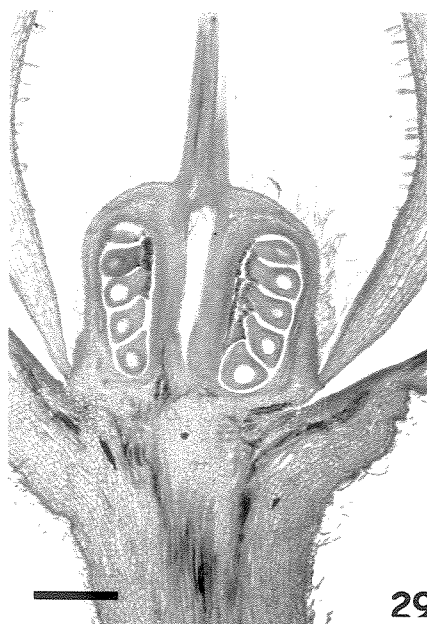
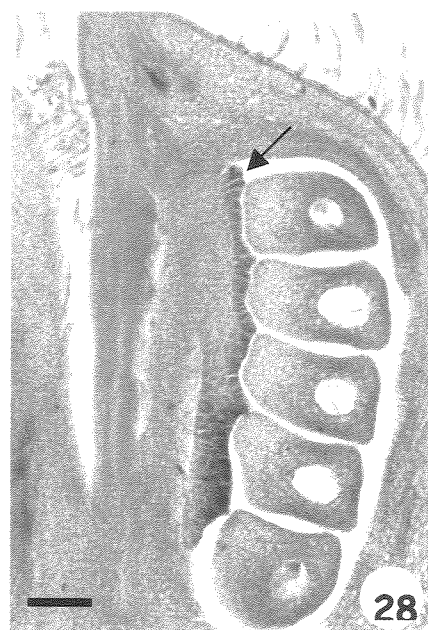
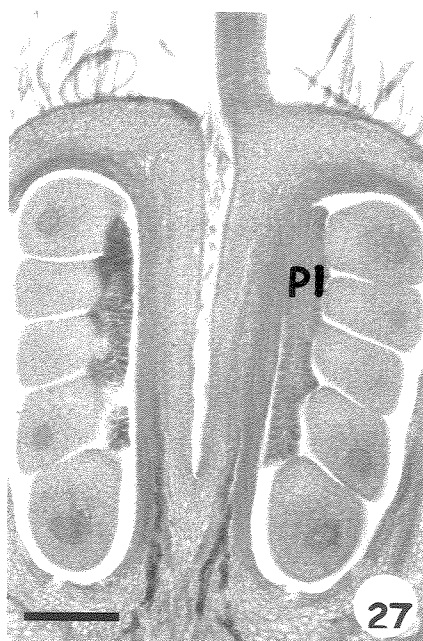




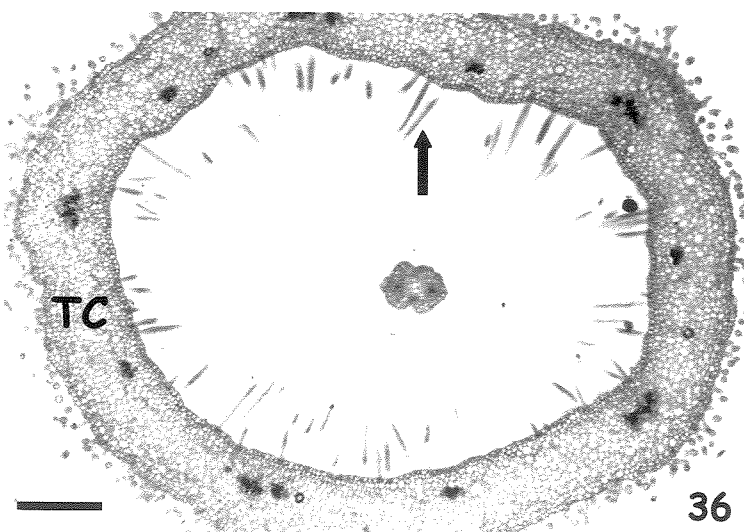
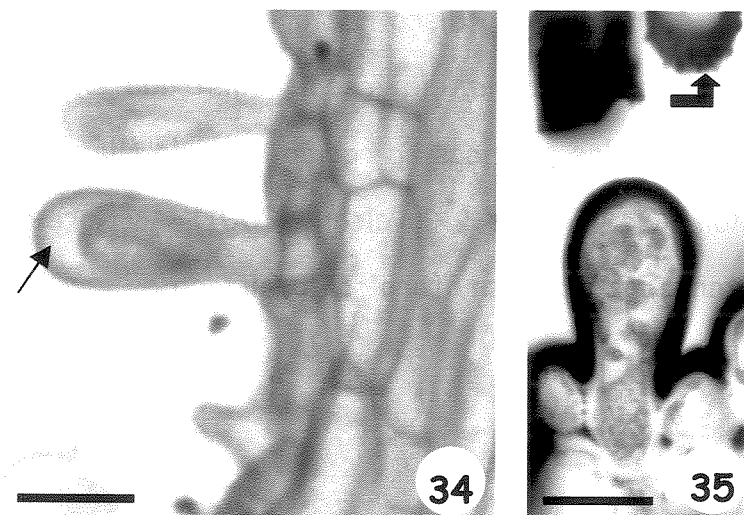
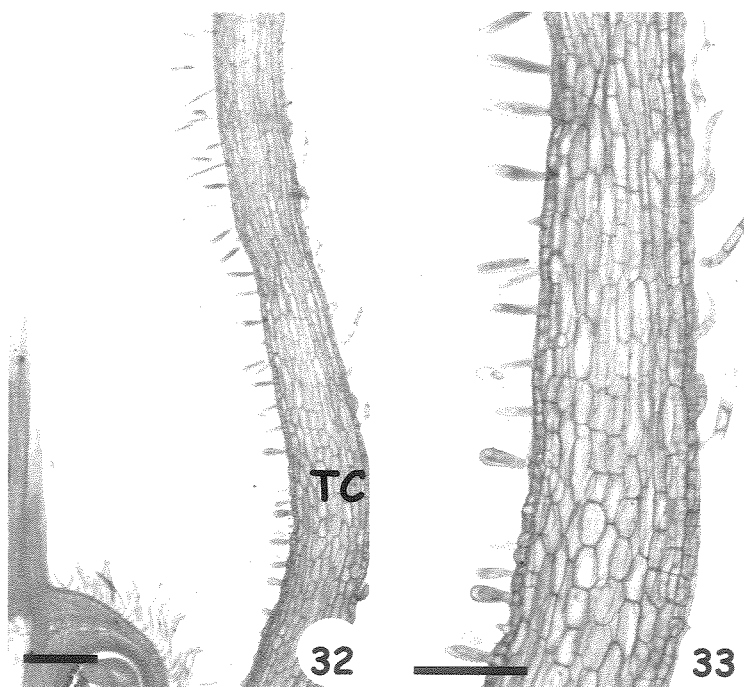
**Fig. 23-26.** Laticíferos em secções transversais do pedicelo de flores adultas de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. **23.** Vista geral; notar laticíferos no córtex. **24.** Pormenor da figura 23; notar laticíferos de diferentes calibres, laticíferos próximos ao floema externo e interno. **25.** Laticíferos maduros com paredes de coloração alaranjada. **26.** Laticíferos ausentes na região central do parênquima medular. **cabeça de seta = laticífero.** Escalas: **23.** 150  $\mu\text{m}$ ; **24,26.** 75  $\mu\text{m}$ ; **25.** 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 27-31.** Epiderme da placenta em botões florais e flores adultas de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. 27-30. Secções longitudinais. 27-28. Botões florais no estágio 2; alongamento das células protodérmicas da placenta. 29. Vista geral do ovário. 30. Pormenor da figura 29; notar epiderme da placenta totalmente diferenciada com as paredes celulares arroxeadas. 31. Secção transversal do ovário; células placentárias crescem em direção à micrópila dos óvulos. Pl = placenta; seta = epiderme da placenta. Escalas: 27,30. 150  $\mu\text{m}$ ; 28,31. 75  $\mu\text{m}$ ; 29. 300  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 32-36.** Tricomas corolinos em botões florais e flores adultas de *Aspidosperma australe* Müll. Arg. **32.** Vista geral dos tricomas. **33-34.** Pormenores da figura 32; tricomas de estrutura intermediária. **34.** Detalhe do tricoma de estrutura intermediária com espaço periplasmático evidente (**seta**). **35.** Tricoma de estrutura intermediária tratado pelo preto de Sudão B; notar ornamentações da cutícula (**seta**). **36.** Secção transversal no terço apical do tubo; tricomas tectores (**seta**) muito longos e de parede espessa, próximos à cabeça dos estiletes. TC = tubo da corola. Escalas: **32,36.** 250 µm; **33.** 150 µm; **34.** 25 µm; **35.** 30 µm.





## Discussão

*Aspidosperma* é um dos gêneros brasileiros mais basais de Apocynaceae *s.l.* (Kinoshita com. pess.). Ele pertence à tribo Alstonieae, considerada a mais basal das Rauvolfioideae (Endress & Bruyns 2000) e apenas duas estruturas secretoras foram encontradas nas flores de *A. australe*: a epiderme da cabeça dos estiletes e o laticífero. Estas não são as únicas estruturas secretoras descritas para o gênero; segundo Lin e Bernardello (1999), em *A. quebracho-blanco*, o nectário presente na superfície da base do ovário não tem atividade secretora e o néctar é produzido em nectários não estruturados na superfície externa do cálice e da corola. No presente estudo, nenhum tecido nectarífero foi encontrado na superfície do ovário nem no cálice e na corola. A presença do disco nectarífero é variável em Alstonieae; embora esteja ausente em *Aspidosperma*, ele já foi registrado em *Alstonia* (Rao & Ganguli 1963). Um par de glândulas elípticas na região livre do filete foi relatado unicamente para *A. nobile* Müll. Arg. (Gomes & Cavalcanti 2001). As flores de *A. australe* exalam um aroma; entretanto, nenhum osmóforo foi localizado.

### Cabeça dos estiletes

A cabeça dos estiletes é resultado da fusão posgênita dos ápices dos carpelos (Fallen 1986). Esta estrutura tem significado evolutivo e Fallen (1986) descreveu quatro tipos básicos de cabeça dos estiletes com base na morfologia, histologia e complexidade funcional e definiu uma progressão desta estrutura dentro da família. O tipo 1 possui uma cabeça "indiferenciada" morfologicamente e coberta por uma camada uniforme de epiderme secretora; o tipo 2 tem um anel superior de tricomas longos, um corpo principal cilíndrico com epiderme secretora composta por células colunares curtas e uma coroa inferior de tricomas longos fundidos; o tipo 3 apresenta a mesma organização do tipo 2, mas com anteras adnatas à cabeça do estilete; e o tipo 4



assemelha-se superficialmente ao tipo 1 devido à perda secundária das estruturas para captura do pólen na base da cabeça do estilete e do anel superior de tricomas. A cabeça dos estiletos de *A. australe* é do tipo 1; ela é cônica, recoberta por tricomas unicelulares secretores e não é adnata à nenhuma estrutura. Embora o tipo 1 seja o tipo mais basal, ele já é consideravelmente especializado e apresenta a função de produção de substância adesiva para a captura do pólen. A cabeça dos estiletos de *Geissospermum laeve* (Vell. Conc.) Miers e *A. quebracho-blanco* foram descritas como tendo duas funções: produzir substância para a captura do pólen e estigma (Fallen 1986; Lin & Bernardello 1999); no presente estudo, embora houvesse muitos grãos de pólen retidos junto à cabeça dos estiletos, não foi observada germinação de tubos polínicos. O formato cônico da cabeça dos estiletos também foi observado em *Landolphia owariensis* Beauv. e *Haplophyton crooksii* L. Benson, ambas Rauvolfioideae (sob Plumerioideae; Fallen 1986).

Há uma correlação entre o início da fusão posgênita dos estiletos e a posição filogenética do gênero; quanto mais derivado o gênero ou quanto mais complexa a morfologia da cabeça dos estiletos ou o mecanismo de polinização, mais cedo ocorre a fusão (Fallen 1986). Em *Blepharodon bicuspidatum* Fourn., cuja cabeça dos estiletos é funcionalmente complexa e que tem um igualmente complicado mecanismo de polinização, a fusão ocorre rapidamente e antes que o cálice se abra, a cabeça dos estiletos já está totalmente formada e em fase secretora (capítulo 4). Em *A. australe* que pertence a um gênero basal, a fusão é mais tardia, ocorrendo apenas após a abertura do cálice e a fase secretora se inicia pouco antes da flor estar em pré-antese. Este resultado concorda com os anteriormente descritos por Fallen (1986) para a cabeça dos estiletos do tipo 1.

Em todas as Apocynaceae s.l., a cabeça dos estiletos é coberta por epiderme unisseriada secretora (Fallen 1986; Kunze 1993, 1994; Galetto 1997; Lin & Bernardello

1999; capítulo 4); entretanto, as células epidérmicas secretoras têm diferentes disposições. Em *B. bicuspidatum*, as células secretoras são bastante alongadas, mas estão dispostas em paliçada, estando intimamente relacionadas (capítulo 4), já em *A. australe* as células são longas e livres entre si, formando uma superfície secretora composta por tricomas unicelulares. Alguns pesquisadores cogitaram a hipótese dos apêndices apicais da cabeça dos estiletes serem o estigma, mas estes apêndices pareceram não ser receptivos em todos os gêneros estudados por Fallen (1986).

A secreção da cabeça dos estiletes é viscosa e envolve os tricomas tectores que estão ao redor desta estrutura, formando uma rede que retém os grãos de pólen. Segundo Fallen (1986), esta secreção é composta por polissacarídeos e terpenos.

### Laticífero

Os laticíferos estão presentes em membros de várias famílias, muitas vezes sem relação taxonômica próxima, sugerindo que a capacidade de produzir látex surgiu mais de uma vez ao longo da história evolutiva destes grupos (Metcalf 1967; Fahn 1979). Laticíferos já foram registrados em 40 famílias (Lewinsohn 1991), sendo uma característica importante das Apocynaceae *s.l.*, pois está presente em todos os membros da família, ocorrendo em órgãos vegetativos e reprodutivos (Metcalf & Chalk 1950; Yoder & Mahlberg 1976; Murugan & Inamdar 1987a,b; Thomas & Dave 1994; Aguiar 2003).

O látex de *A. australe* é branco leitoso, mas látex avermelhado e amarelado já foram registrados em outras espécies de *Aspidosperma* (Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Endress & Bruyns 2000). Segundo Farrell *et al.* (1991), as plantas produtoras de látex e resina têm sido mais bem sucedidas que os grupos relacionados que não os produzem.

Os laticíferos de *A. australe* foram observados em todas as partes da flor, com exceção dos óvulos e do parênquima medular do pedicelo. Eles também não foram encontrados nos óvulos de *Blepharodon bicuspidatum*, *Plumeria alba* Linn. e *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. , mas estão presentes no parênquima medular do pedicelo nas três espécies (Murugan & Inamdar 1987a,b; capítulo 4). Nestas flores, os laticíferos são ramificados. Além de não ocorrerem na região central do pedicelo, os laticíferos florais de *A. australe* raramente apresentam ramificações; no entanto, muitas ramificações foram observadas nos laticíferos foliares desta espécie (Christian 2002).

O laticífero é composto por uma célula especializada ou uma fileira de células que contêm látex e, de acordo com a classificação mais utilizada, podem ser divididos em dois tipos: articulado e não articulado (Fahn 1979). Os laticíferos da grande maioria das Apocynaceae s.l. são considerados do tipo não articulado (Metcalf 1967; Yoder & Mahlberg 1976; Giordani 1978; Wilson & Mahlberg 1978, 1980; Murugan & Inamdar 1987a,b; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Mahlberg 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997) e são descritos como provenientes de células iniciais laticíferas que se alongam por crescimento apical autônomo intrusivo através dos espaços intercelulares dos diversos tecidos do corpo vegetal (Metcalf 1967; Mahlberg 1993). Entretanto através de análise cuidadosa das terminações dos laticíferos de *A. australe*, percebe-se que eles são articulados, que têm rápida dissolução da parede terminal, não sendo observado restos desta, logo abaixo de seu ápice. Laticíferos articulados também foram encontrados em *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. e *B. bicuspidatum* (Sacchetti *et al.* 1999; capítulo 4) e tanto articulados quanto não articulados em *Stapelia bella* A Berger (Wilson & Maxam 1987).

Há discordância com relação ao tipo e desenvolvimento dos laticíferos. Segundo Milanez (1959, 1960-1, 1966, 1977), os laticíferos de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e *Nerium oleander* L. são formados por fusão celular, contradizendo as descrições feitas

por Blaser (1945), Mahlberg (1961, 1963) e Stockstill e Nessler (1986) para estas mesmas espécies.

O diâmetro dos laticíferos pode variar bastante em uma mesma flor, como observado no presente estudo. Em *B. bicuspidatum*, *P. alba* e *V. solanacea* a maior diferença ocorre entre os laticíferos medulares do pedicelo e os demais (Murugan & Inamdar 1987a,b; capítulo 4).

As paredes dos laticíferos podem ser tão finas quanto a parede das células parenquimáticas ou muito mais grossas (Mahlberg 1993). Elas são exclusivamente primárias e podem ter substâncias incrustante ou adcrustante que sela o sistema laticífero dos demais tecidos (Fineran *et al.* 1988; Condon & Fineran 1989; Fahn 1990). Uma lamela de suberina foi encontrada na parede dos laticíferos de espécies de *Convolvulaceae*; contudo, até o momento, isto aparentemente está restrito à esta família. Fahn (1990) sugeriu a presença de calose, mas os laticíferos de *A. australe* não reagiram positivamente ao teste aplicado com este fim; assim como não apresentaram resultado positivo no teste para suberina e lignina. Portanto, em nível de microscopia óptica, não foi possível detectar nenhum tipo de substância que isole o sistema laticífero da flor de *A. australe*. As paredes dos laticíferos de *Asclepias speciosa* Torr. foram investigadas histoquímica e imunocitoquimicamente com relação à presença de substâncias que as diferenciem das paredes das demais células (Serpe *et al.* 2001); eles não encontraram calose, proteínas, lignina nem compostos fenólicos, mas descobriram que a porção madura dos laticíferos tem propriedades citoquímicas diferentes das paredes da porção mais jovem com relação a epitopos de pectina. A distinta coloração da parede da porção jovem dos laticíferos (roxa) de *A. australe* e a da porção madura (laranja) através da coloração com safranina, violeta cristal e laranja G, pode indicar que também há diferença de composição entre as diferentes regiões destes laticíferos.

O látex está presente desde a porção mais jovem do laticífero e o preenche totalmente, sendo constituído pelo próprio protoplasto. Esta secreção somente é liberada para o meio extracelular se o tecido for injuriado. Milanez (1946) já havia reconhecido a natureza protoplásmica do látex em *Hevea*.

Muitos núcleos podem ser observados nos laticíferos de *A. australe*. Em geral, os laticíferos multinucleados são considerados cenocíticos, resultantes de repetidas divisões nucleares sem a formação de parede terminal, embora a maioria dos pesquisadores não tenha sido capaz de detectar a ocorrência de qualquer divisão nuclear dentro de laticíferos (Mahlberg 1993). Em *A. australe*, assim como em *B. bicuspidatum*, *C. grandiflora* e *N. oleander*, o protoplasto multinucleado é resultado da fusão de células que são constantemente adicionadas ao sistema (condição sincicial).

Muitos autores consideraram os laticíferos não articulados de toda a planta como sendo resultantes do crescimento de um número específico de células iniciais laticíferas embrionárias. Entretanto, produção contínua deste tipo de laticífero foi observada no ápice caulinar de *Vallaris solanacea* (Murugan & Inamdar 1987b) e nos tecidos primário e secundário de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Em 1961, Mahlberg registrou a existência de cerca de 28 iniciais laticíferas em *Nerium oleander* e considerou seu crescimento pela planta toda como sendo autônomo. Posteriormente, Milanez (1977) estudou os laticíferos desta mesma espécie e observou que os laticíferos cresciam por meio de fusões celulares.

Alguns pesquisadores tentaram provar o crescimento apical autônomo dos laticíferos. Snyder (1955) não obteve qualquer crescimento dos laticíferos em cultura asséptica de fragmentos de medula de *Cryptostegia grandiflora*. Mahlberg (1959), ao realizar cultura de embrião de *Euphorbia marginata* Pursh., considerou o contorno sinuoso dos laticíferos e sua presença entre grandes espaços intercelulares como provas de seu crescimento apical. Os laticíferos florais de *A. australe* raramente

apresentam contorno sinuoso e as células de seu ápice não têm crescimento intrusivo, apresentando sempre as mesmas dimensões das demais e fazendo contato com outra célula. Através da análise da série de cortes, também é possível perceber que o ápice agudo observado muitas vezes, é resultado de uma secção oblíqua a esta célula.

A presença de ramos transestelares em *C. grandiflora* e *B. bicuspidatum* (Milanez 1977; capítulo 4) sem que haja qualquer deformidade nestas células intimamente relacionadas, também é dificilmente explicado pela teoria de crescimento apical autônomo.

As funções atribuídas aos laticíferos, em geral, é de proteção contra herbívoros, microorganismos e de selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrel *et al.* 1991; Hunter 1994). Embora os botões e flores adultas dos indivíduos de *A. australe* aparentemente sejam protegidos pelo látex, galhas foliares são freqüentes nesta espécie (Isaías *et al.* 2000; Formiga *et al.* 2001; Christiano 2002).

#### Epiderme da placenta e tricomas corolinos

Segundo Endress e Bruyns (2000), é muito difícil encontrar caracteres florais estáveis para distinguir as tribos de Rauvolfioideae e, por isso, a delimitação tribal é quase sempre baseada nos frutos.

Embora não tenha sido comprovada a função do tecido encontrado em *A. australe*, sua estrutura, origem e posição levam a crer que este seja um obturador placentário. O obturador é uma estrutura cuja função é direcionar o crescimento do tubo polínico até a micrópila. Sua origem é variável. Ele pode ter origem do funículo, placenta ou uma combinação de ambos, e ser formado por tricomas secretores e tecido subepidérmico ou simplesmente por uma camada epidérmica papilosa (Johri 1984; Werker 1997). Embora ele tenha ampla ocorrência em algumas famílias, como Euphorbiaceae (Sutter & Endress 1995), não foi encontrado nenhum registro de sua presença em Apocynaceae

s./l. A presença de obturador é uma das características que distinguem as Rubiaceae das demais Gentianales (Backlund *et al.* 2000).

Os tricomas glandulares possuem paredes finas e, muitas vezes, acumulam secreção num espaço subcuticular. Por outro lado, os tectores têm parede espessa e não apresentam este espaço. Os tricomas corolinos do terço basal da face interna do tubo da corola de *A. australe* apresentam características intermediárias entre glandulares e tectores. Embora possuam espaço periplasmático, também apresentam cutícula espessa e ornamentada e nenhuma secreção foi observada. Nenhuma referência foi encontrada com relação a este tipo de tricoma.

## Conclusões

A flor de *A. australe* possui poucas estruturas secretoras em relação às outras espécies da família. Apenas duas estruturas foram encontradas: epiderme secretora da cabeça dos estiletes e laticíferos. Não há coléteres nem disco ao redor do ovário. Nenhum tecido nectarífero foi encontrado e, embora as flores sejam aromáticas, não foram localizados osmóforos. Novos estudos são necessários para se localizar o sítio de produção do aroma floral.

A cabeça dos estiletes de *A. australe* é simples em relação às demais presentes nas espécies da família. Ela possui epiderme secretora composta por tricomas, que iniciam sua atividade secretora no estágio intermediário do desenvolvimento floral e continuam secretando até o último estágio. A secreção é acumulada em um espaço na porção apical da célula e depois liberada para o meio extracelular; *in vivo*, ela tem aspecto viscoso e juntamente com os tricomas corolinos forma uma rede que retém os grãos de pólen.

Os laticíferos são articulados anastomosados, estão presentes em todas as peças florais, com exceção do parênquima medular do pedicelo e dos óvulos, possuem

diâmetro variável e raramente se ramificam. A parede dos laticíferos é exclusivamente pecto-celulósica e suas características químicas provavelmente se alteram durante o desenvolvimento do laticífero. Os laticíferos já estão formados e em fase secretora em botões no estágio 1 e somente liberam o látex se o tecido for injuriado. Portanto, os botões florais já apresentam um sistema de defesa contra herbivoria desde o início do seu desenvolvimento.

Novos estudos são necessários para se verificar se a epiderme diferenciada da placenta das flores de *A. australe* realmente é um obturador e se os tricomas corolinos de estrutura intermediária são (ou não) secretores.

A ausência de coléteres e de disco nectarífero, além da cabeça dos estiletos estruturalmente simples, confirmam a posição basal de *Aspidosperma* na subfamília Rauvolfioideae e na tribo Alstonieae (*sensu* Endress & Bruyns 2000).

## Referências bibliográficas

- AGUIAR, S 2003 Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.
- BACKLUND, M; OXELMAN, B & BREMER, B 2000 Phylogenetic relationships within the Gentianales based on NDHF and RBCL sequences, with particular reference to the Loganiaceae. American Journal of Botany 87:1029-1043.
- BLASER, HW 1945 Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. American Journal of Botany 32:135-141.
- CHRISTIANO, J de CS 2002 Respostas cecidogênicas no modelo *Aspidosperma*



- australe* (Apocynaceae) – *Pseudophacopteron* sp (Homoptera: Phacopteronidae). São Paulo, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CLARK, G 1973 Staining procedures. 3<sup>rd</sup> ed., Baltimore, The Williams & Wilkins Co.
- CONDON, JM & FINERAN, BA 1989 Distribution and organization of articulated laticifers in *Calystegia silvatica* (Convolvulaceae). *Botanical Gazette* 150:289-302.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers Cambridge, University Press.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae s.l. *The Botanical Review* 66:1-56.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press Inc.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 106:245-286.
- FARRELL, BD; DUSSOURD, DE & MITTER, C 1991 Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FINERAN, BA; CONDON, JM & INGERFELD, M 1988 An impregnated suberized wall layer in laticifers of the Convolvulaceae and its resemblance to that in walls of oil cells. *Protoplasma* 147:42-54.
- FORMIGA, AT; GONÇALVES, SJ de MR; ISAÍAS, M dos S & SOARES, GLG 2001 Desenvolvimento das galhas foliares de *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex Muell Arg. (Apocynaceae). 52<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica, Resumos:103.
- GALETTO, L 1997 Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192:197-207.

- GIORDANI, R 1978 Autophagie cellulaire et differenciation des laticifères non articulés chez une Asclepiade. *Biologie Cellulaire* 33:253-260.
- GOMES, SM & CAVALCANTI, TB 2001 Morfologia floral de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae). *Acta Botanica Brasilica* 15:73-88.
- HUNTER, JR 1994 Reconsidering the functions of latex. *Trees* 9:1-5.
- INAMDAR, JA; MURUGAN, V & SUBRAMANIAN, RB 1988 Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. *Annals of Botany* 62:583-588.
- ISAÍAS, RM dos S; SOARES, GLG; CHRISTIANO, J de CS & GONÇALVES, SJ de MR 2000 Análise comparativa entre as defesas mecânicas e químicas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Müell. Arg. contra herbivoria. *Floresta e Ambiente* 7:19-30.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- JOHRI, BM 1984 Embryology of Angiosperms. Berlin, Heildelberg.
- KUNZE, H 1993 Evolution of the translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. *Plant Systematics and Evolution* 185:99-122.
- KUNZE, H 1994 Ontogeny of the translator in Asclepiadaceae *s.str.* *Plant Systematics and Evolution* 193:223-242.
- LEWINSOHN, TM 1991 The geographical distribution of plant latex. *Chemoecology* 2:64-68.
- LIN, S & BERNARDELLO, G 1999 Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Science* 160:869-878.
- MAHLBERG, PG 1959 Development of the non-articulated laticifer in proliferated embryos of *Euphorbia marginata* Pursh. *Phytomorphology* 9:156-162.

- MAHLBERG, PG 1961 Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. *American Journal of Botany* 48:90-99.
- MAHLBERG, PG 1963 Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. *Botanical Gazette* 124:224-231.
- MAHLBERG, PG 1993 Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* 59:1-23.
- MARCONDES-FERREIRA, W & KINOSHITA, LS 1996 Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 19:203-214.
- METCALFE, CR 1967 Distribution of latex in the plant kingdom. *Economic Botany* 21:115-127.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- MILANEZ, FR 1946 Nota prévia sobre os laticíferos de *Hevea brasiliensis*. *Arquivos do Serviço Florestal* 2:39-65.
- MILANEZ, FR 1959 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - I. Embrião. *Rodriguésia* 21/22:347-394.
- MILANEZ, FR 1960-1 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae). *Rodriguésia* 35/36:99-128.
- MILANEZ, FR 1966 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - III. Nota sobre a estrutura secundária. *Rodriguésia* 25:335-350.

- MILANEZ, FR 1977 Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium* (*Nerium*) *oleander* L. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975:343-379.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. *Phytomorphology* 37:209-214.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* 97:25-31.
- PEARSE, AGE 1985 *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. II., 4th ed., Edinburgh, C. Livingstone.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963 Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42:419-435.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. Br. nom. cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ROY, AT & DE, DN 1992 Studies on differentiation of laticifers through light and electron microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. *Annals of Botany* 70:443-449.
- SACCHETTI, G; BALLERO, M; SERAFINI, M; ROMAGNOLI, C; BRUNI, A & POLI, F 1999 Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). *Phyton* 39:265-275.
- SERPE, MD; MUIR, AJ & KEIDEL, AM 2001 Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. *Protoplasma* 216:215-226.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia,

Universidade Estadual de Campinas.

- SMITH, MM & McCULLY, ME 1978 A critical evaluation of the specificity of aniline blue induce fluorescence. *Protoplasma* 95:229-254.
- SNYDER, FW 1955 Growth of excised tissues from the stem of *Cryptostegia grandiflora*. *Botanical Gazette* 117:147-155.
- STOCKSTILL, BL & NESSLER, CL 1986 Ultrastructural observations on the nonarticulated, branched laticifers in *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). *Phytomorphology* 36:347-355.
- SUTTER, D & ENDRESS, PK 1995 Aspects of gynoecium structure and macrosystematics in Euphorbiaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 116:517-536.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1994 Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 63:9-20.
- TORRES, C & GALETTO, L 1998 Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 127:207-223.
- WERKER, E 1997 Seed anatomy. Berlin, Stuttgart: Borntraeger.
- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1978 Ultrastructure of non-articulated laticifer in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 65:98-109.

- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1980 Ultrastructure of developing and mature nonarticulated laticifers in the milkweed *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 67:1160-1170.
- WILSON, KJ & MAXAM, TE 1987 Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 74:628-628.
- WOODSON, RE Jr & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.
- YODER, LR & MAHLBERG, PG 1976 Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). American Journal of Botany 63:1167-1173.

## CAPÍTULO 4

### Caracterização anatômica das glândulas florais de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. (Apocynaceae s.l. – Asclepiadoideae)

#### Introdução

Dentre as Apocynaceae s.l., as Asclepiadoideae destacam-se por possuírem as flores mais complexas e elaboradas de todas as dicotiledôneas. Elas apresentam algumas estruturas que não são encontrados em outras dicotiledôneas. Estas flores têm coroa e um complicado sistema de canais para deposição de néctar, ginostégio e polinário, formado por duas polínias mais o translador (Endress 1994). O trabalho mais abrangente envolvendo a estrutura floral de espécies de Apocynaceae foi realizado por Woodson e Moore (1938). Trabalhos posteriores também se destacaram, como o de Rao e Ganguli (1963), Fallen (1986), Kunze (1991, 1995, 1997), Galetto (1997), Torres e Galetto (1998), Vieira (1998), Lin e Bernardello (1999), Farinaccio (2000), Vieira e Shepherd (2002) e Simões (2004).

As estruturas secretoras florais relatadas são: epiderme que reveste a cabeça dos estiletos, laticíferos, coléteres, nectários e osmóforos.

A cabeça dos estiletos é coberta por epiderme secretora (Walker 1975; Falle 1986; Kunze 1993, 1994; Galetto 1997; Lin & Bernardello 1999). Nas Asclepiadoideae esta estrutura é responsável pela produção do translador (Endress 1994). Falle (1986) descreveu tipos básicos de cabeça dos estiletos e definiu uma progressão desta estrutura para a família.

Os coléteres possuem ampla ocorrência, porém, não universal na família (Endress & Bruyns 2000; capítulo 1). Eles produzem uma secreção viscosa que lubrifica e protege os meristemas contra o dessecamento (Thomas 1991) e também pode proteger

as flores contra a proliferação de fungos (capítulo 1 e 2). Os coléteres florais de *B. bicuspidatum* não serão abordados neste capítulo, pois já foram descritos em termos ontogenéticos, histoquímicos e estruturais (capítulos 1 e 2).

Os nectários formam um anel basal ao redor do ovário nas Rauvolfioideae e Apocynoideae, freqüentemente lobado na porção apical (Woodson & Moore 1938), sendo considerado de natureza receptacular (Galetto 1997). Nas Asclepiadoideae, a sua posição é controversa. O tecido nectarífero pode ocorrer no tubo dos filetes, nas câmaras estigmáticas, na corona ou na região em que os lobos da corola estão conectados ao ginostégio (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Kunze 1991, 1995, 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). O néctar pode ser encontrado na câmara estigmática (nectário primário) e na corona estaminal (nectário secundário). Em geral, assume-se que apenas o nectário primário é secretor e o néctar flui através de um intrincado sistema capilar até o nectário secundário (Galil & Zeroni 1965; Kunze 1997); todavia, tecido nectarífero já foi descrito na corona (Woodson 1954; Kunze 1995, 1999).

O laticífero tem ocorrência universal em Apocynaceae s.l. (Metcalfe & Chalk 1950). A classificação de laticíferos mais usada é a de De Bary (1884 *apud* Rudall 1987) que reconhece dois tipos de laticíferos: os articulados e os não articulados. Segundo Esau (1977), ambos os tipos podem ser ramificados ou não. Embora existam estudos anatômicos sobre laticíferos de Apocynaceae s.l., incongruências quanto à identificação de seu tipo e sua formação podem ser encontradas na literatura, como por exemplo em *Nerium oleander* L. (Mahlberg 1961, 1963; Milanez 1977; Stockstill & Nessler 1986). As prováveis funções são as de proteção contra herbívoros, microorganismos e selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrel *et al.* 1991; Hunter 1994). Segundo Farrell *et al.* (1991), as plantas produtoras de látex e resina têm sido mais bem sucedidas que os grupos relacionados que não os produzem.



*Osmóforos* são apenas citados fazendo parte da estrutura floral (Endress 1994, Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999), mas nunca foram anatomicamente ilustrados.

Baseado na ausência de dados anatômicos sobre as complexas flores com glândulas de origem e posição controversas e a falta de estudos estruturais de espécies brasileiras de *Asclepiadoideae*, o presente estudo teve por objetivo caracterizar anatomicamente as estruturas secretoras florais de *Blepharodon bicuspidatum*, com a definição dos estádios de desenvolvimento em que estas estruturas estejam em fase secretora.

### Material & métodos

O material de estudo foi coletado em duas áreas de cerrado do estado de São Paulo: Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu e fragmento situado no município de Campinas. As coletas foram realizadas de novembro de 2002 a outubro de 2003 e as plantas identificadas pelo Dr. André O. Simões. Os materiais testemunhados dos três indivíduos foram herborizados: *B. bicuspidatum*: Brasil, São Paulo, Moji-Guaçu, 18/XI/2002, D. Demarco 7; Campinas, 29/VIII/2003, D. Demarco 11; 04/VIII/2004, D. Demarco 16. Todas as exsicatas serão incorporadas ao Herbário UEC.

Ramos florais de três indivíduos foram cortados com lâmina aquecida e fixado em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 h (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v; Lillip 1948 in Clark 1973) por 48 h. Após este período, os materiais foram desidratados estocados em etanol 70%.

Botões florais e flores foram classificados em cinco estádios considerando-se desenvolvimento floral com seus comprimentos medidos a partir da base d

receptáculo: Estádio 1 - botões florais com até 0,9 mm; Estádio 2 - botões florais de 1 a 2 mm (início da formação da coroa); Estádio 3 - botões com cerca de 4 mm; Estádio 4 - botões com cerca de 5 mm; Estádio 5 - flores adultas com cerca de 6 mm (pré-antese, antese e pós-antese). Todas estas peças foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940), incluídas em "paraplast" e seccionadas em séries transversais e longitudinais com 10 a 14  $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo Microm HM340E. As secções foram coradas com azul de astra e safranina (CI 50240; Gerlach 1969 modificado) e as lâminas montadas em resina sintética. Também foram utilizados cortes tratados com vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) e submetidos à reação PAS (Periodic-Acid-Schiff's reagent; pararosanilina CI 42510; McManus 1948).

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 51 utilizando-se filme Kodak Pro Image asa 100. As escalas das figuras foram obtidas através de lâmina micrométrica fotografada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

## Resultados

As estruturas secretoras distribuem-se em diferentes compartimentos nas flores de *B. bicuspidatum*. Há seis sítios de secreção: epiderme secretora da ala da antera (Fig. 6, 12-17), epiderme secretora da cabeça dos estiletes (Fig. 1-2, 4, 7, 18-25, 27), laticífero (Fig. 8, 28-45), coléter (Fig. 9), epiderme secretora da câmara estigmática (Fig. 4, 10, 47-57) e epiderme secretora da coroa estaminal (Fig. 1-3, 11, 59-63).

Estas glândulas apresentam atividade secretora em diferentes estádios do desenvolvimento floral (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estádios do desenvolvimento floral de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. em que as estruturas estão em fase meristemática, secretora e pós-secretora.

Glândulas	Botões florais				Flores adultas	
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	Estádio 5	
	até 0,9 mm	1 - 2 mm	3 - 4 mm	ca. 5 mm	Pré-antese e antese ca. 6 mm	Pós-antese
Epiderme secretora da ala da antera	meristemática	meristemática	secretora	secretora	necrose	necrose
Epiderme secretora da cabeça dos estiletes	meristemática	secretora	secretora	secretora	secretora	secretora
Laticífero	secretora	secretora	secretora	secretora	secretora	secretora
Coléter	meristemática	secretora	secretora	secretora	secretora	pós-secretora
Epiderme secretora da câmara estigmática	meristemática	meristemática	meristemática	secretora	secretora	secretora
Epiderme secretora da coroa estaminal	—	meristemática	meristemática	secretora	secretora	pós-secretora

## Epiderme secretora da ala da antera

A ala da antera é uma estrutura formada por uma projeção lateral da antera. As alas de duas anteras adjacentes delimitam uma fenda (Fig. 3, 5-6, 12) que servirá como guia para o polinizador ("guide rail") e retirará a polínia deste devido à presença de tricomas que se encontram nesta região voltados para a base da flor (Fig. 6, 12). Em cada ala das anteras, há um sítio secretor (Fig. 12-17).

### Estrutura

A região secretora se estende ao longo de toda a extremidade interna da ala da antera (Fig. 14) e é composta por uma única camada de células epidérmicas secretoras (Fig. 12-17). Estas células são colunares e dispõem-se em paliçada sobre células parenquimáticas não secretoras (Fig. 12-17). Esta estrutura mantém a forma desde seu ápice (Fig. 16) até quase sua base, quando se alarga, aumentando a superfície secretora (Fig. 17). As células secretoras possuem paredes finas, conteúdo citoplasmático de aspecto denso com gotas fortemente coradas pela safranina em materiais fixados em FNT e núcleo ocupando posição mediana na célula (Fig. 13, 15). A secreção é acumulada num espaço na porção apical da célula antes de ser liberada para o meio extracelular. Não há vascularização na ala da antera e o sistema vascular mais próximo é o feixe do filete (Fig. 10).

### Distribuição

Como a flor possui cinco anteras e cada antera, duas alas, em cada flor são encontradas 10 regiões secretoras em posição interestaminal, na fenda anteral, opostas à câmara estigmática (Fig. 10).

### Fase secretora

Em botões no estágio 3, as células epidérmicas já são colunares e apresentam atividade secretora (Fig. 12-17). Esta fase dura apenas até botões no estágio 4 (Tabela 1).

### **Epiderme secretora da cabeça dos estiletes**

#### Estrutura

A cabeça dos estiletes é formada pela fusão apical dos dois estiletes (Fig. 1-2, 4, 18) e possui epiderme secretora composta por uma única camada de estreitas células colunares dispostas em paliçada (Fig. 7, 18-26).

Nas regiões oposta e alterna às anteras, as células epidérmicas secretoras são colunares; porém, nas regiões alternas, as células são mais longas (Fig. 20-22).

Estas células apresentam paredes finas, conteúdo citoplasmático de aspecto denso (Fig. 7, 18-26) e núcleo em posição mediana. Um espaço pode ser observado em algumas células (Fig. 25), onde a secreção é acumulada antes de ser liberada para o meio externo. Não há vascularização próxima à epiderme secretora, o sistema vascular mais próximo está na região central da cabeça dos estiletes, formado pelos feixes vasculares dos estiletes (Fig. 20, 23).

#### Distribuição

No início da fase secretora (estágio 2), a epiderme secretora se estende por toda a superfície lateral da cabeça dos estiletes (Fig. 20); porém, nos demais estádios, ela permanece secretora apenas nas cinco regiões alternas às anteras (Fig. 7, 23-26) e formará o translador (Fig. 7, 25-26).

### Fase secretora

A fase secretora inicia nos botões do estágio 2 (Tabela 1). Logo após a formação da cabeça dos estiletes, a epiderme desta estrutura já possui as células muito alongadas e estreitas, formando uma camada contínua por toda a sua superfície lateral (Fig. 18-22). Neste estágio (botões com 2 mm), a região secretora se restringe às porções alternas às anteras (Fig. 23); nestas regiões, a epiderme secretora se estende por toda a lateral da cabeça dos estiletes (Fig. 24) e as células em paliçada são mais longas. Já neste estágio, o translador começa a ser formado. A secreção toma forma e em botões do estágio 4, o corpúsculo (corpusculum de Corry; chamado retináculo por alguns pesquisadores) já está totalmente formado e inicia-se a liberação da secreção que formará as caudículas (Fig. 25). Em flores adultas (estágio 5), a partir da pré-antese, o translador já está totalmente formado (Fig. 7, 26), sendo constituído pelo corpúsculo mais duas caudículas (Fig. 7, 26-27) e o polinário pode ser observado, principalmente em flores em antese e pós-antese, através da ligação do translador a duas polínias de anteras distintas (adjacentes) por meio das caudículas (Fig. 26-27). Embora o translador esteja totalmente formado, a epiderme continua a apresentar atividade secretora nas flores em pós-antese (Fig. 26).

### **Laticífero**

#### Estrutura

Os laticíferos de *B. bicuspidatum* são articulados anastomosados e facilmente observados nos diferentes órgãos devido, principalmente, à espessura de suas paredes e às ramificações do sistema, além do calibre e conteúdo destas estruturas (Fig. 8, 28-46). As paredes laterais dos laticíferos possuem muitas vezes a espessura das paredes das células parenquimáticas (Fig. 30-31) e têm de 1 a 1,6  $\mu\text{m}$ . Embora possuam paredes espessas, elas são exclusivamente primárias (Fig. 30-31).

O diâmetro dos laticíferos varia muito principalmente no pedicelo. Os laticíferos encontrados na medula possuem grande diâmetro (de 21 a 48  $\mu\text{m}$ ; fig. 8, 30-34, 43-44), enquanto os do córtex possuem de 5 a 38  $\mu\text{m}$  de diâmetro; geralmente, os laticíferos mais calibrosos encontram-se próximos ao sifonostelo anfiflóico (Fig. 32, 43-44) e, às vezes cruzam-no, interrompendo o tecido vascular (Fig. 43).

O comprimento de um laticífero é de difícil mensuração, mas no pedicelo, onde eles são razoavelmente retilíneos, pode se observar um mesmo laticífero atravessando alguns centímetros (Fig. 8, 34).

O látex é o próprio protoplasto das células e, por isso, pode ser observado desde as partes mais jovens preenchendo todo o laticífero. A secreção possui aspecto denso e cora fortemente com safranina, evidenciando sua natureza acidófila (Fig. 29). Cada laticífero possui muitos núcleos ao longo de sua extensão e cada núcleo tem pelo menos três ou quatro nucléolos (Fig. 33).

Em todos os indivíduos estudados, poucas vezes órgãos com sinais de herbivoria foram observados. Ao seccionar um órgão, imediatamente inicia o extravasamento do látex de aspecto leitoso que, pouco tempo depois, coagula e sela o órgão injuriado. Parasitas foram freqüentemente encontrados nas pétalas dos indivíduos de Moji-Guaçu (Fig. 46).

### Distribuição

Os laticíferos estão presentes em todas as peças florais (Fig. 8, 28-45). Laticíferos de grande calibre com trajetória quase retilínea localizam-se principalmente na medula do pedicelo (Fig. 8, 34). Muitos laticíferos de menor calibre também são observados no córtex do pedicelo e tecido vascular (Fig. 32, 43). Eles ramificam-se, principalmente, no receptáculo juntamente com o tecido vascular (Fig. 34). Nas demais partes florais, os laticíferos possuem diâmetro menor, mas ainda há variação de calibre (de 4 a 15  $\mu\text{m}$ ). Eles ocorrem na sépala (Fig. 35), na pétala (Fig. 36), na coroa (Fig. 38), no estame (Fig. 37), na parede do ovário

(Fig. 39), na placenta (Fig. 39), no estilete e cabeça dos estiletos (Fig. 18, 40). Em todas estas partes, os laticíferos são sinuosos e estão presentes em todos os tecidos, exceto na epiderme. Laticíferos também não foram encontrados nos óvulos. A grande maioria dos laticíferos localiza-se no parênquima (Fig. 8, 28-44); entretanto, outros são observados cruzando o tecido vascular (Fig. 29, 43-44) ou em meio aos elementos condutores (Fig. 45).

### Fase secretora

O laticífero é a primeira estrutura secretora a se diferenciar já no estágio 1 (Tabela 1). Enquanto todos os demais tecidos ainda estão meristemáticos, os laticíferos já estão diferenciados e em estágio secretor (Fig. 28-31, 33, 41-44).

A fase meristemática dos laticíferos é muito breve. Em botões florais no estágio 1, laticíferos totalmente formados podem ser observados (Fig. 28-29, 41-42).

Os laticíferos de *B. bicuspidatum* são articulados anastomosados, formados pela adição de células (Fig. 28-29, 42). A dissolução das paredes terminais é rápida e a poucas células de seu ápice, não é mais possível vê-las (Fig. 28-29, 42; cabeça de seta), formando um sistema contínuo (Fig. 33). Nesta região, as paredes dos laticíferos já estão espessadas, embora continuem a crescer em diâmetro posteriormente. O sistema laticífero pode ter origem a partir de células do meristema fundamental e/ou do procâmbio. Os laticíferos só crescem em comprimento em regiões meristemáticas, por adição de novas células e, posteriormente, por alongamento celular. Em todas estas regiões meristemáticas onde os laticíferos estão se formando, as células apicais dos laticíferos possuem as mesmas dimensões das demais células, das quais se originaram (Fig. 28-29, 41-42). A anastomose lateral de células origina um sistema laticífero ramificado (Fig. 29, 42); estas ramificações ocorrem no início do desenvolvimento dos laticíferos e são observadas em todas as partes da flor. Os laticíferos de grande calibre do pedicelo



crecem rapidamente em diâmetro e originam um arranjo radial das células parenquimáticas à sua volta (Fig. 32, 43-44). Eles atingem seu diâmetro máximo em botões no estágio 2 (Fig. 43-44); as células dos laticíferos de menor calibre atingem seu diâmetro máximo poucas células abaixo de seu ápice.

Os laticíferos já apresentam secreção durante a diferenciação das células que os compõem (Fig. 29). A fase secretora só termina quando todo o laticífero estiver cheio e o órgão onde ele ocorre estiver totalmente diferenciado, não havendo mais adição de novas células. Entretanto, as células aparentemente permanecem vivas e com a secreção em seu interior (Fig. 8, 28-45). A secreção (protoplasto) só é liberada para o meio extracelular quando o tecido é injuriado; quando isto ocorre, o látex de todos os laticíferos interconectados extravasa.

### **Epiderme secretora da câmara estigmática**

#### **Estrutura**

A câmara estigmática é o espaço delimitado pelo tubo dos filetes e as alas das anteras (Fig. 4, 10, 47, 50, 52-53). A porção secretora corresponde apenas à epiderme do tubo dos filetes (Fig. 10, 47-57) e se estende até a base das alas das anteras (Fig. 47, 52-55). Esta câmara é coberta na sua parte superior por uma projeção da cabeça dos estiletos, mantendo livre apenas a fenda anteral ("guide rail"; fig. 3).

A epiderme secretora é composta por uma única camada de células quadradas a levemente alongadas, com paredes finas, citoplasma com conteúdo de aspecto denso (secreção acidófila) e núcleo volumoso em relação às suas dimensões (Fig. 49, 51), com dois a quatro nucléolos. Esta epiderme é contínua até a base da cabeça dos estiletos (Fig. 10, 47-53), onde se encontra a região estigmática, composta por células epidérmicas alongadas não secretoras (Fig. 54-55, 57); nesta região, que corresponde à porção apical dos filetes, as anteras são livres entre si (mas adnatas à cabeça dos estiletos) e é por ela que os tubos polínicos irão penetrar no estigma

(Fig. 55). A secreção é acumulada num espaço celular (Fig. 49, 51) antes de ser liberada para o interior da câmara. Não há ramificações vasculares em direção à epiderme, mas os feixes vasculares dos filetes estão próximos a esta estrutura (Fig. 10, 52).

A secreção flui através de toda a câmara estigmática e da câmara formada pelas projeções da corona interestaminal (Fig. 56), que não é secretora (Fig. 58), e irá se acumular na base da corona. Esta segunda câmara é contínua com a estigmática, formando uma única **câmara interestaminal**, cuja metade superior é delimitada pelo tubo dos filetes e alas das anteras (câmara estigmática) e na metade inferior, pelo tubo dos filetes e corona interestaminal (Fig. 4-5, 56). Parte da secreção que permanece no interior da câmara irá propiciar a germinação dos tubos polínicos (Fig. 55).

### Distribuição

Em cada flor, cinco câmaras estigmáticas são encontradas alternas às anteras, atrás da fenda anteral (Fig. 1-2, 10, 52).

### Fase secretora

A fase secretora da câmara estigmática inicia pouco antes da pré-antese, em botões no estágio 4 (Tabela 1). As células praticamente não se alongam e sua atividade secretora pode ser percebida pelo aspecto do conteúdo citoplasmático e a presença de um espaço na porção apical (Fig. 10, 47-54, 56-57). As câmaras permanecem secretando até o término do desenvolvimento floral.

### **Epiderme secretora da corona estaminal**

A corona estaminal corresponde à porção da corona oposta à antera. Ela forma uma estrutura cupuliforme que fica repleta de secreção (Fig. 1-3).

### Estrutura

A epiderme secretora da corona estaminal localiza-se na porção proximal ao estame (Fig. 11, 61). A área secretora se estende lateralmente cerca de um terço da abertura da corona (Fig. 11, 59) e longitudinalmente, do nível da base da antera até a base da estrutura cupuliforme (Fig. 61).

A epiderme secretora é composta por uma única camada de células quadradas (extremidades) a colunares curtas (região central; Fig. 59-63). Estas células apresentam paredes finas, citoplasma com conteúdo de aspecto denso (secreção acidófila) e núcleo em posição basal (Fig. 60, 63) com dois a quatro nucléolos. A secreção é armazenada em um espaço (Fig. 60, 63) antes de ser liberada para o meio externo e se acumular nesta estrutura formada pela corona. O feixe do filete fica próximo à região secretora da corona, mas não há qualquer ramificação em sua direção (Fig. 11).

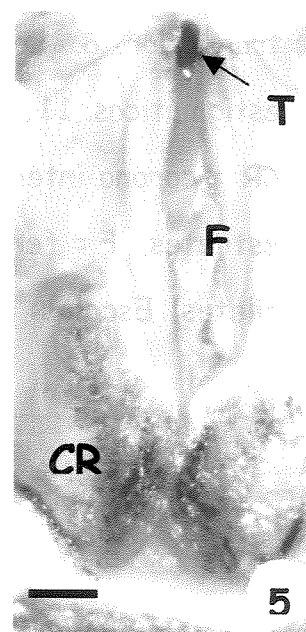
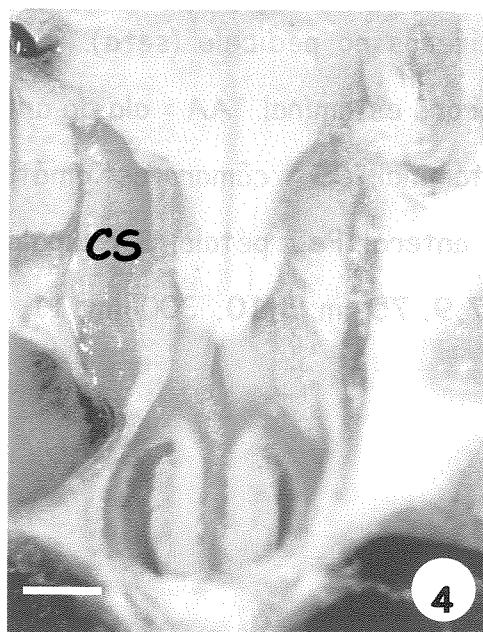
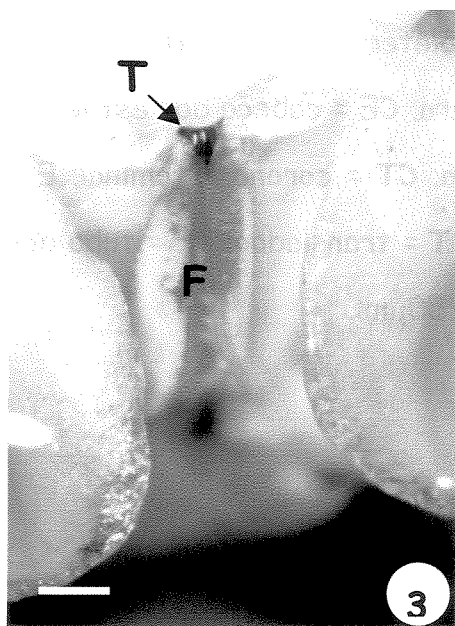
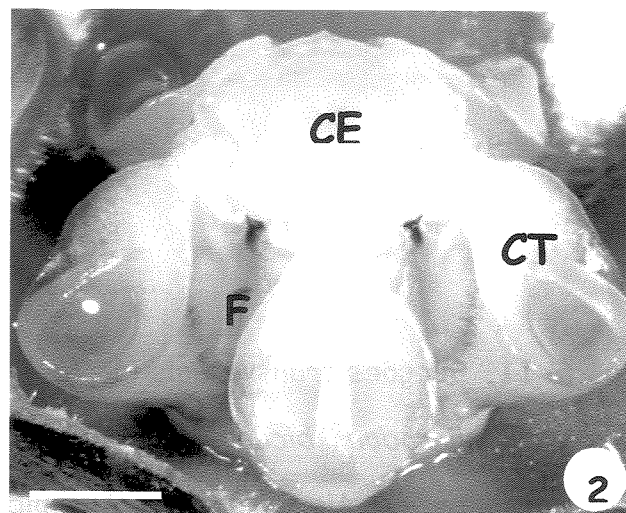
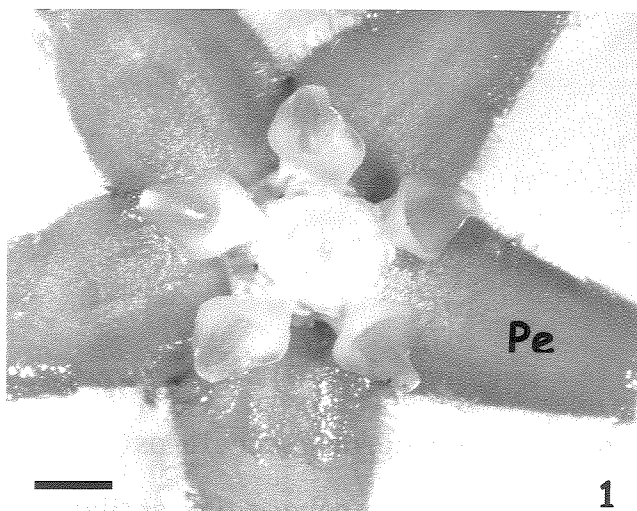
### Distribuição

A flor possui cinco coronas estaminais cupuliformes onde a secreção produzida pela própria corona será acumulada (Fig. 1-3). Embora a flor seja pêndula, a secreção é viscosa o suficiente para não escoar.

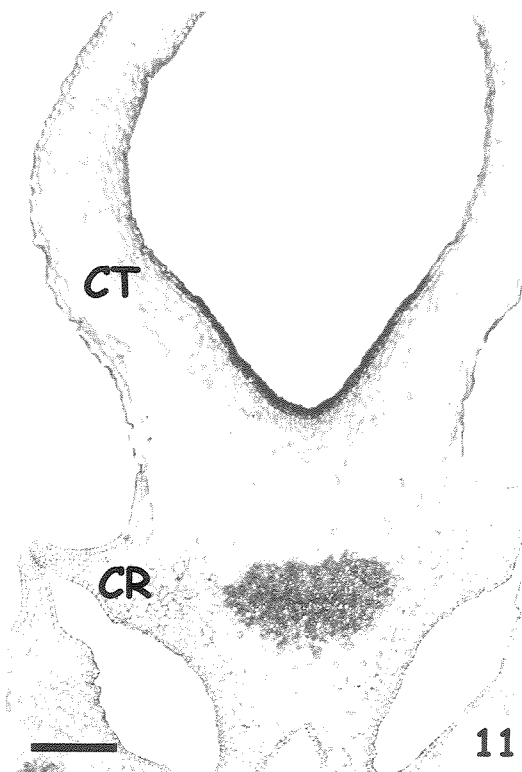
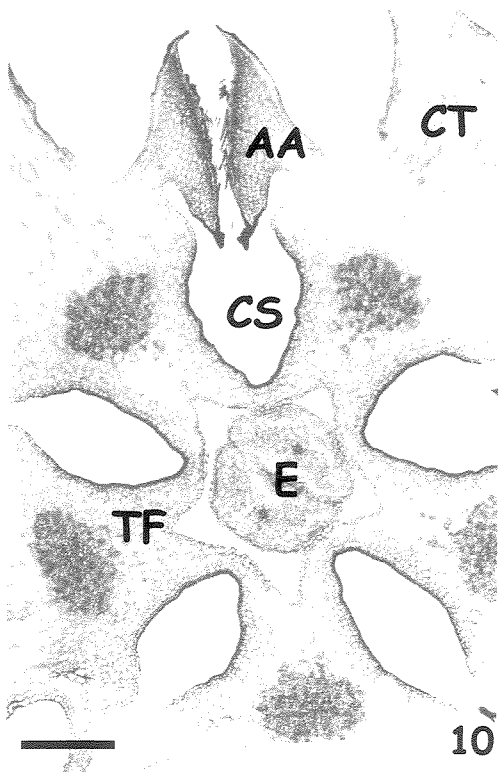
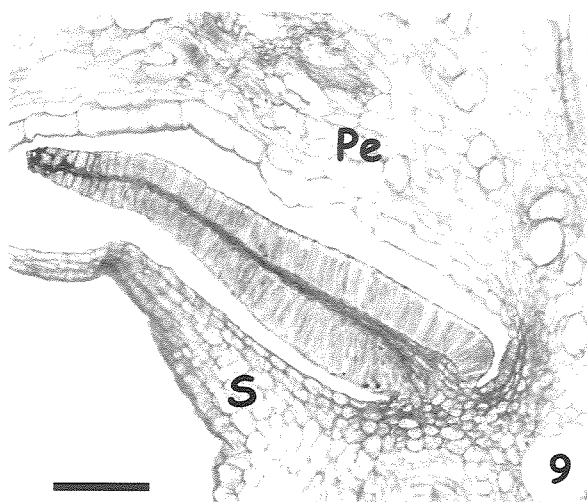
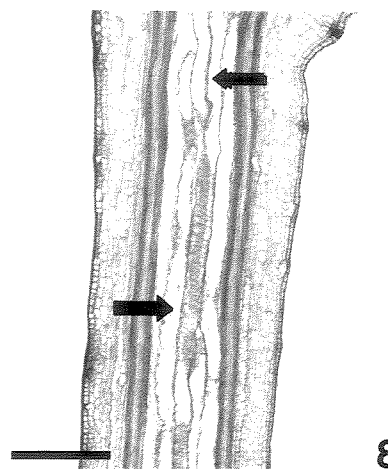
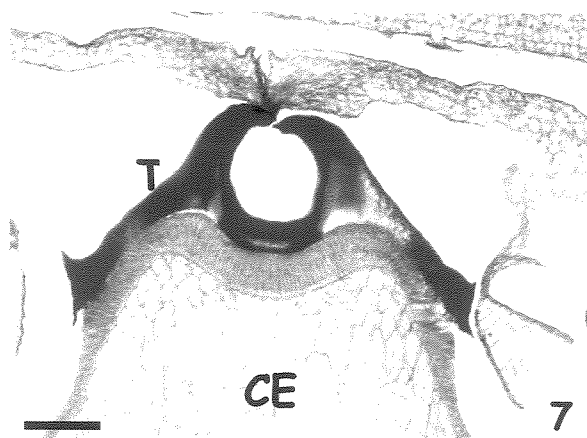
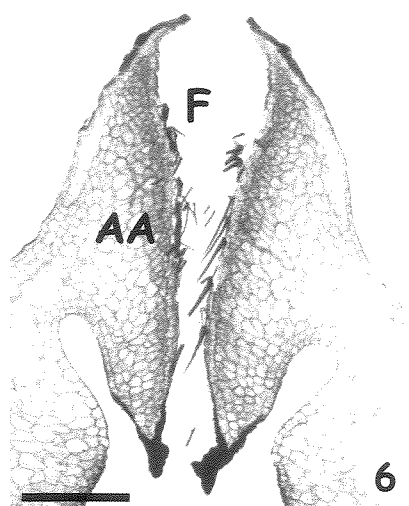
### Fase secretora

As células secretoras da corona só começam a secretar pouco antes da pré-antese, em botões no estágio 4 (Tabela 1). Nesta fase, as células começam a apresentar secreção no citoplasma e um espaço na porção apical (Fig. 59-60). As células da porção central da região secretora se alongam um pouco (Fig. 59-60, 63). A fase secretora dura até a flor estar totalmente formada e em antese (Estádio 5; fig. 61-63).

**Fig. 1-5.** Flores adultas de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **1-2.** Vista frontal e lateral da flor. **3.** Pormenor da fenda anterolateral. **4.** Secção longitudinal mostrando a câmara estigmática. **5.** Detalhe da fenda anterolateral com o translador em porção apical e sua continuidade com a câmara formada pela coroa interestaminal. **CE** = cabeça dos estiletes; **CR** = coroa interestaminal; **CS** = câmara estigmática; **CT** = coroa estaminal; **F** = fenda anterolateral; **Pe** = pétala; **T** = translador. **Escala:** 1. 1,5 mm; 2. 1,6 mm; 3,5. 300  $\mu$ m; 4. 400  $\mu$ m.

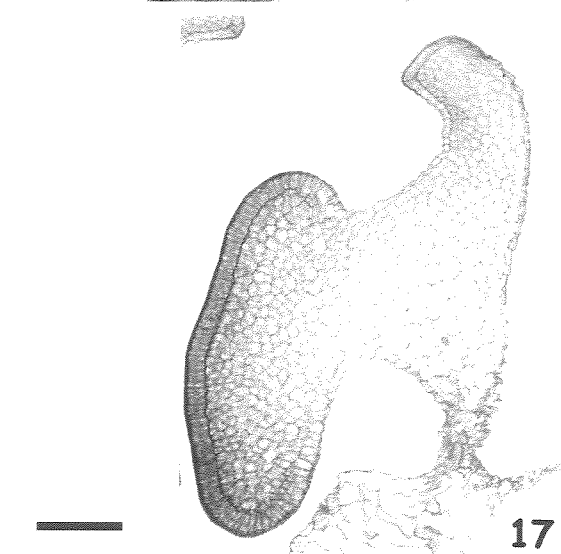
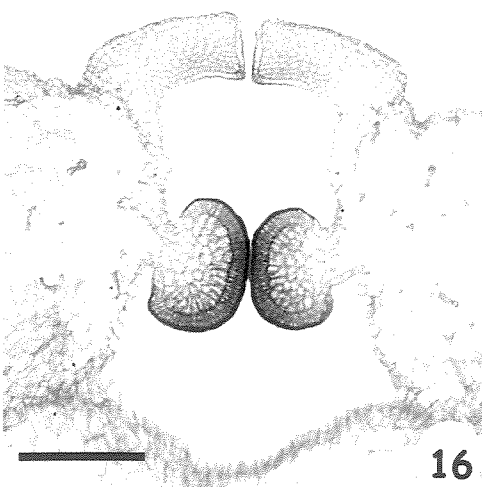
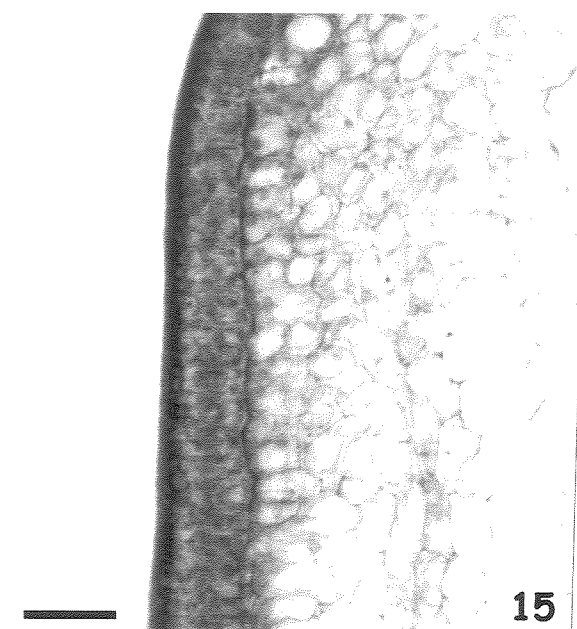
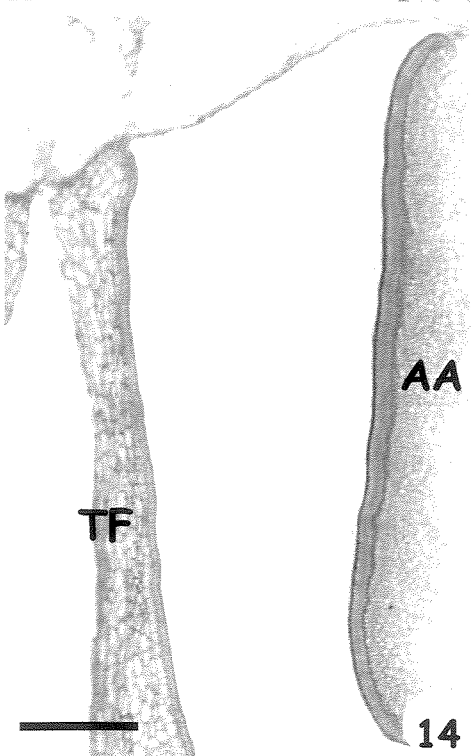
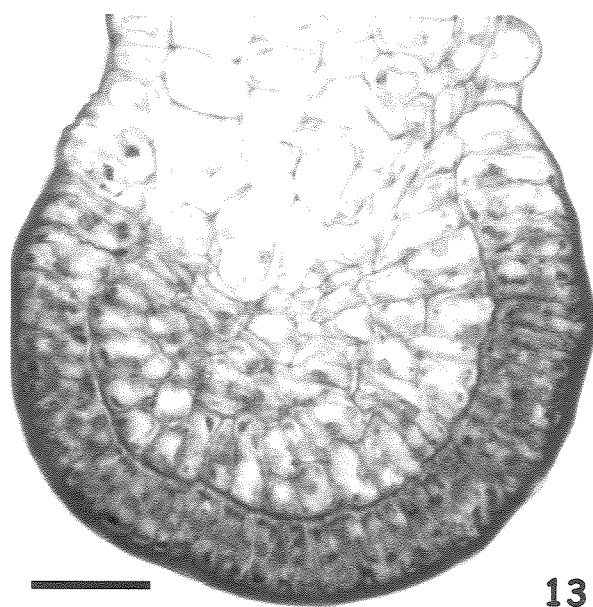
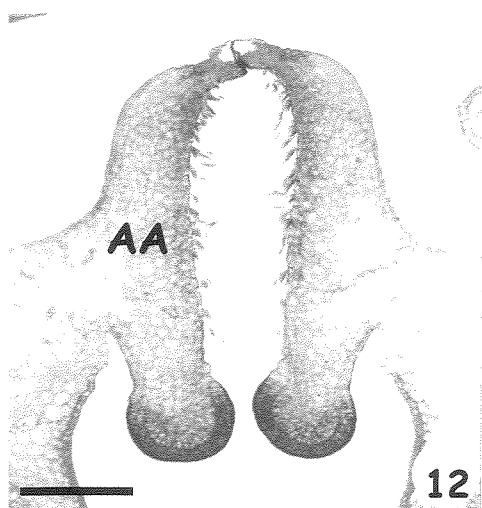


**Fig. 6-11.** Secções transversais (6-7, 10-11) e longitudinal (8-9) de flores adultas de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 6-11. Estruturas secretoras florais observadas. 6. Ala da antera. 7. Epiderme secretora da cabeça dos estiletes e translador. 8. Laticíferos no pedicelo (*seta*). 9. Coléter calicinal. 10. Câmaras estigmáticas. 11. Corona estaminal. AA = ala da antera; CE = cabeça dos estiletes; CR = corona interestaminal; CS = câmara estigmática; CT = corona estaminal; E = estiletes; F = fenda anteral; Pe = pétala; S = sépala; T = translador; TF = tubo dos filetes. Escalas: 6-7,9. 75 µm; 8,10. 300 µm; 11. 250µm.

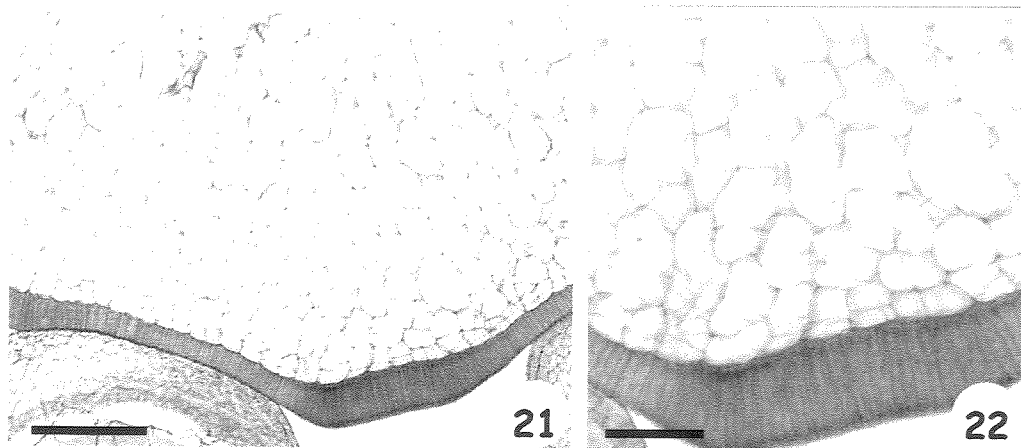
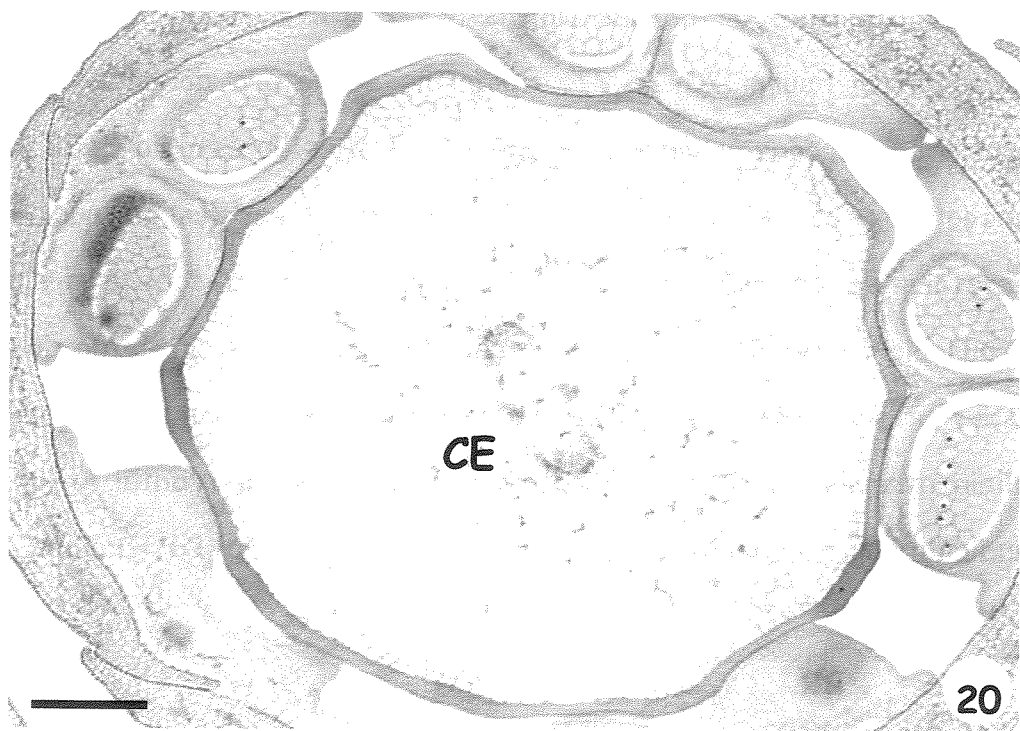
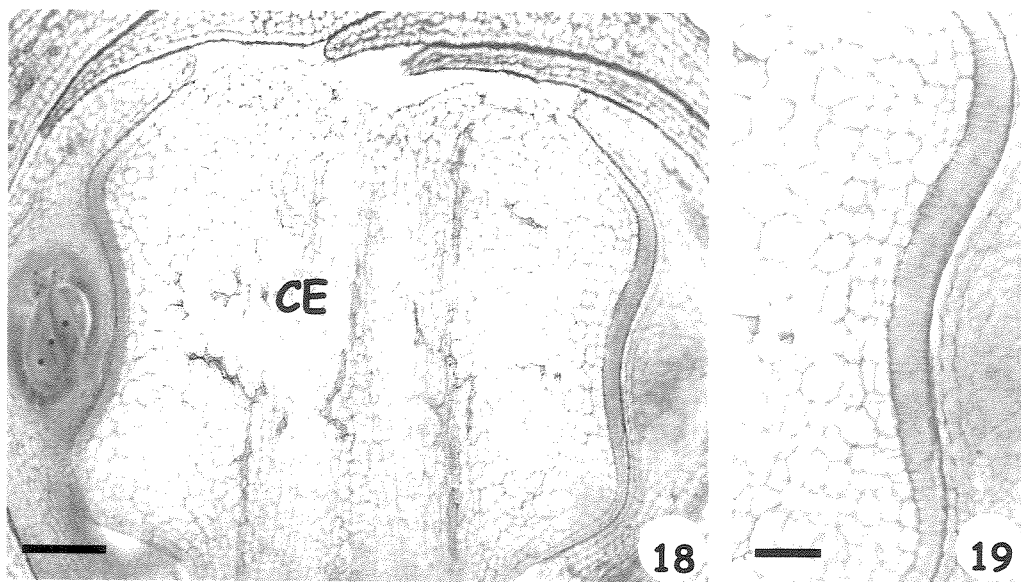


**Fig. 12-17.** Secções transversais (12-13, 16-17) e longitudinais (14-15) de botões florais de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 12-17. Epiderme secretora da ala da antera. 12-13, 15. Botões do estágio 4. 14, 16-17. Botões do estágio 3. 12. Vista geral da região secretora da ala da antera. 13. Pormenor da figura 12. 14. Região secretora da ala da antera. 15. Detalhe da epiderme secretora em secção longitudinal da figura 14. 16. Porção apical da região secretora da ala da antera. 17. Porção basal da região secretora da ala da antera. AA = ala da antera; TF = tubo dos filetes. Escalas: 12,14,16. 150 µm; 13,15. 30 µm; 17. 75 µm.

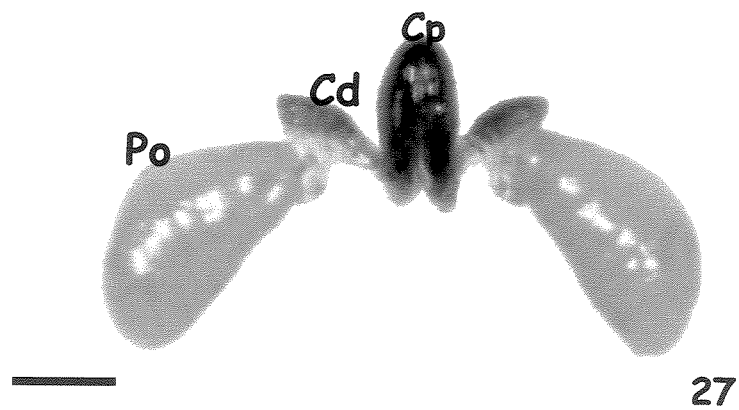
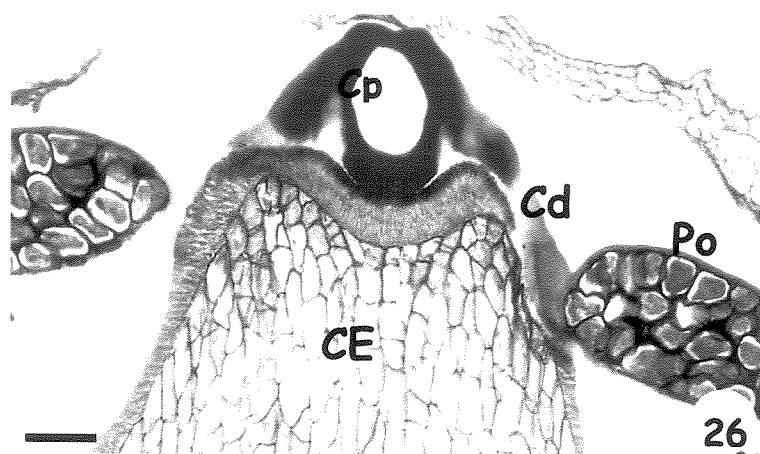
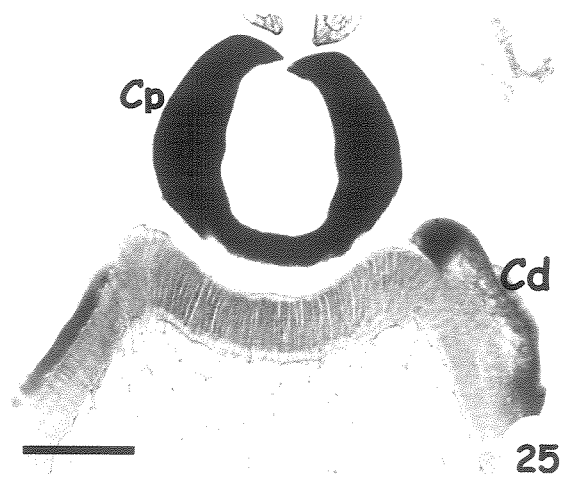
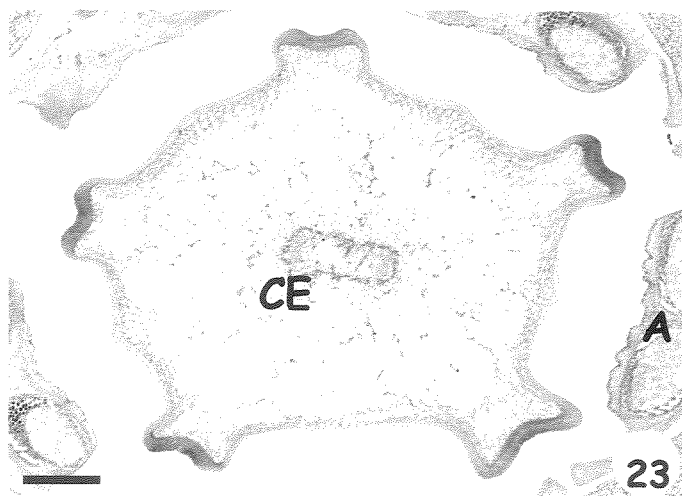




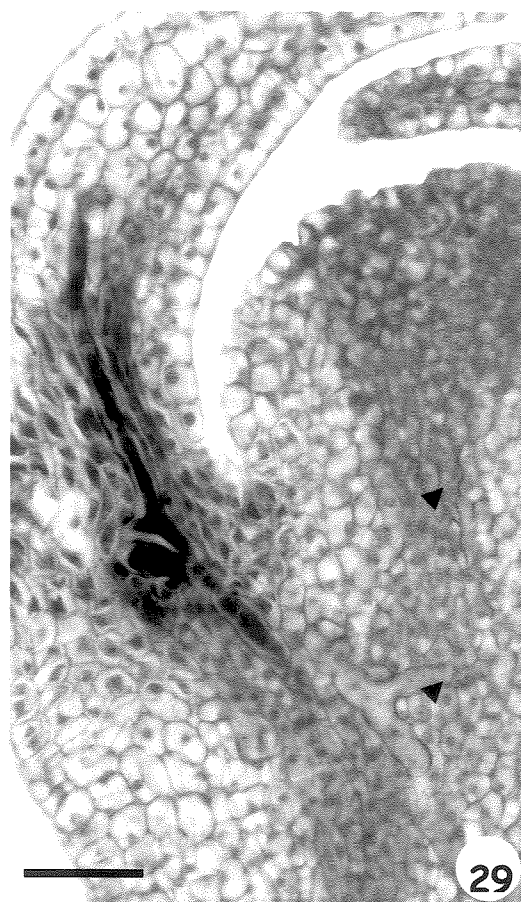
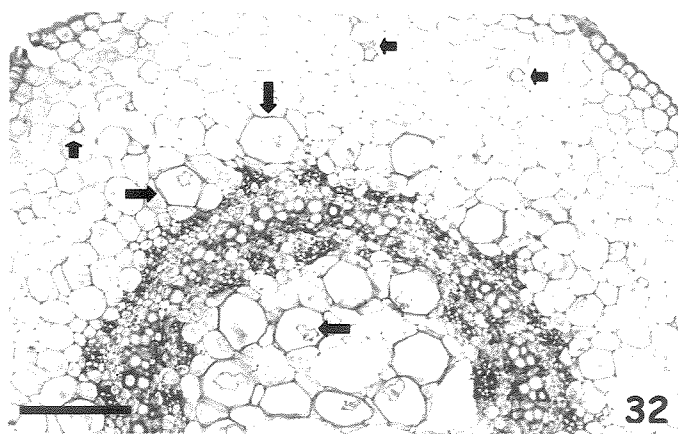
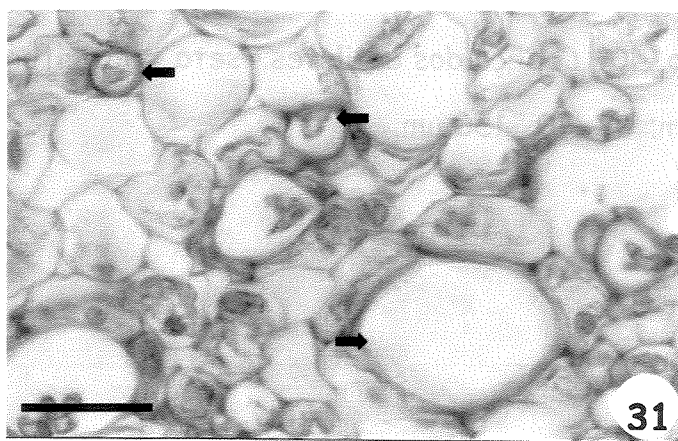
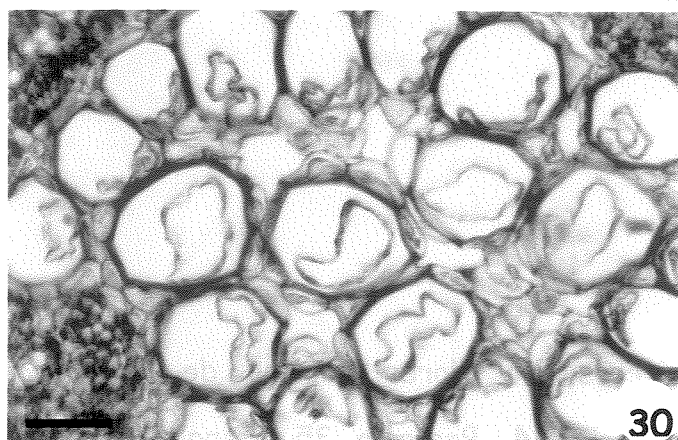
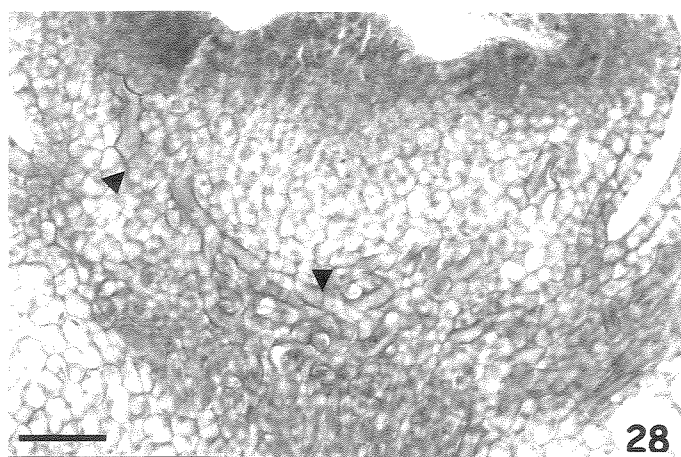
**Fig. 18-22.** Secções longitudinais (18-19) e transversais (20-22) de botões florais do estágio 2 de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 18-22. Epiderme secretora da cabeça dos estiletos. 18. Vista geral da cabeça dos estiletos. 19. Pormenor da figura 18. 20. Epiderme secretora contínua da cabeça dos estiletos. 21-22. Pormenores da figura 20. CE = cabeça dos estiletos. Escalas: 18-19,21. 75  $\mu\text{m}$ ; 22. 30  $\mu\text{m}$ ; 20. 150  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 23-27.** Secções de botões florais (23-25) e flor adulta (27) de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 23-25,27. Epiderme secretora da cabeça dos estiletes e translador; secções transversais. 23-24. Botões do estágio 2. 23. Vista geral da cabeça dos estiletes; notar epiderme secretora descontínua. 24. Epiderme secretora se estende por toda a região lateral da cabeça dos estiletes. 25. Corpúsculo formado; início da secreção das caudículas em botão do estágio 4. 26. Epiderme secretora permanece em atividade secretora e o corpúsculo se liga à polínia através da caudícula. 27. Polinário em vista frontal. *A* = antera; *Cd* = caudícula; *CE* = cabeça dos estiletes; *Cp* = corpúsculo; *Po* = polínia. Escalas: 23. 250 µm; 24-25. 75 µm; 26. 50 µm; 27. 200 µm.

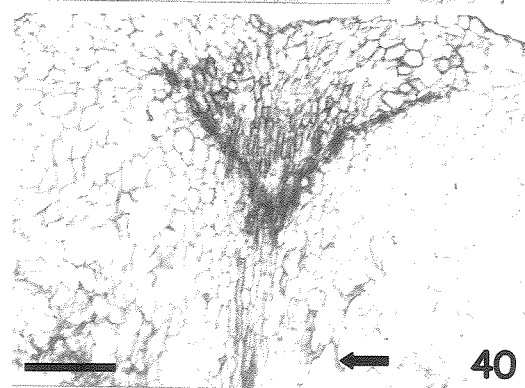
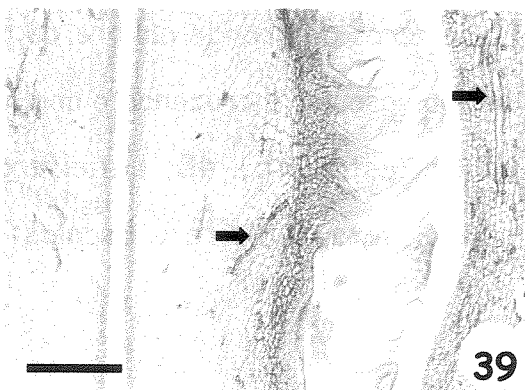
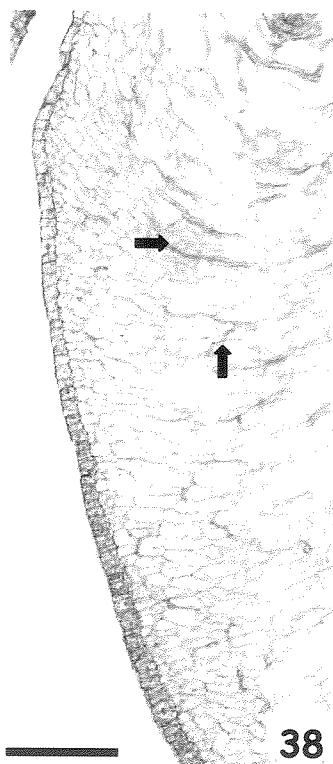
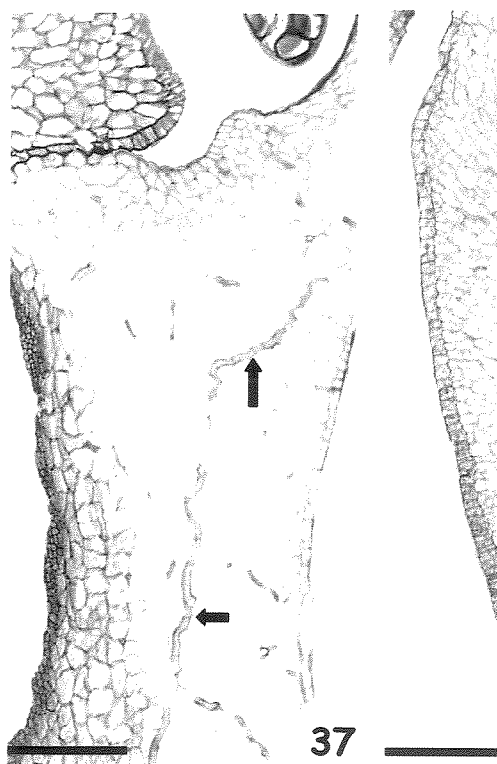
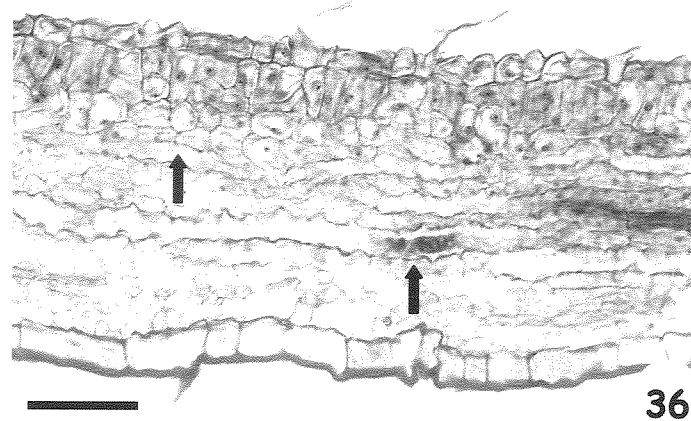
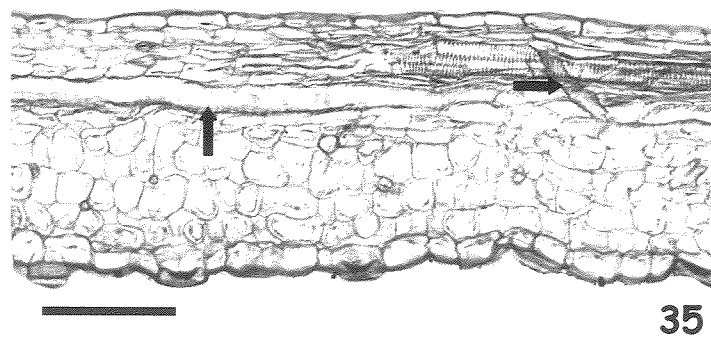


**Fig. 28-33.** Laticíferos em botões florais de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. Secções longitudinais (28-29, 33) e transversais (30-32). 28-29. Botões florais do estágio 1. 30-31, 33. Botões florais do estágio 2. 32. Botão floral do estágio 3. 28. Laticíferos no meristema fundamental e procâmbio. 29. Laticífero e ramo transestelar. 30-31. Laticíferos medulares (30) e corticais (31) do pedicelo; cortes tratados com vermelho de rutênio. 32. Presença de laticíferos de diferentes calibres no pedicelo. 33. Laticífero polinucleado (seta = núcleos). cabeça de seta = parede terminal do laticífero; seta = laticífero. Escalas: 28-31. 30 µm; 32. 75µm; 33. 25 µm.

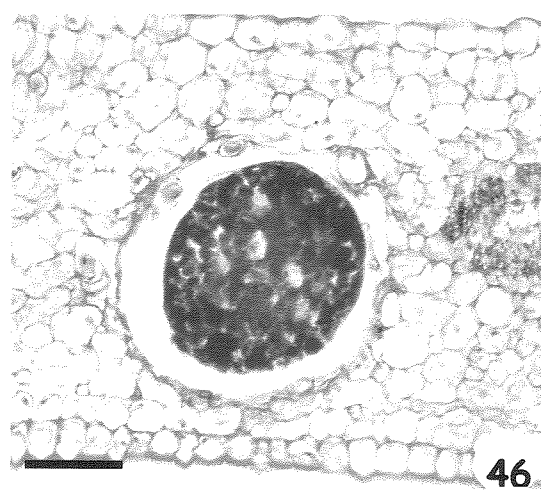
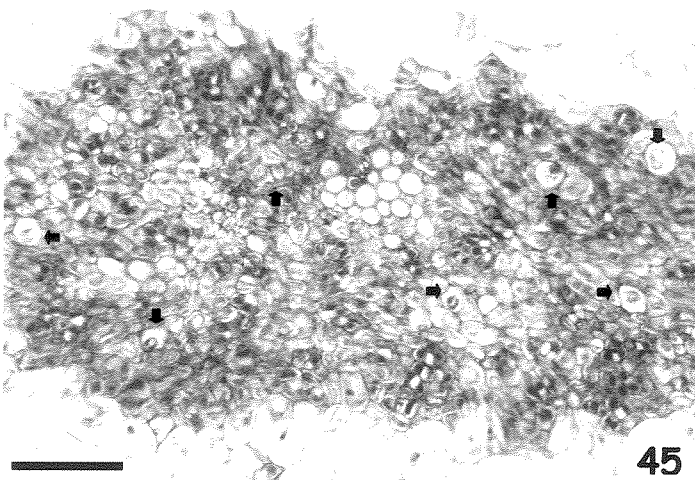
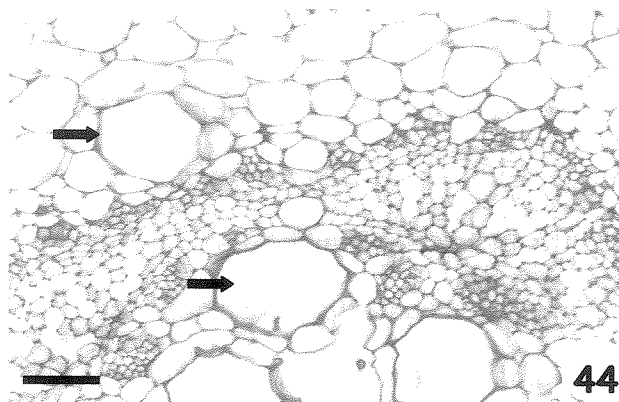
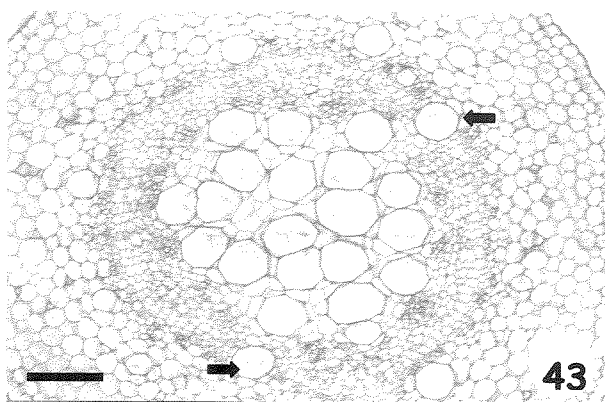
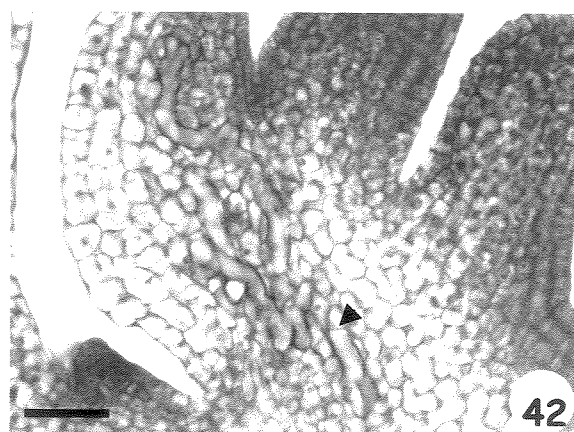


**Fig. 34-40.** Distribuição dos laticíferos em flores adultas de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. Secções longitudinais. **34.** Pedicelo. **35.** Sépala. **36.** Pétala. **37.** Estame. **38.** Corona. **39.** Ovário. **40.** Cabeça dos estiletos. **seta** = laticíferos. Escalas: **34.** 300  $\mu\text{m}$ ; **35-36.** 75  $\mu\text{m}$ ; **37-40.** 150  $\mu\text{m}$ .

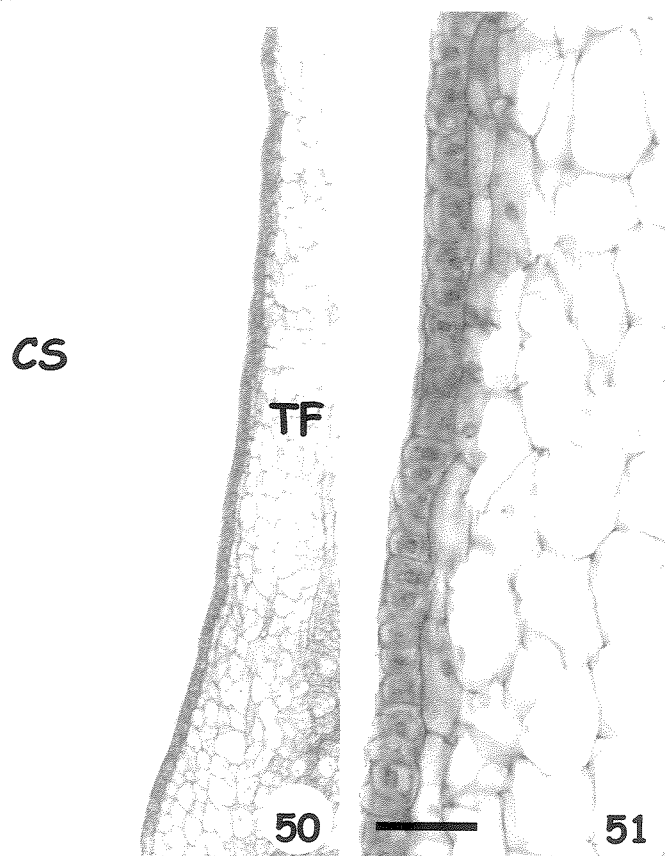
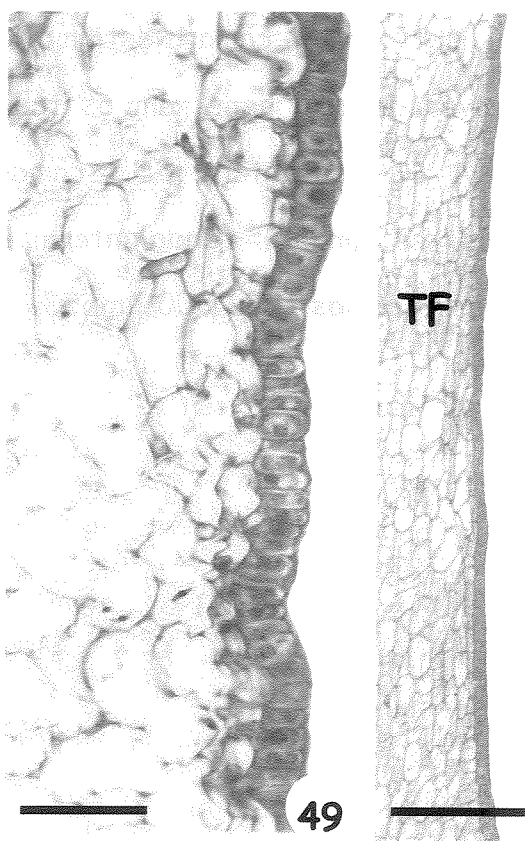
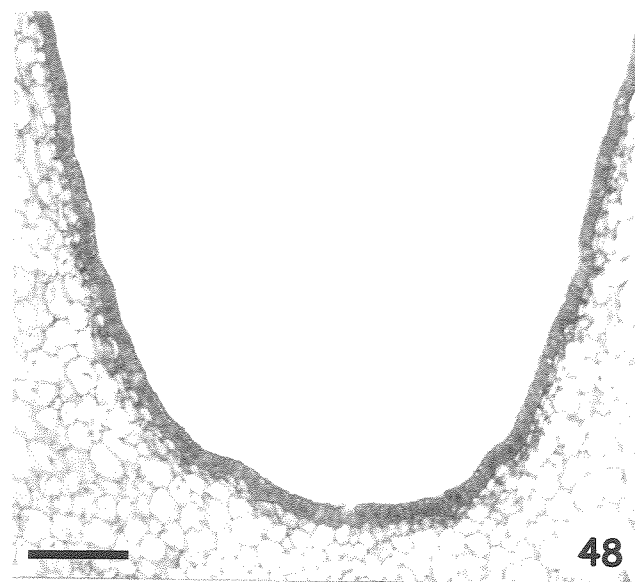
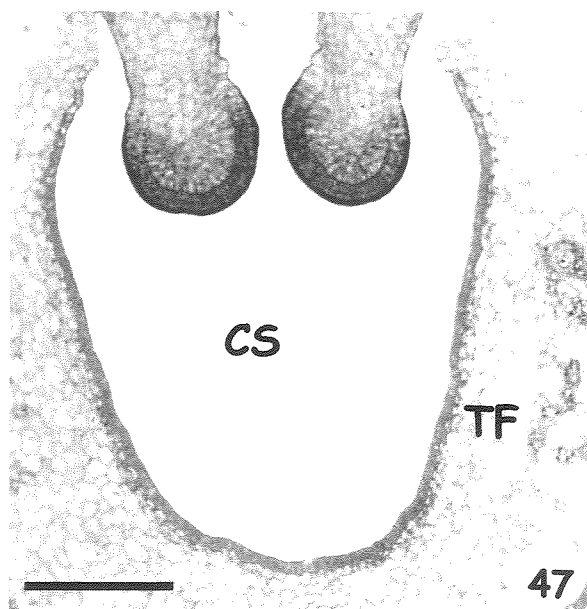




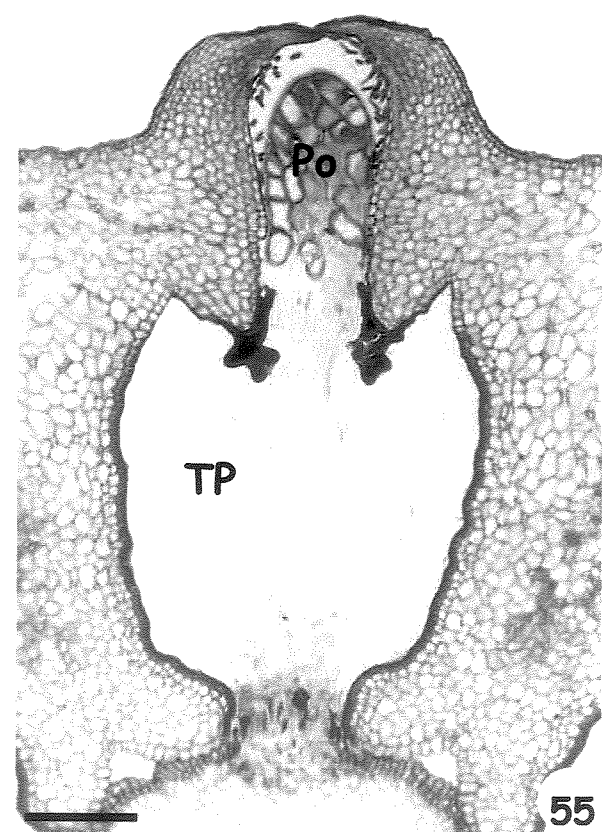
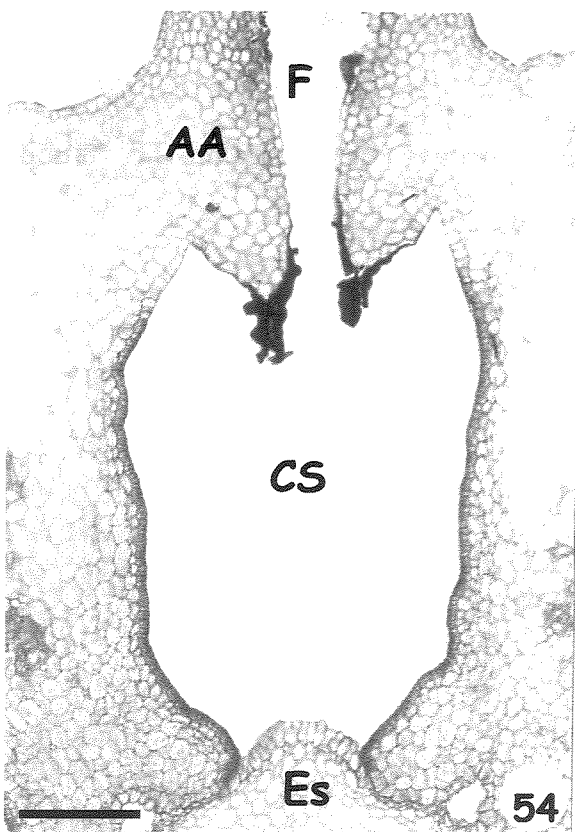
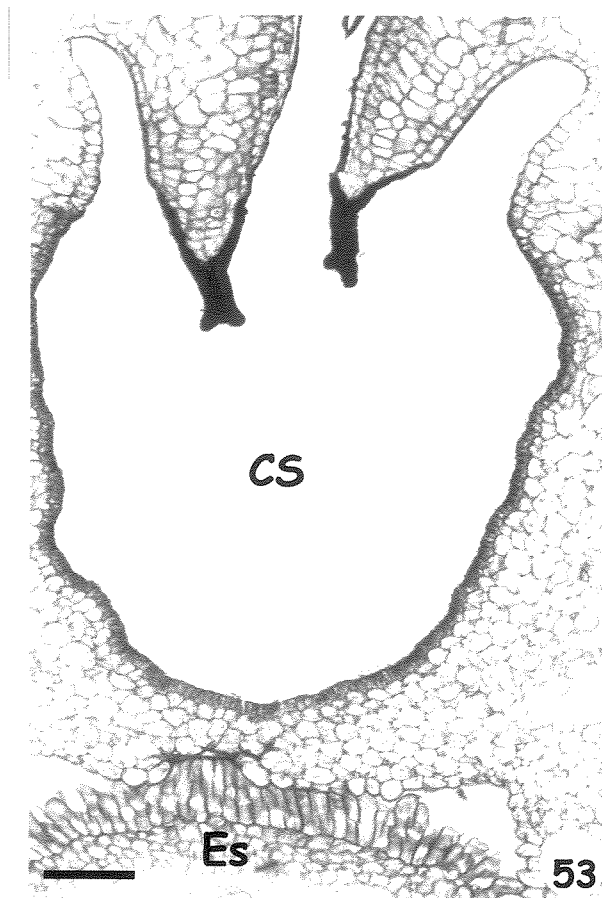
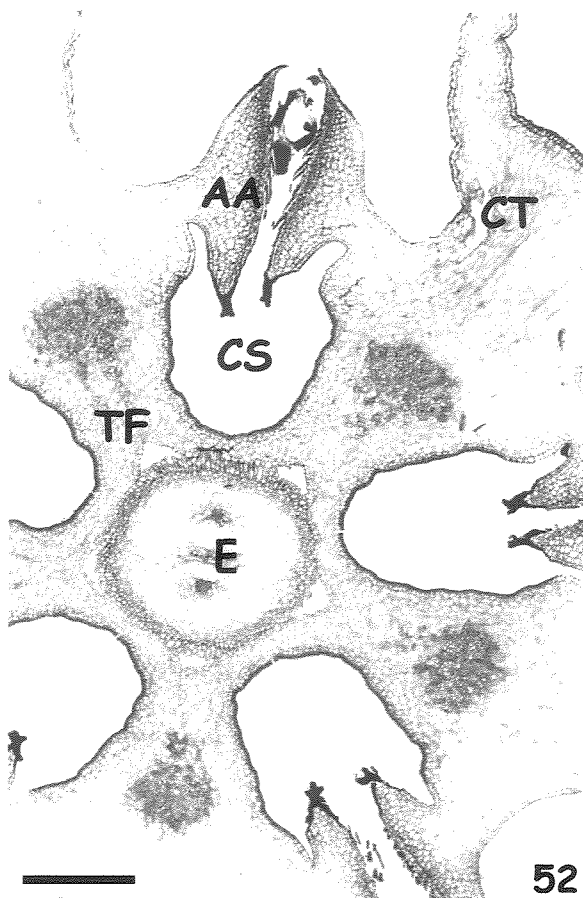
**Fig. 41-46.** Secções de botões florais (41-44) e flores adultas (45-46) de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **41-42.** Botão floral do estágio 1. **41.** Laticíferos sendo formados nas regiões meristemáticas. **42.** Pormenor da figura 41; notar parede terminal (cabeça de seta). **43-44.** Botão floral do estágio 2. **43.** Laticíferos de grande calibre do pedicelo presentes na medula, no córtex junto ao tecido vascular e cruzando o anel vascular. **44.** Pormenor da figura 43. **45-46.** Flor adulta (estágio 5). **45.** Laticíferos no tecido vascular do filete. **46.** Parasita na pétala. seta = laticífero. **Escala:** 41. 75  $\mu\text{m}$ ; 42,44. 30  $\mu\text{m}$ ; 43,45-46. 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 47-51.** Secções transversais (63-65) e longitudinais (66-67) de botões florais do estágio 4 de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **47-51.** Câmara estigmática. **47.** Vista geral da câmara estigmática. **48-49.** Detalhes da epiderme secretora da câmara estigmática; pormenores da figura 47. **50.** Vista geral da câmara estigmática em secção longitudinal. **51.** Detalhe da epiderme secretora; pormenor da figura 50. **CS** = câmara estigmática; **TF** = tubo dos filetes. **Escala:** **47,50.** 150  $\mu\text{m}$ ; **48.** 75  $\mu\text{m}$ ; **49,51.** 30  $\mu\text{m}$ .

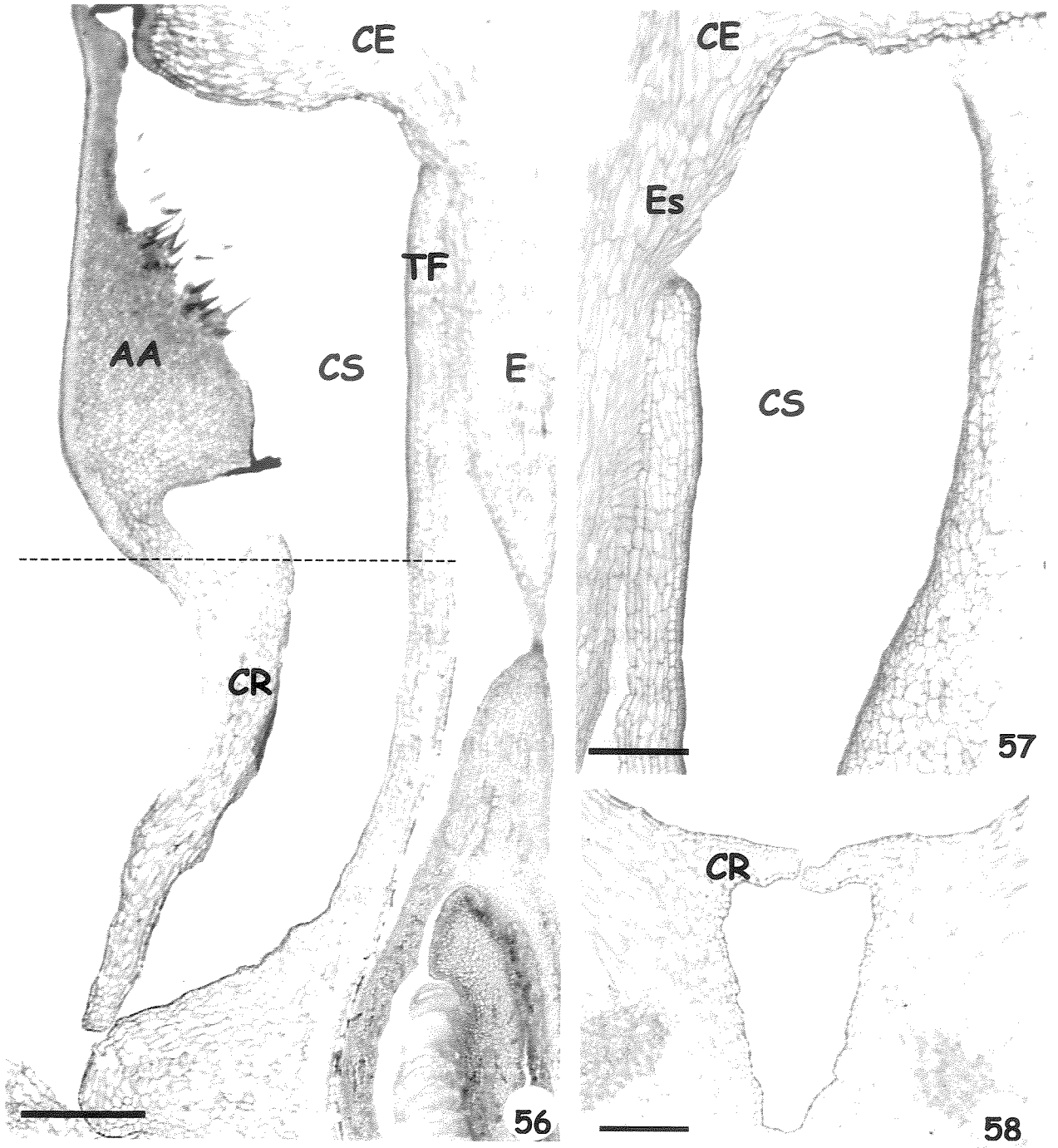


**Fig. 52-55.** Secções transversais de flores adultas de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **52-55.** Câmara estigmática. **52.** Vista geral das cinco câmaras estigmáticas. **53.** Pormenor da figura 52. **54-55.** Abertura da câmara estigmática na base da cabeça dos estiletes (estigma) através da qual penetram os tubos polínicos. **55.** Corte submetido à reação PAS. **AA** = ala da antera; **CS** = câmara estigmática; **CT** = coroa estaminal; **E** = estilete; **Es** = estigma; **F** = fenda anteral; **Po** = polínia; **TF** = tubo dos filetes; **TP** = tubos polínicos. **Escalas:** **52.** 300  $\mu\text{m}$ ; **53.** 75  $\mu\text{m}$ ; **54-55.** 150  $\mu\text{m}$ .

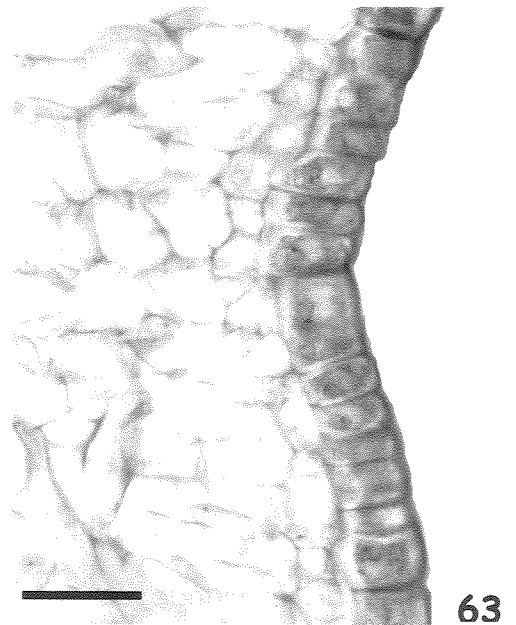
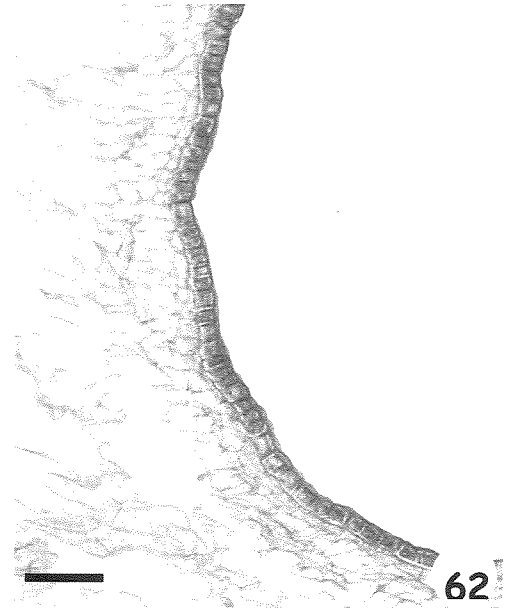
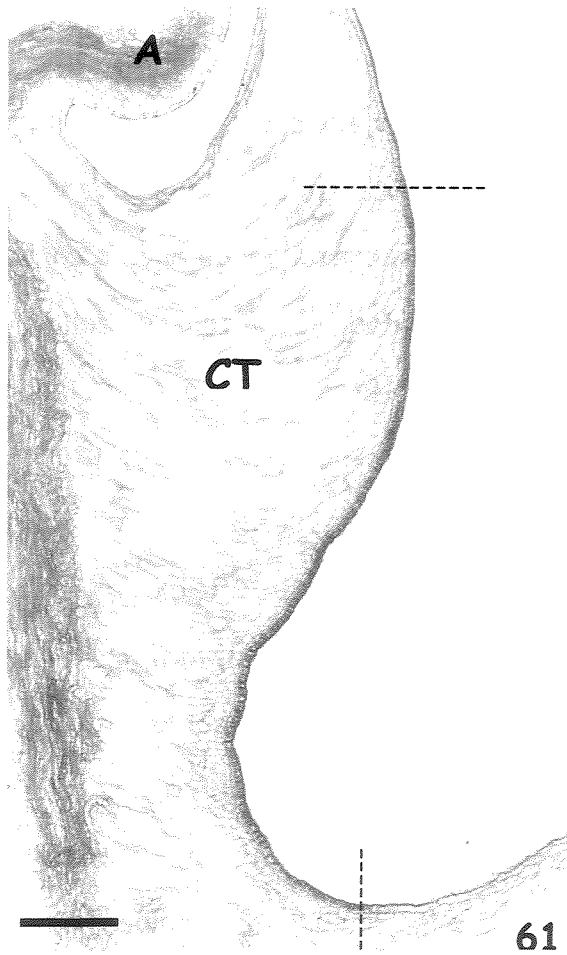
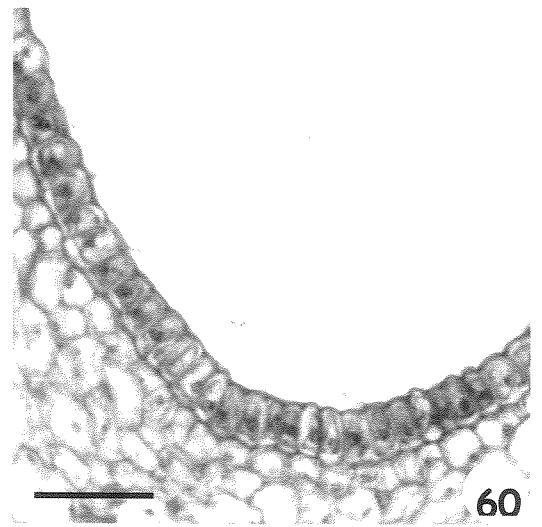
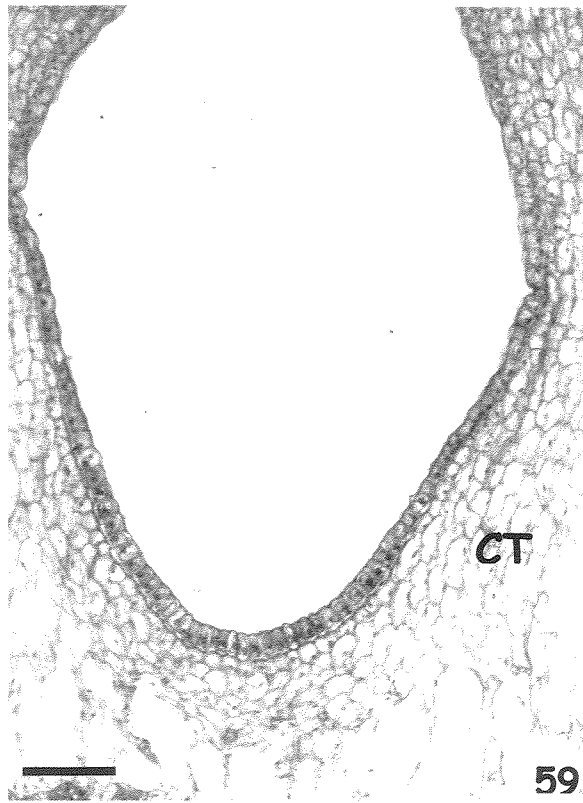


**Fig. 56-58.** Secções longitudinais (56-57) e transversal (58) de flores adultas de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. **56-58.** Câmara estigmática e corona estaminal. **56.** Câmara interestaminal formada pela continuidade entre a câmara estigmática e a câmara delimitada pela corona interestaminal. **57.** Região de abertura da câmara estigmática na base da cabeça dos estiletes. **58.** Câmara formada pela corona interestaminal. **AA** = ala da antera; **CE** = cabeça dos estiletes; **CR** = corona interestaminal; **CS** = câmara estigmática; **E** = estilete; **Es** = estigma; **TF** = tubo dos filetes. **Escala:** 56. 300 µm; 57. 150 µm; 58. 250 µm.





**Fig. 59-63.** Secções de botão floral (59-60) e flor adulta (61-63) de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. 59-60. Secção transversal. 59. Epiderme da corona estaminal em atividade secretora. 60. Pormenor da figura 59. 61-63. Secção longitudinal. 61. Vista geral da região secretora da corona estaminal (linha tracejada = limites da epiderme secretora). 62-63. Pormenores da figura 61. A = antera; CT = corona estaminal. Escalas: 59,62. 75  $\mu\text{m}$ ; 60. 50  $\mu\text{m}$ ; 61. 250  $\mu\text{m}$ ; 63. 30  $\mu\text{m}$ .



## Discussão

### Ala da antera

A estrutura encontrada na extremidade interna das alas das anteras de *B. bicuspidatum* nunca foi descrita antes. Apenas em *Matelea reticulata* (Engelm. ex A. Gray) Woodson foi mencionada uma estrutura similar; porém, ela foi chamada de "pad" do interior da fenda anteral e não foi considerada como tendo atividade secretora (Kunze 1995). Em *B. bicuspidatum*, esta estrutura tem sua formação, fase secretora e senescência antes da antese, durante o desenvolvimento dos botões florais. Ela é composta por uma única camada de células epidérmicas colunares secretoras dispostas em paliçada. Devido à sua posição, a secreção desta estrutura provavelmente será adicionada à secreção da câmara estigmática.

### Cabeça dos estiletes

A cabeça dos estiletes é resultado da fusão posgênita dos ápices dos carpelos (Fallen 1986). Em *Catharanthus roseus* G. Don (Walker 1975), a morfogênese desta estrutura é rápida, com a diferenciação da epiderme secretora logo após o contato dos dois ápices carpelares. Esta estrutura tem significado evolutivo e Fallen (1986) descreveu quatro tipos básicos de cabeça dos estiletes com base na morfologia, histologia e complexidade funcional e definiu uma progressão desta estrutura dentro da família. Em todas as Apocynaceae s.l., a cabeça dos estiletes é coberta por epiderme unisseriada secretora (Fallen 1986; Kunze 1993, 1994; Galetto 1997; Lin & Bernardello 1999; capítulo 3). A cabeça dos estiletes de *B. bicuspidatum* também tem uma morfogênese rápida e já possui a epiderme em atividade secretora no início do desenvolvimento floral. Esta epiderme possui uma única camada de células em paliçada, como nas demais espécies da família. As regiões opostas às anteras secretam apenas durante o início da atividade secretora e, depois, apenas as regiões alternas às

anteras, que são responsáveis pela secreção do translador, continuarão secretando. Esta atividade diferencial de regiões distintas da cabeça dos estiletes é um relato inédito para espécies desta subfamília.

Kunze (1994) estudou a ontogênese do translador em espécies de Asclepiadoideae e observou a formação inicial do corpúsculo e posterior, das caudículas, considerando o translador de *Fockea* o mais primitivo e o das Asclepiadeae o mais elaborado. *B. bicuspidatum* pertence à tribo Asclepiadeae (Endress & Bruyns 2000) e segue este mesmo padrão de secreção do translador: primeiro é secretado o corpúsculo, que se situa sobre a fenda anteral, e depois as caudículas, que irão se prender às polínias.

### Laticífero

Laticíferos já foram registrados em 40 famílias (Lewinsohn 1991). A falta de relação taxonômica próxima em muitas delas sugere que a capacidade de produzir látex surgiu mais de uma vez durante a evolução (Metcalf 1967; Fahn 1979). Segundo Farrell *et al.* (1991), as plantas produtoras de látex e resina têm sido mais bem sucedidas que os grupos relacionados que não os produzem.

Látex está presente em todas as Apocynaceae *s.l.* (Metcalf & Chalk 1950; Endress & Bruyns 2000) e pode ser leitoso, avermelhado, amarelado ou incolor (Endress & Bruyns 2000; Aguiar 2003; capítulo 3).

Laticíferos foram observados em praticamente todas as partes da flor de *Plumeria alba* Linn. e *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze., exceto nos lobos da antera, óvulo e estigma (Murugan & Inamdar 1987a,b). No presente estudo, eles estão presentes em todas as partes florais, exceto nos óvulos. Eles ocorrem em todos os tecidos, exceto epiderme, e são encontrados principalmente no parênquima. Os laticíferos são bastante ramificados; porém, os medulares do pedicelo apresentar ramificações apenas no receptáculo.

Os extensos laticíferos da grande maioria das Apocynaceae *s.l.*, Euphorbiaceae e Moraceae são considerados laticíferos não articulados formados a partir de células iniciais laticíferas que se alongam por crescimento apical autônomo através de todo o corpo vegetal (Metcalf 1967; Mahlberg 1993). Os ápices da célula laticífera e de seus ramos são descritos como tendo crescimento intrusivo através dos espaços intercelulares nos diversos tecidos (Mahlberg 1993).

Os laticíferos podem variar bastante seu diâmetro nas diferentes partes florais; como observado em *B. bicuspidatum*, os laticíferos medulares do pedicelo de *Plumeria alba* e *Vallaris solanacea* apresentam diâmetro bem maior que os demais (Murugan & Inamdar 1987a,b).

As paredes dos laticíferos podem ser tão finas quanto a parede das células parenquimáticas ou muito mais grossas (Mahlberg 1993). Elas são exclusivamente primárias e podem ter substâncias incrustantes como calose ou suberina (Fineran *et al.* 1988; Condon & Fineran 1989; Fahn 1990). As paredes dos laticíferos de *B. bicuspidatum* são várias vezes mais espessas que as paredes das células parenquimáticas e não apresentam suberina, que até o momento foi encontrada apenas em espécies de Convolvulaceae (Fineran *et al.* 1988; Condon & Fineran 1989).

Em geral, os laticíferos de Apocynaceae *s.l.* são descritos como não articulados (Metcalf 1967); entretanto, laticíferos formados por fusão celular foram descritos em *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e *Nerium oleander* (Milanez 1959, 1960-1, 1966, 1977), contradizendo as descrições anteriores para estas espécies (Blaser 1945; Mahlberg 1961, 1963; Stockstill & Nessler 1986). Os dois tipos de laticíferos (articulado e não articulado) já foram encontrados em um mesmo indivíduo de *Stapelia bella* A. Berger (Wilson & Maxam 1987). Embora laticíferos não articulados tenham sido descritos em *Allamanda violacea* Gard., *Asclepias curassavica* L., *A. syriaca* L., *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br., *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (hoje *M. pohliana*), *Plumeria alba*, *Vallaris solanacea*

(Giordani 1978; Wilson & Mahlberg 1978, 1980; Murugan & Inamdar 1987a,b; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), apenas laticíferos articulados foram encontrados em *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Sacchetti *et al.* 1999). Os laticíferos de *B. bicuspidatum* são articulados anastomosados e, através de rápida dissolução das paredes de contato, formam um sistema contínuo. Esta dissolução é total, não sendo observado nenhum indício das paredes terminais abaixo do ápice de cada laticífero.

A secreção, que já está presente desde a porção mais jovem dos laticíferos e preenche totalmente, é constituída por todo o protoplasto, que é liberado quando o tecido é injuriado. O protoplasto multinucleado encontrado nos laticíferos, geralmente é considerado uma condição cenocítica resultante de repetidas divisões nucleares sem a formação de parede terminal, embora a maioria dos pesquisadores não tenha sido capaz de detectar a ocorrência de qualquer divisão nuclear dentro dos laticíferos (Mahlberg 1993). Em *B. bicuspidatum*, o protoplasto multinucleado é resultado da fusão de células que são adicionadas ao sistema (condição sincicial).

Muitos autores consideraram os laticíferos não articulados de toda a planta com sendo resultantes do crescimento de um número específico de células iniciais laticíferas embrionárias. Em 1961, Mahlberg registrou a existência de cerca de 20 iniciais laticíferas em *Nerium oleander* e descreveu seu crescimento de acordo com esta teoria. Posteriormente, Milanez (1977) estudou os laticíferos desta mesma espécie e observou fusões celulares, através das quais os laticíferos cresciam. Muitos outros estudos descreveram a contínua formação de laticíferos a partir do meristema apical e do câmbio, contradizendo alguns pontos da teoria clássica. Em *Vallaris solanacea*, as iniciais têm origem procambial e são continuamente produzidas pelo ápice caulinar (Murugan & Inamdar 1987b). Em *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*), sistemas laticíferos primário e secundário foram encontrados (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997) e em *Cryptostegia grandiflora*, a formação de laticíferos foi

observada no sistema axial do floema secundário e radial do floema e xilema secundários (Milanez 1966). Em *B. bicuspidatum*, os laticíferos são continuamente formados por adição de células e dissolução das paredes de contato.

Alguns pesquisadores tentaram provar o crescimento apical autônomo dos laticíferos. Entretanto, em cultura asséptica de fragmentos de medula de *Cryptostegia grandiflora*, Snyder (1955) não obteve qualquer crescimento dos laticíferos. Em cultura de embrião de *Euphorbia marginata* Pursh., Mahlberg (1959) considerou o contorno sinuoso dos laticíferos no hipocótilo e sua presença entre os grandes espaços intercelulares das células parenquimáticas do cotilédone, muitas vezes próximo à epiderme, como provas de seu crescimento apical.

No estágio inicial do desenvolvimento floral de *B. bicuspidatum*, há muitos laticíferos atravessando o anel procambial, sem que haja qualquer deformidade nestas células intimamente relacionadas. Pela teoria clássica, este fato é dificilmente explicado. Já Milanez (1977) observou células recém-divididas do procâmbio de *Cryptostegia grandiflora* dando origem a um ramo transestelar. No presente estudo, laticíferos com paredes terminais também foram encontrados no meristema fundamental e procâmbio de botões florais em início de desenvolvimento.

As anastomoses dos laticíferos de *B. bicuspidatum* ocorrem rapidamente próximo aos ápices das séries e o sistema ramifica-se por fusão lateral de outras células meristemáticas. Estes laticíferos não têm crescimento intrusivo; as células do ápice de cada ramo apresentam sempre as mesmas dimensões das demais e fazem contato com outra célula. Através da análise da série de cortes, percebe-se que o ápice agudo muitas vezes encontrado nas células do ápice dos laticíferos, corresponde a uma secção oblíqua a estas células. Os laticíferos só crescem em regiões meristemáticas por adição de novas células; a célula adicionada pode estar em posição apical ou lateral em relação à série, gerando seu contorno sinuoso. Há uma grande variação de diâmetro entre os laticíferos florais de *B. bicuspidatum*. Segundo Milanez (1974), os laticíferos



de grande calibre adquirem este tamanho por fusão lateral de células. No presente estudo, isto não foi observado, sendo proposto que as células aumentem seu diâmetro. Provavelmente, os laticíferos de pequeno calibre se formam por divisão desigual das células meristemáticas, como observado por Milanez (1977) em *Nerium oleander*.

As funções atribuídas aos laticíferos são de proteção contra herbívoros, microorganismos e de selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrel *et al.* 1991; Hunte 1994). As observações dos indivíduos de *B. bicuspidatum* corroboram esta hipótese, já que poucas vezes foram encontrados órgãos injuriados. Segundo Farrell *et al.* (1991), presença de látex ou resina nas plantas está relacionada com o seu sucesso no ambiente. Entretanto, a presença de parasitas nas pétalas de *B. bicuspidatum* foi freqüente e, embora poucos insetos consigam se alimentar de plantas latexcentes, alguns fitófagos desenvolveram mecanismos para combater este sistema de defesa (Lewinsohn & Vasconcelos-Neto 1980, 1985; Compton 1987; Dussourd & Eisner 1987; Dussourd 1990; Isaías *et al.* 2000; Formiga *et al.* 2001; Christiano 2002).

#### Câmara estigmática e corona estaminal

Nas Asclepiadoideae, o tecido nectarífero pode ocorrer em diversas regiões, mas sua localização primária é no tubo dos filetes (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnep 1985; Kunze & Liede 1991; Kunze 1991, 1995, 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). Devido à grande diversidade e complexidade das flores desta subfamília, posição dos nectários é controversa. O néctar pode ser encontrado na câmara estigmática, na corona e na base da corola junto ao ginostégio. Em geral, assume-se que apenas o nectário localizado no tubo dos filetes, abaixo da fenda anteral secreta e o néctar flui através de um intrincado sistema capilar até compartimentos formados pela corona (Galil & Zeroni 1965; Kunze 1997). Na descrição da subfamília feita por Endress e Bruyns (2000), há cinco nectários atrás das cinco fendas anterais no tubo dos filetes. Muitas vezes, como neste caso, o nectário corresponde ao tecido

que reveste a câmara estigmática (Galil & Zeroni 1965; Kevan *et al.* 1989; Kunze 1997). Em algumas espécies de Asclepiadoideae, o néctar presente na câmara estigmática é o responsável pela germinação dos tubos polínicos e o promove dependendo de sua concentração (Wyatt & Shannon 1986; Kevan *et al.* 1989).

Woodson (1954) encontrou células nectaríferas na corona estaminal de espécies de *Asclepias*. Entretanto, a partir do trabalho de Galil e Zeroni (1965) com *Asclepias curassavica*, passou a se admitir que há apenas cinco nectários (no tubo dos filetes) e que o néctar flui através de passagens capilares até a corona estaminal. Este ponto de vista foi adotado por diversos autores, que trabalharam com *Asclepias* (Kevan *et al.* 1989), *Calotropis* (Eisikowitch 1986) e outras 24 espécies de Asclepiadinae (Kunze 1997). Apenas com os trabalhos em espécies de Gonolobinae (*sensu* Rapini *et al.* 2003; Kunze 1995), a existência de tecido secretor na corona foi admitida novamente; nestas espécies, há tecido secretor no anel formado pelas coronas estaminal e interestaminal. Posteriormente, Kunze (1999) observou três regiões secretoras, que ele chamou de nectário primário (no ápice do tubo dos filetes junto à região estigmática), nectário secundário (na base do tubo dos filetes) e nectário terciário (na porção externa do anel formado pela corona). Em *B. bicuspidatum*, regiões secretoras também foram encontradas no tubo dos filetes e corona estaminal. A região secretora do tubo dos filetes corresponde à epiderme da câmara estigmática. Esta epiderme é descontínua apenas na porção estigmática. Abaixo da câmara estigmática, há uma câmara delimitada pela corona interestaminal que não possui atividade secretora e, aparentemente, apenas guia a secreção até a base formada pela corona, como observado em *Parapodium* e *Xysmalobium* (Kunze 1997). No presente trabalho, estas duas regiões estão sendo consideradas como uma única câmara interestaminal devido à continuidade entre elas. O oferecimento de néctar na base, abaixo da fenda anteral, amplamente distribuído nas Asclepiadoideae foi considerado por Kunze (1997) como um caráter plesiomórfico.

Nas *Asclepiadoideae*, o nectário pode ser composto por apenas uma camada de células epidérmicas secretoras (Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Kunze 1995) ou pela epiderme e uma a duas camadas subepidérmicas (Christ & Schnepf 1985; Kunze 1999).

Em *B. bicuspidatum*, a corona estaminal também possui tecido secretor e pode ser observada repleta de secreção. A epiderme da câmara estigmática é composta por células quadradas, enquanto a epiderme secretora da corona estaminal é composta por células quadradas a levemente alongadas. Não há nenhuma ligação entre a câmara estigmática e a corona estaminal, cada estrutura produz seu próprio exsudato. Todos os trabalhos levantados assumem que a secreção encontrada na câmara estigmática e na corona estaminal é néctar, embora não haja nenhum estudo histoquímico desta secreção. Atribui-se ao néctar dupla função: recurso para o polinizador e indutor da germinação do tubo polínico (Galil & Zeroni 1965; Eisikowitch 1986; Kunze 1991). Em *B. bicuspidatum*, a secreção da câmara promoveu a germinação dos tubos polínicos; talvez a secreção da corona estaminal sirva como recurso para o polinizador.

## Conclusões

*B. bicuspidatum* possui seis sítios de secreção florais: epiderme da extremidade interna da ala da antera, epiderme da superfície lateral da cabeça dos estiletes laticífero, coléter, epiderme da câmara estigmática e epiderme da face proximal da antera da corona estaminal.

Em cada flor são encontradas: dez regiões secretoras das alas das anteras; a epiderme secretora da cabeça dos estiletes; laticíferos em todas as peças florais exceto os óvulos, e em todos os tecidos exceto a epiderme; cinco a 15 coléteres na base do cálice, alternos às suas lacínias (capítulo 1); cinco câmaras estigmáticas delimitadas por epiderme secretora e cinco coronas estaminais com epiderme secretora. O grande número de partes da flor envolvidas no processo secretor parece

estar relacionado com a grande complexidade deste órgão nas Asclepiadoideae e com a coevolução dos agentes polinizadores.

Dos seis sítios de secreção, cinco são externos e apenas um é interno. O laticífero (interno) pode ser formado a partir de células do meristema fundamental e/ou do procâmbio; nas demais estruturas encontradas, a porção secretora se restringe à epiderme (ala da antera, cabeça dos estiletes, coléter, câmara estigmática e corona estaminal).

A epiderme secretora da ala da antera nunca foi descrita para outras espécies da família. A epiderme da cabeça dos estiletes é semelhante à maioria das Apocynaceae s./, embora a secreção das Rauvolfioideae e Apocynoideae seja diferente da secreção das Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (tradutor).

Os laticíferos estão presentes em todos os membros da família, mas sua origem é contraditória e os resultados obtidos no presente estudo divergem dos resultados da maioria dos laticíferos descritos em espécies de Apocynaceae s./ Os coléteres têm ampla ocorrência na família, mas não universal (capítulo 1).

A câmara estigmática possui epiderme secretora, que é descrita como nectarífera na subfamília. Não há ligação entre a câmara estigmática e a corona estaminal, como sugerida para alguns membros da subfamília, e a secreção encontrada nesta estrutura é produzida neste mesmo local. Os sítios de secreção começam a secretar em diferentes estádios do desenvolvimento floral.

Primeiro começam a secretar as estruturas que estão relacionadas com proteção - laticíferos e coléteres; depois, as que estão envolvidas com a polinização - epiderme secretora da cabeça dos estiletes (tradutor), epiderme da câmara estigmática e epiderme secretora da corona estaminal. A câmara estigmática e a corona estaminal apresentam atividade secretora no estágio que antecede a pré-antese.

A diversidade de estruturas secretoras encontradas na flor de *B. bicuspidatum* e sua estrutura complexa em relação às demais Apocynaceae s.l. confirmam sua posição derivada na família e na subfamília.

## Referências bibliográficas

- AGUIAR, S 2003 Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66:301-306.
- BLASER, HW 1945 Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. *American Journal of Botany* 32:135-141.
- CHRIST, P & SCHNEPF, E 1985 The nectaries of *Cynanchum vincetoxicum* (Asclepiadaceae). *Israel Journal of Botany* 34:79-90.
- CHRISTIANO, J de CS 2002 Respostas cecidogênicas no modelo *Aspidospermum australe* (Apocynaceae) - *Pseudophacopteron* sp (Homoptera: Phacopteronidae). São Paulo, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CLARK, G 1973 Staining procedures. 3rd ed., Baltimore, The Williams & Wilkins Co.
- COMPTON, SG 1987 *Aganais speciosa* and *Danaus chrysippus* (Lepidoptera) sabotage the latex defenses of their host plants. *Ecological Entomology* 12:115-118.
- CONDON, JM & FINERAN, BA 1989 Distribution and organization of articulated laticifers in *Calystegia silvatica* (Convolvulaceae). *Botanical Gazette* 150:289-302.
- DUSSOURD, DE 1990 The vein drain; or, how insects outsmart plants. *Natural History* 90:44-49.

- DUSSOURD, DE & EISNER, T 1987 Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defense of plants. *Science* 237:898-901.
- EISIKOWITCH, D 1986 Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in Israel. *Plant Systematics and Evolution* 152:185-194.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* *The Botanical Review* 66:1-56.
- ESAU, K 1977 Anatomy of seed plants. 2<sup>nd</sup> ed., New York, John Wiley.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press Inc.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 106:245-286.
- FARINACCIO, MA 2000 Asclepiadoideae (Apocynaceae) do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. São Paulo, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- FARRELL, BD; DUSSOURD, DE & MITTER, C 1991 Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FINERAN, BA; CONDON, JM & INGERFELD, M 1988 An impregnated suberized wall layer in laticifers of the Convolvulaceae and its resemblance to that in walls of oil cells. *Protoplasma* 147:42-54.
- FORMIGA, AT; GONÇALVES, SJ de MR; ISAIÁS, M dos S & SOARES, GLG 2001 Desenvolvimento das galhas foliares de *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex Muell. Arg. (Apocynaceae). 52º Congresso Nacional de Botânica, Resumos:103.

- GALETTO, L 1997 Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192:197-207.
- GALIL, J & ZERONI, M 1965 Nectar system of *Asclepias curassavica*. *Botanical Gazette* 126:144-148.
- GERLACH, D 1969 Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Stuttgart, Georg Thieme.
- GIORDANI, R 1978 Autophagie cellulaire et differenciation des laticifères non articulés chez une Asclepiade. *Biologie Cellulaire* 33:253-260.
- GREGORY, M & BAAS, P 1989 A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38: 125-174.
- HUNTER, JR 1994 Reconsidering the functions of latex. *Trees* 9:1-5.
- INAMDAR, JA; MURUGAN, V & SUBRAMANIAN, RB 1988 Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. *Annals of Botany* 62:583-588.
- ISAÍAS, RM dos S; SOARES, GLG; CHRISTIANO, J de CS & GONÇALVES, SJ de MR 2000 Análise comparativa entre as defesas mecânicas e químicas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Müell. Arg contra herbivoria. *Floresta e Ambiente* 7:19-30.
- JOHANSEN, DA 1940 Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- KEVAN, PG; EISIKOWITCH, D & RATHWELL, B 1989 The role of nectar in the germination of pollen in *Asclepias syriaca* L. *Botanical Gazette* 150:266-270.
- KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. *Plant Systematics and Evolution* 176:227-253.
- KUNZE, H 1993 Evolution of the translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. *Plant Systematics and Evolution* 185:99-122.

- KUNZE, H 1994 Ontogeny of the translator in *Asclepiadaceae s.str.* *Plant Systematics and Evolution* 193:223-242.
- KUNZE, H 1995 Floral morphology of some *Gonolobeae* (*Asclepiadaceae*). *Botanische Jahrbücher für Systematik* 117:211-238.
- KUNZE, H 1997 Corona and nectar system in *Asclepiadinae* (*Asclepiadaceae*). *Flora* 192:175-183.
- KUNZE, H 1999 Pollination ecology in two species of *Gonolobus* (*Asclepiadaceae*). *Flora* 194:309-316.
- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (*Asclepiadaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 178:95-105.
- LEWINSOHN, TM 1991 The geographical distribution of plant latex. *Chemoecology* 2:64-68.
- LEWINSOHN, TM & VASCONCELLOS-NETO, J 1980 Alimentação de crisomelídeos em *Asclepiadáceas*: um comportamento que reduz a ingestão de substâncias tóxicas. *Ciência e Cultura* 32 (Suppl.):497.
- LEWINSOHN, TM & VASCONCELLOS-NETO, J 1985 Convergência comportamental e padrões coevolutivos de insetos folívoros em plantas latescentes. XII Congresso Brasileiro de Zoologia, Resumos: 152-153.
- LIN, S & BERNARDELLO, G 1999 Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (*Apocynaceae*), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Science* 160:869-878.
- MAHLBERG, PG 1959 Development of the non-articulated laticifer in proliferated embryos of *Euphorbia marginata* Pursh. *Phytomorphology* 9:156-162.



- MAHLBERG, PG 1961 Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. *American Journal of Botany* 48:90-99.
- MAHLBERG, PG 1963 Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. *Botanical Gazette* 124:224-231.
- MAHLBERG, PG 1993 Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* 59:1-23.
- McMANUS, JFA 1948 Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108.
- METCALFE, CR 1967 Distribution of latex in the plant kingdom. *Economic Botany* 21:115-127.
- METCALFE, CR & CHALK, L 1950 *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. 2 v., Oxford, Clarendon Press.
- MILANEZ, FR 1959 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - I. Embrião. *Rodriguésia* 21/22:347-394.
- MILANEZ, FR 1960-1 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae). *Rodriguésia* 35/36:99-128.
- MILANEZ, FR 1966 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - III. Nota sobre a estrutura secundária. *Rodriguésia* 25:335-350.
- MILANEZ, FR 1974 Ontogênese dos laticíferos contínuos. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- MILANEZ, FR 1977 Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium* (*Nerium*) *oleander* L. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975:343-379.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. *Phytomorphology* 37:209-214.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* 97:25-31.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963 Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42:419-435.
- RAPINI, A; CHASE, MW; GOYDER, DJ & GRIFFITHS, J 2003 Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Taxon* 52:33-50.
- ROY, AT & DE, DN 1992 Studies on differentiation of laticifers through light and electron microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. *Annals of Botany* 70:443-449.
- RUDALL, PJ 1987 Laticifers in Euphorbiaceae - a conspectus. *Botanical Journal of the Linnean Society* 94:143-163.
- SACCHETTI, G; BALLERO, M; SERAFINI, M; ROMAGNOLI, C; BRUNI, A & POLI, F 1999 Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). *Phyton* 39:265-275.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- SNYDER, FW 1955 Growth of excised tissues from the stem of *Cryptostegia grandiflora*. Botanical Gazette 117:147-155.
- STOCKSTILL, BL & NESSLER, CL 1986 Ultrastructural observations on the nonarticulated, branched laticifers in *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). Phytomorphology 36:347-355.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- TORRES, C & GALETTO, L 1998 Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127:207-223.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae) na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002 *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*: a taxon of Asclepiadaceae with an extragynoecial compitum. Plant Systematics and Evolution 233:199-206.
- WALKER, DB 1975 Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) I. Light and scanning electron microscopic study of gynoecial ontogeny. American Journal of Botany 64:457-467.
- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1978 Ultrastructure of non-articulated laticifer: in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L (Asclepiadaceae) American Journal of Botany 65:98-109.

- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1980 Ultrastructure of developing and mature nonarticulated laticifers in the milkweed *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 67:1160-1170.
- WILSON, KJ & MAXAM, TE 1987 Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 74:628-628.
- WOODSON, RE 1954 The North American species of *Asclepias* L. Annals of the Missouri Botanical Garden 41:1-211.
- WOODSON, RE & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. Bulletin of the Torrey Club 65:135-166.
- WYATT, R & SHANNON, TR 1986 Nectar production and pollination of *Asclepias exaltata*. Systematic Botany 11:326-334.

## Discussão e conclusões gerais

Apocynaceae s.l. é uma família grande e diversa, composta por 424 gêneros e cerca de 4800 espécies (Mabberley 1997; Endress & Bruyns 2000). Seus representantes possuem importância econômica ou medicinal devido à presença de algumas classes de metabólitos secundários (Rizzini & Mors 1976, Joly 1977; Judd *et al.* 1999; Simões *et al.* 2004). Os mais variados compostos estão presentes nos integrantes desta família devido à existência de vários tipos de estruturas secretoras envolvidas na sua produção, tanto em órgãos vegetativos quanto em reprodutivos, como tricomas, idioblastos, cavidades, laticíferos, coléteres, cabeça dos estiletes, nectários e osmóforos (Solereder 1908; Woodson & Moore 1938; Metcalfe & Chalk 1950, 1979 1983; Fallen 1986; Kunze 1991, 1995, 1997; Thomas 1991; Endress 1994).

Dentre as estruturas secretoras, os coléteres se destacam pela sua ampla ocorrência e importância taxonômica para a família. Até o momento, coléteres foram registrados em 74 gêneros de Apocynaceae s.l. e mencionados nas descrições taxonômicas de membros das cinco subfamílias (Woodson 1935; Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Pereira & Silva 1974; Silva *et al.* 1975; Morillo 1978, 1995; Arekal & Ramakrishna 1980; Fjell 1983; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989 a,b,c, 1990, 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Endress & Bruyns 2000; Rio 2001; Ric *et al.* 2002, 2005; Simões 2004). Entretanto, a presença de coléteres não é universal nesta família. *A. australe* e *A. tomentosum* não possuem coléteres nos órgãos vegetativos nem nos reprodutivos. Embora não haja relato anatômico sobre sua presença em órgãos vegetativos de espécies de *Aspidosperma*, coléteres foliares já foram registrados em 13 gêneros de Rauvolfioideae (Mia 1960; Ramayya & Bahadur 1968; Mello Filho 1973; Barros 1989; Thomas & Dave 1989a,b, 1990, 1991; Thomas 1991), inclusive em *Alstonia* e *Vallesia* que também pertencem a Alstonieae (Endress &

Bruyns 2000). Coléteres calicinais também já foram observados em *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989b, 1990).

Membros de outras tribos de Rauvolfioideae também caracterizadas pela ausência de coléteres calicinais (Endress & Bruyns 2000) já tiveram sua presença registrada na revisão de Thomas (1991) em flores de *Catharanthus*, *Chilocarpus*, *Condylocarpon*, *Kopsia*, *Rauvolfia*, *Rhazia* (= *Amsonia*) e *Vinca*. Coléteres caducos também podem levar a uma descrição incorreta das flores, como em *Rhodocalyx rotundifolius*, onde os coléteres calicinais estão presentes apenas nos botões florais; não sendo encontrados em flores maduras (Koch & Kinoshita 1999). Esse fato evidencia, que a anatomia pode contribuir de forma relevante para os estudos sistemáticos; como é o caso dos coléteres. O presente estudo confirmou anatomicamente, que coléteres não estão presentes em *A. australe* e *A. tomentosum*. A ausência de coléteres em *Aspidosperma* indica sua ancestralidade na tribo e, conseqüentemente, na família. Novos estudos anatômicos em outros representantes de Rauvolfioideae e de Alstonieae são necessários para se verificar a sua ocorrência em outros gêneros da subfamília ou, principalmente, da tribo.

*B. bicuspidatum* possui coléteres foliares e calicinais, que já foram observados em outros 19 gêneros de Asclepiadoideae (Woodson 1935; Metcalfe & Chalk 1950; Pereira & Silva 1974; Silva *et al.* 1975; Morillo 1978, 1995; Arekal & Ramakrishna 1980; Kuriachen & Dave 1989; Thomas 1991).

Os coléteres foliares foram encontrados em posição interpeciolar e peciolar e os calicinais, solitários ou em grupos, alternos às lacínias do cálice. Coléteres calicinais alternos também foram registrados em outros dez gêneros de Apocynaceae *s.l.* (Rao & Ganguli 1963; Sennblad *et al.* 1998; Simões 2004). Esta característica foi considerada basal e a presença de coléteres opostos às sépalas, como derivada por Woodson e Moore (1938). Entretanto, *Blepharodon*, que pertence à tribo mais derivada da família, possui coléteres alternos.

*B. bicuspidatum* possui variação de número de coléteres foliares e florais. Os interpeciolares variam de seis a sete por nó, os peciolares, de dois a três por folha e os calicinais, de cinco a 15 por flor. Variações quanto ao número também já foram registrados em *Blepharodon hatschbachii* (Pereira & Silva 1974), *B. colombianum* (Morillo 1978) e *B. polydori* (Morillo 1995), além de *Allamanda cathartica*, *Beaumontia grandiflora*, *Funtumia elastica*, *Mandevilla sanderi*, *Strophanthus emini* e *Thevetia* (Ramayya & Bahadur 1968; Hifny Saber *et al.* 1969 *apud* Thomas 1991; Fjell 1983; Thomas & Dave 1989a; Sennblad *et al.* 1998). O número de coléteres de *B. bicuspidatum* varia independentemente da localização geográfica, ao contrário do proposto por Thomas (1991).

Embora a maioria dos coléteres de Apocynaceae *s.l.* seja descrita como do tipo padrão (Thomas 1991, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Rio 2001, Rio *et al.* 2002) recentemente, tipos inéditos de coléteres foram descritos para *Prestonia coalita* (Rio 2001), *Forsteronia glabrescens* (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla pycnantha*, *M. scabra*, *M. tenuifolia* e *Mesechites mansoana* (Simões 2004). *B. bicuspidatum* possui quatro tipos inéditos: 1. cônico pedunculado (íntegro ou bífido); 2. cônico séssil; 3. laminar séssil inteiro e 4. laminar séssil (bi-) tripartido (na base ou no ápice). Coléter partido próximo à base também já foi descrito em *Holarrhena antidysenterica* (Rao & Ganguly 1963), como fimbriado em *Prestonia coalita* (Rio 2001) e bifurcado em *Mandevilla pycnantha* e *M. tenuifolia* (Simões 2004). Coléteres partidos estão sendo encontrados em outras espécies (Martins 2003-2007) e aparentemente não são incomuns dentre as espécies brasileiras.

Os coléteres interpeciolares, peciolares e calicinais de *B. bicuspidatum* são formados por epiderme secretora unisseriada em paliçada e um eixo de células parenquimáticas não secretoras. Em geral, os coléteres possuem uma epiderme unisseriada (Thomas 1991). Os coléteres interpeciolares de *B. bicuspidatum* são pedunculados, enquanto os peciolares e calicinais são sésseis. Em *Prestonia coalita* (Rio

2001) e *Mesechites mansoana* (Simões 2004), os coléteres calicinais também não possuem pedúnculo.

Woodson e Moore (1938) descreveram os coléteres calicinais de Apocynaceae como sendo normalmente desprovidos de vascularização, como são todos os coléteres de *B. bicuspidatum*. Contudo, coléteres calicinais vascularizados já foram observados em *Aganosma*, *Funtumia*, *Holarrhena*, *Nerium*, *Strophanthus*, *Vallaris* e *Wrightia* (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Dave *et al.* 1987; Thomas & Dave 1989c).

A presença de tecido vascular também pode variar até mesmo entre os diferentes tipos de coléteres foliares. Em *Mandevilla*, os coléteres interpeciolares não possuem vascularização e os foliares podem ter ou não dependendo da sua proximidade do traço vascular (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Em *Prestonia coalita*, apenas os coléteres intercalares possuem vascularização (Rio *et al.* 2002).

Idioblastos portando cristais do tipo drusa e laticíferos foram encontrados no parênquima dos coléteres de *B. bicuspidatum*. Embora a presença destas estruturas tenha sido considerada como modificações estruturais de alguns coléteres de Apocynaceae (Thomas 1991), cristais também são observados em outros órgãos destas mesmas plantas e laticíferos ocorrem em todas as Apocynaceae *s.l.* Portanto, a sua presença nesta estrutura é tão normal quanto em qualquer outro órgão, não devendo ser considerada uma modificação estrutural.

Embora os coléteres calicinais tenham sido considerados de importância taxonômica por terem posição, forma e número suficientemente constantes (Woodson & Moore 1938) e sua presença seja utilizada como caráter distintivo em chaves de identificação em níveis genérico e específico (Barroso 1986; Rio 2001), o único caráter constante dos coléteres de *B. bicuspidatum* é a posição. O polimorfismo destes coléteres impede que eles sejam utilizados como caráter taxonômico no momento e novos estudos em representantes de Asclepiadoideae são necessários para que se possa verificar o seu potencial taxonômico nesta subfamília.



Estes coléteres se destacam dos demais Apocynaceae não só pelo seu polimorfismo, como também por sua ontogênese e composição do exsudato. Os coléteres foliares de *B. bicuspidatum* são totalmente verdes no início, possuem o pedúnculo verde e a porção secretora amarelada durante toda a fase secretora e tornam-se acastanhados conforme senescem do ápice para a base.

Os coléteres calicinais se formam nos primeiros estádios do desenvolvimento floral, como observado em outras espécies da família. Entretanto, os foliares possuem um desenvolvimento assincrônico e têm origens distintas. Os coléteres interpeciolares começam a ser formados no primeiro nó, a partir de projeções da base dos primórdios foliares (estípulas) que se fundirão formando um arco do qual se originam os coléteres interpeciolares. A existência desse arco interconectando os pecíolos só foi registrada para *Mandevilla bridgesii* (Woodson & Moore 1938; prancha 3, figura 3), onde também foi considerado de natureza estipular. O desenvolvimento dos coléteres peciolares só se inicia no terceiro nó, a partir de grupos de células meristemáticas na região adaxial do pecíolo próximo à lâmina foliar. No nó seguinte, os coléteres interpeciolares já estão em fase secretora; porém, os peciolares só iniciarão esta fase no quinto nó. A duração da fase secretora dos coléteres foliares varia sazonalmente de acordo com a expansão dos respectivos órgãos em que estão inseridos; na primavera e verão, eles permanecem em atividade secretora até o 12º nó, enquanto no outono e inverno, até cerca do sétimo nó. Nos coléteres calicinais não há variação sazonal; os coléteres começam a secretar no segundo estágio do desenvolvimento floral (cerca de 1 mm) e cessam sua atividade no último estágio.

Após a senescência, usualmente os coléteres retêm sua forma (Thomas 1991), mas em *B. bicuspidatum*, assim como em *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), os coléteres foliares se contraem do ápice para a base até desconectarem (coléteres caducos) dos respectivos órgãos. A senescência do ápice para a base já foi observada em *Aganopsis caryophyllata* (Dave *et al.* 1987), *Calotropis* (Kuriachen & Dave 1989), *Roupelia grat*

(Thomas *et al.* 1989), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. pohliana*; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Já os coléteres calicinais de *B. bicuspidatum* são persistentes, mantêm sua forma e a fase pós-secretora é observada em flores em pós-antese.

Os coléteres foliares e calicinais não se distinguem apenas pelo tipo como também pela secreção. A secreção de aspecto viscoso dos coléteres foliares é branca, enquanto a secreção dos calicinais é incolor. A secreção dos coléteres foliares é composta por mucilagem e compostos fenólicos lipofílicos, enquanto a dos calicinais possui mucilagem, ácidos graxos e compostos fenólicos lipofílicos. Esta secreção heterogênea é produzida ao longo de toda a fase secretora dos coléteres.

A secreção de todos os coléteres de *B. bicuspidatum* se acumula em um espaço periplasmático antes de ser liberada para o meio externo através da parede e da cutícula. Este não é o mecanismo mais comum; segundo Fahn (1990), normalmente a secreção dos coléteres é liberada por ruptura da cutícula.

A função dos coléteres é proteger os meristemas do dessecação e esta função protetora tem sido bem estabelecida em Apocynaceae (Thomas & Dave 1989a,b). Os coléteres de *B. bicuspidatum* possuem outras funções além da lubrificação das gemas, como proteger os ramos vegetativos imobilizando fitófagos e as flores, contra a proliferação de fungos. Estas funções complementares mostram, que a espécie possui não só a defesa interna dos laticíferos, como também uma defesa externa. Os coléteres foliares estão presentes nos órgãos apenas enquanto estes estão se desenvolvendo, tendo, portanto, a função de lubrificação. Entretanto, os coléteres calicinais continuam secretando mesmo depois da flor estar totalmente formada e em pós-antese; portanto, mesmo não havendo mais regiões meristemáticas, os coléteres continuam ativos, não mais como produtores de secreção lubrificante, mas como protetores contra fungos. Além disso, a análise histoquímica detectou a constante produção de compostos fenólicos, que reconhecidamente impedem o crescimento de

fungos. De acordo com estes dados, os coléteres de *B. bicuspidatum* são estruturas de proteção externa, contra o dessecação, fitófagos e a proliferação de fungos.

Com relação à estrutura floral, as Apocynaceae s.l. possuem uma grande variação que se inicia nas Rauvolfioideae, com as flores menos especializadas da família, passa pelas Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e culmina nas Asclepiadoideae, que apresentam as flores mais complexas e elaboradas de todas as dicotiledôneas (Endress 1994; Endress & Bruyns 2000). Estas diferenças puderam ser observadas através da análise estrutural das flores de *A. australe* e *B. bicuspidatum* que se encontram nos extremos da família. Enquanto *A. australe*, possui estrutura floral simples e apresenta apenas dois sítios secretores, *B. bicuspidatum* tem uma flor complexa e seis sítios secretores.

A cabeça dos estiletos está presente em todos os membros da família e é uma estrutura muito utilizada na taxonomia (Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000) principalmente com relação a sua adnação aos estames formando o ginostégio (Endress 1994). Esta é uma das características mais úteis para a classificação das Apocynoideae; entretanto, ela não está presente nas Rauvolfioideae e a delimitação de suas tribos é baseada quase exclusivamente em caracteres de fruto (Endress & Bruyns 2000). O único gênero que possui alguma estrutura unida à cabeça dos estiletos nesta subfamília é *Thevetia*, onde a cabeça dos estiletos, por fusão posgênita, é adnata com apêndices infraestaminais do tubo da corola (Endress *et al.* 1996; Endress & Bruyns 2000).

A cabeça dos estiletos de *A. australe* e de *B. bicuspidatum* apresenta muitas diferenças. Em *A. australe*, há um par de apêndices apicais, a porção secretora é formada por epiderme unisseriada, com longas células livres entre si (tricomas), que recobre toda a cabeça dos estiletos, exceto os apêndices apicais. Em *B. bicuspidatum* a cabeça dos estiletos não possui apêndices apicais, a porção secretora também é formada por epiderme unisseriada, mas as células estão dispostas em paliçada e

região secretora se restringe à porção lateral da cabeça dos estiletes, alterna às anteras em quase todo o desenvolvimento floral. Em *A. australe*, a fusão dos estiletes e, conseqüente formação da cabeça dos estiletes, é tardia em relação à de *B. bicuspidatum*; esta constatação corrobora a relação feita por Fallen (1986) de que nos gêneros mais derivados a fusão ocorre primeiro. A estrutura da cabeça dos estiletes de *A. australe* foi considerada como do tipo 1, segundo a classificação de Fallen (1986), que é o tipo mais basal e que ocorre apenas em alguns gêneros de Rauvolfioideae. Em *A. quebracho-blanco* e *Geissospermum laeve* (Alstonieae) também foi observado a mesma estrutura da cabeça dos estiletes encontrada no presente estudo (Fallen 1986; Lin & Bernardello 1999).

A secreção nas duas espécies estudadas também é distinta. A secreção de *A. australe* é viscosa e envolve os tricomas tectores presentes no tubo da corola e a própria cabeça dos estiletes, formando uma rede que retém os grãos de pólen. Em *B. bicuspidatum*, a cabeça dos estiletes forma o translador que se prende às polínias originando o polinário. A produção de uma secreção viscosa pela epiderme da cabeça dos estiletes é característica de Rauvolfioideae e Apocynoideae; enquanto em Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae há a formação do translador (Kunze 1994). A função do translador está bem definida para estas três subfamílias, mas a função da secreção da cabeça dos estiletes do tipo 1 e a posição de seu estigma precisam de comprovação. Segundo Fallen (1986) e Lin e Bernardello (1999), a epiderme secretora da cabeça dos estiletes de *A. quebracho-blanco* e *Geissospermum laeve*, além de produzir a substância adesiva, também possui a função de estigma, mas nenhum deles comprova este fato através de ilustrações. Em *A. australe*, germinação de pólen e penetração do tubo polínico não foi observado em nenhuma das flores seccionadas, não sendo possível localizar o estigma. Já em *B. bicuspidatum*, assim como nas demais Asclepiadoideae, o estigma está localizado na parte inferior da cabeça dos

estiletes (Endress & Bruyns 2000) e tubos polínicos foram observados penetrando este local.

Os laticíferos também têm ocorrência universal nas Apocynaceae *s.l.* Eles estão presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos. Em *A. australe* e *B. bicuspidatum*, eles são do mesmo tipo, mas apresentam diferenças quanto à estrutura e à distribuição. Os laticíferos de *A. australe* são articulados anastomosados, quase exclusivamente retilíneos e praticamente não têm ramificações. Eles são formados no meristema fundamental e/ou no procâmbio e estão presentes em todas as peças florais, mas não ocorrem nos óvulos nem no parênquima medular do pedicelo. Em *B. bicuspidatum*, os laticíferos também são articulados anastomosados, mas, com exceção dos presentes na medula do pedicelo, são muito sinuosos e com muitas ramificações. Eles são formados a partir de meristema fundamental e/ou procâmbio, estão presentes em todas as peças florais e só não ocorrem nos óvulos. A ausência de laticíferos no parênquima medular do pedicelo de *A. australe* contraria a distribuição dos laticíferos florais descritos até o momento (Murugan & Inamdar 1987a,b; capítulo 2), mas devido ao pequeno número de espécies estudadas, ainda não se pode ter certeza se esta distribuição distinta pode ter significado taxonômico. Os laticíferos de ambas as espécies são polinucleados e a parede dos laticíferos de *A. australe* não apresenta substância incrustante (calose) como sugerido por Fahn (1990) ou adcrustante (suberina), como observado nos laticíferos de Convolvulaceae, para selar o sistema, sendo constituída apenas por substâncias pecto-celulósicas. A composição da parede dos laticíferos de *A. australe* varia durante seu desenvolvimento, como observado em *Asclepias speciosa* (Serpe *et al.* 2001).

Em geral, os laticíferos das Apocynaceae são muito extensos e classificados como não articulados (Metcalfe 1967; Giordani 1978; Wilson & Mahlberg 1978, 1980; Murugan & Inamdar 1987a,b; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Mahlberg 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Embora, logo abaixo de suas terminações eles

sejam contínuos, através de análise cuidadosa, pode-se encontrar paredes terminais, revelando seu verdadeiro tipo e forma de crescimento. Incongruências com relação a estas duas características são observadas em *Cryptostegia grandiflora* e *Nerium oleander* (Blaser 1945; Milanez 1959, 1960-1, 1966, 1977; Mahlberg 1961, 1963; Stockstill & Nessler 1986). Este fato mostra a importância de se estudar a ontogênese dos laticíferos para se identificar o seu tipo. Com os resultados obtidos em *A. australe* e *B. bicuspidatum*, laticíferos articulados anastomosados de rápida dissolução das paredes terminais foram registrados em quatro das cinco subfamílias de Apocynaceae s.l. - Rauvolfioideae (*Aspidosperma*), Apocynoideae (*Nerium*), Periplocoideae (*Cryptostegia*) e Asclepiadoideae (*Blepharodon*). Novos estudos são necessários para se verificar qual é o tipo de laticífero predominante na família e se outros extensos laticíferos descritos como não articulados poderiam ter o mesmo tipo de formação encontrado no presente trabalho.

Os laticíferos têm como principais funções, proteger a planta contra herbivoria, microorganismos e selar ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrel *et al.* 1991; Hunter 1994). A presença de laticíferos está diretamente relacionada com o sucesso das plantas no ambiente, pois tanto os órgãos vegetativos quanto os reprodutivos não são predados e, conseqüentemente, podem se estabelecer melhor que as plantas não latexcentes nos mais variados ambientes. Farrell *et al.* (1991) também considerou as plantas produtoras de látex e resina como sendo mais bem sucedidas que os grupos relacionados que não os produzem.

Embora os laticíferos estejam presentes em todas as Apocynaceae s.l. e que sua principal função seja de defesa, alguns gêneros também possuem outras estruturas de defesa internas. Embora de ocorrência restrita, **idioblastos secretores** foram registrados em gêneros de Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae (Tabela 1). Eles não foram observados em órgãos vegetativos nem em flores de *A. australe*, *A. tomentosum* e *B. bicuspidatum*. Outros trabalhos anatômicos de espécies de

*Aspidosperma* (Milanez 1938, 1939; Morretes & Ferri 1959; Valente & Carvalho 1973; Santos & Grisi 1976; Prazeres & Alves 1980; Ferraz & Pimenta 1988; Lin & Bernardello 1999; Rebollar & Quintanar 2000) e *Alstonia* (Mueller 1985; Thomas & Dave 1989b) também não registraram a ocorrência deste tipo de idioblasto, que parece estar ausente na tribo Alstonieae. A ocorrência de idioblastos produtores de compostos fenólicos parece estar melhor definida. Em Apocynoideae, eles estão restritos às tribos Apocyneae e Mesechiteae (Tabela 1). Estudos em *Prestonia* (Rio 2001) e *Temnadenia* (Martins 2003-2007) mostram que estes idioblastos estão ausentes na tribo Echiteae. Embora haja poucos dados até o momento, a presença de idioblastos produtores de compostos fenólicos nestas espécies pode contribuir na delimitação das tribos desta subfamília. Em Asclepiadeae, não há um padrão de presença de idioblastos em nível de tribo, mas de acordo com as subtribos (Rapini *et al.* 2003), *Glossonema* é Glossonematinae e *Pentatropis* é Astephaninae, enquanto *Blepharodon* é Metastelmatinae. Somente com mais estudos de representantes das subtribos de Asclepiadeae será possível verificar se a ocorrência de idioblastos de conteúdo fenólico está restrita a algumas subtribos, como ocorre nas tribos de Apocynoideae, e se possui valor taxonômico.

**Tabela 1.** Idioblastos presentes em Apocynaceae s.l., classificação segundo Endress e Bruyns (2000). Dados baseados em Metcalfe e Chalk (1950), Rio (2001-2004), Martins (2003-2007) e Simões (2004).

Subfamília	Tribo	Com secreção semelhante a látex	Óleo ou mucilagem	Compostos fenólicos
Rauvolfioideae	Vinceae	<i>Kopsia</i>		
	Tabernaemontaneae	<i>Tabernaemontana</i>	<i>Stemmadenia</i> , <i>Voacanga</i>	
Apocynoideae	Apocyneae	<i>Cleghornia</i>		<i>Forsteronia</i> , <i>Odontadenia</i>
	Mesechiteae			<i>Macrosiphonia</i> , <i>Mandevilla</i> , <i>Mesechites</i> , <i>Secundaria</i>
	Echiteae	<i>Echites</i>		
	Ceropegieae			<i>Leptadenia</i>
Asclepiadoideae	Asclepiadeae			<i>Glossonema</i> , <i>Pentatropis</i>



A flor de *A. australe* ainda apresenta outras duas estruturas que devem ser destacadas. Na face interna do terço basal do tubo da corola, tricomas corolinos de estrutura intermediária entre glandulares e tectores são encontrados. Estes tricomas são unicelulares, com a porção apical alargada, onde se observa um espaço periplasmático - característico de tricomas glandulares. Entretanto, estes tricomas possuem cutícula espessa e ornamentada - características encontradas em tricomas tectores. Embora eles tenham desenvolvimento assincrônico e todas as suas fases sejam encontradas numa mesma flor, nenhum tipo de secreção foi encontrado. Estudos histoquímicos são necessários para se verificar se estes tricomas são ou não secretores.

Células epidérmicas alongadas originadas da placenta também foram encontradas. Embora experimentos para verificar sua função não tenham sido efetuados, sua estrutura, origem e posição levam a crer que este seja um obturador placentário, cuja função é guiar o tubo polínico até a micrópila. Novos estudos são necessários para se verificar a função deste tecido que, se for realmente um obturador, terá sua presença registrada pela primeira vez na família. Além disso, a presença de obturador é uma das características que distingue as Rubiaceae das demais Gentianales (Backlund *et al.* 2000).

Osmóforo também não foi encontrado em *A. australe*, embora as flores sejam aromáticas. Segundo Lin e Bernardello (1999), o osmóforo de *A. quebracho-blanco* está localizado na corola, mas não comprovou esta afirmação com ilustrações. Eles já foram registrados em outras espécies, mas não foram descritos anatomicamente (Endres: 1994; Torres & Galetto 1998). Novos estudos são necessários para se localizar o sítio secretor da fragrância floral de *A. australe*.

*B. bicuspidatum* apresenta outras estruturas secretoras, que refletem seu complexo mecanismo de polinização.

A epiderme secretora da ala da antera nunca foi descrita para Apocynaceae *s.l.* Apenas em *Matelea reticulata* foi mencionada uma estrutura similar; porém, ela foi chamada de "pad" e não foi considerada secretora (Kunze 1995). Esta estrutura possui uma camada de células epidérmicas secretoras em paliçada e tem sua formação, fase secretora e senescência antes da antese. Devido à sua posição, sugere-se que a secreção desta estrutura seja adicionada à secreção da câmara estigmática.

A posição do nectário é controversa em *Aspidosperma* e nas Asclepiadoideae. Segundo Lin e Bernardello (1999), há um nectário inconspícuo não funcional ao redor do ovário de *A. quebracho-blanco* e nectários extraflorais não estruturados estão presentes no cálice e corola. No presente estudo, não foi observado tecido nectarífero em nenhum verticilo floral nem anel ao redor do ovário. Embora haja nectário em forma de anel na maioria das Rauvolfioideae e Apocynoideae (Woodson & Moore 1938), ele parece estar ausente em *Aspidosperma*.

Em Asclepiadoideae, o tecido nectarífero pode ocorrer em diversas regiões, mas sua localização primária é no tubo dos filetes (Galil & Zeroni 1965; Christ & Schnepf 1985; Kunze & Liede 1991; Kunze 1991, 1995, 1997; Vieira 1998; Vieira & Shepherd 2002). Na descrição da subfamília feita por Endress e Bruyns (2000), há cinco nectários atrás das cinco fendas anterais no tubo dos filetes. Muitas vezes, como neste caso, o nectário corresponde ao tecido que reveste a câmara estigmática (Galil & Zeroni 1965; Kevan *et al.* 1989; Kunze 1997). A partir do trabalho de Galil e Zeroni (1965) com *Asclepias curassavica*, passou a se admitir que há apenas cinco nectários (no tubo dos filetes) e que a secreção encontrada na corona estaminal é o néctar que flui através de passagens capilares até ela. Este ponto de vista foi adotado pelos autores subsequentes (Eisikowitch 1986; Kevan *et al.* 1989; Kunze 1997). Kunze (1997) chamou a região produtora de nectário primário e a corona estaminal de nectário secundário. Entretanto, segundo o próprio autor, a corona apenas contém o néctar; portanto, ela não deve ser considerada como um outro nectário, mas apenas uma região

contentora da secreção. Apenas com os trabalhos em espécies da subtribo *Gonolobinae* (*sensu* Rapini *et al.* 2003; Kunze 1995, 1999), a existência de tecido secretor na corona foi admitida novamente. Em *B. bicuspidatum*, há tecido secretor na câmara estigmática e na corona estaminal. Abaixo da câmara estigmática, há um espaço delimitado pela corona interestaminal que não possui atividade secretora e é contínuo com a câmara estigmática, formando uma única câmara de posição interestaminal. Através dela, a secreção flui até a base da corona. O oferecimento de néctar na base abaixo da fenda anteral, amplamente distribuído nas *Asclepiadoideae*, foi considerado por Kunze (1997) como um caráter plesiomórfico. Em *B. bicuspidatum*, a secreção que permanece na câmara estigmática promove a germinação dos tubos polínicos da polínia que fica retida pelos tricomas lignificados da fenda anteral. A corona estamina também possui tecido secretor e não tem ligação com a câmara interestaminal.

Tanto a porção secretora da câmara estigmática quanto a da corona estaminal são formadas por uma camada de células epidérmicas secretoras. Nas *Asclepiadoideae*, o nectário pode ser composto por apenas uma camada de células epidérmicas secretoras (Kunze 1991; Kunze & Liede 1991; Kunze 1995) ou pela epiderme e uma a duas camadas subepidérmicas (Christ & Schnepf 1985; Kunze 1999). Todos os trabalhos levantados assumem que a secreção encontrada na câmara estigmática e na corona estaminal é néctar, embora não haja nenhum estudo histoquímico desta secreção e lhe atribuem dupla função: recurso para o polinizador e indutor da germinação do tubo polínico (Galil & Zeroni 1965; Eisikowitch 1986; Kunze 1991).

A escassez de estruturas secretoras na flor de *A. australe* (ausência de coléter e nectário) e o tipo de cabeça dos estiletes encontrado corroboram sua posição basal na família. Endress e Bruyns (2000) consideraram a tribo *Alstonieae*, como a tribo mais basal de *Rauvolfioideae*, caracterizada por uma morfologia floral e do fruto plesiomórfica. Por outro lado, *B. bicuspidatum* é classificado como *Asclepiadeae*, que é a tribo mais derivada de *Asclepiadoideae* (Endress & Bruyns 2000), apresenta

estrutura floral complexa e grande diversidade de estruturas secretoras (dez regiões secretoras das alas das anteras; a epiderme secretora da cabeça dos estiletos; laticíferos em todas as peças florais, exceto os óvulos, e em todos os tecidos exceto a epiderme; cinco a 15 coléteres na base do cálice, alternos às suas lacínias; cinco câmaras estigmáticas delimitadas por epiderme secretora e cinco coronas estaminais com epiderme secretora), evidenciando sua posição derivada na família.

As estruturas secretoras encontradas nas flores de *A. australe* e *B. bicuspidatum* evidenciam a relação entre as duas espécies através de estruturas conservativas, como a presença da cabeça dos estiletos e de laticíferos articulados anastomosados. Por outro lado, a maior diversidade de glândulas florais em *B. bicuspidatum* em relação a *A. australe* e sua estrutura muito mais complexa justificam os seus respectivos posicionamentos nas subfamílias Asclepiadoideae (derivada) e Rauvolfioideae (basal) em Apocynaceae s./.

## Referências bibliográficas

- AGUIAR, S 2003 Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ALLORGE, L & POUPAT, C 1991 Position systématique èt revision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trios Guyanes. Le point sur leur etude chimique. Bulletin de la Societe Botanique de France (Lettres Botaniques) 138:267-301.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 1997 Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B & ESTELITA, MEM 2000 Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23:113-120.
- AREKAL, GD & RAMAKRISHNA, TM 1980 Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. *Phytomorphology* 30:303-306.
- BACKLUND, M; OXELMAN, B & BREMER, B 2000 Phylogenetic relationships within the Gentianales based on NDHF and RBCL sequences, with particular reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany* 87:1029-1043.
- BANERJEE, JN & LEWIS, JJ 1953 Pharmacology of the alkaloids of *Aspidosperma oblongum* A.DC. *Nature* 171:802.
- BARROS, CF 1989 *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae). *Anatomia foliar. Rodriguesia* 38-40:25-31.
- BARROSO, GM 1986 *Sistemática de angiospermas do Brasil. Vol. III, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária.*
- BLASER, HW 1945 *Anatomy of Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. *American Journal of Botany* 32:135-141.
- BOLZANI, V da S; SERUR, LM; MATOS, FJ de A & GOTTLIEB, OR 1987 Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. *Biochemical Systematics and Ecology* 15:187-200.
- CHRIST, P & SCHNEPF, E 1985 The nectaries of *Cynanchum vincetoxicum* (Asclepiadaceae). *Israel Journal of Botany* 34:79-90.
- CHRISTIANO, J de CS 2002 *Respostas cecidogênicas no modelo Aspidosperma australe* (Apocynaceae) – *Pseudophacopteron* sp (Homoptera: Phacopteronidae). São Paulo, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- CRONQUIST, A 1981 An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press.
- DAVE, Y; THOMAS, V & KURIACHEN, PM 1987 Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.
- EISIKOWITCH, D 1986 Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in Israel. Plant Systematics and Evolution 152:185-194.
- ENDRESS, PK 1994 Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.
- ENDRESS, ME & BRUYNS, PV 2000 A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.
- ENDRESS, ME; SENNBAD, B; NILSSON, S; CIVEYREL, L; CHASE, MW; HUYSMANS, S; GRAFTON, E & BREMER, B 1996 A phylogenetic analysis of Apocynaceae *s.str.* and some related taxa in Gentianales: a multidisciplinary approach. Opera Botanica Belgica 7:59-102.
- FAHN, A 1979 Secretory tissues in plants. London, Academic Press Inc.
- FAHN, A 1990 Plant anatomy. 4<sup>th</sup> ed., Oxford, Pergamon Press.
- FALLEN, ME 1986 Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanische Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FARRELL, BD; DUSSOURD, DE & MITTER, C 1991 Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.
- FERRAZ, CL de A & PIMENTA, ISM 1988 Anatomia foliar de *Aspidosperma pyricollum* Muell. Arg. (Apocynaceae). Bradea 5:108-124.
- FJELL, I 1983 Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia*

- peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3:383-392.
- FORMIGA, AT; GONÇALVES, SJ de MR; ISAÍAS, M dos S & SOARES, GLG 2001 Desenvolvimento das galhas foliares de *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex Muell Arg. (Apocynaceae). 52º Congresso Nacional de Botânica, Resumos:103.
- GALETTO, L 1997 Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192:197-207.
- GALIL, J & ZERONI, M 1965 Nectar system of *Asclepias curassavica*. *Botanical Gazette* 126:144-148.
- GARCIA, RF & BROWN, KS 1976 Alkaloids of 3 *Aspidosperma* species. *Phytochemistry* 15:1093-1095.
- GILBERT, B 1966 Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 38(Suplemento):315-319.
- GIORDANI, R 1978 Autophagie cellulaire et differenciation des laticifères non articulés chez une Asclepiade. *Biologie Cellulaire* 33:253-260.
- GOMES, SM & CAVALCANTI, TB 2001 Morfologia floral de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae). *Acta Botanica Brasilica* 15:73-88.
- HUNTER, JR 1994 Reconsidering the functions of latex. *Trees* 9:1-5.
- INAMDAR, JA; MOHAN, JSS & SUBRAMANIAN, RB 1985 Extrafloral nectaries of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall ex G. Don. Development, ultrastructure and secretion. *Trends in Plant Research*. 137-148.
- INAMDAR, JA; MURUGAN, V & SUBRAMANIAN, RB 1988 Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. *Annals of Botany* 62:583-588.
- ISAÍAS, RM dos S; SOARES, GLG; CHRISTIANO, J de CS & GONÇALVES, SJ de MR 2000 Análise comparativa entre as defesas mecânicas e químicas de

*Aspidosperma australe* Müell. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Müell. Arg. contra herbivoria. *Floresta e Ambiente* 7:19-30.

JOLY, AB 1977 Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. 4ª Edição, São Paulo, Companhia Editora Nacional.

JUDD, WS; CAMPBELL, CS; KELLOGG, EA & STEVENS, PS 1999 Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland, Sinauer Associates.

JUDD, WS; SANDERS, RW & DONOGHUE, MJ 1994 Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany* 5:1-51.

KEVAN, PG; EISIKOWITCH, D & RATHWELL, B 1989 The role of nectar in the germination of pollen in *Asclepias syriaca* L. *Botanical Gazette* 150:266-270.

KOCH, I & KINOSHITA, LS 1999 A família Apocynaceae na região de Bauru, SP-Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 13:61-86.

KUNZE, H 1991 Structure and function in asclepiad pollination. *Plant Systematics and Evolution* 176:227-253.

KUNZE, H 1993 Evolution of the translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. *Plant Systematics and Evolution* 185:99-122.

KUNZE, H 1994 Ontogeny of the translator in Asclepiadaceae *s.str.* *Plant Systematics and Evolution* 193:223-242.

KUNZE, H 1995 Floral morphology of some Gonolobeae (Asclepiadaceae). *Botanische Jahrbücher für Systematik* 117:211-238.

KUNZE, H 1997 Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). *Flora* 192:175-183.

KUNZE, H 1999 Pollination ecology in two species of *Gonolobus* (Asclepiadaceae). *Flora* 194:309-316.



- KUNZE, H & LIEDE, S 1991 Observations on pollination in *Sarcostemma* (Asclepiadaceae). *Plant Systematics and Evolution* 178:95-105.
- KURIACHEN, PM & DAVE, Y 1989 Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). *Journal of Phytological Research* 2:7-14.
- LIN, S & BERNARDELLO, G 1999 Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Science* 160:869-878.
- LYON, RL; FONG, HS & FARNSWORTH, NR 1972 Study on alkaloids of leaves of *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae). *Lloydia* 35:467.
- MABBERLEY, DJ 1997 *The plant-book*. 2 ed., Cambridge University Press.
- MAHLBERG, PG 1961 Embryogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. *American Journal of Botany* 48:90-99.
- MAHLBERG, PG 1963 Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. *Botanical Gazette* 124:224-231.
- MAHLBERG, PG 1993 Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* 59:1-23.
- MARCONDES-FERREIRA, W 1991 Novos taxa para o gênero *Aspidosperma* Mart., nom. cons. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 14:127-132.
- MARCONDES-FERREIRA, W 1999 A new species of *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae) from Bahia, Brazil. *Brittonia* 51:74-76.
- MARCONDES-FERREIRA, W & KINOSHITA, LS 1996 Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de*

Botânica 19:203-214.

MARTINS, FM 2003-2007 Glândulas foliares e florais em espécies de Apocynaceae de cerrado. Projeto de Tese de Doutorado.

MELLO FILHO, LE de 1973 Novas observações sobre as espécies americanas do gênero *Rauwolfia* (Plum.) L. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Biologia 33:507-520.

METCALFE, CR 1967 Distribution of latex in the plant kingdom. Economic Botany 21:115-127.

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

METCALFE, CR & CHALK, L 1979 Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2<sup>nd</sup> ed., v. 1, Oxford, Claredon Press.

METCALFE, CR & CHALK, L 1983 Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction. 2<sup>nd</sup> ed., v. 2, Oxford, Claredon Press.

MIA, AJ 1960 Structure of the shoot apex of *Rauwolfia vomitoria*. Botanical Gazette 122:121-124.

MILANEZ, FR 1938 Anatomia do lenho de *Aspidosperma aquaticum* Ducke. Archivos do Instituto de Biologia Vegetal 4:65-70.

MILANEZ, FR 1939 Estudo anatômico do lenho de trinta espécies do gênero *Aspidosperma*. Physis 15:429-90.

MILANEZ, FR 1959 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - I. Embrião. Rodriguésia 21/22:347-394.

- MILANEZ, FR 1960-1 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária (Asclepiaceae) Rodriguésia 35/36:99-128.
- MILANEZ, FR 1966 Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - III. Nota sobre a estrutura secundária. Rodriguésia 25:335-350.
- MILANEZ, FR 1977 Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium* (*Nerium oleander* L. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975:343-379.
- MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1986 Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- MORILLO, G 1978 Tres especies nuevas de *Blepharodon* Dcne. Acta Botanica Venezuelica 13:75-80.
- MORILLO, G 1995 Tres nuevas especies en las Asclepiadaceae sudamericanas Caldasia 17:413-418.
- MORILLO, G 1997 Asclepiadaceae, In J.A. Steyermark, P.E. Berry & B.K. Holst (eds) Flora of the Venezuelan Guayana. Saint Louis, Missouri Botanical Garden, vol. 3, p 129-177.
- MORRETES, BL & FERRI, MG 1959 Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo 7-70.
- MUELLER, RJ 1985 Determinate branch development in *Alstonia scholaris* (Apocynaceae): the plagiotropic module. American Journal of Botany 72:1435-1444.
- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987a Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.

- MURUGAN, V & INAMDAR, JA 1987b Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences) 97:25-31.
- PICHON, M 1948 Classification des Apocynacées: XIX. Le rétinacle des Echitoidées. Bulletin du Museum National D'Histoire Naturelle 22:211-216.
- PRAZERES, S do M & ALVES, JL de H 1980 Alguns aspectos do desenvolvimento estrutural e fisiológico de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae). Brasil Florestal 43:35-40.
- PEREIRA, JF & SILVA, NMF da 1973 Estudos em Asclepiadaceae. IV - *Blepharodon* Decaisne. Revista Brasileira de Biologia 33:77-86.
- PEREIRA, JF & SILVA, NMF 1974 Estudos em Asclepiadaceae. V. Uma nova espécie de *Blepharodon* Decne. Boletim do Museu Botânico Municipal 18:1-3.
- RAMAYYA, N & BAHADUR, B 1968 Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.
- RAO, VS & GANGULI, A 1963 Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.
- RAPINI, A; MELLO SILVA, R & KAWASAKI, ML 2001 Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 19:55-169.
- RAPINI, A; CHASE, MW; GOYDER, DJ & GRIFFITHS, J 2003 Asclepiadeae classification: evaluating the phylogenetic relationships of New World Asclepiadoideae (Apocynaceae). Taxon 52:33-50.
- REBOLLAR, S & QUINTANAR, A 2000 Anatomía y usos de la madera de siete árboles tropicales de México. Revista de Biología Tropical 48:569-578.
- RIO, MCS do 2001 Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR.

- nom. cons. (Apocynaceae). Campinas, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas.
- RIO, MCS do 2001-2004 Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey (Apocynaceae) de cerrado. Projeto de Tese de Doutorado.
- RIO, MCS do; CASTRO, M de M & KINOSHITA, LS 2002 Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.
- RIO, MCS do; KINOSHITA, LS & CASTRO, M de M 2005 Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Submetido à Revista Brasileira de Botânica em janeiro/2005.
- RIZZINI, CT & MORS, WB 1976 Botânica econômica brasileira. São Paulo, EPU & USP.
- ROY, AT & DE, DN 1992 Studies on differentiation of laticifers through light and electron microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. Annals of Botany 70:443-449.
- SANTOS, AVP & GRISI, BM 1976 Anatomia foliar ecológica de algumas plantas de caatinga. Revista Brasileira de Biologia 36:773-787.
- SENNBLAD, B & BREMER, B 1996 The familial and subfamilial relationships of Apocynaceae and Asclepiadaceae evaluated with *rbcL* data. Plant Systematics and Evolution 202:153-175.
- SENNBLAD, B; ENDRESS, ME & BREMER, B 1998 Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. American Journal of Botany 85:1143-1158.

- SENNBLAD, B & BREMER, B 2002 Classification of Apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. *Systematic Biology* 51:389-409.
- SERPE, MD; MUIR, AJ & KEIDEL, AM 2001 Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. *Protoplasma* 216:215-226.
- SILVA, NMF; VALENTE, M da C; ALENCASTRO, FMMR de; PEREIRA, JF & SUCRE, BD 1975 Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. - X. Estudos taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. *Revista Brasileira de Biologia* 35(4):745-756.
- SIMÕES, AO 2004 Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP de; MENTZ, LA & PETROVICK, PR 2004 Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- SOLEREDER, H 1908 Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Translated by L.A. Boodle & F.G. Fritsch, 2v., Oxford, Claredon Press.
- STOCKSTILL, BL & NESSLER, CL 1986 Ultrastructural observations on the nonarticulated, branched laticifers in *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). *Phytomorphology* 36:347-355.
- STRUWE, L; ALBERT, A & BREMER, B 1994 Cladistics and family level classification of Gentianales. *Cladistics* 10:175-206.
- SUBRAMANIAN, RB; MURUGAN, V; MOHAN, JSS & INAMDAR, JA 1989 Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some

- Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.
- THOMAS, V 1991 Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68:287-305.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989a Histochemistry and senescence of collectors of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:201-203.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989b The collectors of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1989c Structure, origin, development and senescence of collectors in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1990 Mode of secretion in the collectors of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). Phytom 30:209-212.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1991 Comparative and phylogenetic significance of collectors in Apocynaceae. Feddes Repertorium 102:23-28.
- THOMAS, V & DAVE, Y 1994 Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 63:9-20.
- THOMAS, V; DAVE, Y & MENON, ARS 1989 Anatomy and histochemistry of collectors in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.
- TORRES, C & GALETTO, L 1998 Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127:207-223.

- VALENTE, M da C & CARVALHO, L d'AF 1973 Plantas da caatinga. I - Apocynaceae. Anatomia e desenvolvimento de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. var. *molle* Muell. Arg. - "Pereiro". Revista Brasileira de Biologia 33:285-301.
- VIEIRA, MF 1998 Biologia reprodutiva de espécies de *Oxypetalum* (Asclepiadaceae), na região de Viçosa, MG, sudeste brasileiro. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VIEIRA, MF & SHEPHERD, GJ 2002 *Oxypetalum banksii* subsp. *banksii*: a taxon of Asclepiadaceae with an extragynoecial compitum. Plant Systematics and Evolution 233:199-206.
- WALKER, DB 1975 Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynoecial ontogeny. American Journal of Botany 64:457-467.
- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1978 Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 65:98-109.
- WILSON, KJ & MAHLBERG, PG 1980 Ultrastructure of developing and mature nonarticulated laticifers in the milkweed *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 67:1160-1170.
- WOODSON, RE Jr 1935 The floral anatomy and probable affinities of the genus *Grisebachiella*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 62:471-478.
- WOODSON, RE 1954 The North American species of *Asclepias* L. Annals of the Missouri Botanical Garden 41:1-211.
- WOODSON, RE Jr & MOORE, JA 1938 The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.