



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLOS ANDRÉ ESPOLADOR LEITÃO

“ANATOMIA DOS NECTÁRIOS, DO COLÉTER E DO ESTIGMA
DE *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (ORCHIDACEAE)”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carlos André Espolador Leitão
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Assinatura]

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Campinas, 2007

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

L535a

Leitão, Carlos André Espolador
Anatomia dos nectários, do coléter e do estigma de
Rodriguezia venusta (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae) / Carlos
André Espolador Leitão. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Angelo Luiz Cortelazzo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Rodriguezia*. 2. Orchidaceae. 3. Coléteres. 4.
Anatomia vegetal. 5. Nectários. I. Cortelazzo, Angelo
Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Anatomy of the nectaries, colleter, and stigma of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae).

Palavras-chave em inglês: *Rodriguezia*; Orchidaceae; Colleters; Plant anatomy; Nectaries.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Angelo Luiz Cortelazzo, Fábio de Barros, Beatriz Appezzato-Da-Glória, Aristéia Alves Azevedo, Jane Elizabeth Kraus.

Data da defesa: 31/07/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

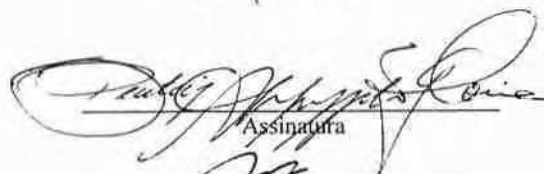
Campinas, 31 de julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

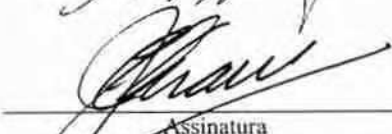
Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo (Orientador)


Assinatura

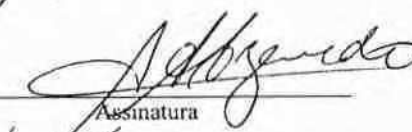
Profa. Dra. Beatriz Appezzato Da Glória


Assinatura

Profa. Dra. Jane Elizabeth Kraus


Assinatura

Profa. Dra. Aristéa Alves Azevedo


Assinatura

Prof. Dr. Fábio de Barros


Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro


Assinatura

Prof. Dr. Giulio Cesare Stancato


Assinatura

Prof. Dr. José Francisco de Souza


Assinatura

No dia 15 de janeiro de 2007, fumei o meu último cigarro.

Assim sendo, dedico esta tese a todos os ex-fumantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Angelo Luiz Cortelazzo, pelos ensinamentos, conselhos e exemplo de conduta profissional, e pela confiança em mim depositada;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, pelo apoio financeiro;

Ao Depto de Ciências Naturais da UESB, pela minha liberação para cursar o doutorado;

À Profª Drª Heidi Dolder, pelos auxílios e pelo “help” na parte de microscopia eletrônica;

Aos Profs. Drª Shirley Recco Pimentel e Dr Edson Rosa Pimentel, pelos conselhos e auxílios em alguns procedimentos de laboratório;

À Profª Drª Marília M. Castro, pelas conversas, conselhos e ensinamentos;

À Drª Samantha Köehler, pela identificação da espécie estudada no presente trabalho;

Às colegas de departamento, Drª Karina Mancini e Drª Uyrá S. Zama, pela ajuda na parte de microscopia eletrônica;

Aos colegas acadêmicos e também orientados do Prof. Angelo Cortelazzo: Dr José Francisco de Souza, à quase doutora Divina A. A. Vilhalva e à recém-doutoranda Viktória Kövesdy Ribeiro, pela amizade, companheirismo e prazeroso convívio no Laboratório de Biologia Celular Vegetal;

Aos colegas do Programa de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural, Sérgio Siqueira Júnior e Gisele Orlandi Introíni, pelo auxílio com as artes gráficas e com as técnicas de microscopia eletrônica, respectivamente, e pelo agradável convívio com essas duas feras;

Às técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, Antônio M. F. Lima, Adriane C. S. Sprogis, Maria A. S. da Silva e Maria A. Santos, pelo auxílio e pelo agradável convívio;

À Luciana Aguilar Aleixo, minha mulher e colega junto ao quadro docente do Depto de Ciências Naturais - UESB, pelo companheirismo, paciência e motivação;

Aos secretários do Depto de Biologia Celular, Mário Bianchi e Beatriz G. Dechichi, pelo convívio e por toda a ajuda burocrática prestada;

À Alessandra N. Caiafa e Fabiano M. Martins, pela hospedagem em sua casa antes de minha instalação definitiva em Campinas;

À minha amiga e colega da Área de Botânica do Departamento de Ciências Naturais - UESB, Dr^a Débora Leonardo dos Santos, pelo companheirismo e pelo apoio à minha saída para cursar o doutorado;

À Sara Fernandes Galvão, minha orientada, por ter mantido a atividade de Anatomia Vegetal no Laboratório de Botânica da UESB, durante o período de meu afastamento;

Aos meus pais, Carlos Eduardo Pini Leitão e Rosa Helena Winter Espolador, pela criação e primeira formação;

À minha tia Vera Regina Pini Leitão, pela sempre presença, e à minha tia Elizabeth Maria Pini Leitão, pela ajuda e pelo exemplo acadêmico (é Prof^a da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ);

Aos meus antigos professores da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Dr^a Aristéa Alves de Azevedo, Dr João Marcos de Araújo e, em especial, à Dr^a Renata Maria Strozi Alves Meira, pela minha primeira formação e trajetória de anatomista vegetal;

À Liliam A. S. Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por ser o meu anjo-da-guarda burocrático junto à Secretaria do Programa de Pós-Graduação;

Aos demais professores do Depto de Biologia Celular, aos demais colegas acadêmicos da Unicamp, aos demais funcionários das secretarias e bibliotecas que frequentei, aos colegas da UESB, aos meus familiares e a todos os demais que eu cometi a gafe de não citar aqui, mas com quem certamente o convívio foi motivador e agradável, e por efeito direto, indireto e/ou borboleta foi positivamente influente neste trabalho.

A todos vocês, muitíssimo obrigado!



Selos postais nacionais com a representação da orquídea *Rodriguezia venusta*.

Fotos disponíveis em: <http://edmourao.atspace.com/selos02.html>

Acesso em 19 de junho de 2007.



SUMÁRIO

ABSTRACT.....	1
RESUMO.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	4
CAPÍTULO 1 – Inexpensive alternative equipment for plant material embedding in paraffin under vacuum.....	9
Abstract.....	10
Introduction.....	10
Materials and Methods.....	10
Results and Discussion.....	12
Resumo.....	13
References.....	13
CAPÍTULO 2 - Structural and histochemical characterization of the colleter of <i>Rodriguezia venusta</i> (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae).....	14
Abstract.....	15
Introduction.....	16
Material and Methods.....	16
Results.....	18
Discussion.....	18
References.....	22
Legends and Figures.....	25

CAPÍTULO 3 - Ontogenia e histoquímica do tecido estigmático e transmissor de <i>Rodriguezia venusta</i> (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae).....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	37
Referências Bibliográficas.....	41
Legendas e Figuras.....	46
 CAPÍTULO 4 – Anatomia e histoquímica dos nectários de <i>Rodriguezia venusta</i> (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae).....	55
Resumo.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	58
Resultados.....	60
Discussão.....	66
Referências Bibliográficas.....	73
Legendas e Figuras.....	84
 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	95
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	97

ABSTRACT

Rodriguezia venusta is an orchid with ornamental potential, native to Brazil and Peru. This specie belongs to subtribe Oncidiinae that is in Epidendroideae, the notorious biggest Orchidaceae's subfamily. Although the wide morphology and taxonomy studies on this family, the works concerning anatomy are rare, specially focusing the secretory structures, in order that is the objective of the present work. Floral buds, bracts and expansion leaves samples were carried out to microscopy analysis. In the abaxial side of the bract subtending each flower, especially at the portion of they insertion, there are material secreting trichomes that react positive to carbohydrates and mucilage histochemical tests. Due the probable lubricant action of this secretion during the floral bud growth passing over the bract, it is expected that "colleters" is the most convenient term to designate these structures. In the flowers, the stigmatic and transmitting tissues have similar cellular types characterized by the elongated shape. The cellular unions only at the terminal walls give a net shape to the structure. In the intercellular spaces copious secretion occurs constituted predominantly of mucilage. There is a cuticle on the stigma surface and at the canal delimited by transmitting tissue in it apical region. In addition, *R. venusta* has extrafloral nectaries in the growing leaves and in the floral bud subtending bract, and also a floral nectary inserted at the lip base. The extrafloral nectaries are anatomically similar, whereas floral nectary is more complex structurally, being covered by nectariferous trichomes.

RESUMO

Rodriguezia venusta é uma orquídea com potencial ornamental nativa do Brasil e do Peru. Pertence à subtribo Oncidiinae que se encontra na subfamília Epidendroideae que é, de longe, a maior subfamília de Orchidaceae. Apesar desta família ser amplamente estudada quanto à morfologia e taxonomia, são raros os trabalhos de anatomia, principalmente em se tratando de estruturas secretoras, como se levou a cabo no presente trabalho. Amostras de botões florais, brácteas e folhas em expansão foram processadas para a microscopia e analisadas. Na face abaxial da bráctea que subtende cada flor, em especial na região de sua inserção, encontram-se tricomas que secretam material que reage positivamente a testes para detecção de carboidratos e mucilagem. Como, provavelmente, esta secreção atua como lubrificante durante o crescimento do botão floral sobre a bráctea, concluiu-se que a denominação “coléteres” é a mais adequada neste caso. Em se tratando das flores, os tecidos estigmático e transmissor são constituídos por tipos celulares semelhantes, que se caracterizam pela presença de células alongadas que se mantêm unidas por suas paredes terminais, formando assim uma estrutura reticulada. Nos espaços intercelulares ocorre copiosa secreção predominantemente mucilaginosa. Na superfície do estigma e na porção apical do canal delimitado pelo tecido transmissor, ocorre uma cutícula. *R. venusta* possui também nectários extraflorais nas folhas em expansão e na bráctea que subtende os botões, além de um nectário floral que se insere na base da face abaxial do labelo. Os nectários extraflorais são anatomicamente semelhantes entre si enquanto o nectário floral é

estruturalmente mais complexo e revestido por uma epiderme constituída por tricomas nectaríferos.

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade secretora é inerente a todas as células vivas (Roshchina & Roshchina, 1993), mas muitas células ou tecidos apresentam especializações decorrentes de processos de diferenciação que auxiliam ou otimizam essa atividade (Carvalho & Recco-Pimentel, 2007).

Em plantas, existem estruturas secretoras especializadas com diferentes graus de complexidade, desde idioblastos e tricomas unicelulares até conspícuas estruturas multicelulares vascularizadas (Metcalf & Chalk, 1950; Fahn, 1979). Na identificação das estruturas secretoras são utilizados diversos parâmetros, como a natureza química do produto de secreção, a morfologia da estrutura, sua localização no corpo da planta e a atuação fisiológica e, caso exista, ecológica na planta (Esau, 1976; Fahn, 1979; Schmid, 1988). Assim sendo, nectários são estruturas secretoras de néctar enquanto hidatódios secretam água. Algumas estruturas superficiais que secretam solução salina denominam-se glândulas de sal (Fahn, 1979), outras, que secretam material mucilaginoso ou resinífero denominam-se coléteres (Uphof 1962) ou “squamelae” (Thomas, 1991). Além disso, estruturas secretoras internas que delimitam espaços isodiamétricos são denominadas cavidades e, se longos, são denominadas ductos ou canais (Esau, 1976; Dickson, 2000). Dependendo do produto da secreção dessas estruturas tem-se, por exemplo, cavidades ou canais mucilaginosos, resiníferos e oleíferos (Castro & Machado, 2004). Em plantas carnívoras, dentre outros tipos de estruturas secretoras, ocorrem as glândulas digestivas que secretam enzimas que digerem o animal capturado (Fahn, 1979). Em

flores perfumadas, ocorrem estruturas produtoras de aroma, os osmóforos, em outras ocorrem elaióforos, que são estruturas secretoras de óleos fixos (Endress, 1996).

À medida que os estudos sobre as estruturas secretoras se avolumam e aprofundam, fica mais evidente a sua importância. Por exemplo, dentre as angiospermas, a secreção produzida pelo estigma é utilizada na hidratação e fornecimento de nutrientes para o grão-de-pólen (Cruden & Lyon, 1985) sendo, portanto, essencial para o ciclo de vida da planta. Em se tratando da importância para o homem do material secretado pela planta, os aromas utilizados em perfumaria, nas indústrias cosmética, farmacêutica e de alimentos (Simões & Spitzer, 2000), a produção de mel em apiários, onde a matéria-prima é o néctar obtido e regurgitado pelas abelhas operárias (Roubik, 1989) e o látex obtido dos laticíferos da seringueira, a *Hevea brasiliensis* (Fahn, 1979), são alguns exemplos da importância econômica das estruturas secretoras.

Também, as estruturas secretoras são muitas vezes características valiosas nos estudos taxonômicos, quando se analisa a sua anatomia, a natureza da secreção e a posição na planta (Solereder, 1908). Sabe-se que um tipo de estrutura secretora pode se originar a partir de outro tipo (Fahn, 1988), e a análise de forma comparada das estruturas secretoras em um grupo taxonômico pode levar a inferências evolutivas de especialização de função e interação ecológica.

Orchidaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com cerca de 19.500 espécies (Dressler, 1993) e o Brasil é um dos países com maior diversidade de orquídeas (Toscano-de-Brito & Cribb, 2005). As flores das orquídeas são epíginas, trímeras, geralmente possuindo uma pétala modificada, denominada labelo. Esta pétala é originalmente superior, entretanto, em muitas espécies ocorre um movimento que direciona esta pétala para baixo, fenômeno denominado

ressupinação (Dressler, 1993). As flores são zoófilas, e possivelmente as abelhas são os agentes polinizadores mais freqüentes. Em algumas espécies pode haver autogamia (Van Der Pijl & Dodson, 1966).

Segundo o sistema de classificação proposto por Dressler (1993), Orchidaceae é subdividida em cinco subfamílias: Apostasioideae e Cypripedioideae são as mais basais, com dois ou três estames férteis. Spiranthoideae, Epidendroideae e Orchidoideae são as subfamílias monândricas, isto é, com um único estame fértil, geralmente completamente adnato ao estilete, formando uma estrutura denominada coluna ou ginostêmio. Os grãos de pólen são pulverulentos em Apostasioideae, porém em algumas espécies de Cypripedioideae e na grande maioria das orquídeas monândricas, os grãos de pólen são dispersos em massas bem definidas, denominadas polínias.

Cameron *et al.* (1999), utilizando seqüências nucleotídicas de *rbcL*, propuseram algumas modificações no sistema de Dressler (1993), que basicamente consistem na criação da subfamília Vanilloideae que passou a abrigar três subtribos anteriormente atribuídas a Epidendroideae; e a dissolução de Spiranthoideae, cujos representantes foram distribuídos entre Orchidoideae e Epidendroideae. Em ambos os sistemas de classificação, Epidendroideae é de longe a maior e mais diversa subfamília, com mais de 15.500 espécies em cerca de 570 gêneros. É também nessa subfamília que se encontram as maiores dificuldades de classificação e interpretação filogenética (Cameron *et al.*, 1999), sugerindo a necessidade de um acúmulo de informações sobre este grande grupo.

Apesar do grande número de espécies e da riqueza de diversidade de formas, pouca atenção tem sido dada às estruturas secretoras das orquídeas, em especial ao seu aspecto estrutural. Com o intuito de contribuir para o conhecimento das estruturas secretoras nas orquídeas, este trabalho teve como objeto de estudo

Rodriguezia venusta (Lindl.) Rchb. f., uma orquídea epífita com potencial ornamental, pertencente à subtribo Oncidiinae, localizada na tribo Maxillarieae da subfamília Epidendroideae (Dressler, 1993). No presente trabalho realizaram-se estudos anatômicos e histoquímicos das estruturas secretoras de *R. venusta*. Também, frente às dificuldades na execução das atividades de inclusão em parafina, foi desenvolvido um equipamento barato que substitui a dispendiosa estufa de inclusão de parafina sob vácuo.

Esta tese está organizada em quatro capítulos. São eles:

Capítulo 1 – “Inexpensive alternative equipment for plant material embedding in paraffin under vacuum”, tratando-se de um artigo aceito para publicação na revista Brazilian Archives of Biology and Technology;

Capítulo 2 – “Structural and histochemical characterization of the collectors of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)”, tratando-se de um artigo submetido à revista Australian Journal of Botany;

Capítulo 3 – “Ontogenia e histoquímica do tecido estigmático e transmissor de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)”, que será traduzido para inglês e formatado para submissão na revista American Journal of Botany;

Capítulo 4 – “Anatomia e histoquímica dos nectários de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)”, que será traduzido para inglês e formatado para submissão na revista Annals of Botany.

Após estes capítulos, são apresentadas as considerações finais e as perspectivas de todo o trabalho realizado, onde são discutidas conjuntamente e de forma sintética as informações aqui obtidas.

CAPÍTULO 1

Inexpensive alternative equipment for plant material embedding in paraffin under vacuum

Carlos André Espolador Leitão & Angelo Luiz Cortelazzo

Artigo aceito para publicação na revista
Brazilian Archives of Biology and Technology

Inexpensive Alternative Equipment for Plant Material Embedding in Paraffin under Vacuum.

Carlos André Espolador Leitão^{1,2*} and Angelo Luiz Cortelazzo³

¹Departamento de Ciências Naturais; UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; Estrada do Bem Querer, Km04; Vitória da Conquista – BA - Brasil; 45.083-900; candreel@yahoo.com.br; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural; Unicamp; ³Departamento de Biologia Celular; Unicamp; Campinas – SP – Brasil; 13.083-863; angelo@unicamp.br

ABSTRACT

*The present work describes an equipment constructed using inexpensive material, for embedding plant material in paraffin under vacuum, using an oven and a vacuum pump. The equipment was tested using samples of **Rodriguezia venusta** (Orchidaceae) buds embedded in paraffin, where half of the samples were submitted to vacuum by the equipment during embedding. The material was sectioned with a rotary microtome, obtaining full series of quality sections. The control was hard to section with the microtome, obtaining damaged sections due the air bubbles, making ribbon formation difficult. These results prove the effectiveness of the equipment, make it a practical, cheap and more portable solution for newly established laboratories.*

Kew words: Embedding, paraffin method, plant anatomy, technique in microscopy

INTRODUCTION

Paraffin embedding is a crucial step in preparing permanent slides of material sectioned with a microtome. For a structural study based on serial sections, it is necessary to have good sectioning, so as to easily obtain ribbons of sections and therefore preserve the full series. The inclusion of compact plant organs is usually easy, but structures with many trichomes or air bubbles, as occurs in buds, frequently are difficult to embed. There are many models of vacuum ovens but this equipment is expensive and bulky, and often inaccessible to newly established laboratories or field laboratories. Alternative methodologies can provide several facilities and efficient results contributing to the enhancement of research in developing countries (Jordão & Takaki, 1986; Takaki, 1987). Thus the objectives of this study were to construct a low cost equipment that could maintain paraffin in liquid state at a controlled temperature and under vacuum and to analyze the equipment's efficiency to obtain easily sectioned material forming ribbon of serial sections during microtomy.

MATERIALS AND METHODS

Equipment construction

To make the equipment, we employed a thick glass transparent 500mL flask with a wide mouth and, a flexible, copper tube, 5mm wide and 1m long, a portion of ½ inch PVC pipe, three rubber stoppers and 1m of latex tubing. The equipment was mounted as in figures 1A and 1B schematic drawings. The PVC pipe was sawed to fit vertically in the wide mouthed flask, which was covered with the large stopper, so that the pipe rested on the flask bottom and was supported by the contact with the stopper. Using a hot nail, three holes were made near the top of the PVC pipe. These holes should remain free even after plugging the pipe. Holes were made through the large stopper and a small one. This smaller one was introduced firmly in the upper end of the PVC pipe and the portion of the stopper rising above the pipe was cut off with a blade. The copper tube was threaded through the two stoppers, coupling them. The bottom of the PVC pipe was closed with a stopper, without hole (see figs. 1A and 1B).

* Author for correspondence

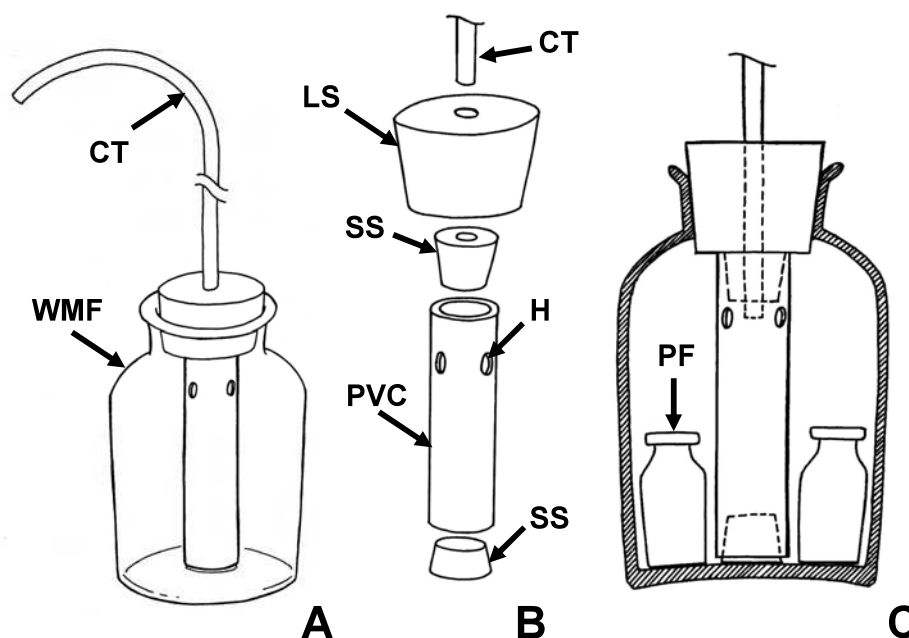


Figure 1 - Diagrams of the equipment for paraffin embedding under vacuum. A) General view of the mounted equipment without the embedding samples. B) Internal components of the equipment before the mounting. C) Wide mouth flask sectioned longitudinally, with the mounted equipment, showing the arrangement of the penicillin flasks, containing the samples being embedded. The traced lines indicate internal edges of components. CT- copper tube; H- hole; LS – large stopper; PF- penicillin flask; PVC- 1/2 inch PVC pipe; SS- smaller stoppers; WMF- wide mouthed flask.

Operating the equipment

To test the equipment's efficiency, flower buds of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae) were collected, fixed in FAA₅₀, (Johansen, 1940) dehydrated in a graded ethanol/tertiary butanol series and embedded in butanol and paraffin (1/1). The embedding paraffin baths occurred with the samples packed in penicillin flasks. The flasks containing the samples embedded in tertiary butanol and paraffin were covered and placed in an oven, at 59°C. Two hours later, the covers were removed and the flasks returned to the oven, for 6 hrs. At the first pure paraffin bath, they were placed, with the help of clawed tweezers, inside a previously heated 500mL flask (Fig. 1C). The copper tube was introduced into the oven through the hole made to pass a thermometer. The large flask, containing the penicillin flasks was placed in the oven and stopped. The copper tube outside the oven was connected to the vacuum pump (Primar®, mod.141) with latex tubing. When the paraffin was liquefied, the vacuum pump was

turned on (Fig. 2) with vacuum meter registering 50cmHg. After bubble formation, the latex tubing was clamped and the vacuum pump turned off, leaving the flask in the oven for 2hrs before opening the oven. The material was embedded in paraffin with 4% beeswax in paper trays, making paraffin blocks.

The control material was identically processed but without the vacuum step. The procedure was performed five times and at least three hundred sections (8µm thick) were obtained for each one, with a rotary microtome.

The paraffin was removed using xylol and the sections were hydrated in a regressive ethanol series, stained with Toluidine Blue (Colour Index 52040) in McIlvaine buffer at pH4,0 (O'Brien and McCully, 1981), washed in distilled water and air dried. The slides were mounted with Canada balsam (Berlyn and Miksche, 1976) and observed with a light microscope.

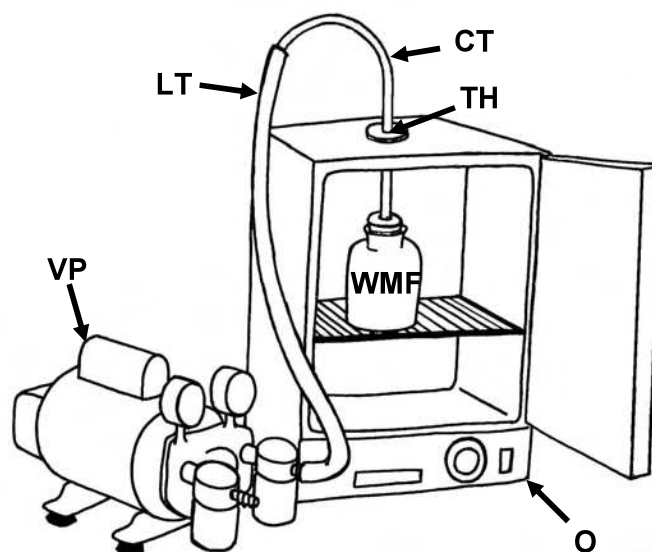


Figure 2 - Diagram of the mounted equipment showing the oven and the vacuum pump. CT- copper tube; LT- latex tubing; O- oven; TH- hole originally made for passing a thermometer; VP- vacuum pump; WMF- wide mouthed flask, mounted with the samples.

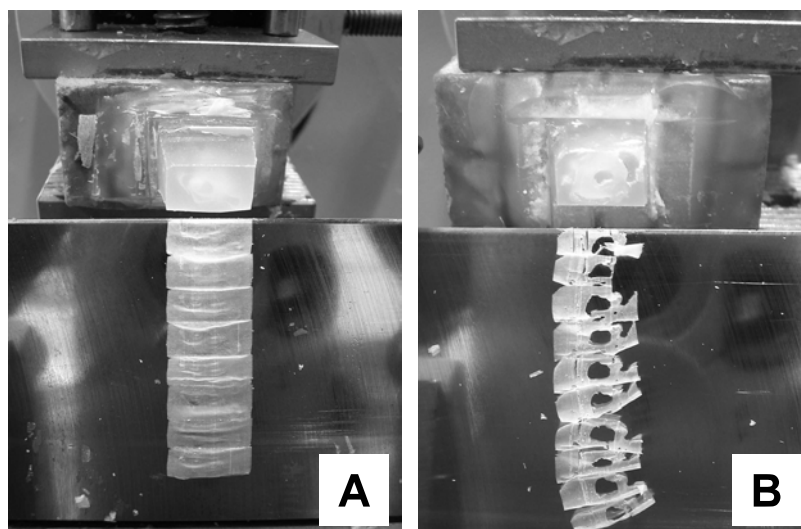


Figure 3 - Photographs showing the paraffin blocs with samples, cut with a rotary microtome, and the ribbons of sections extending over the knife. A) Bloc of material submitted to vacuum during paraffin embedding. B) Control not submitted to vacuum during embedding.

RESULTS AND DISCUSSION

The sections of material embedding in paraffin under vacuum, formed ribbons easily, making it possible to attain the full series, in the three

repetitions (Fig. 3A). However the control material was very difficult to section, presenting many large, deep air bubbles (Fig. 3B). Sectioning the paraffin blocks with bubbles, it was practically

impossible to obtain ribbons, making it impossible to obtain a full series of sections.

After staining and mounting the slides, the sections of the material not submitted to vacuum during the paraffin embedding was inferior in quality with less information due, mainly, to the loss of many sections.

The construction of the vacuum embedding equipment described in this work is inexpensive and quickly mounted, using material easy to find. The operation is also easy, although care must be taken to avoid tipping over the penicillin flasks, especially when moving, or opening and closing the large flask. Despite the fact that sections were attained with both procedures, the fact that a full series could not be obtained for those not embedded under vacuum, makes this procedure highly desirable.

The equipment for paraffin embedding under vacuum presented here is the best option for obtaining a full series of plant material with air pockets, such as buds.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof^a Dr^a Heidi Dolder for revising the English. C. A. E. Leitão received a fellowship from Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Brasil, during this work.

RESUMO

O presente trabalho apresenta um equipamento feito com material barato, destinado à infiltração de material botânico em parafina sob vácuo, utilizando-se uma estufa e uma bomba de vácuo. O equipamento foi testado utilizando-se amostras de botão floral de *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae) incluídas em parafina, metade das quais foi submetida ao vácuo pelo equipamento durante a infiltração. O material foi seccionado em micrótomo rotativo, obtendo-se séries completas de cortes de boa qualidade das amostras submetidas ao vácuo. O controle foi de difícil seccionamento, obtendo-se cortes danificados pela presença de bolhas de ar, dificultando assim a formação de fitas. Estes resultados comprovam a eficácia do equipamento proposto, sendo este uma solução prática, barata e portátil para laboratórios em início de estruturação.

REFERENCES

- Berlyn, G. P. & Miksche, J. P. (1976), *Botanical Microtechnique and Cytochemistry*. Iowa State University Press, Iowa
- Johansen, D. A. (1940), *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York
- Jordão, L. R. & Takaki, M. (1986), An efficient microbiological hood. *Arq. Biol. Tecnol.*, 29, 297-299
- O'Brien, T. P. & McCully, M. E. (1981), The study of plant structure principles and selected methods. Termarcaphi Pty Ltd., Melbourne, Australia
- Takaki, M. (1987). An eppendorf centrifuge with a blender. *Arq. Biol. Tecnol.*, 30, 633-634

CAPÍTULO 2

Structural and histochemical characterization of the colleters of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)

Carlos André Espolador Leitão & Angelo Luiz Cortelazzo

Artigo submetido para publicação na revista
Australian Journal of Botany

Structural and histochemical characterization of the colleters of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)

Abridged title: anatomy of the colleters of *Rodriguezia venusta*

Carlos André E. Leitão^{A,C}, Angelo L. Cortelazzo^B

^ADepartamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista – BA, 45.083-900, Brazil.

^BDepartamento de Biologia Celular-IB, Unicamp, Cx. Postal 6109, Campinas-SP, 13.083-970, Brazil.

^CCorresponding author. Email: candreel@yahoo.com.br

Abstract. Colleters are secretory structures present in many dicotyledon families, but probably have not yet been reported for the Orchidaceae. However, the orchid *Rodriguezia venusta* was observed to possess secretory trichomes on the adaxial side of the bracts subtending floral buds that can be interpreted as colleters. The present work describes the anatomy and histochemistry of such structures. These bracteal trichomes are multicellular, uniseriate, and densely spaced near the region where the bract attaches to the inflorescence. The secretions of these trichomes are mucilaginous and apparently constituted by carbohydrates, and they appear to act as a lubricant that facilitates the young floral bud to slide over the bract as it grows. In light of these characteristics, it is proposed that these secretory trichomes should be considered “colleters”.

Introduction

According to Esau (1977), colleters are appendices or multicellular trichomes that produce mucilaginous secretions. The term “colleter” comes from the Greek word “colla”, referring to the tacky characteristics of the secretions (Thomas 1991), which are composed of mucilaginous compounds and/or resins (Uphof 1962).

In spite of the fact that these structures have been reported in many dicotyledon families (Wilkinson 1988; Thomas 1991), such as Rubiaceae (Lersten 1974), Apocynaceae (Thomas and Dave 1989), Rhizophoraceae (Lersten and Curtis 1974), Caricaceae (Decraene and Smets 1999), and Turneraceae (González 1998), no published reports have been found pointing the existence of colleters in the Orchidaceae or in another monocotyledon family.

Rodriguezia venusta is an epiphytic orchid native to Brazil and Peru (Griffiths 1994) that has secreting trichomes of mucilaginous material, on the adaxial side of the bracts that subtend each flower. The present work describes the trichomal structure, the histochemistry of the trichomes and of their secretory material, and discusses their identification as colleters.

Materials and Methods

Specimens of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. were collected from a riparian forest located in the municipality of Barra do Choça, Bahia State, Brazil (14°53'26"S x 40°32'37"W) at 778m AMSL and cultivated in a greenhouse. Voucher specimen was deposited at the herbarium (VIC) of the Biology Department of the Federal University of Viçosa – Brazil under number 31,027..

The samples were collected in November 2005. Expanded bracts subtending floral buds four to six millimeter long were removed with a razor blade, fixed in

formalin-acetic acid-alcohol (FAA) for 24hr and stored in 70% ethanol (Johansen 1940). To increase the infiltration, the samples in fixative solution were submitted to vacuum during fixation.

Light microscopy

Bract samples were dehydrated either in ethanol for embedding in Leica Historesin®, or through a tertiary butyl alcohol series for embedding in paraffin. These samples were subsequently sectioned both longitudinally and transversely at 2 and 8 µm thicknesses, respectively. Staining and histochemical analyses were performed as follows: toluidin blue (Colour Index – C.I. 52040) 0.025% in McIlvaine buffer at pH 4,0 (Vidal 1977) for structural analysis and histochemical inferences by metachromasia; PAS reaction (Maia 1979) for detecting total polysaccharides; iodine and potassium iodide solution (Johansen 1940) for detecting starch; 5% tannic acid and 3% ferric chloride (Pizzolato and Lillie 1973) for detecting mucilage; 0.1% xyloidine ponceau (C.I. 16150) at pH 2,5 (Vidal 1970) for detecting total proteins; and Sudan black B (C.I. 26150) (Benes 1964) for detecting lipids. The PAS and acid tannic and chloride ferric tests were carried out with the control. An Olympus CX21 light microscope equipped with image digital acquire system was used for viewing the prepared slides and for documentation purposes.

Scanning electron microscopy

Some of the samples stored in 70% ethanol were re-hydrated, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 24 h, washed in distilled water, dehydrated in a graded ethanol series, submitted to critical point drying, and subsequently coated with gold (Bozzola and Russell 1992). A 10kV Jeol JSM-5800 LV scanning electron

microscope equipped with an image digital acquire system was used for observation and documentation purposes.

Results

Secretory trichomes were observed on the basal portions of the adaxial sides of the bracts subtending the floral buds of *R. venusta* (Figs 1-2). These trichomes were densely spaced in the mid portion of the bracts where it attaches to the inflorescence (Figs 3, 4). The trichomes were digitiform, generally uniseriate (Figs 5, 6, 7), composed of a unique basal cell that is the slender portion (Figs. 5, 8), and distally there were from one to seven cells (Fig. 5) relatively uniform thickness along their entire length with rounded apices (Fig. 6). The cytoplasm of these trichomes stained densely with toluidin blue (Fig. 6) and xyloidine ponceau (Fig. 7), and contained numerous small vacuoles. Their nuclei also stained densely, but nucleoli were not always evident (Fig. 6). The basal cell showed small starch grains, as did the cells of the adaxial epidermis of the bract (Fig. 9). The cell walls of the trichomes were thin (Fig. 6) with a thinner cuticle than the epidermal cells of the bract (Fig. 10). Vascular terminations were not observed near the trichomes.

The entire length of the bract in contact with the flower bud was copiously covered by secretions produced by the trichomes (Figs 3, 11, 12). This substance demonstrated strong positive reactions in tests with tannic acid and ferric chloride (Fig. 11) and PAS (Fig. 12). However, no additional staining was observed with the other reagents employed (Figs 4-10).

Discussion

The use of the term “colleter” has varied somewhat with different authors due the criteria utilized to define these secretory structures, like morphology, location and

the chemical nature of the secretions. The term colleter has been attributed to secretory structures formed by emergences constituted by epidermal and parenchymatic cells in Apocynaceae (Thomas *et al.* 1989), Rhyzophoraceae (Lersten and Curtis 1974), and Rubiaceae (Klein *et al.* 2004), and sometimes they may be vascularized (Thomas 1991). The term is also used, however, for trichome structures that are solely of protodermic origin, such as those that occur on the bracts, bracteoles and sepals of *Chrysosplenium alternifolium* (Saxifragaceae) (Decraene *et al.* 1998). In Gentianinae (Gentianaceae) trichome-like colletes have also been described on the leaves, calyx and corolla (Renobales *et al.* 2001). Colletes are frequently observed in apical positions, such as the precocious structures encountered in meristematic regions (Decraene *et al.* 1998).

The uniseriate trichomes observed in *R. venusta* represent simpler structures than the multi-seriate trichomes observed in Gentianinae (Renobales *et al.* 2001). However, the trichomes of *R. venusta* were densely spaced at the base of the bract and they produced a copious secretion of a material that stained positively with PAS and in the tests with tannic acid and ferric chloride, the latter being specific for mucilage. This secretion did not stain with xylydine ponceau, a protein detecting test. The negative result with sudan black B indicates the absence of lipids or, at least their insoluble varieties.

In spite of the positive reactions with tannic acid and ferric chloride, no staining was observed with toluidin blue at pH 4.0, in contrast to the coloration observed in the mucilaginous idioblasts of *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae) (Leitão *et al.* 2005) and in the mucilage produced on the stigma of *R. venusta* itself, which stains purple to violet (personal observation). This differential staining is attributed to the phenomena of metachromasia, observed when planar molecules of toluidin blue stack up in response to the large number of closely spaced anionic

radicals in the sample (Kiernan 1990). In mucilage, these closely spaced anionic radicals are attributed to acidic sugar molecules such as uronic acids, especially galacturonic acid (Fahn 1979) and other pectates (Esau 1977; Roshchina and Roshchina 1993). In the case of the mucilage produced by the bracteal trichomes of *R. venusta*, only small quantities of these acidic sugars would seem to be present, as no metachromatic reaction with toluidin blue was observed (Silva *et al.* 1997).

Some functions are attributed to the colleters, such as: protecting meristematic tissues from desiccation or from predation by animals (Uphof 1962; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991); promoting symbiotic associations with bacteria (Lersten 1975); and influencing apical dominance and phyllotaxis (Williams *et al.* 1982). Mucilaginous secretions may also serve as lubricant, facilitating the sliding of one surface over another during growth (Uphof 1962).

The plant organs examined in the present work were not already fully undifferentiated. The floral buds were approximately 5 mm long and their floral parts were already well defined. The secretions were abundant on the adaxial surfaces of the bracts where these made contact with the flower bud. As the trichomes occurred principally in the region of the bract insertion, probable the secretions was spread due to the movement of the bud over the bract during floral growth. Then, these trichomes probably initiated their secretions when the flower bud was quite small and these secretions have a role in lubricating the contact area between the bud and the bract. Additionally, the trichomes themselves might serve as physical buffers between these two surfaces, as has been observed in Gentianaceae (Renobales *et al.* 2001).

The dense cytoplasm, innumerous small vacuoles, and large nuclei observed in the bracteal trichomes of *R. venusta* suggest secretory activity during the phase analyzed, and we can infer that the colleters secrete mucilage for relatively long

periods of time during the growth of the floral bud. The presence of small starch granules within the trichomes may indicate their participation in the secretory process, but the results presented here are insufficient for a consistent conclusion. Similar granules have been reported in the epidermal layer of colleters of *Allamanda cathartica* (Apocyanaceae) (Thomas and Dave 1989) and associated to other types of secretory structures, such as transmitting tissue (Ladd *et al.* 1996) and nectaries. These starch granules sometimes show evidence of degradation during periods of active secretion (Rachmilevitz and Fahn 1973; Subramanian and Inamdar 1986) but they also may remain apparently intact (Elephteriu and Hall 1983). Complementary studies with younger plants will be necessary to determine when the bracteal trichomes of *R. venusta* first initiate their secretion.

Based on the observations presented here concerning the nature of the mucilaginous secretions, the precocious activity of the trichomes, their presence on the adaxial surface of the bracts that subtend the floral bud, as well as the visible action of the secretion as a lubricant between these two contacting surfaces, the use of the term “colleter” in designating these secretory structures of *R. venusta* is well supported.

Aknowledgements

We thank Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia for C.A.E.L. fellowship. This paper details some of the work carried out by C.A.E.L. for his PhD thesis at the Structural and Cell Biology program of the State University of Campinas/UNICAMP.

References

- Benes K (1964) Detection of lipids in plant meristematic cell with aid of sudan black staining. *Biologia Plantarum* **6**, 142-151.
- Bozzola JJ, Russell LD (1992) 'Electron microscopy' (Jones and Bartlett Publishers, Boston).
- Decraene LPR, Roels P, Smets EF, Backlund A (1998) The floral development and floral anatomy of *Chrysosplenium alternifolium*, an unusual member of the Saxifragaceae. *Journal of Plant Research* **111**, 573-580.
- Decraene LPR, Smets EF (1999) The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). *Canadian Journal of Botany* **77**, 582-598.
- Eleftheriou, EP and Hall JL (1983). The extrafloral nectaries of cotton. I. Fine structure of the secretory papillae. *Journal of Experimental Botany* **34**, 103-119.
- Esau K (1977) 'Anatomy of seeds plants' (John Wiley and Sons, New York).
- Fahn A (1979) 'Secretory tissues in plants' (Academic Press, London).
- González AM (1998) Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **128**, 215-228.
- Griffiths M (1994) 'Index of garden plants' (The Macmillan Press, London and Basingstoke).
- Johansen, DA (1940) 'Plant Microtechnique' (McGraw-Hill Book Co. Inc., New York).
- Kiernan JA (1990) 'Histological and histochemical methods: theory and practice' (Pergamon Press, Oxford).
- Klein DE, Gomes VM, Silva-Neto SJ, Cunha M (2004). The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* **94**, 733-740.

- Ladd PG, Alkema AJ, Thomson GJ (1996). Pollen presenter morphology and anatomy in *Branksia* and *Dryandra*. *Australian Journal Botany* **44**, 447-471.
- Leitão CAE, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM, Silva KLFS, Collevatti RG (2005) Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**, 279-286.
- Lersten NR (1974) Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **69**, 125-136.
- Lersten NR (1975) Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **71**, 311-319.
- Lersten NR, Curtis JD (1974) Colleter anatomy in red mangrove, *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae). *Canadian Journal of Botany* **52**, 2277-2278.
- Maia V (1979) ‘Técnica histológica’ (Atheneu, São Paulo).
- Pizzolato, TD, Lillie RD (1973) Mayer’s tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **21**, 56-64.
- Rachmilevitz T, Fahn A. (1973) Ultrastructure of nectaries of *Vinca rosea* L., *Vinca major* L. and *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Valencia* and its relation to the mechanism of nectar secretion. *Annals of Botany* **37**, 1-9.
- Renobales G, Diego E, Urcelay B, López-Quintana A (2001) Secretory hairs in *Gentiana* and allied genera (Gentianaceae, subtribe Gentianinae) from the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* **136**, 119-129.
- Roshchina VV, Roshchina VD (1993) ‘The excretory function of higher plants’ (Springer-Verlag, Berlin).

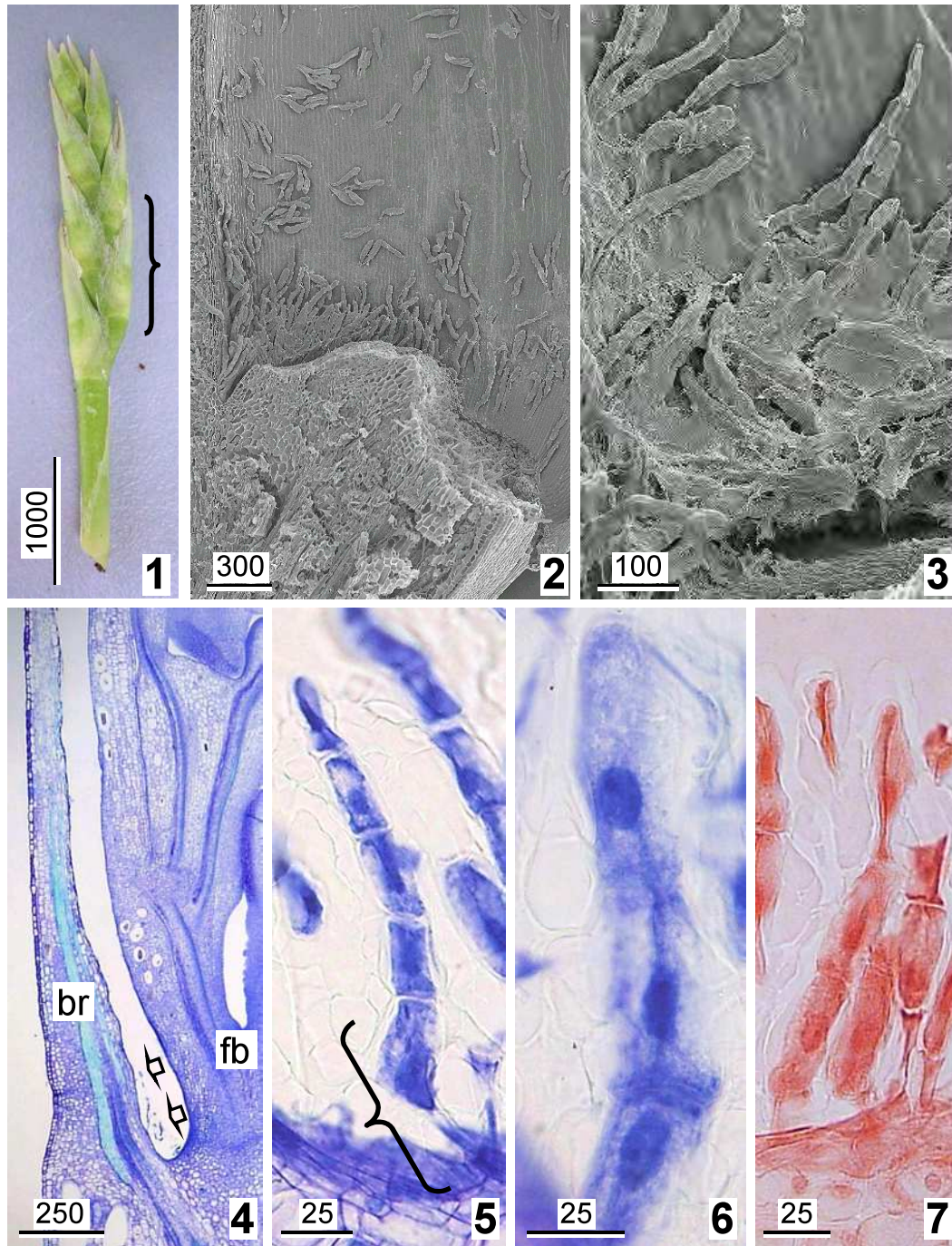
- Silva, TRG, Cortelazzo AL, Dietrich SMC (1997) Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. *Ciência e Cultura* **49**, 219-222.
- Subramanian, RB, Inamdar JA (1986) Nectaries in *Bignonia illicium* L. – Ontogeny, structure and functions. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Plant Science)* **96**, 135-140.
- Thomas V (1991) Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* **68**, 287-305.
- Thomas V, Dave Y (1989) Histochemistry and senescence of collectors of *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany* **64**, 201-203.
- Thomas V, Dave Y, Menon ARS (1989) Anatomy and histochemistry of collectors in *Roupelia grata* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* **8**, 493-496.
- Uphof JCTh (1962) 'Plant hairs' (Gebrüder Borntraeger, Berlin-Nikolassee).
- Vidal BC (1970) Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Annales d'Histochimie* **15**, 289-296.
- Vidal BC (1977) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell and Molecular Biology* **22**, 45-64.
- Wilkinson HP (1988) The plant surface (mainly leaf). In: 'Anatomy of the dicotyledons Vol I' (Ed Metcalfe CR, Chalk L) pp. 97-165. (Clarendon Press, Oxford).
- Williams RF, Metcalf RA, Gust LW (1982) The genesis of form in Oleander (*Nerium oleander* L.). *Australian Journal of Botany* **30**, 677-687

Legends and Figures

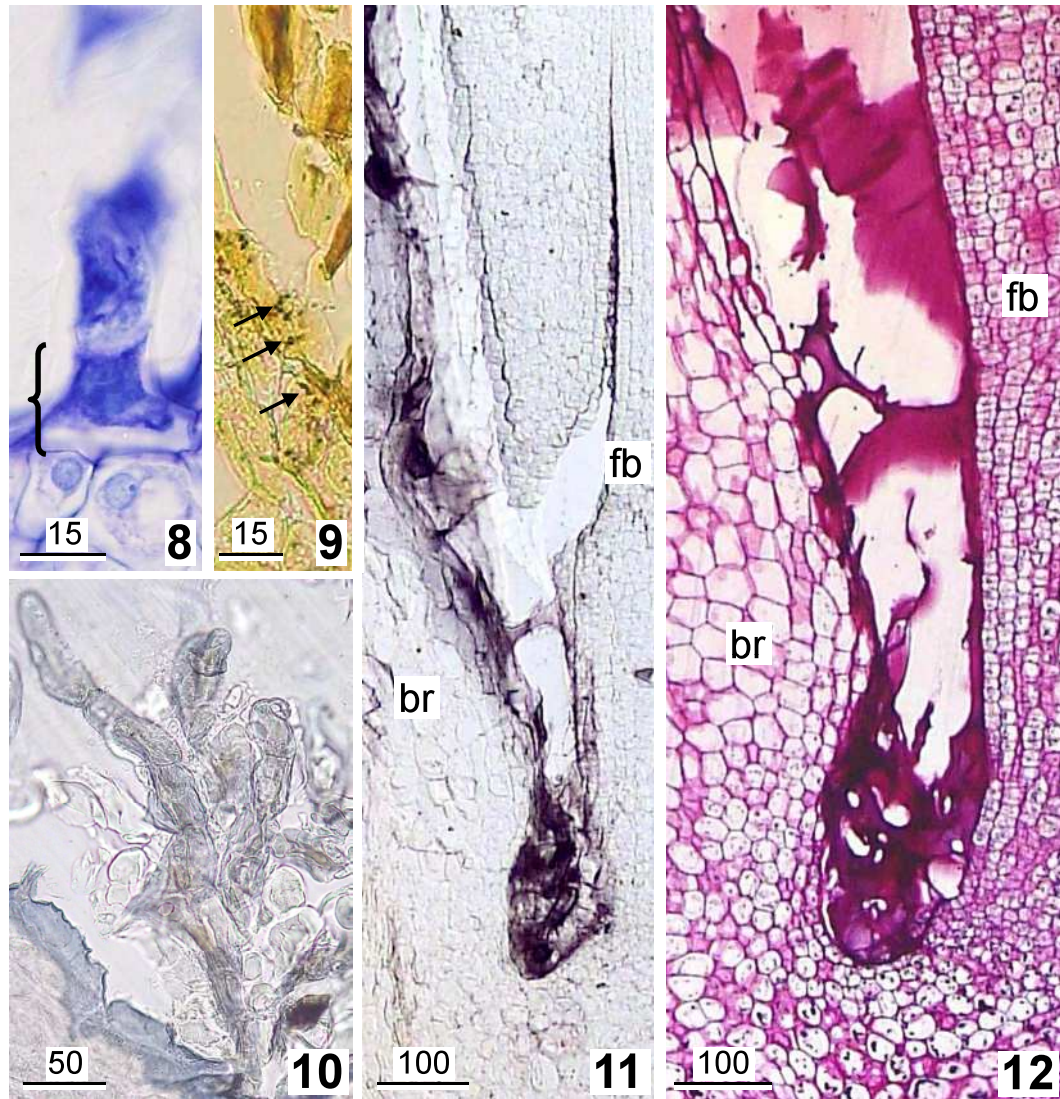
Figs 1-7. Bracts and secretory bracteal trichomes of *Rodriguezia venusta*. Fig. 1. General view of the inflorescence, with floral buds 4-6 mm in length covered by the bracts that subtend them; bract are indicated (bracket). Fig. 2. Basal portion of the adaxial face of a bract showing secretory trichomes. Fig. 3. Detail of the insertion region of the bract, demonstrating dehydrated secretions and densely spaced trichomes. Fig. 4. General view of the bract and floral bud, with secretory trichomes (wide arrows). Stain: toluidin blue. Fig. 5. Detail of the insertion region of the bract, with densely spaced secretory trichomes. Stain: toluidin blue. Fig. 6. Detailed view of a glandular trichome. Stain: toluidin blue. Fig 7. Detailed view of densely spaced trichomes. Stain: xylidine ponceau. Legends: br – bract; fb - floral bud. Bar scales in micrometers.

Figs. 8-12. Secretory bracteal trichomes of *Rodriguezia venusta*. Fig. 8. Detailed view of the basal cell of a trichome (bracket). Stain: toluidin blue. Fig. 9. Detailed view of the base of the densely spaced secretory trichomes near the insertion region of the floral bract, demonstrating starch granules (arrows). Stain: iodine and potassium iodide solution. Fig. 10. As Figure 9, but stained with Sudan black B. Fig. 11. Wide view of the base of the bract and of the floral bud, with visible secretions. Stain: tannic acid and ferric chloride. Fig. 12. As Figure 11, but stained with PAS. Legends: br – bract; fb - floral bud. Bar scales in micrometers.

Figures 1-7



Figures 8-12



CAPÍTULO 3

Ontogenia e histoquímica do tecido estigmático e transmissor de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)

Carlos André Espolador Leitão & Angelo Luiz Cortelazzo

Artigo a ser submetido para publicação na revista
American Journal of Botany

Ontogenia e histoquímica do tecido estigmático e transmissor de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae).

LEITÃO, C. A. E¹. & CORTELAZZO, A. L.²

¹ Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
- BA. candreel@yahoo.com.br

² Departamento de Biologia Celular, Unicamp - SP. angelo@unicamp.br

PALAVRAS-CHAVE

Estigma, tecido transmissor, Orchidaceae, estrutura secretora, anatomia.

RESUMO

O estigma e o tecido transmissor são fundamentais para a reprodução sexuada das angiospermas, estando envolvidos no estímulo da germinação do tubo polínico e na nutrição durante o crescimento deste em direção ao ovário. Essas estruturas também podem ser um valioso parâmetro no estudo taxonômico. *Rodriguezia venusta* é uma orquídea epífita pertencente à grande subfamília Epidendroideae, grupo este de complicada determinação. Este trabalho teve como objetivos descrever a anatomia e a histoquímica das diferentes fases da ontogenia do tecido estigmático e transmissor de *R. venusta*. Para este fim foram utilizadas amostras processadas segundo diversas metodologias em microscopia de luz e eletrônica de varredura. Tanto o estigma quanto o tecido transmissor apresentam

desenvolvimento e atividade secretora precoces, como se pode verificar no botão com 4mm. As divisões celulares cessam quando o botão atinge 12mm de comprimento, e a antese se inicia com o botão com 18mm. Esses tecidos secretam material predominantemente mucilaginoso enquanto as células ainda estão se dividindo e se alongando no sentido longitudinal. A secreção é acumulada nos espaços intercelulares entre as paredes anticlinais das células secretoras, separando assim umas das outras. Estas permanecem unidas às adjacentes apenas por suas paredes terminais, conferindo aspecto reticulado ao tecido. O estigma é recoberto por uma cutícula que se estende em direção ao tecido transmissor, revestindo o canal central aí presente. Na região do estigma, a cutícula aparenta possuir poros, possivelmente envolvidos na saída de parte do material secretado. Também aí, nos espaços intercelulares, ocorrem pequenos corpúsculos esféricos que se coram com o teste para lipídios, proteínas e carboidratos totais. Quando em senescência, observa-se o colapso de todos os tipos celulares e o deslocamento da cutícula do estigma, entretanto, a secreção contida nos espaços intercelulares permanece reagindo fortemente ao teste para mucilagem.

INTRODUÇÃO

O estigma e o tecido transmissor são partes do carpelo responsáveis pela interação do esporófito com o grão de pólen, isto é, entre as duas fases do ciclo de vida das angiospermas (Rosen & Thomas, 1970). Portanto, são cruciais na reprodução sexuada dessas plantas.

Em muitas espécies, o estigma produz secreção contendo carboidratos e lipídios (Calder & Slater, 1985; Clifford & Owens, 1990), podendo ocorrer também outros compostos, como proteínas (Calder & Slater, 1985), pigmentos (Heslop-

Harrison, 1981) e compostos fenólicos (Esau, 1977). Aparentemente, a principal função do estigma é aderir os grãos de pólen (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982), protegê-los contra dessecação (Fahn, 1979) e nutrir, em algum grau, o pólen germinado (Cruden & Lyon, 1985). O tecido transmissor ocorre no estilete, tratando-se de um tecido diferenciado que liga o estigma ao ovário (Esau, 1977). Neste tecido podem ocorrer adaptações citológicas que conferem características de células de transferência, favorecendo o aporte de substâncias para o tubo polínico em desenvolvimento (Rosen & Thomas, 1970).

Os estigmas são estruturalmente muito diversos, podendo ser utilizados como parâmetro taxonômico (Heslop-Harrison, 1981). Dentre as Orchidaceae, existem três tipos morfológicos principais: tipo I, característico de *Paphiopedilum*, convexo com três lobos claramente visíveis; tipo II, convexo com papilas digitiformes; e tipo III, côncavo e afunilado. Tais tipos aparentemente exibem uma seqüência evolutiva correlacionada com o desenvolvimento do polinário nesta família (Dannenbaum *et al.*, 1989). O pistilo das orquídeas é tricarpelar e o estigma é trilobado. O carpelo correspondente ao lobo mediano quase sempre apresenta o desenvolvimento adiantado em relação aos outros dois carpelos e o lobo estigmático correspondente a este carpelo é geralmente muito maior que os demais (Kurzweil, 1987a; 1987b; 1988; 1993).

Nas orquídeas monândricas ancestrais, possivelmente a secreção estigmática produzida era espalhada sobre o inseto polinizador durante a sua visita, agindo como um adesivo para um grupo de grãos de pólen. As orquídeas consideradas mais avançadas desenvolveram estruturas estigmáticas especializadas na adesão do polinário, como o viscidio (Dressler, 1993). O estigma também pode atuar ecologicamente como nectário floral, como se verifica nos gêneros *Aceras* e *Himantoglossum* (Dahlgren & Clifford, 1982). Porém, em se tratando das

características anatômicas dos tecidos estigmático e transmissor nas orquídeas, infelizmente se verifica uma grande carência de informação, sendo incomuns os trabalhos que abordam essas estruturas de forma mais aprofundada.

Rodriguezia venusta é uma orquídea epífita nativa do Brasil e do Peru (Griffiths, 1994). O gênero *Rodriguezia* possui 40 espécies, sendo pertencente à subtribo Oncidiinae, da subfamília Epidendroideae, que apresenta grande diversidade e que abriga mais da metade dos gêneros e espécies de Orchidaceae (Dressler, 1993).

No intuito de contribuir para um melhor entendimento das características anatômicas florais e, conseqüentemente, da biologia reprodutiva das orquídeas, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar a anatomia do estigma e do tecido transmissor de *R. venusta*, e descrever suas modificações no decorrer da ontogenia da flor detectando, mediante a utilização de testes histoquímicos, algumas classes de substâncias nas diferentes fases de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados espécimes de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. oriundos de uma mata de galeria localizada no município de Barra do Choça – BA, Brasil (14°53'26"S; 40°32'37"W, 778m de altitude) e cultivados em casa de vegetação. O material testemunha foi depositado no Herbário pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (VIC) – MG, Brasil, sob o número N°: 31.027.

Amostras da coluna de botões florais com 4 a 14mm de comprimento, de botões em início de antese (18-20mm), de flores recém abertas e de flores abertas após 4 a 9 dias, foram fixadas em FAA₅₀ por 24h e estocadas em etanol 70%

(Johansen, 1940). Durante a fixação, as amostras foram submetidas ao vácuo, para garantir uma maior penetração do fixador. O comprimento do botão tratado neste trabalho desconsidera o pedicelo, isto é, trata-se da medida do receptáculo ao ápice do botão.

Microscopia de luz. As amostras foram desidratadas em série etílica para inclusão em Histoiresin® Leica, ou em série etílica/butílica terciária para inclusão em parafina sob vácuo (Leitão & Cortelazzo, *in press*), sendo obtidos cortes seriados longitudinais e transversais de 2 e 8µm respectivamente, segundo metodologia usual (Berlyn & Micksche, 1976). Para a coloração e histoquímica, foram utilizadas as seguintes técnicas: Azul de toluidina (Colour Index – C.I. 52040) 0,025% em tampão McIlvaine pH4,0 (Vidal, 1977), para caracterização estrutural e obtenção de metacromasia; reação PAS com o controle adequado (Maia, 1979), para detecção de carboidratos totais; lugol (Johansen, 1940), para detecção de amido; ácido tânico 5% e cloreto férrico 3% com o controle adequado (Pizzolato & Lillie, 1973), para evidenciação de mucilagem; xyloidine ponceau (C.I. 16150) 0,1% pH 2,5 (Vidal, 1970), para evidenciação de proteínas totais e sudan black B (C.I. 26150), (Pearse, 1980 modificado; Benes, 1964 modificado), para localização de lipídios.

Para montagem das lâminas, utilizou-se bálsamo-do-canadá (Berlyn & Micksche, 1976), gelatina glicerinada (Kaiser, 1880) ou água (Johansen, 1940), segundo a metodologia utilizada.

Para análise e documentação fotográfica, utilizou-se um microscópio Olympus CX21, equipado com recurso de captura de imagem digital.

Microscopia eletrônica de varredura. Amostras de estigmas de flores recém-abertas estocadas em etanol 70% foram re-hidratadas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 24h, lavadas em água destilada, desidratadas em série etílica, submetidas ao ponto crítico do CO₂ e à posterior deposição catódica com ouro (Bozzola & Russell, 1992). Para observação e documentação fotográfica, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5800 LV, à 10KV, equipado com sistema de captura de imagens digital.

RESULTADOS

No botão com 4 a 5mm (figs. 1-8), a coluna apresenta sua porção terminal com desenvolvimento mais adiantado (fig. 1). A cavidade do estigma é nítida, o estilete é relativamente curto apresentando um canal central colabado e a cavidade do ovário é ampla, com as placentas em início de desenvolvimento (fig. 2). Os tecidos estigmático e transmissor já iniciaram o seu desenvolvimento, sendo constituídos por células secretoras cúbicas, pouco vacuolizadas, com citoplasma densamente corado, núcleo relativamente grande, com cerca de quatro nucléolos (figs 3, 4) e pequenos grãos de amido presentes no citoplasma. Essas células ocorrem em três camadas, sendo subtendidas por cerca de três camadas de células mais estreitas no sentido periclinal, também pertencentes aos tecidos estigmático e transmissor e aqui denominadas células de transição (fig. 4). Observam-se divisões predominantemente periclinais em todas as camadas (figs. 3, 4). Entre as células, em especial no canal central e entre as paredes anticlinais, já se observa alguma secreção birrefringente (fig. 5) que se cora fortemente com azul de toluidina (figs. 3, 4), e que reage positivamente com ácido tânico e cloreto férrico (fig. 6) e também com o teste PAS (fig. 7). Externamente às células superficiais do estigma e

da abertura do tecido transmissor no ápice do ovário, ocorre secreção de aspecto granuloso que se cora com o PAS (fig. 7) e com o xylidine ponceau (fig. 8).

As demais células parenquimáticas da coluna são relativamente maiores, isodiamétricas, contendo grãos de amido maiores do que o das células dos tecidos estigmático e transmissor.

No botão com 7mm, os tecidos estigmático (fig. 9) e transmissor (fig. 10) encontram-se com suas células alongadas, sendo as da camada superficial do estigma mais curtas (fig. 9). Nessa região, ocorre uma cutícula que se cora com sudan black B (fig. 11). No estigma e no tecido transmissor ocorrem amplos espaços intercelulares, células unidas por suas paredes terminais, em geral a quatro ou mais células adjacentes, conferindo aspecto reticulado ao tecido (figs. 9, 10). A secreção presente nesses espaços, assim como no canal delimitado pelo tecido transmissor, apresenta cor arroxeadada (metacromasia) após coloração com o azul de toluidina (fig. 10), e reage fortemente com o PAS (fig. 12). Nas camadas de células de transição ainda ocorrem divisões periclinais (fig. 13). Já no parênquima subjacente prevalecem as divisões anticlinais que geralmente ocorrem na porção basal da coluna (fig. 14).

No botão com 9mm, torna-se nítida a ocorrência de corpúsculos esféricos no tecido estigmático que se coram diferencialmente com xylidine ponceau (fig. 15), que reagem fortemente com o sudan black B (fig. 16), e que se coram também diferencialmente com o PAS (fig. 17). Tais estruturas não se coram com o azul de toluidina. A secreção presente nos espaços intercelulares cora-se menos com azul de toluidina, exceto na região em torno das células, onde permanece arroxeadada pela metacromasia, birrefringente e de aspecto fibrilar (fig. 18). Sobre as células da camada superficial do estigma, observa-se material de aspecto fimbriado que reage com o PAS (fig. 17) e se cora fortemente com o azul de toluidina (fig. 19). A

cutícula praticamente não se cora com este corante. Em alguns cortes, observa-se material corado com xylidine ponceau na superfície do estigma (fig. 20). A cutícula aparenta uma espessura maior que aquela observada na fase anterior e se prolonga até o terço apical do estilete (fig. 21), revestindo a superfície interna do canal central do tecido transmissor.

As divisões mitóticas na coluna cessam quando o botão atinge 12mm e a antese se inicia quando o botão atinge cerca de 18mm. Neste estágio, a secreção presente nos espaços intercelulares dos tecidos estigmático e transmissor praticamente não se cora mais com o azul de toluidina, sendo visível a parede dessas células, que se cora fracamente com este corante (fig. 22). No entanto, a secreção permanece reagindo fortemente com o PAS (fig. 23) e com o ácido tânico e cloreto férrico (fig. 24). As células dos tecidos estigmático (figs. 23, 24) e transmissor encontram-se mais alongadas, sendo extremamente finas e com o núcleo também alongado no tecido transmissor do estilete (fig. 22). Os grãos de amido encontrados nas células desses tecidos são inconspícuos.

Na flor recém aberta (figs. 25-30), isto é, no dia seguinte após o início da separação das peças do perianto, não se observa mais o material fimbriado na superfície das células da camada externa do tecido estigmático (figs. 28, 29). Em algumas amostras, encontrou-se material granulado (fig. 26) depositado externamente à cutícula (figs. 25), que apresenta possíveis poros (fig. 26). Este material se cora com azul de toluidina (fig. 28) e com o PAS (fig. 29). Já o material encontrado entre as células do tecido estigmático apresenta aspecto fibrilar (fig. 27). Observa-se que a secreção de todo o trato cora-se progressivamente menos com o PAS (fig. 29). No ovário, todas as células do tecido transmissor mantêm aspecto semelhante ao das células de transição do tecido transmissor do estilete, e nos espaços intercelulares ocorre discreta secreção que se cora fortemente com azul

de toluidina (fig. 30). Os corpúsculos que ocorrem nos espaços intercelulares do tecido estigmático permanecem se corando pela reação PAS, pelo xylidine ponceau e pelo sudan black B.

Nas flores no terceiro dia, após a abertura, observa-se diminuição da intensidade de coloração do citoplasma de todos os tipos celulares.

A partir do sexto dia de antese, todos os tecidos encontram-se em notável senescência, com as células apresentando paredes colapsadas. Em todas as amostras analisadas, a camada celular superficial do estigma mostrou-se separada das células subjacentes (fig. 31), e a secreção apresentou aspecto granulado, quando corado com o PAS (fig. 32). Também, a secreção permanece reagindo intensamente com o ácido tânico e cloreto férrico, em especial nas camadas de células de transição (fig. 33).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos tecidos estigmático e transmissor inicia-se precocemente em *Rodriguezia venusta*. No botão com 4mm, já se observavam até seis camadas de células nesses tecidos, bem como a presença de secreção intercelular. A ocorrência de divisões periclinais nas células mais superficiais indica que algumas camadas de células desses tecidos são de origem protodérmica. No entanto, as divisões periclinais em células mais internas não são, necessariamente, indicativo de origem a partir do meristema fundamental, uma vez que neste trabalho não se analisaram botões em que os tecidos estigmático e transmissor ainda se encontrassem plenamente indiferenciados.

Durante o desenvolvimento dos tecidos estigmático e transmissor, observou-se uma separação entre as células no sentido periclinal. Esses espaços intercelulares

encontravam-se ocupados com copiosa secreção e as células do trato encontravam-se unidas às células adjacentes apenas por suas paredes terminais, conferindo aspecto reticulado, semelhante ao descrito na orquídea *Lemboglossum maculatum* (Clifford & Owens, 1990), que também pertence à subtribo Oncidiinae.

Em *Dendrobium speciosum*, foi descrito que as células do estigma encontram-se destacadas e livremente suspensas na matriz estigmática mucilagínosa (Calder & Slater, 1985; Slater & Calder, 1990). Esses autores propuseram a sigla WDc (Wet Detached-cellular), uma variante da WP (Wet Pappilate) segundo o sistema de classificação de Heslop-Harrison (1981), para denominar este tipo de estigma (Calder & Slater, 1985). Já em *Cephalanthera*, Prutsch & Schill (2000) também descreveram a condição de células destacadas no tecido estigmático, porém neste caso, as células permaneciam um pouco conectadas umas às outras por plasmodesmos. Esses autores descreveram a presença de uma epiderme revestida por cutícula e também classificaram esse estigma como do tipo WDc.

Em *R. venusta*, as células de todo o trato não só aparentaram coesão, como até mesmo tensão, sendo então inaplicável a classificação como WDc. Apenas quando em senescência, observou-se o desprendimento celular do tecido estigmático, em especial da camada superficial como um todo. Por conta disso, talvez se possa especular que a condição WDc descrita para *D. speciosum* (Calder & Slater, 1985; Slater & Calder, 1990) e, em menor grau para *Cephalanthera* (Prutsch & Schill, 2000) seja uma derivação de uma condição em que as células secretoras permaneçam unidas entre si.

As células mais profundas do tecido estigmático e transmissor também aparentam ser ativas na secreção, uma vez que seus citoplasmas se coraram fortemente com azul de toluidina e pelo xylidine ponceau. Essas células apresentam

aspecto transicional, entre as células do parênquima da coluna e as células das camadas mais externas dos tecidos estigmático e transmissor, e cessam a atividade mitótica tardiamente em relação às células mais superficiais. No ovário, o tecido transmissor é constituído apenas por células deste tipo transicional, diferindo do relatado em *Lemboglossum maculatum*, que apresenta três camadas de células de arranjo mais frouxo externamente (Clifford & Owens, 1990), indicando que, em *R. venusta*, ocorre menor diferenciação do tecido transmissor na região do ovário.

A secreção intercelular dos tecidos estigmático e transmissor corou-se fortemente com o PAS bem como com ácido tânico e cloreto férrico em todas as fases de desenvolvimento, indicando natureza mucilagínosa. Entretanto, quando corada com azul de toluidina em pH4,0, observou-se progressiva diminuição de afinidade pelo corante e conseqüente diminuição de metacromasia, no botão com 9mm ou mais. As mucilagens são heteropolissacarídeos, geralmente incluindo açúcares ácidos (Gregory & Baas, 1989), como ácido urônico (Calder & Slater, 1985), ácido galacturônico (Fahn, 1979) e pectatos (Esau, 1977) que, em pH4,0, apresentam disponibilidade de radicais aniônicos por estarem com as carboxilas desprotonadas. Quando esses radicais aniônicos ocorrem adensados, as moléculas do corante ligados a eles também ficam muito próximas entre si e, por serem planares, formam pilhas, ocasionando o fenômeno denominado metacromasia (Silva *et al.* 1997). Então, seria razoável supor uma mudança nas características químicas da mucilagem secretada, no decorrer da ontogenia. Uma possibilidade seria a diminuição da concentração de açúcares ácidos, o que justificaria a diminuição de metacromasia observada.

R. venusta possui cutícula conspícua recobrindo a concavidade e se aprofundando pelo tecido transmissor. Tais características, dentre outras, configuram o estigma tipo IIIb, segundo a classificação de Dannenbaum *et al.*

(1989). Nesta cutícula, observaram-se estruturas aqui consideradas poros, cuja presença pode ser interpretada como pontos de entrada para os tubos polínicos (Dannenbaum *et al.* 1989). Em adição, a observação de material de aspecto fimbriado na parede periclinal externa das células mais superficiais do estigma de *R. venusta* (veja figura 19) parece se tratar da secreção atravessando pequenos poros cuticulares, o que indica também para estes, uma função de permeabilidade para a secreção.

Em espaços intercelulares do estigma do botão a partir de 9mm de comprimento, observou-se a ocorrência de corpúsculos que se coraram com sudan black B, indicando natureza lipídica. Porém, esses corpúsculos se coraram com o xylydine ponceau em pH2,5, indicando a presença de radicais catiônicos tais como amina de proteínas e com o PAS, indicando a presença de hidroxilas vicinais, passíveis de oxidação pelo ácido per-iódico. Como eles não se coraram com o azul de toluidina em pH4,0, pode-se inferir que tais corpúsculos não possuem radicais aniônicos nesse pH, isto é, sulfato, fosfato ou carboxilas.

Os corpúsculos foram as únicas estruturas presentes nos espaços intercelulares que se coraram com o xylydine ponceau. Entretanto, externamente à película superficial, foi encontrada pequena quantidade de material com afinidade por este corante, indicando natureza protéica e possível origem a partir das células da camada superficial.

Aparentemente, os lipídios apresentam importante função na interação pólen-estigma, regulando a captação de água pelo tubo polínico ou grão de pólen (Wolters-Arts *et al.*, 1998) e determinando temporalmente a receptividade do estigma (Sanzol *et al.*, 2003). Por outro lado, também podem agir como substância de reserva (Souza *et al.*, 2006). Nos processos de reconhecimento, germinação e crescimento do tubo polínico, podem atuar substâncias como proteínas (Mattson *et*

al., 1974; Maldonato & Otegui, 1997), carboidratos, polissacarídeos ácidos, lipídios e compostos fenólicos (Sedgley, 1982). Durante o crescimento do tubo polínico em direção ao ovário atuam agentes quimiotrópicos cuja natureza química e ação pode variar de acordo com a espécie considerada (Rosen, 1961). O quase completo desaparecimento de grãos de amido nas células dos tecidos estigmático e transmissor, assim como nas células do parênquima adjacente no botão de *R. venusta* em início de antese, pode ter um envolvimento na aptidão da flor para o recebimento do pólen. Porém, para um maior aprofundamento sobre o processo de secreção dos tecidos estigmático e transmissor de *R. venusta*, é necessária a complementação com estudos de ultra-estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENES, K. 1964. Detection of lipids in plant meristematic cell with aid of sudan black staining. *Biologia Plantarum* 6: 142-151.
- BERLYN, G. P., AND J. P. MIKSCHE. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press, Iowa City, USA.
- BOZZOLA, J. J., AND L. D. RUSSELL. 1992. Electron microscopy. Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA.
- CALDER, D. M., AND A. T. SLATER. 1985. The stigma of *Dendrobium speciosum* Sm. (Orchidaceae): a new stigma type comprising detached cells within a mucilaginous matrix. *Annals of Botany* 55: 297-307.

- CLIFFORD, S. C., AND S. J. OWENS. 1990. The stigma, style and ovarian transmitting tract in the Oncidiinae (Orchidaceae): morphology, developmental anatomy, and histochemistry. *Botanical Gazette* 151: 440-451.
- CRUDEN, R. W., AND D. L. LYON. 1985. Correlations among stigma depth, style length, and pollen grain size: Do they reflect function or phylogeny? *Botanical Gazette* 146: 143-149.
- DAHLGREN, R. M. T., AND H. T. CLIFFORD. 1982. The monocotyledons: a comparative study. Academic Press, London, England.
- DANNENBAUM, C., M. WOLTER, AND R. SCHILL. 1989. Stigma morphology of the orchids. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 110: 441-460.
- DRESSLER, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, USA.
- ESAU, K. 1977. Anatomy of seeds plants. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, New York, USA.
- GREGORY, M., AND P. BAAS. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38: 125-174.

- GRIFFITHS, M. 1994. Index of Garden Plants. The Macmillan Press, London and Basingstoke, England.
- HESLOP-HARRISON, Y. 1981. Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. *Nordic Journal of Botany* 1: 401-420.
- HESLOP-HARRISON, J. AND Y. HESLOP-HARRISON. 1982. The specialized cuticles of the receptive surfaces of angiosperm stigmas. *In* D. F. Cutler, K. L. Alvin and C. E. Price [eds.], The plant cuticle, 99-119. Academic Press, London, UK.
- JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill., New York, USA.
- KAISER, E. 1880. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *Botanisch Zentralb* 180: 25-26.
- KURZWEIL, H. 1987a. Developmental studies in orchid flowers I: Epidendroid and vandoid species. *Nordic Journal of Botany* 7: 427-442.
- KURZWEIL, H. 1987b Developmental studies in orchid flowers II: Orchidioid species. *Nordic Journal of Botany* 7: 443-451.
- KURZWEIL, H. 1988. Developmental studies in orchid flowers III: Neottiid species. *Nordic Journal of Botany* 8: 271-282.

- KURZWEIL, H. 1993. Developmental studies in orchid flowers IV: Cypripedioid species. *Nordic Journal of Botany* 13: 423-430.
- MAIA, V. 1979. Técnica histológica. Atheneu, São Paulo, Brazil.
- MALDONADO, S., AND M. OTEGUI. 1997. Secretory tissues of the flower of *Sanango racemosum* (Gesneriaceae). I. light microscopy. *Acta Botanica Neerlandica* 46: 413-420.
- MATTSSON, O., R. B. KNOX, J. HESLOP-HARRISON, AND Y. HESLOP-HARRISON. 1974. Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature* 247: 298-300.
- PEARSE, A. G. E. 1980. Histochemistry theoretical and applied. Vol. II, 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland Longman.
- PIZZOLATO, T. D., AND R. D. LILLIE. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21: 56-64.
- PRUTSCH, J. AND R. SCHILL. 2000. The stigma of *Cephalanthera* (Orchidaceae) provides a link between primitive and derived Epidendroideae. *Nordic Journal of Botany* 20: 599-604.
- ROSEN, W. G. 1961. Studies on pollen-tube chemotropism. *American Journal of Botany* 48: 889-895.

- ROSEN, W. G., AND H. R. THOMAS. 1970. Secretory cells of lily' pistils. I. Fine structure and function. *American Journal of Botany* 57: 1108-1114.
- SANZOL, J., P. RALLO, AND M. HERRERO. 2003. Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; Rosaceae) flower. *American Journal of Botany* 90: 78-84.
- SEDGLEY, M. 1982. Anatomy of the unpollinated and pollinated watermelon stigma. *Journal of Cell Science* 54: 341-355.
- SILVA, T. R. G., A. L. CORTELAZZO, AND S. M. C. DIETRICH. 1997. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. *Ciência e Cultura* 49: 219-222.
- SLATER, A. T. AND D. M. CADER. 1990. Fine structure of the wet, detached cell stigma of the orchid *Dendrobium speciosum* Sm. *Sexual Plant Reproduction* 3: 61-69.
- SOUZA, M. M., T. N. S. PEREIRA, A. J. B. DIAS, B. F. RIBEIRO, AND A. P. VIANA. 2006. Structural, histochemical and cytochemical characteristics of the stigma and style in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 93-98.
- VIDAL, B. C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine ponceau 2R. *Annales D'Histochimie* 15: 289-296.

VIDAL, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular and Biology* 22: 45-64.

WOLTERS-ARTS, M., S. M. LUSH, AND C. MARIANI. 1998. Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392: 818-821.

LEGENDAS E FIGURAS

Figuras 1-8: Botões florais de *Rodriguezia venusta* com 4-5mm. Fig. 1- Panorama do corte longitudinal do botão, indicando os tecidos estigmático e transmissor (retângulo). Coloração: azul de toluidina. Fig. 2- Panorama dos tecidos estigmático e transmissor, conforme indicado na figura 1. Coloração: azul de toluidina. Fig. 3- Detalhe do tecido transmissor, com célula superficial em divisão periclinal (seta). Coloração: azul de toluidina. Fig. 4- Detalhe de célula interna do tecido transmissor em divisão periclinal (seta). Coloração: azul de toluidina. Fig. 5- Panorama do tecido transmissor sob luz polarizada. Fig. 6- Panorama do tecido transmissor após reação com ácido tânico e cloreto férrico. Fig. 7- Detalhe do tecido estigmático com secreção na superfície (setas), positiva ao PAS. Fig. 8- Detalhe do tecido estigmático com secreção na superfície (setas), positiva ao xylidine ponceau. Legendas: asterico— canal central do tecido transmissor; Br— bráctea; Co- coluna; CS- células secretoras; CT- células de transição; Es- estigma; Lb- labelo; Ov- ovário; Pl- placentas. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 9-14: Botões florais de *Rodriguezia venusta* com 7mm. Fig. 9- Detalhe do tecido estigmático em corte longitudinal, corado com xylidine ponceau. Fig. 10- Detalhe do tecido transmissor em corte longitudinal, indicando o canal central (asterisco). Coloração: azul de toluidina. Fig. 11- Corte transversal do estigma, com cutícula em evidência (setas). Coloração: sudan black B. Fig. 12. Corte transversal do estigma, corado com PAS. Fig. 13. Corte longitudinal do tecido transmissor, com célula de transição em divisão periclinal (seta). Coloração: azul de toluidina. Fig. 14- Corte longitudinal do tecido transmissor, com célula do parênquima da coluna em divisão anticlinal (seta). Coloração: azul de toluidina. Legendas: asterisco- canal central do tecido transmissor; Co- coluna; CPC- células do parênquima da coluna; CS- células secretoras; CT- células de transição; Es- estigma; Lb- labelo. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 15-18: Botões florais de *Rodriguezia venusta* com 9mm. Fig. 15- Detalhe do tecido estigmático, com grânulos que se coram com xylidine ponceau (setas). Fig. 16- Detalhe do tecido estigmático, com os grânulos corados com sudan black B (setas). Fig. 17- Detalhe do tecido estigmático, com grânulos corados pelo PAS (setas) e material de aspecto fimbriado (cabeças de seta) na cutícula. Fig. 18- Detalhe do corte longitudinal do estigma, com secreção de aspecto fibrilar em torno das células, corada com azul de toluidina (setas). Barras de escala em micrômetros.

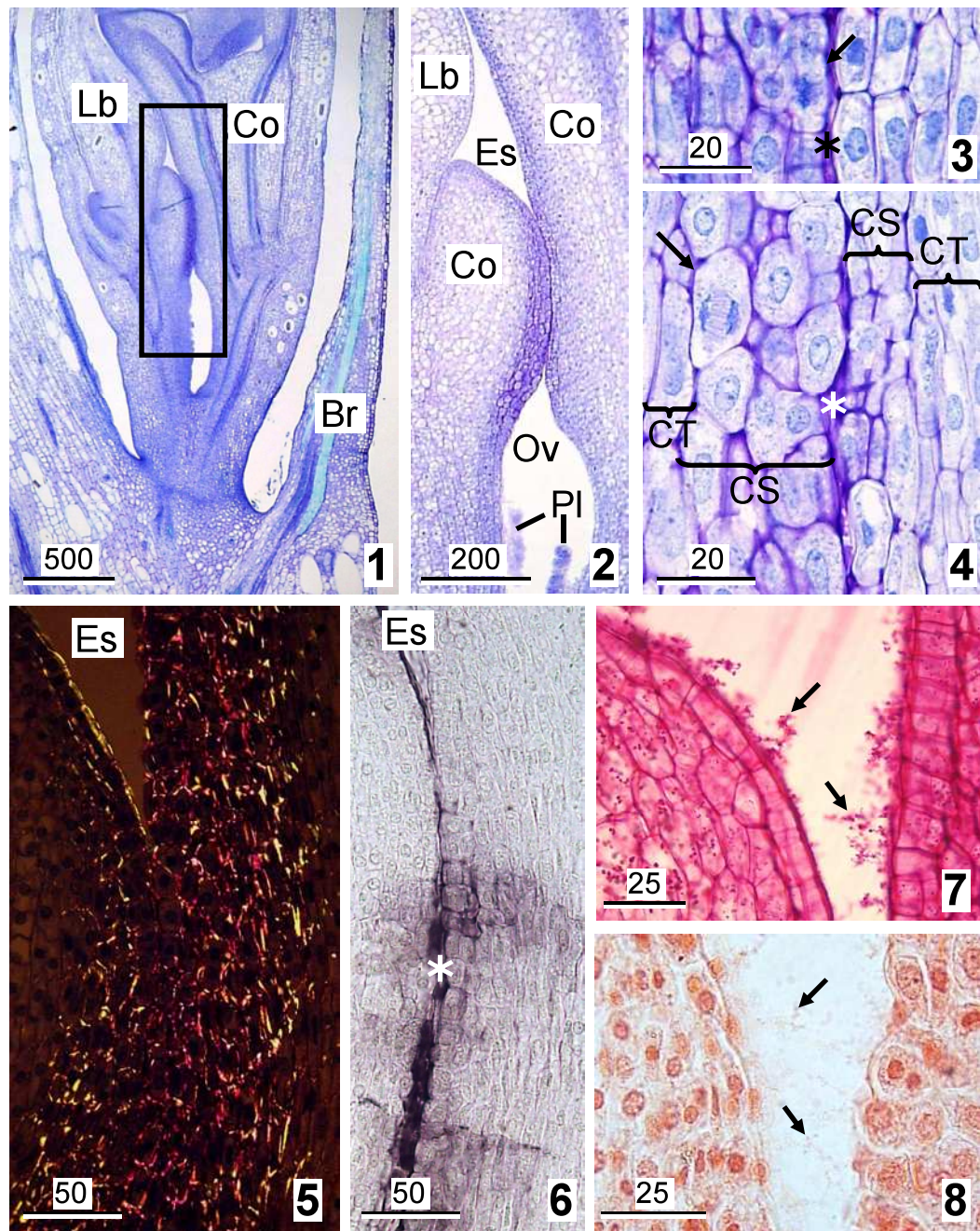
Figuras 19-21: Botões de *Rodriguezia venusta* com 9mm. Figuras 22-24: Botões de *R. venusta* em início de antese. Fig. 19- Detalhe do corte transversal do estigma, com material de aspecto fimbriado corado com azul de toluidina (setas). Fig. 20- Corte transversal do estigma, com material corado com xylidine ponceau (setas) externamente à superfície. Fig. 21- Panorama do corte longitudinal do estigma e

região apical do tecido transmissor, com cutícula (setas) evidenciada pelo sudan black B. Fig. 22- Detalhe do tecido transmissor, corado com azul de toluidina. Fig. 23- Panorama do estigma e tecido transmissor, corado pelo PAS. Fig. 24- Detalhe do estigma, corado com ácido tânico e cloreto férrico. Legendas: asterisco- canal central do tecido transmissor; CPC- células do parênquima da coluna; CS- células secretoras; CT- células de transição; Es- estigma; TT- tecido transmissor. Barras de escala em micrômetros.

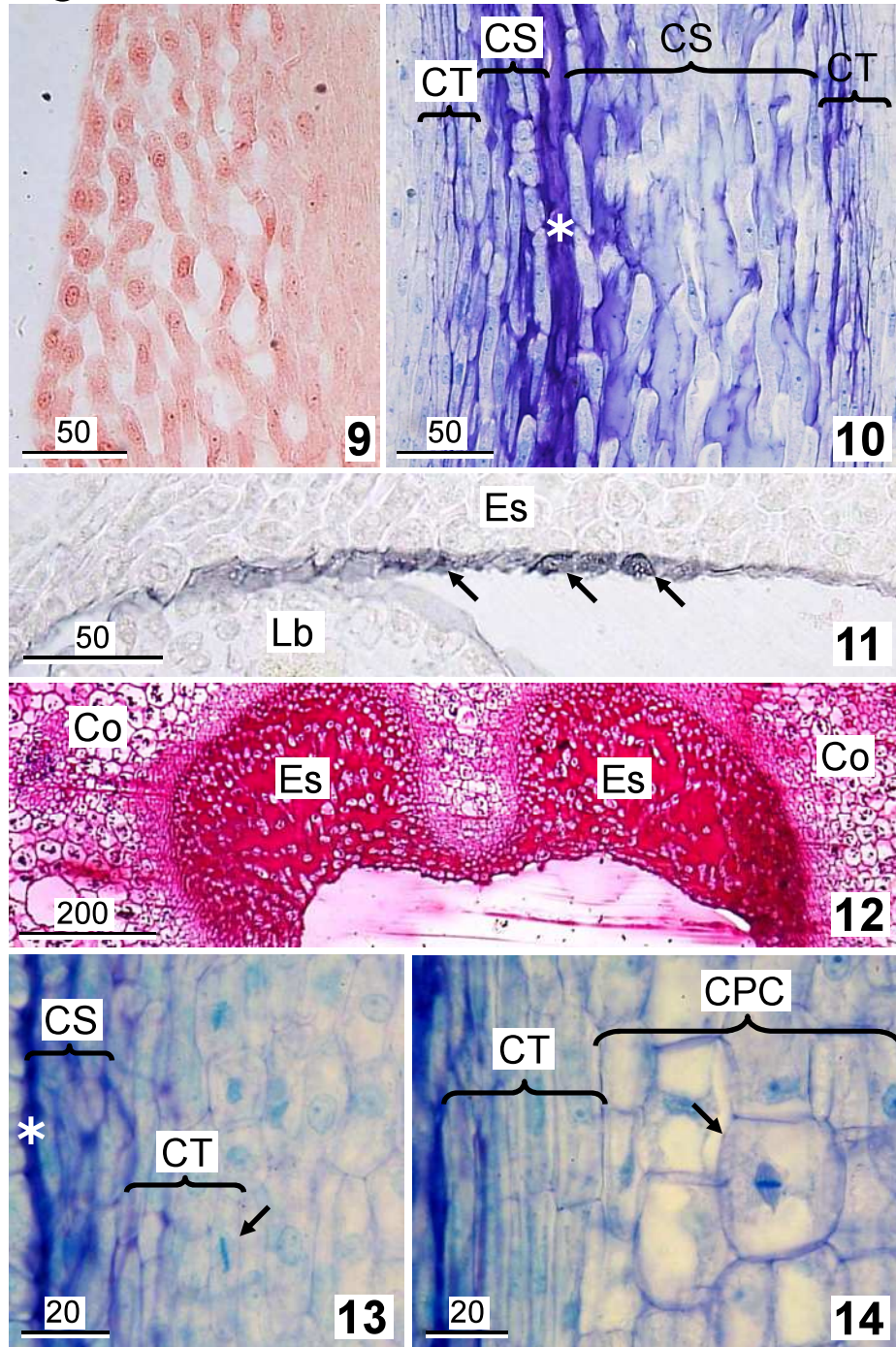
Figuras 25-27: Micrografias de varredura do estigma da flor recém-aberta de *Rodriguezia venusta*. Fig. 25- Panorama do estigma, com a cutícula evidente, com uma parte se soltando (setas). Fig. 26- Detalhe da cutícula que recobre o estigma, com material externo (setas) e inúmeras estruturas interpretadas como sendo poros (ovais). Fig. 27- Células do tecido estigmático com a cutícula removida, mostrando secreção de aspecto fibrilar (setas). Barras de escala em micrômetros.

Figuras 28-30: Flores recém-abertas de *Rodriguezia venusta*. Figuras 31-33: Flores senescentes de *R. venusta*, com pelo menos seis dias após abertura. Fig. 28- Detalhe do corte longitudinal do estigma, com material externo à cutícula, corado com azul de toluidina (setas). Fig. 29- Detalhe do corte longitudinal do estigma, com material externo à cutícula corado pelo PAS (setas). Fig. 30- Detalhe do corte longitudinal do ovário corado com azul de toluidina. Fig. 31- Panorama do estigma e da região apical do tecido transmissor, com a camada celular superficial destacada (setas). Coloração: azul de toluidina. Fig. 32- Detalhe do corte longitudinal do estigma, corado com PAS. Fig. 33- Corte transversal do tecido transmissor, corado com ácido tânico e cloreto férrico. Legendas: Es- estigma; Pl- placenta; TT- tecido transmissor. Barras de escala em micrômetros.

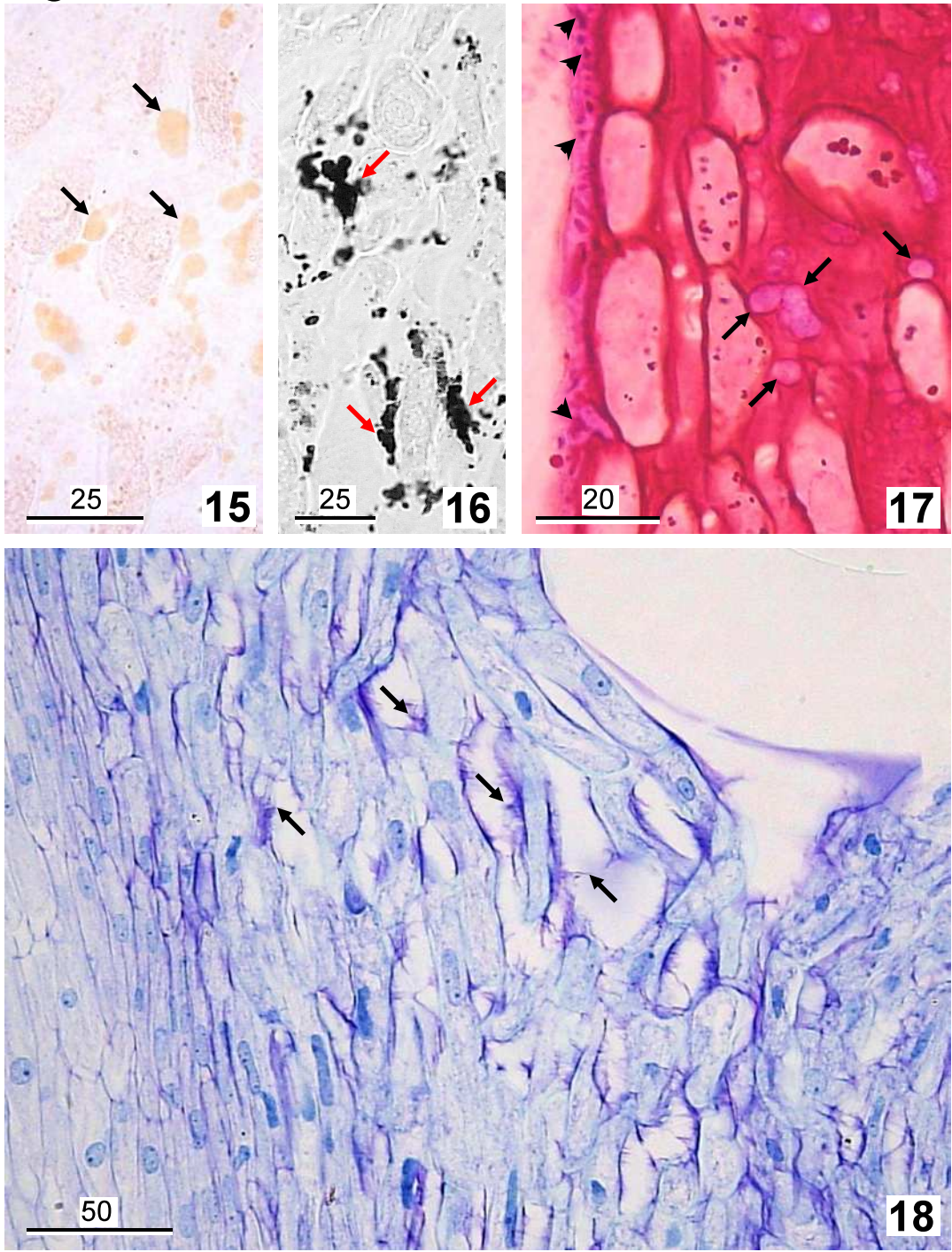
Figuras 1-8



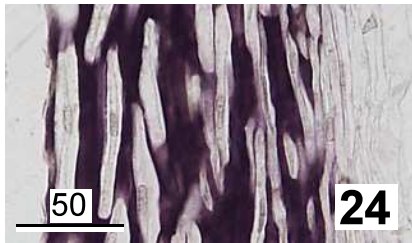
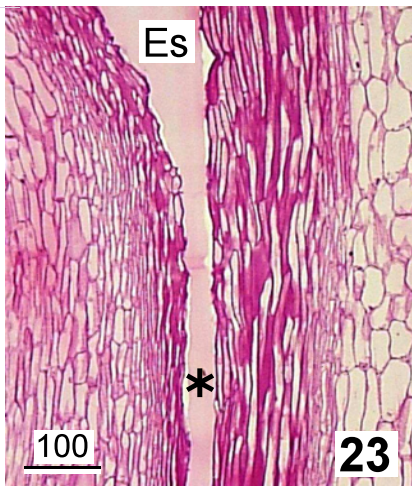
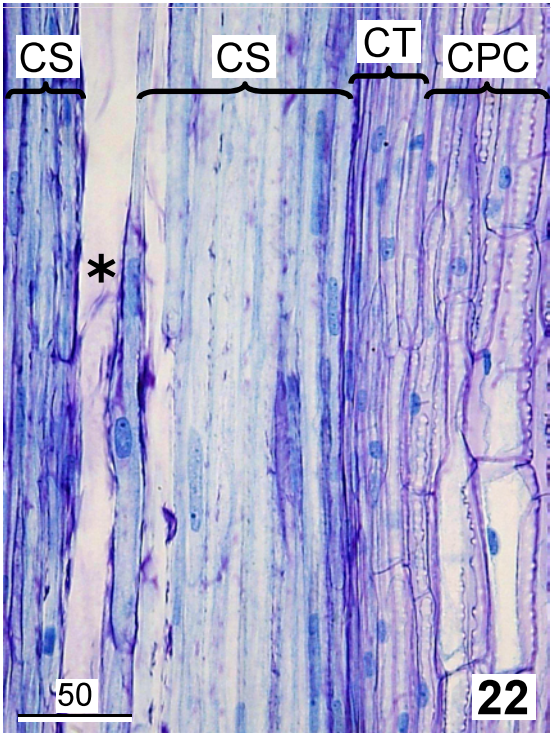
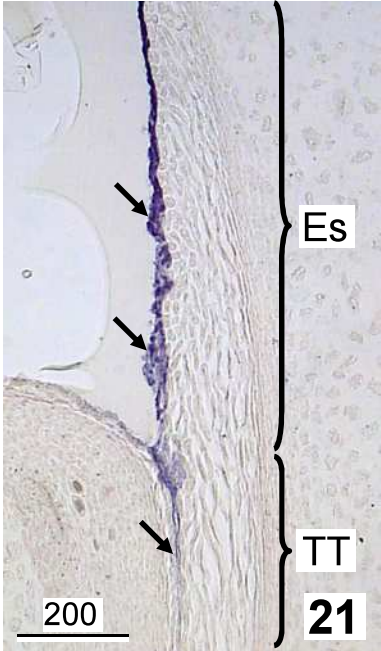
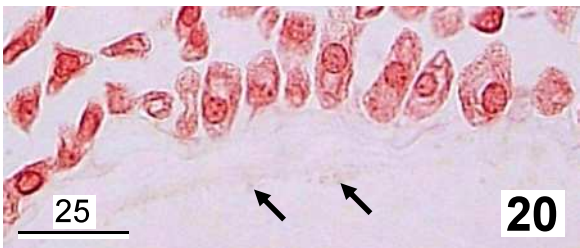
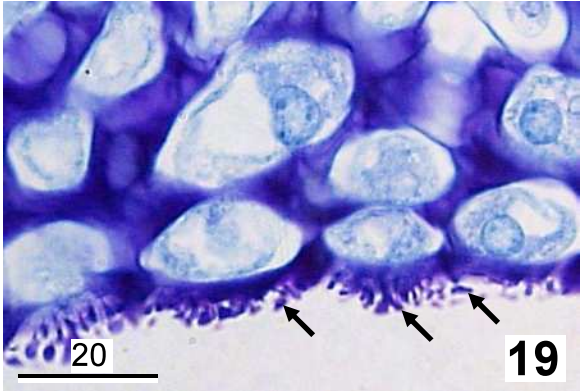
Figuras 9-14



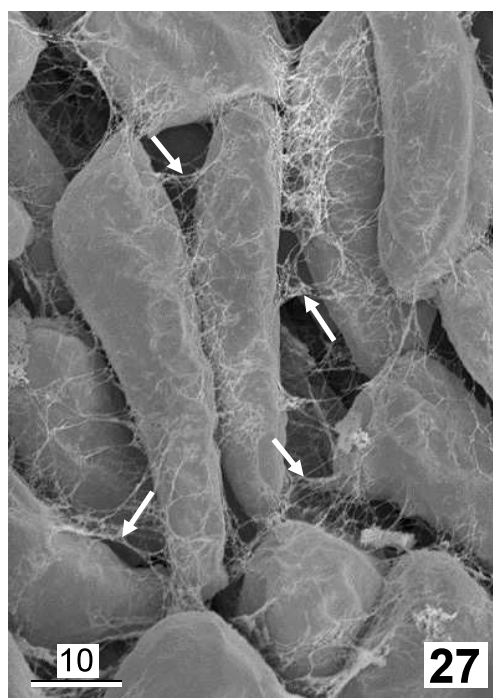
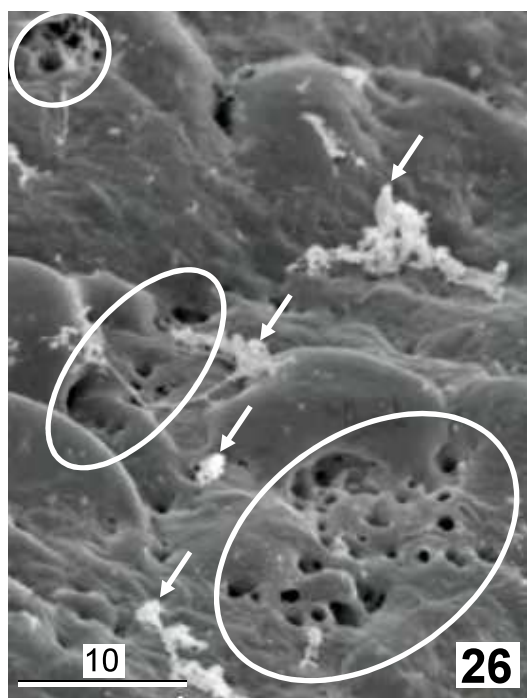
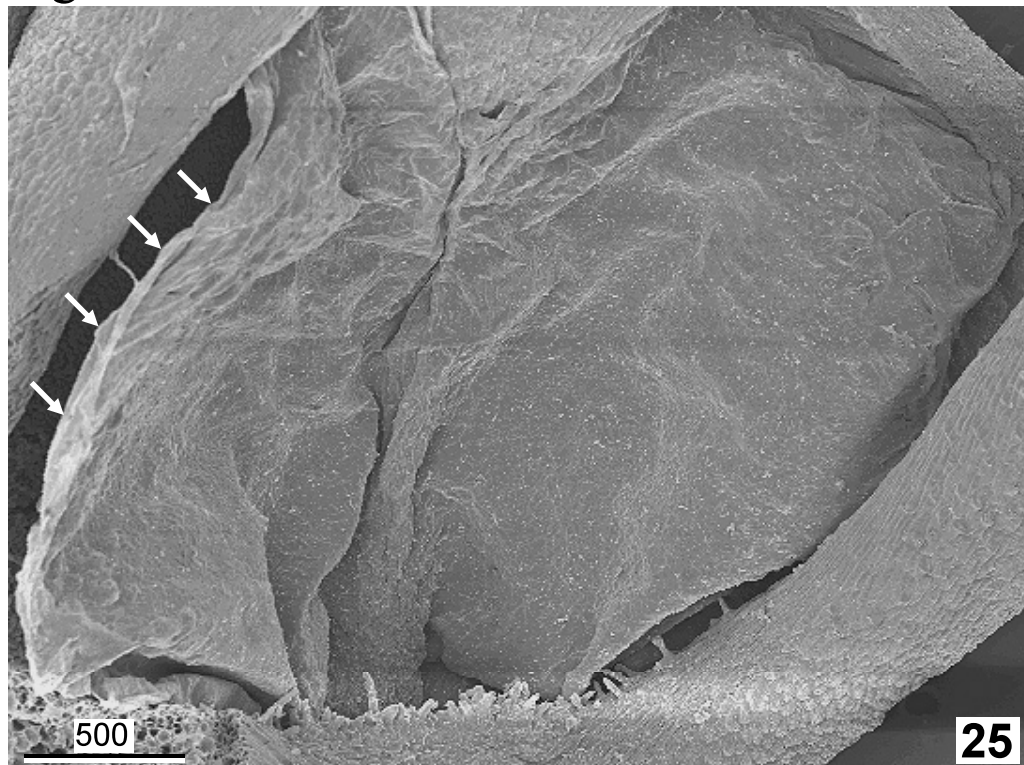
Figuras 15-18



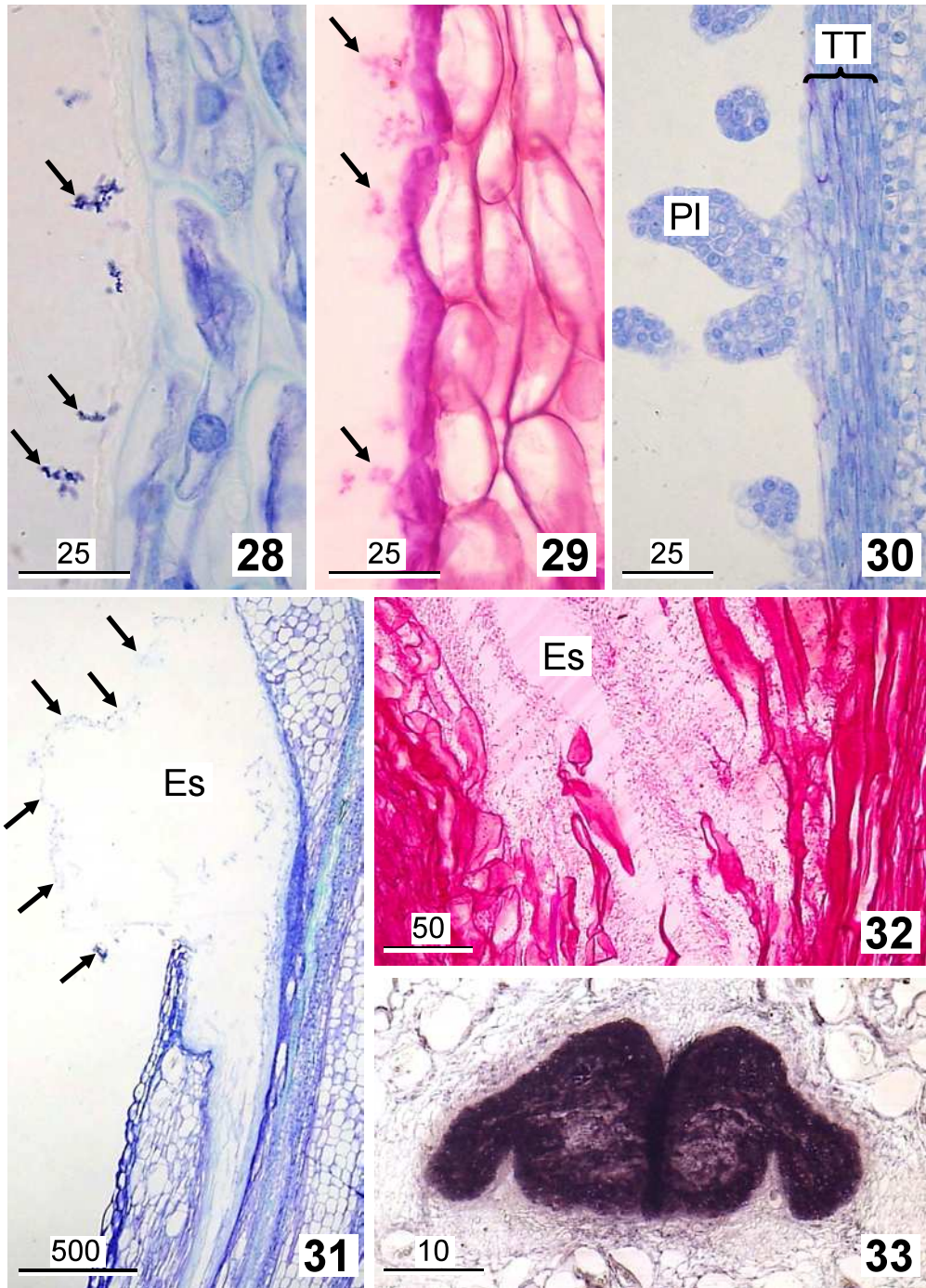
Figuras 19-24



Figuras 25-27



Figuras 28-33



CAPÍTULO 4

Anatomia e histoquímica dos nectários de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)

Carlos André Espolador Leitão & Angelo Luiz Cortelazzo

Artigo a ser submetido para publicação na revista

Annals of Botany

Anatomia e histoquímica dos nectários de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rehb. f. (Orchidaceae).

LEITÃO, C. A. E¹. & CORTELAZZO, A. L.²

¹ Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - BA. candreel@yahoo.com.br

² Departamento de Biologia Celular, Unicamp - SP. angelo@unicamp.br

PALAVRAS-CHAVE

Nectários, estruturas secretoras, anatomia comparada, orquídea, histoquímica.

RESUMO

Rodriguezia venusta possui nectários floral e extraflorais. Os nectários extraflorais localizam-se em regiões pontuais no bordo e sub-bordo das folhas em expansão, ou na bráctea que subtende o botão floral. São pouco diferenciados, possuindo um parênquima nectarífero que secreta o néctar em espaços intercelulares, que chega ao exterior através de estômatos. É possível que as células epidérmicas dos nectários bracteais também sejam atuem na eliminação do néctar. Ocorrem feixes vasculares sem contudo emitir terminações no local. O nectário floral insere-se no receptáculo adnato à face abaxial do labelo. É estruturalmente complexo, sendo parcialmente revestido por tricomas nectaríferos secretores, possuindo em sua estrutura interna um parênquima diferenciado em células nectaríferas secretoras e

em células fundamentais. Este nectário é ricamente vascularizado, havendo terminações vasculares nas subjacências da epiderme tricomatosa.

INTRODUÇÃO

Nectários são estruturas secretoras de néctar, uma solução composta basicamente de sacarose, glicose e frutose, podendo conter outras substâncias (Fahn, 1979a, 1988). Podem ocorrer em diferentes partes do corpo da planta, sendo denominados florais os nectários presentes na flor, e extraflorais aqueles em outras partes da planta (Schmid, 1988).

A secreção de néctar é geralmente associada à função de atrativo a animais, seja para polinização (Cruden *et al.*, 1983), seja para proteção contra ataque de herbívoros (Beattie, 1985). Entretanto, existem relatos de nectários que são visitados por organismos que aparentemente não conferem nenhum benefício à planta (Inouye, 1983; O'Dowd and Catchpole, 1983). A morfologia dos nectários é muito diversa, visto que essas estruturas apareceram independentemente em diversos táxons (Elias, 1983; Vogel, 1997). Os nectários podem ter sua origem evolutiva a partir de outras estruturas secretoras tais como hidatódios (Elias and Gelband, 1977), ou então pela modificação de tricomas secretores (McDade and Turner, 1997) ou pelo agregamento dos mesmos (Lersten and Brubaker, 1987). Uma mesma planta pode ainda portar nectários florais e extraflorais, que podem ser estruturalmente semelhantes (Leitão *et al.*, 2005) ou diferentes entre si (Davis *et al.*, 1988; Thomas and Dave, 1992).

Orchidaceae, com aproximadamente 19.500 espécies, é uma das maiores famílias de angiospermas (Dressler, 1993). O néctar é o principal recurso floral para os polinizadores (Van der Pijl and Dodson, 1966) e, tendo-se em vista o

número de espécies, são poucos os trabalhos que tratam da anatomia de nectários. Em adição, praticamente não existem relatos de nectários extraflorais em estruturas fora das inflorescências (Solereder and Meyer, 1969; Fischer *et al.*, 1990; Almeida and Figueiredo, 2003), não sendo encontrado, no presente levantamento bibliográfico, nenhum trabalho sobre a estrutura de um nectário foliar de orquídea.

Rodriguezia venusta pertence à subtribo Oncidiineae, subfamília Epidendroideae (Dressler, 1993). Trata-se de uma orquídea epífita que ocorre no Brasil e no Peru (Griffiths, 1994). Suas flores são brancas com uma mancha amarela no labelo, geralmente dispostas em um a três racemos que emergem da base dos pseudobulbos. *R. venusta* possui nectários florais e extraflorais, estes últimos ocorrendo na bráctea que subtende cada botão floral e nas folhas vegetativas, quando em expansão.

Visando contribuir para o conhecimento da estrutura dos nectários em Orchidaceae, este trabalho tem como objetivo descrever, de forma comparada, a anatomia dos diferentes nectários de *R. venusta* e detectar, mediante testes histoquímicos, algumas classes de substâncias presentes nos nectários em atividade secretora.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras. Os espécimes de *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. foram coletados em uma mata de galeria localizada no município de Barra do Choça, estado da Bahia, Brasil, coordenadas 14°53'26"S; 40°32'37"W, 778m de altitude, em excursões realizadas nos anos de 2004 e 2005. O material testemunha foi depositado no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade

Federal de Viçosa (VIC) – MG, Brasil, sob o número 31.027. As plantas cresceram em casa de vegetação e a coleta das amostras realizou-se durante as florações de novembro/dezembro de 2004 e 2005. Utilizando-se tubo capilar, foram obtidas amostras da secreção dos nectários analisados, que foram armazenadas a -4°C para posterior submissão ao teste Keto-Diabur-Test®, da Roche, para detecção de glicose na urina. Amostras de nectários florais (NFs) de flores em início de antese; de nectários extraflorais (NEFs) da bráctea que subtende os botões florais; do bordo da base da lâmina das folhas, em expansão, que subtendem o pseudobulbo e do bordo da lâmina da folha, também em expansão, no ápice do pseudobulbo; foram removidas com o auxílio de uma lâmina de barbear. As amostras foram fixadas em formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico (FAA) por 24h e estocadas em etanol 70%.

Microscopia de luz. As amostras destinadas à inclusão em parafina foram desidratadas em série etanol / álcool butílico terciário, sendo posteriormente embebidas em parafina sob vácuo (Leitão and Cortelazzo, *in press*). Já as amostras destinadas à inclusão em resina glicol-metacrilato (Historesin – Leica) foram parcialmente desidratadas a etanol 95%, sendo posteriormente infiltradas na resina, segundo instruções do fabricante. Para obtenção de cortes seriados em parafina (8µm) e Historesin® (2µm), foi utilizado um micrótomo rotativo e navalha tipo C. Os cortes foram afixados em lâminas e submetidos a diferentes técnicas de contrastação e histoquímica, a saber: para caracterização estrutural e obtenção de metacromasia – azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH4,0 (Vidal, 1977); para detecção de carboidratos totais - reação PAS (Maia, 1979), para detecção de amido – lugol (Johansen, 1940); para evidênciação de mucilagem – ácido tânico 5% e cloreto férrico 3% (Pizzolato and Lillie, 1973); para

evidenciação de proteínas totais – xylidine ponceau 0,1% pH 2,5 (Vidal, 1970) e para localização de lipídios – sudan black B, (Pearse, 1980 modificado; Benes, 1964 modificado). Com exceção do sudan black B, lugol e xylidine ponceau, foram realizados os devidos controles para todos os testes histoquímicos.

Para montagem das lâminas, utilizou-se resina sintética bálsamo-do-canadá (Berlyn and Miksche, 1976), gelatina glicerizada (Kaiser, 1880) ou água (Johansen, 1940), segundo a metodologia de contrastação utilizada.

Para análise e documentação fotográfica, utilizou-se um microscópio Olympus CX21, equipado com recurso de polarização e com recurso de captura de imagens digital.

Microscopia eletrônica de varredura. Parte das amostras estocada em etanol 70% foi re-hidratada, pós-fixada em tetróxido de ósmio 1% por 24h, lavada em água destilada e desidratada em série etílica. Posteriormente, foi submetida ao ponto crítico do CO₂ utilizando-se um CPD030 da Balzers. A deposição catódica com ouro foi realizada utilizando-se um SCD050 da Balzers (Bozzola and Russell, 1992). Para observação e documentação fotográfica, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5800 LV, a 10Kv, equipado com sistema de captura de imagens digital.

RESULTADOS

A secreção produzida pelas estruturas secretoras aqui estudadas reagiu fortemente com o teste Keto-Diabur-Test®, da Roche, indicando a presença de glicose. Sendo assim, neste trabalho a secreção será considerada néctar, e as estruturas secretoras, nectários.

Nectários extraflorais foliares. São localizados apenas quando apresentam uma gota de secreção (figs. 1, 2). Esta pode ocorrer na base sub-marginal da lâmina foliar, próximo à zona de abscisão entre a lâmina e a bainha, assim como ao longo da margem da lâmina foliar, sempre na face abaxial (fig. 1). No primeiro caso o nectário é maior e mais distante do bordo foliar (fig. 1, 3), enquanto os nectários ao longo do bordo são menores e mais próximos a este (fig. 1, 2, 4, 5). Ambos os nectários são constituídos por um parênquima nectarífero, cujas células se dispõem justapostas, em fileiras periclinais no sentido longitudinal da folha (fig. 6), em continuidade com as demais células do parênquima clorofiliano do mesofilo homogêneo, porém sendo menores (fig. 5) e mais curtas. Essas células apresentam núcleo relativamente grande com um nucléolo evidente, citoplasma mais denso e fortemente corado com o azul de toluidina (AT) (fig. 3) e com o xylidine ponceau (XP) (fig. 7), apresentando em geral um vacúolo menor que o das demais células do mesofilo (figs. 3, 5). Neste ocorre um corpúsculo esférico ou de aspecto granular, que se cora fortemente com o PAS (fig. 6) e com o ácido tânico e cloreto férrico (AcT/FeCl₃) (fig. 8) e cujo contorno se cora com o XP (fig. 7). Associado a este corpúsculo, ocorre freqüentemente um corpúsculo birrefringente (fig. 9) que se cora com o sudan black B (SBB) (fig. 10). O citoplasma dessas células pode apresentar pequenos grãos de amido (fig. 11). As células mais próximas à epiderme abaxial, em especial nas adjacências das câmaras subestomáticas, delimitam espaços intercelulares um pouco mais amplos que as demais células do parênquima nectarífero (fig. 6). Na região do nectário, assim como por toda a folha, observam-se grandes idioblastos contendo um feixe de ráfides (figs. 4, 8) e com conteúdo que se cora com PAS e com AcT/FeCl₃ (fig. 8).

A folha é hipoestomática, a epiderme é simples com a cutícula espessa (fig. 12) e as células apresentam paredes mais espessas e citoplasma menos denso que as células do parênquima nectarífero (fig. 6). No vacúolo também ocorre o corpúsculo esférico ou de aspecto granulado (fig. 6). Tanto na região do nectário quanto no restante da lâmina foliar, os estômatos ocorrem dispostos em fileiras (fig. 13) alinhadas com feixes de fibras (fig. 12), separados da epiderme abaxial por uma hipoderme uniestratificada descontínua (figs. 4, 6). As fibras são vivas e possuem pequenas pontuações simples em toda sua parede celular. As mais externas apresentam corpos cônicos translúcidos e não birrefringentes em sua parede periclinal externa, tratando-se provavelmente (e aqui denominados) de corpos silicosos (fig. 12). Entre esses feixes ocorrem feixes hipodérmicos menos calibrosos e destituídos de corpos silicosos (fig. 12). Sobre a epiderme, observam-se hifas (fig. 3), algumas vezes penetrando pelos estômatos.

Os feixes vasculares encontram-se subjacentes à epiderme adaxial separados desta por uma camada de células hipodérmicas mais uma ou duas camadas de células parenquimáticas (figs. 3-5). São colaterais, envolvidos por fibras vivas. Assim como nos feixes de fibras, a parede periclinal externa das fibras superficiais dos feixes vasculares também apresenta corpos silicosos. Tanto os feixes vasculares quanto os feixes de fibras encontram-se em contato direto com as células do parênquima nectarífero (figs. 3, 4).

Nectário extrafloral bracteal. Ocorre na metade basal da bráctea que subtende cada flor. Essa região é espessada e de coloração verde, afinando distalmente. O restante da bráctea é uma região mais fina, incolor e translúcida (fig. 14), apresentando estrias longitudinais (fig. 15) decorrentes do relevo formado pelos feixes de fibras e vasculares, entre regiões mais finas do mesofilo colapsado. Este

nectário se mostrou mais ativo que os nectários foliares. Produz uma ou duas gotas de secreção que são frequentemente visitadas por formigas (fig. 14). No habitat natural dos espécimes analisados, as formigas que forrageavam este nectário pertenciam ao gênero *Crematogaster*.

O nectário apresenta um parênquima nectarífero, constituído por células justapostas, porém em disposição menos regular que a verificada nos nectários foliares (fig. 16). O núcleo é grande e em geral esférico com um ou dois nucléolos, o citoplasma é denso e se cora fortemente pelo AT (fig. 17) e pelo XP, e o vacúolo geralmente é único e relativamente pequeno (fig. 17). Podem ocorrer pequenos grãos de amido local (fig. 18). Em cada célula usualmente ocorre um corpúsculo intravacuolar, que possui formato esférico (fig. 17) ou de aspecto granulado. Assim como descrito para os nectários foliares, este corpúsculo cora-se fortemente com o PAS (fig. 19) e com o AcT/FeCl_3 , e geralmente é associado a um corpúsculo birrefringente que se cora com o SBB. As células do parênquima nectarífero encontram-se entre a vascularização que irriga a bráctea e a epiderme abaxial que recobre o nectário (fig. 16) e possuem diversos campos primários de pontuação em suas paredes (fig. 19). A camada de células subjacente à epiderme constitui uma hipoderme muito pouco distinta das demais células do parênquima nectarífero (fig. 20). Ocorrem alguns idioblastos contendo ráfides no local (fig. 16).

A epiderme do nectário é semelhante à dos nectários foliares (fig. 20), entretanto a cutícula é bem mais fina no nectário bracteal, podendo apresentar regiões intumescidas por aparente descolamento (fig. 21) e prováveis poros diminutos (fig. 22). Os estômatos são modificados (fig. 22) e subtendidos por uma pequena câmara subestomática (fig. 20). As células do parênquima nectarífero nas proximidades da câmara subestomática delimitam espaços intercelulares mais amplos que as células mais distantes (fig. 20).

A vascularização que passa pelo nectário é também constituída por feixes colaterais formados por xilema, floema e, externamente a este, fibras vivas com pontoações simples, semelhantes às descritas nos nectários foliares. As fibras em contato com as células do parênquima nectarífero possuem corpos silicosos cônicos (fig. 23). Em células parenquimáticas pertencentes ao floema, ocorre um corpúsculo fusiforme conspícuo, que se cora fortemente pelo AT (figs. 23, 24) e pelo XP. Não foram vistos feixes unicamente constituídos por fibras, na região do nectário.

Nectário floral. Observando a flor após a ressupinação que se dá por torção do pedicelo, o nectário floral ocorre entre as sépalas laterais, que são coalescentes em toda a sua extensão, e o labelo (fig. 25) inserindo-se no receptáculo juntamente com este. O nectário é parcialmente revestido por tricomas nectaríferos (fig. 26), e possui formato semelhante a uma língua humana, porém mais estreito (fig. 27).

Internamente, o nectário possui um parênquima nectarífero (PN) secretor, um parênquima fundamental (PF) e vascularização (fig. 28). O PN ocorre subjacente aos tricomas nectaríferos em torno das terminações vasculares. É constituído por células com núcleo relativamente grande e um ou dois nucléolos evidentes, citoplasma denso que se cora fortemente com AT (fig. 29) e XP (fig. 30); porém difere-se do parênquima nectarífero dos nectários extraflorais por apresentar um vacúolo maior, grãos de amido inconspícuos e pela ausência dos corpúsculos intravacuolares birrefringentes que se coram com SBB. Entretanto, em algumas células ocorre o corpúsculo esférico ou de aspecto granulado, que se cora fortemente com o PAS (fig. 31), mas não se cora de forma perceptível como XP. Esses corpúsculos são maiores e mais freqüentes nas células do PF, que são mais volumosas (fig. 32), com o núcleo menor e o citoplasma discreto, envolvendo um

grande vacúolo central (fig. 29). O PF constitui praticamente toda a estrutura interna do nectário, tratando-se do seu tecido mais volumoso (fig. 28).

A epiderme do nectário é constituída integralmente por tricomas nectaríferos nas suas regiões apical e subapical. Em sentido basípeto, a ocorrência desses tricomas passa a se restringir apenas à face inferior do nectário, sendo completamente ausentes em sua porção basal (figs. 26-28). No lugar dos tricomas, ocorrem células epidérmicas de revestimento, isodiamétricas ou alongadas no sentido longitudinal do nectário. Os tricomas nectaríferos são pluricelulares, apresentando a base multisseriada e a porção média e apical unisseriadas (fig. 33). A base do tricoma é larga, afilando em direção ao ápice obtuso (figs. 26, 33), sendo comum a ocorrência de tricomas geminados. Também podem ocorrer tricomas ramificados (fig. 34). O núcleo é evidente e o citoplasma se cora fortemente com AT (fig. 33) e XP (fig. 30). Entre os tricomas, foi observado material que se cora com o PAS, com AT (fig. 37) e com AcT/FeCl₃ (fig. 35). A parede das células dos tricomas, assim como das demais células epidérmicas e das células parenquimáticas da camada subjacente aos tricomas, é mais espessa e se cora mais fortemente com PAS e com AT, em comparação com as demais células do parênquima nectarífero deste nectário (figs. 29, 33). A cutícula é muito fina, corando-se fracamente com o SBB (fig. 36). Os campos primários de pontuação encontrados nas paredes entre células adjacentes nos tricomas nectaríferos são conspícuos (figs. 33, 37, 38).

A vascularização do nectário tem origem comum com a do labelo. É constituída por xilema e floema, entretanto não ocorrem as fibras vivas nem os corpos silicosos descritos nos nectários extraflorais. No nectário floral, partem ramificações da vascularização, formando terminações vasculares que se dirigem à epiderme secretora. O floema estende-se nesta direção um pouco mais que o xilema, sendo observadas terminações floemáticas separadas da epiderme secretora

por quatro camadas de células do PN (fig. 29). Em algumas células parenquimáticas, aparentemente células companheiras e células terminais das terminações vasculares, observa-se uma estrutura fusiforme conspícua que se cora fortemente com AT (fig. 39) e com XP. Nas adjacências dos feixes mais calibrosos encontrados na metade basal do nectário, ocorrem grãos de amido evidentes, sendo inconspícuos nas células parenquimáticas mais distantes da vascularização, assim como na metade superior do nectário (fig. 40).

DISCUSSÃO

Rodriguezia venusta apresenta a particularidade de portar nectários em folhas, brácteas e flores, havendo grande diferença anatômica entre os nectários extraflorais e florais. Os nectários encontrados em espécies de Orchidaceae são muito diversos (Davies *et al.*, 2005), sendo relatados em esporões (Brown, 1992; Figueiredo and Pais, 1992; Galetto *et al.*, 1997; Stpiczyńska *et al.*, 2005), na base da coluna (Stpiczyńska *et al.*, 2003), no calo da face adaxial do labelo (Davies *et al.*, 2005), na base deste e das sépalas (Ruschi, 1997), no pedicelo do botão floral, flor e fruto (Almeida and Figueiredo, 2003).

Os nectários extraflorais de *R. venusta* são estruturalmente semelhantes entre si por serem constituídos por um parênquima nectarífero cujas células possuem características de células secretoras tais como paredes finas, citoplasma denso e núcleo relativamente grande. Em visão macroscópica, esses nectários são indiscerníveis quando sem a gota de secreção. Em cortes longitudinais do nectário foliar, observa-se um alinhamento das células do parênquima nectarífero com as demais células do mesofilo foliar adjacentes a este. Já nos nectários bracteais, o arranjo menos organizado das células do parênquima nectarífero pode ser devido à

disparidade da espessura da bráctea na região do nectário, em relação aos bordos e à metade superior da bráctea, bem mais finos e aclorofilados.

Em ambos os nectários extraflorais, foram observados estômatos na epiderme, assim como em algum grau, características de células secretoras nas demais células epidérmicas do nectário. Seria razoável supor a participação, ainda que pequena, dessas células na secreção do néctar para o apoplasto, tal qual provavelmente ocorre com as células do parênquima nectarífero. Os espaços intercelulares, que são maiores nas adjacências das pequenas câmaras subestomáticas, podem ser uma adaptação anatômica para uma drenagem mais eficiente do néctar, que seria liberado para fora do mesofilo através dos estômatos na região do nectário.

A atuação de estômatos na eliminação de néctar produzido por um parênquima nectarífero é amplamente descrita em vários grupos taxonômicos, principalmente em nectários florais (Fahn, 1952; Durkee *et al.*, 1981; Decraene and Smets, 1991; Galetto and Bernardello, 1992; O'Brien *et al.*, 1996; Gaffal *et al.*, 1998). No caso dos nectários foliares de *R. venusta*, por causa da grande espessura da cutícula, provavelmente os estômatos sejam as únicas vias de saída do néctar para o exterior. Já nos nectários bracteais, cuja cutícula é mais fina, com aparentes poros e regiões de descolamento das células epidérmicas, possivelmente também ocorre saída de néctar através da cutícula, de maneira semelhante ao descrito em *Tropaelum majus* (Rachmilevitz and Fahn, 1975), *Echinacea purpurea* (Wist and Davis, 2006) e em espécies de Limnanthaceae (Link, 1992).

A vascularização, constituída por floema, xilema e fibras vivas, apenas passa através dos nectários extraflorais de *R. venusta*, sem emitir terminações vasculares. De acordo com Elias (1983), ocorrem nectários bracteais em alguns gêneros de Orchidaceae, sendo do tipo avascularizado. Entretanto, observou-se no presente

trabalho a íntima relação da vascularização com as células do parênquima nectarífero, o que sugere ativa atuação no fornecimento de matéria prima para o néctar.

A ocorrência de corpos silicosos na bainha dos feixes vasculares é comum entre as orquídeas (Stern *et al.*, 1993a, b; Holtzmeier *et al.*, 1998; Stern and Whitten, 1999; Stern and Judd; 2002), porém não encontrada na subfamília Orchidoideae. Sua presença ajuda a sustentar que Orchidaceae é um grupo fortemente natural (Dressler, 1993). Withner *et al.* (1974) e Bonates (1993) descreveram estruturas semelhantes em fibras da bainha do feixe vascular de orquídeas, referindo-se a elas como pontoações. Bonates (1993) ainda correlacionou essas fibras a uma adaptação para um efetivo controle de fluxo hídrico. Na folha de várias espécies de *Maxillaria*, ocorrem fibras que são interpretadas como atuantes no armazenamento de água (Holtzmeier *et al.*, 1998). Em *R. venusta* é razoável cogitar uma ação ao menos secundária no transporte de água e/ou solutos por estas fibras, uma vez que elas mantêm o protoplasto vivo e possuem pequenas pontoações simples.

Anatomicamente, o nectário floral de *R. venusta* é, sem dúvida, muito mais complexo que os seus nectários extraflorais. Trata-se de uma estrutura que se insere no receptáculo juntamente com o labelo, apresentando grande parte de sua superfície revestida por tricomas especializados. Internamente, em adição à vascularização, ocorrem dois tipos distintos de parênquima: fundamental e nectarífero. O parênquima fundamental aparentemente tem como principal função dar estrutura ao nectário, enquanto o parênquima nectarífero, por apresentar núcleo relativamente maior e citoplasma intensamente corado com o XP, deve apresentar atividade secretora, juntamente com os tricomas nectaríferos. Segundo Galetto *et al.*, (1997), são raros os relatos de nectários vascularizados e de estrutura complexa

em Orchidaceae. O nectário floral de *R. venusta* é de uma complexidade estrutural ímpar, sendo provavelmente um dos nectários mais complexos já descritos em um trabalho de anatomia de Orchidaceae.

Uma característica que chama a atenção no nectário floral de *R. venusta* é o formato dos tricomas nectaríferos, multisseriados na base e unisseriados no ápice, que não é globular. Essa característica distoa da relatada em tricomas secretores de néctar de algumas dicotiledôneas, como os encontrados em espécies de Malvales (Arbo, 1972; Sawidis *et al.*, 1987; Leitão *et al.*, 2005), Leguminosae (Fahn, 1979a; Lersten and Brubaker, 1987) e Caprifoliaceae (Fahn, 1979b) e também de tricomas glandulares não nectaríferos (Werker, 2000), inclusive dos relatados em Orchidaceae, que geralmente são capitados (Solereder and Meyer, 1969; Kurzweil *et al.*, 1995; Werker, 2000). Em adição, não se observou nenhum anel de cutinização, tal como uma estria de Caspary, que ocorre nas paredes laterais dos tricomas nectaríferos de *Abutilon* (Findlay and Mercer, 1971) e *Triumfetta semitriloba* (Leitão *et al.*, 2005). Esse tipo de cutinização é uma característica comumente descrita em tricomas glandulares (Uphof, 1962; Ascensão *et al.*, 1999), que atua forçando o transporte unicamente via simplasto dos precursores da secreção (Lüttge, 1971; Fahn, 1988).

Antagonicamente, o que se verificou em *R. venusta* foi uma maior espessura em todas as paredes dos tricomas, assim como na camada celular do parênquima subjacente, com forte afinidade com o AT em pH4,0, obtendo-se o fenômeno de metacromasia (Silva *et al.*, 1997). Uma vez que em pH inferior ao biológico já existe grande disponibilidade de radicais catiônicos nas paredes, é de se esperar uma permeabilidade à água relativamente alta, já que a parede tem caráter polar.

As numerosas regiões de menor espessamento de parede das células nectaríferas parenquimáticas e epidérmicas, nos nectários estudados, sugerem uma

rica comunicação simplástica entre essas células. Entre as células dos tricomas nectaríferos e respectivas adjacentes, esses campos são maiores e mais visíveis, o que sugere adaptação para um fluxo fluente de pré-néctar. A cutícula extremamente fina que reveste os tricomas nectaríferos provavelmente não oferece resistência significativa à saída do néctar. Ao microscópio de luz e ao eletrônico de varredura, não foram observados deslocamentos por acúmulo de secreção no espaço subcuticular, como descritos para os nectários de *Abutilon* (Findlay and Mercer, 1971), *Lonicera japonica* (Fahn, 1979a, b), *Passiflora warmingii* (Durkee, 1983) e *Aphelandra* (McDade and Turner, 1997). A aparente permeabilidade e a semelhança estrutural, ao microscópio de luz, de todas as células que constituem os tricomas nectaríferos de *R. venusta* sugere que a secreção do néctar para o exterior não ocorra, necessariamente, apenas nas células mais distais.

A presença de um parênquima nectarífero cujas células possuem características de células secretoras, subjacente à epiderme tricomatosa do nectário e também nas adjacências das terminações vasculares, pode ser interpretada como uma ativa participação do PN e dos tricomas nectaríferos na secreção do néctar em *R. venusta*. As terminações vasculares de floema prolongam-se mais que as de xilema, o que pode indicar uma concentração de açúcares relativamente alta no néctar secretado (Lüttge, 1971; Elias, 1983).

O corpúsculo fusiforme encontrado em algumas células do floema dos nectários bracteal e floral de *R. venusta*, corou-se fortemente com o AT e com XP, indicando grande quantidade de radicais catiônicos e aniônicos. Devido a estes últimos, pode-se inferir a natureza protéica desses corpúsculos. Em *Passiflora* foi constatada estrutura semelhante em células parenquimáticas do floema, descrita como “material fibrilar proteináceo” (proteinaceous fibrillar material) (Durkee *et al.*, 1981; Durkee, 1983). Entretanto, ao microscópio de luz é difícil a exata

identificação do corpo encontrado em *R. venusta*, podendo se tratar inclusive de um plastídeo.

Já o corpúsculo intravacuolar encontrado nas células epidérmicas e do parênquima nectarífero dos nectários extraflorais, e também no PF e PN dos nectários florais, observou-se a ocorrência de duas formas básicas: esférica e granulosa. Muitas vezes, esses corpúsculos ocorreram em formatos intermediários, aparentando ser uma esfera se desmanchando em pequenos grânulos, ou o inverso. A forte reação com o PAS além da reação com o AcT/FeCl₃ indicam natureza glicídica. A afinidade com o XP desses corpúsculos nos nectários extraflorais também sugere natureza protéica. Nos nectários florais de *Maxillaria coccinea* (Stpiczyńska *et al.*, 2003) e de *Hexisea imbricata* (Stpiczyńska *et al.*, 2005), ambas pertencentes à subfamília Epidendroideae (a mesma de *Rodriguezia*), foram descritos corpos intravacuolares semelhantes. Estes, por se corarem com Coomassie brilliant blue R-250, foram denominados pelos autores como “corpos protéicos” (protein bodies). Porém, nesses trabalhos, não foi realizada a reação PAS. Segundo Stpiczyńska *et al.* (2003), essas estruturas são incomuns e sua função é incerta. Sobre as estruturas birrefringentes associadas aos corpos intravacuolares nos nectários extraflorais de *R. venusta*, não foi encontrado nada similar no levantamento bibliográfico realizado para este trabalho.

Nos nectários extraflorais de *R. venusta*, foram encontrados pequenos grãos de amido no parênquima nectarífero. Já no nectário floral, os grãos de amido restringiram-se apenas às adjacências da vascularização, mais calibrosa, da metade basal do nectário. São freqüentes os relatos de consumo de grãos de amido durante a fase de secreção do nectário, contribuindo ao menos em parte, na produção do néctar (Subramaniam and Inamdar, 1985, 1986; Zer and Fahn, 1992; Galetto *et al.*, 1997). O fato de ter sido analisada apenas a aparente fase de secreção dos nectários

de *R. venusta*, nos impede de tirar conclusões quanto à participação dessa reserva no processo de secreção do néctar.

Apesar de todas as amostras de nectários do presente trabalho apresentarem gotas de secreção, após a confecção das lâminas não foram encontrados resquícios de material secretado externamente aos nectários extraflorais. Tal fato possivelmente se deve à solubilidade do néctar e à superfície lisa do nectário, tornando mais fácil a remoção do néctar no decorrer do processamento das amostras. Já no nectário floral, observou-se a presença de material entre os tricomas nectaríferos, principalmente em sua porção basal. Possivelmente, os tricomas ajudaram a reter um pouco de secreção. A coloração deste material com AcT/FeCl₃ indica a presença de mucilagem no néctar.

Os nectários bracteais eram ativos quando as flores associadas encontravam-se em botões, sendo intensamente visitados por formigas. No hábitat natural, a formiga forrageira pertence ao gênero *Crematogaster*, ao passo que as encontradas em casa de vegetação não foram identificadas. Essas últimas forrageavam inclusive os nectários florais. A presença de formigas nas plantas forrageando os nectários extraflorais muitas vezes tem efeito repelente para herbívoros, prevenindo danos à planta (Keeler, 1977; Costa *et al.*, 1992; Koptur *et al.*, 1998; Almeida and Figueiredo, 2003) e *Crematogaster* é um gênero de comportamento agressivo, comumente relatado como atuante nessa proteção (Fiala *et al.*, 1989; Bentley, 1977a, b; Smiley, 1986).

A presença, em *R. venusta*, de nectários em folhas jovens e também nas proximidades dos botões florais pode estar relacionada com a manutenção da integridade dessas partes da planta, por atrair formigas para esses locais. Quanto ao nectário floral, seria interessante a realização de um estudo sobre a sua atuação na interação inseto-planta. Este nectário mostrou algumas curiosas particularidades,

como estrutura complexa e localização, separada das estruturas reprodutivas externas, pelo labelo, sugerindo uma certa inacessibilidade do néctar ao polinizador. Para um melhor entendimento dessas características, devem ser encorajadas todas as iniciativas de estudo sobre nectários florais dentro do gênero *Rodriguezia*.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Heidi Dolder, pelas facilidades nos procedimentos em microscopia eletrônica de varredura, e à UESB, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida AM, Figueiredo RA. 2003.** Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology* **63**: 551-558.
- Arbo MM. 1972.** Estructura y ontogenia de los nectarios foliares del género *Byttneria* (Sterculiaceae). *Darwiniana* **17**: 104-158.
- Ascensão L, Mota L, Castro MM. 1999.** Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* **84**: 437-447.

- Beattie AJ. 1985.** *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*. New York: Cambridge University Press.
- Benes K. 1964.** Detection of lipids in plant meristematic cell with aid of sudan black staining. *Biologia Plantarum* **6**: 142-151.
- Bentley BL. 1977a.** Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* **8**: 407-427.
- Bentley BL. 1977b.** The protective function of ants visiting the extrafloral nectaries of *Bixa orellana* (Bixaceae). *Journal of Ecology* **65**: 27-38.
- Berlyn GP, Miksche JP. 1976.** *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Iowa: Iowa State University Press.
- Bonates LCM. 1993.** Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da amazônia. II - Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia Central. *Acta Amazonica* **23**: 315-348.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1992.** *Electron microscopy*. Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Brown PM. 1992.** *Platanthera pallida* (Orchidaceae), a new species of fringed orchids from Long Island, New York, U. S. A. *Novon* **2**: 308-311.

- Costa FMCB, Oliveira-Filho AT, Oliveira PS. 1992.** The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Volchysiaceae) in limiting herbivory: an experiment ant protection in cerrado vegetation. *Ecological Entomology* **17**: 363-365.
- Cruden RW, Hermann SM, Peterson S. 1983.** Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. In: Bentley B, Elias T, eds. *The biology of nectaries*. New York: Columbia University Press, 80-125.
- Davies KL, Stpiczyńska M, Gregg A. 2005.** Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **96**: 217-227.
- Davis AR, Peterson RL, Shuel RW. 1988.** Vasculature and ultrastructure of the floral and stipular nectaries of *Vicia faba* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* **66**: 1435-1448.
- DeCraene LPR, Smets E. 1991.** The floral nectaries of *Polygonum* s.l. and related genera (Persicarieae and Polygoneae): position, morphological nature and semophylexis. *Flora* **185**: 165-185.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Discorides Press.

- Durkee LT. 1983.** The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. In: Bentley B, Elias T, eds. *The biology of nectaries*. New York: Columbia University Press, 1-29.
- Durkee LT, Gaal DJ, Reisner WH. 1981.** The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. I. The floral nectary. *American Journal of Botany* **68**: 453-462.
- Elias TS, Gelband H. 1977.** Morphology, anatomy, and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Botanical Gazette* **138**: 206-212.
- Elias TS. 1983.** Extrafloral nectaries: their structure and distribution. In: Bentley B, Elias T, eds. *The biology of nectaries*. New York: Columbia University Press, 174-203.
- Fahn A. 1952.** On the structure of floral nectaries. *Botanical Gazette* **113**: 464-470.
- Fahn A. 1979a.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fahn A. 1979b.** Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany* **66**: 977-985.
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *The New Phytologist*. **108**: 229-257.

- Fiala B, Maschwitz U, Pong TY, Helbig AJ. 1989.** Studies of a south east Asian ant-plant association: protection of *Macaranga* trees by *Crematogaster borneensis*. *Oecologia* **79**: 463-470.
- Figueiredo ACS, Pais MS. 1992.** Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **70**: 325-331.
- Findlay N, Mercer FV. 1971.** Nectar production in *Abutilon* I. Movement of nectar through the cuticle. *Australian Journal of Biological Sciences* **24**: 647-656.
- Fischer BL, Sternberg LSL, Price D. 1990.** Variation in the use of orchid extrafloral nectar by ants. *Oecologia* **83**: 263-266.
- Gaffal KP, Heimler W, El-Gammal S. 1998.** The floral nectary of *Digitalis purpurea* L., structure and nectar secretion. *Annals of Botany* **81**: 251-262.
- Galetto L, Bernardello LM. 1992.** Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1101-1106.
- Galetto L, Bernardello G, Rivera GL. 1997.** Nectar, nectaries, flower visitors, and breeding system in five terrestrial Orchidaceae from central Argentina. *Journal of Plant Research* **110**: 393-403.

- Griffiths M. 1994.** *Index of Garden Plants*. London and Basingstoke: The Macmillan Press LTD.
- Holtzmeier MA, Stern LW, Judd WS. 1998.** Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **127**: 43-82.
- Inouye DW. 1983.** The ecology of nectar robbing. In: Bentley B, Elias T, eds. *The biology of nectaries*. New York: Columbia University Press, 153-173.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book.
- Kaiser E. 1880.** Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *Botanisch Zentralb* **180**: 25-26.
- Keeler KH. 1977.** The extrafloral nectaries of *Ipomea carnea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* **64**: 1182-1188.
- Koptur S, Rico-Gray V, Palacios-Rios M. 1998.** Ant protection of the nectaried fern *Polypodium plebeium* in central Mexico. *American Journal of Botany* **85**: 736-379.
- Kurzweil H, Linder HP, Stern WL, Pridgeon AM. 1995.** Comparative vegetative anatomy and classification of Dierke. *Botanical Journal of the Linnean Society* **117**: 171-220.

- Leitão CAE, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM, Silva KLFS, Collevatti RG. 2005.** Anatomy of the floral, bract and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**: 279-286.
- Lersten NR, Brubaker CL. 1987.** Extrafloral nectaries in Leguminosae: Review and original observations in *Erythrina* and *Mucuna* (Papilionoideae; Phaseoleae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **114**: 437-447.
- Link DA. 1992.** The floral nectaries in the Limnanthaceae. *Plant Systematics and Evolution* **179**: 235-243.
- Lüttge U. 1971.** Structure and fuction of plant glands. *Annual Review of Plant Physiology* **22**: 23-44.
- Maia V. 1979.** *Técnica histológica*. São Paulo: Atheneu.
- McDade LA, Turner MD. 1997.** Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). *American Journal of Botany* **84**: 1-15.
- O'Brien SP, Loveys BR, Grant WJR. 1996.** Ultrastructure and function of floral nectaries of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Annals of Botany* **78**: 189-196.
- O'Dowd DJ, Catchpole EA. 1983.** Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. - ant interactions. *Oecologia* **59**: 191-200.

Pearse AGE. 1980. *Histochemistry theoretical and applied. Vol. II.* Edinburgh: Churchill Livingstone.

Pizzolato TD, Lillie RD. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **21**: 56-64.

Rachmilevitz T, Fahn A. 1975. The floral nectary of *Tropaeolum majus* L. - The nature of the secretory cells and the manner of nectar secretion. *Annals of Botany* **39**: 721-728.

Ruschi A. 1997. *Orquídeas do Estado do Espírito Santo.* Rio de Janeiro: EXPED.

Sawidis TH, Eleftheriou EP, Tsekos I. 1987. The floral nectaries of *Hibiscus rosa-sinensis* I. Development of the secretory hairs. *Annals of Botany* **59**: 643-652.

Schmid R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries - historical perspective and terminological recommendations. *The Botanical Review* **54**: 179-232.

Silva TRG, Cortelazzo AL, Dietrich SMC. 1997. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. *Ciência e Cultura* **49**: 219-222.

- Smiley J. 1986.** Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on cartepillar survival. *Ecology* **67**: 516-521.
- Solereder H, Meyer FJ. 1969.** *Systematic anatomy of the monocotyledons Vol IV: Microspermae*. Jerusalem: IPST Press.
- Stern WL, Cheadle VI, Thorsch J. 1993a.** Apostasiads, systematic anatomy, and the origins of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **111**: 411-455.
- Stern WL, Judd WS. 2002.** Systematic and comparative anatomy of Cymbidieae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **139**: 1-27.
- Stern WL, Morris MW, Judd WS, Pridgeon AM, Dressler RI. 1993b.** Comparative vegetative anatomy and systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **113**: 161-197.
- Stern WL, Whitten WM. 1999.** Comparative vegetative anatomy of Stanhopeinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **129**: 87-103.
- Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2003.** Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 87-95.

- Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749-756.
- Subramanian RB, Inamdar JA. 1985.** Occurrence, structure, ontogeny and biology of nectaries in *Kigelia pinnata* DC. *The Botanical Magazine Tokyo* **98**: 67-73.
- Subramanian RB, Inamdar JA. 1986.** Nectaries in *Bignonia illicium* L. – Ontogeny, structure and functions. *The Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* **96**: 135-140.
- Thomas V, Dave Y. 1992.** Structure and biology of nectaries in *Tabebuia serratifolia* Nichols (Bignoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **109**: 395-400.
- Uphof JCTh. 1962.** *Plant hairs*. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Van Der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- Vidal BC. 1970.** Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Annales D'Hiostochimie* **15**: 289-296.

- Vidal BC. 1977.** Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular and Biology* **22**: 45-64.
- Vogel S. 1997.** Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives I. Substitutive nectaries. *Flora* **192**: 305-333.
- Werker E. 2000.** Trichome diversity and development. In: Halahan DL, Gray JC, eds. *Advances in Botanical Research, incorporating advances in plant pathology: Plant trichomes (Vol. 31)*. California: Academic Press, 1-35.
- Wist TJ, Davis AR. 2006.** Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany* **97**: 177-193.
- Withner CL, Nelson PK, Wejksnora PJ. 1974.** The anatomy of orchids. In: Withner CL, ed. *The orchids: Scientific studies*. New York: John Wiley and Sons, 267-347.
- Zer H, Fahn A. 1992.** Floral nectaries of *Rosmarinus officinalis* L. Structure, ultrastructure and nectar secretion. *Annals of Botany* **70**: 391-397.

LEGENDAS E FIGURAS

Figuras 1-2. Nectários foliares de *Rodriguezia venusta* com secreção. Fig. 1- Folhas em expansão, com gotas de secreção (setas). Fig. 2- Detalhe da folha contendo duas gotas de néctar (setas). Barras de escala em micrômetros.

Figuras 3-6. Nectários foliares de *Rodriguezia venusta*. Fig. 3- Corte transversal do nectário do sub-bordo corado com AT, mostrando parênquima nectarífero (oval) e hifas crescendo externamente (setas). Fig. 4- Corte transversal do nectário do bordo em detalhe, corado com AT. Fig. 5- Corte transversal da folha, mostrando nectário do bordo (oval). Coloração: AT. Fig. 6- Corte longitudinal corado com PAS, evidenciando corpúsculos esféricos ou granulados (setas finas) e espaços intercelulares mais amplos (setas largas) nas adjacências de um estômato, que não aparece no corte. Legendas: asterisco- câmara subestomática; FF- feixe de fibras; FV- feixe vascular; Hd- hipoderme; PC- parênquima clorofiliano; Rf- idioblasto contendo ráfides. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 7-13. Nectários foliares de *Rodriguezia venusta*. Fig. 7- Células do parênquima nectarífero coradas com XP, mostrando corpúsculos intravacuolares (setas). Fig. 8- Células do parênquima nectarífero coradas com AcT/FeCl₃, mostrando corpúsculo intravacuolar (seta). Fig. 9- Corte transversal sob luz polarizada, com corpúsculo birrefringente (setas). Fig. 10- Corte transversal corado com SBB, com corpúsculo positivo ao teste (setas). Fig. 11- Corte longitudinal corado com lugol, evidenciando pequenos grãos de amido (setas). Fig. 12- Corte transversal corado com SBB, evidenciando cutícula espessa (seta larga) e corpos silicosos associados a fibras (setas finas). Fig. 13- Micrografia de varredura

mostrando estômatos indistintos na região do nectário. Legenda: FF- feixe de fibras. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 14-19. Nectário bracteal de *Rodriguezia venusta*. Fig. 14- Panorama da bráctea, onde aparece uma gota de néctar sendo visitada por formiga, em casa de vegetação. Fig. 15- Micrografia de varredura do nectário, que se encontra em evidência (oval). Em torno desta região, ocorrem estrias, cuja direção está indicada (setas). Fig. 16- Corte longitudinal da bráctea, na região do nectário (oval), mostrando um feixe vascular (setas). Coloração: AT. Fig. 17- Detalhe de células do parênquima nectarífero, coradas com AT, evidenciando corpúsculo esférico intravacuolar (seta). Fig. 18- Parte do nectário, corado com lugol, mostrando pequenos grãos de amido (setas). Fig. 19- Células do parênquima nectarífero coradas com PAS, mostrando grânulo esférico intravacuolar (cabeças de seta) e campos primários de pontoação (setas). Legenda: Rf- idioblasto contendo ráfides. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 20-24. Nectário bracteal de *Rodriguezia venusta*. Fig. 20- Corte longitudinal na região do estômato do nectário, corado com AT. Fig. 21- Detalhe da epiderme corada com SBB, mostrando estômato e intumescência na cutícula (seta). Fig. 22- Micrografia de varredura mostrando estômato e possíveis poros (setas). Fig. 23- Corte longitudinal de um feixe vascular passando pelo nectário, onde se vê as pontoações simples (setas) nas fibras. Fig. 24- Detalhe da região do floema de um feixe vascular, com corpúsculos fusiformes. Legendas: asterisco- câmara subestomática; CF- corpúsculos fusiformes; CS- corpos silicosos; EM- estômato modificado; ETC- elementos de tubo crivado; Hd- hipoderme; Xi- xilema. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 25-28. Nectário floral de *Rodriguezia venusta*. Fig. 25- Flor fixada em FAA, onde se vê o nectário (seta), por transparência, através das sépalas laterais coalescentes. Fig. 26- Micrografia de varredura mostrando tricomas nectaríferos e material aderido a estes (setas). Fig. 27- Micrografia de varredura mostrando o nectário. Fig. 28- Corte longitudinal do nectário corado com AT, indicando a vascularização (setas) e demais partes constituintes. Legendas: Lb- labelo; PF- parênquima fundamental; PL- pétala lateral; PN- parênquima nectarífero; SL- sépalas laterais coalescentes; SS- sépala superior; TN- tricomas nectaríferos. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 29-40. Nectário floral de *Rodriguezia venusta*. Fig. 29- Detalhe do PF, PN e terminações vasculares, subjacentes às bases dos tricomas nectaríferos. Coloração: AT. Fig. 30- Tricomas nectaríferos e PN corados com XP. Fig. 31- Células do PN coradas com PAS, mostrando corpúsculo intravacuolar (setas). Fig. 32- Células do PF coradas com PAS, mostrando corpúsculos intravacuolares (setas). Fig. 33- Detalhe de tricomas nectaríferos, mostrando campos primários de pontoação (setas). Coloração: AT. Fig. 34- Detalhe de um tricoma nectarífero ramificado, corado com AT. Fig. 35- Corte submetido ao AcT/FeCl₃, com secreção positiva ao teste. Fig. 36- Detalhe de tricomas nectaríferos corados com SBB. Fig. 37- Detalhe da base de tricomas nectaríferos corado com AT, onde se vê material externo corado (setas largas) e campos primários de pontoação (setas finas). Fig. 38- Corte transversal da porção subapical de um tricoma nectarífero, mostrando parede transversal com inúmeros campos primários de pontoação (setas). Coloração: AT. Fig. 39. Detalhe de terminação vascular corada com AT, com célula floemática contendo um corpúsculo fusiforme (seta). Fig. 40- Corte

longitudinal da porção basal do nectário corada com lugol, evidenciando pequenos grãos de amido (setas). Legendas: ETC- elemento de tubo crivado; PF- parênquima fundamental; PN- parênquima nectarífero; TN- tricomas nectaríferos; TV- terminação vascular. Barras de escala em micrômetros.

Figuras 1-2

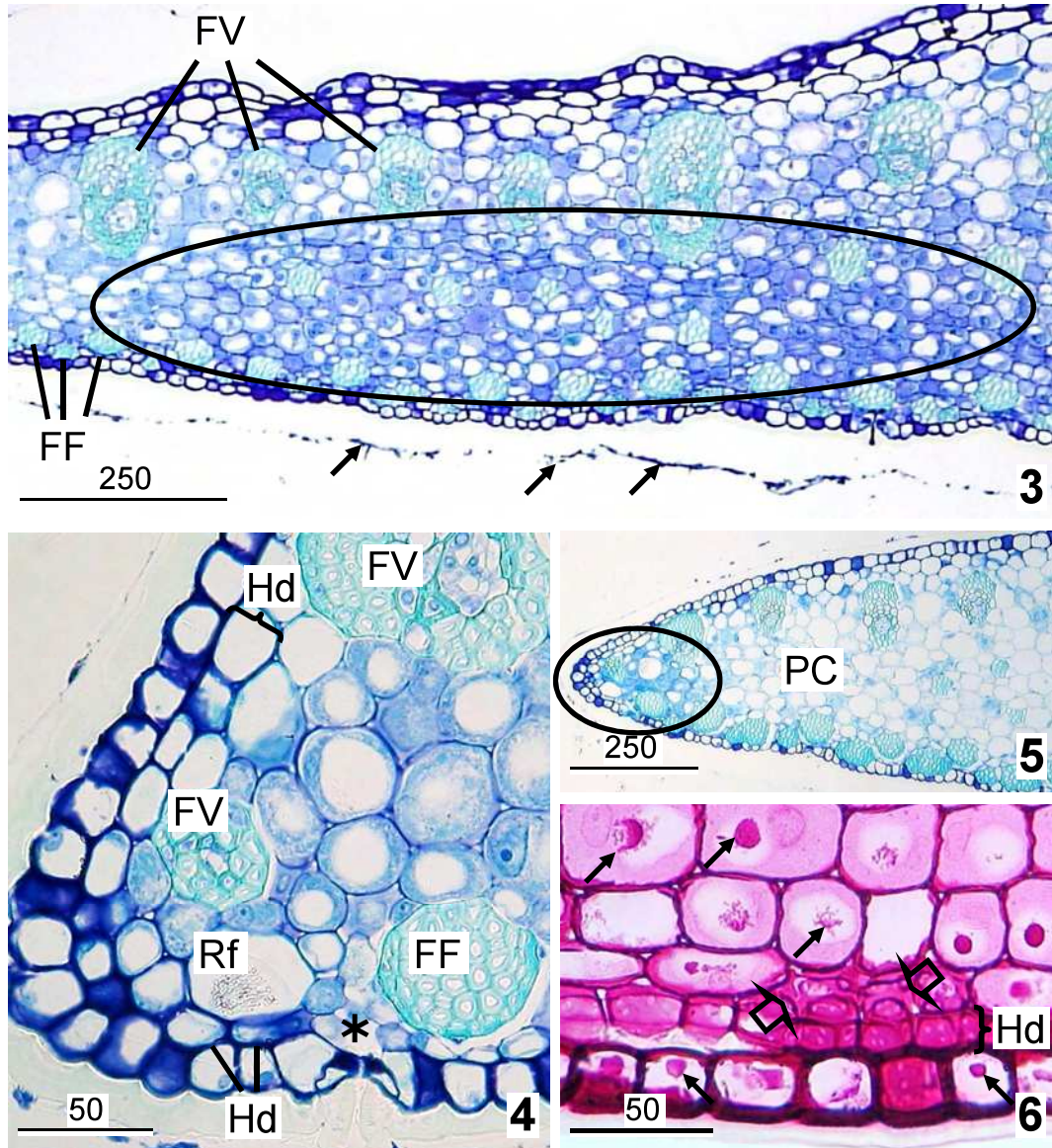


1

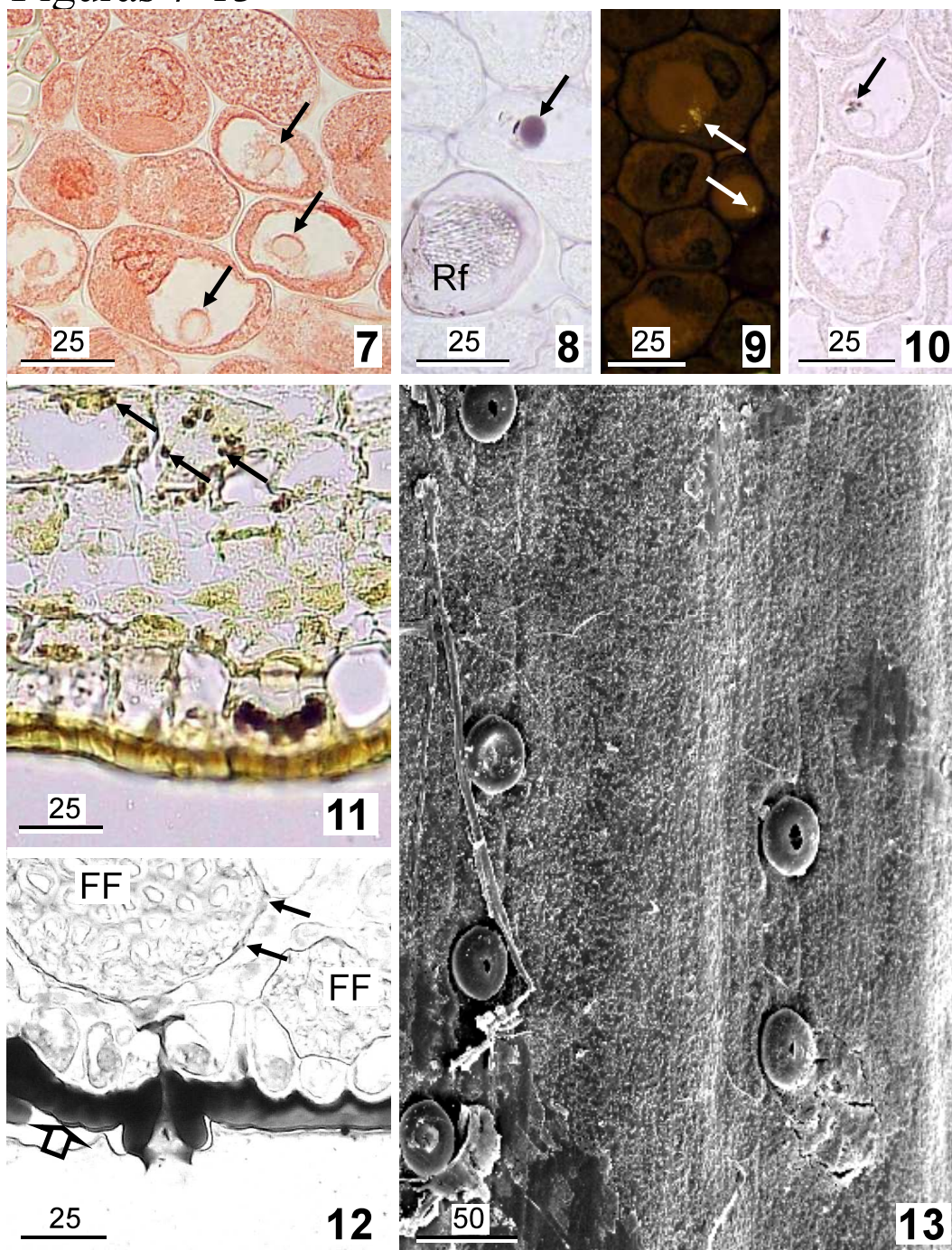


2

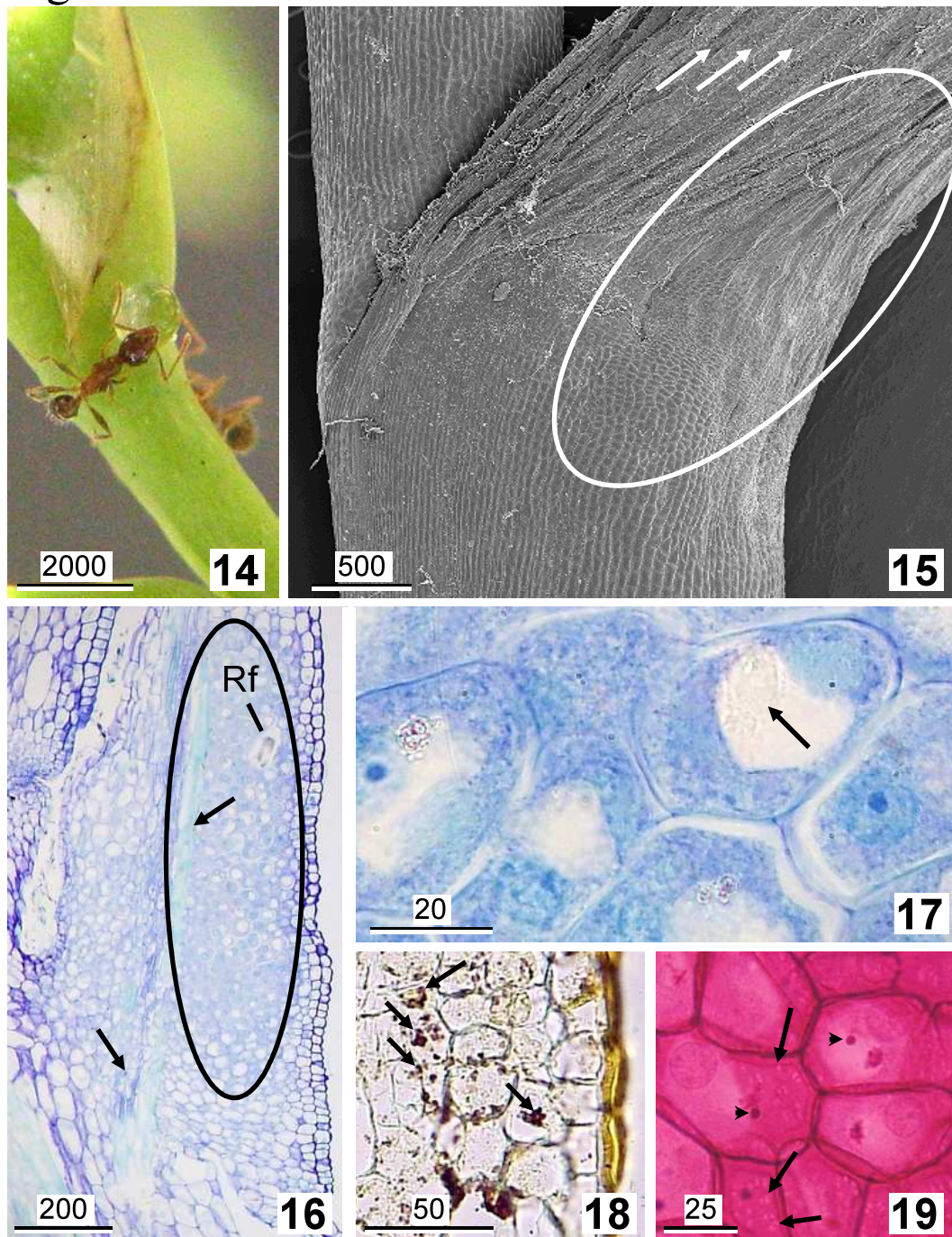
Figuras 3-6



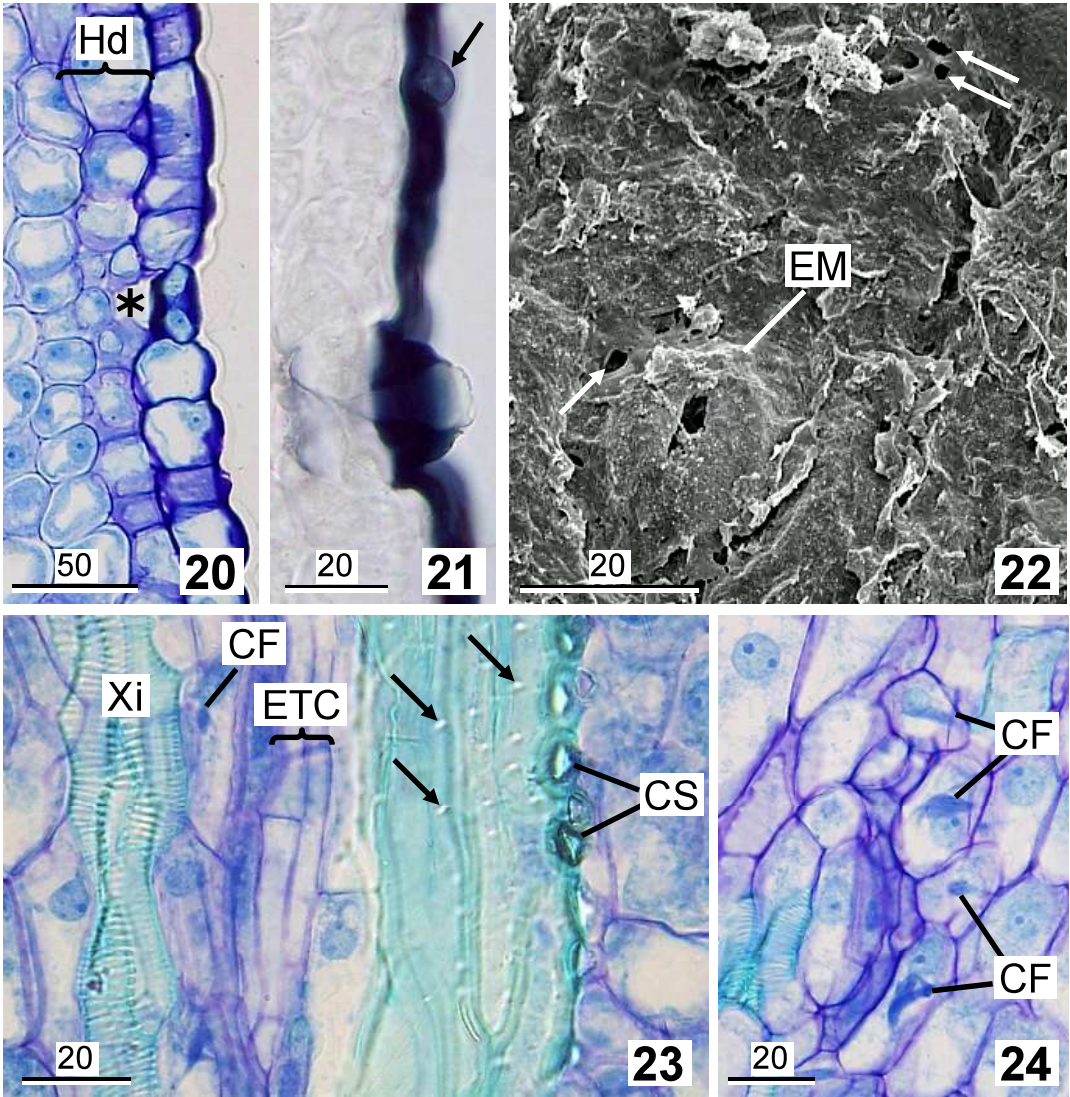
Figuras 7-13



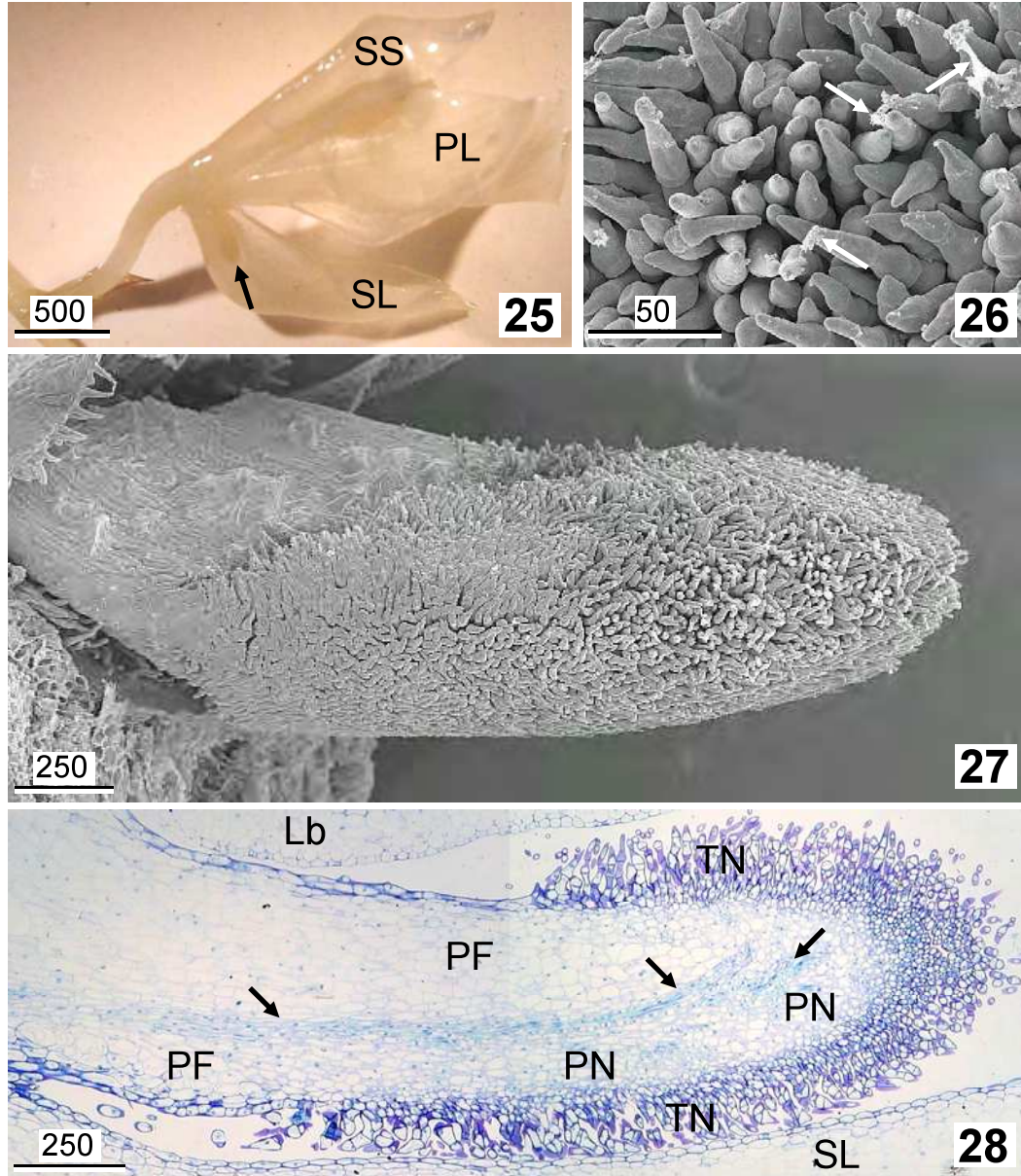
Figuras 14-19



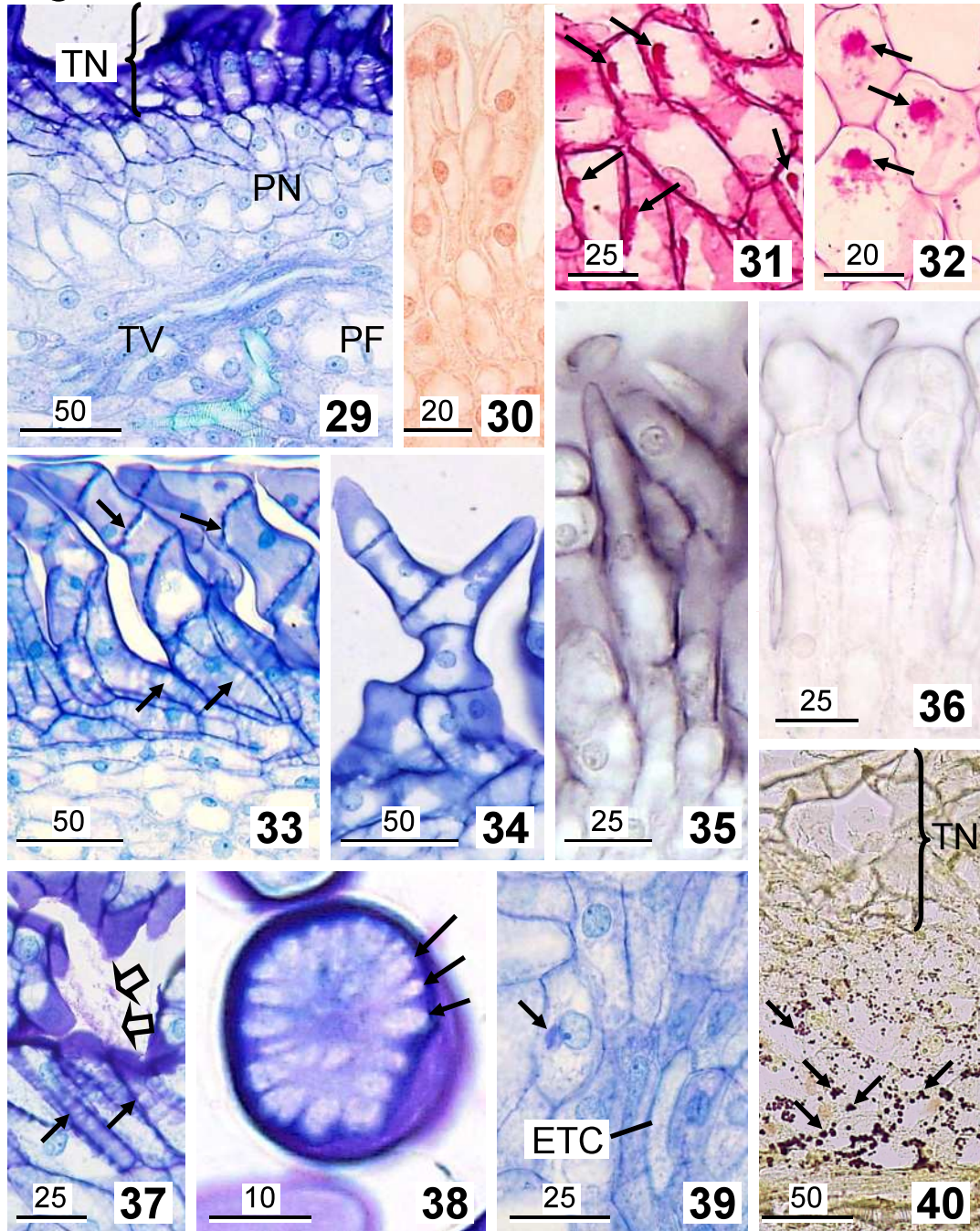
Figuras 20-24



Figuras 25-28



Figuras 29-40



CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Rodriguezia venusta possui interessantes estruturas secretoras, que permitem inferir uma engenhosa constituição do corpo da planta.

Os coléteres na bráctea que subtende o botão floral aparentemente são peças de um mecanismo de crescimento da inflorescência, associadas à lubrificação. Uma vez que a inflorescência, quando ainda muito jovem, é fortemente compactada, com os botões protegidos por brácteas rígidas, a secreção de um lubrificante que facilite o deslizamento dos delicados botões sobre as brácteas, durante a sua exposição, pode ser decisiva para o perfeito desenvolvimento da flor.

Todo o trato transmissor, do estigma ao tecido transmissor ovariano, é uma grande estrutura secretora predominantemente de mucilagem. A penetração da cutícula ao longo do terço apical do estilete constitui, aparentemente, uma barreira hidrofóbica para a evaporação de água que, no entanto, não se estende até o ovário. Em outras palavras, o canal central que liga o estigma ao ovário tem a sua superfície interna impermeabilizada apenas em seu terço apical. A análise do pólen em diferentes fases de desenvolvimento na flor de *R. venusta*, no intuito de elucidar o exato percurso dos tubos polínicos em direção ao ovário e as reações passíveis de acontecerem ao longo do estigma e tecido transmissor durante este processo, seria um interessante objeto de estudos futuros. Esses eventos são fundamentais para a reprodução sexuada da planta, mas infelizmente trata-se de um assunto ainda pouco explorado dentre as orquídeas.

Os diferentes nectários aqui estudados, com sua diversidade de formas, sugerem também uma diferença fisiológica na eliminação da secreção. Aparentemente, no nectário foliar, os estômatos são a única via de saída do néctar. Em se tratando do nectário bracteal, possivelmente ocorre a saída de algum néctar através da cutícula, em adição à via estomática. Já o nectário floral, que intrigantemente não possui indícios de uma impermeabilização da via apoplástica nos tricomas nectaríferos, provavelmente apresenta uma via de secreção inexplicável pelo modelo tradicionalmente descrito para tricomas secretores (Lüttge, 1971; Fahn, 1979; 1988). No modelo tradicional, é forçada a via simplástica da pré-secreção quando esta entra no tricoma e também é impedido o refluxo da secreção de sua porção terminal, em direção à base pela via apoplástica. Em *R. venusta*, aparentemente não existem barreiras para a saída do néctar através das células basais dos tricomas nectaríferos, e possivelmente o néctar é secretado por toda sua extensão. Também tem sido relatada a reabsorção do néctar secretado (Cruden *et al.*, 1983; Bernardello *et al.*, 1994; Nepi *et al.*, 1996; Wist & Davis, 2006), inclusive em Orchidaceae (Koopowitz & Marchant, 1998; Stpiczyńska, 2003), o que leva a concluir que a fisiologia dos nectários pode ser muito mais complexa que o esperado em uma primeira análise. Assim sendo, os resultados apresentados neste trabalho visam contribuir para a abertura de novas frentes de pesquisa, dentre as quais o estudo da ultra-estrutura em diferentes fases de desenvolvimento das estruturas secretoras de *R. venusta*, assim como a análise química da secreção produzida por essas estruturas. Além disso, abrem-se perspectivas para um estudo mais abrangente das estruturas secretoras em Orchidaceae, enfatizando também a anatomia dos coléteres e dos nectários extraflorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- BERNARDELLO, L. M.; GALETTO, I. & RODRIGUEZ, I. G. (1994). Reproductive biology, variability of nectar features and pollination of *Combretum fruticosum* (Combretaceae) in Argentina. **Bot. J. Linnean Soc.** **114**: 293-308.
- CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P. J.; JARRELL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKAWA, T.; HILLS, H. G. & GOLDMAN, D. H. (1999). A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. **Amer. J. Bot.** **86**: 208-224.
- CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S. M. (2007). **A célula**. Ed. Manole, São Paulo.
- CASTRO, M. M. & MACHADO, S. R. (2004). Células e tecidos secretores. Pp. 179-203. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Eds.). **Anatomia vegetal**. Ed. UFV, Viçosa-MG.
- CRUDEN, R. W.; HERMANN, S. M. & PETERSON, S. (1983). Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. Pp. 80-125. In: BENTLEY, B. & ELIAS, T. (Eds.). **The biology of nectaries**. Columbia University Press, New York.

- CRUDEN, R. W. & LYON, D. L. (1985). Correlations among stigma depth, style length, and pollen grain size: Do they reflect function or phylogeny? **Bot. Gaz.** **146**: 143-149.
- DICKISON, W. C. (2000). **Interactive plant anatomy**. Academic Press, San Diego.
- DRESSLER, R. L. (1993). **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- ENDRESS, P. K. (1996). **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge.
- ESAU, K. (1976). *Anatomy of seeds plants*. John Wiley and Sons, New York.
- FAHN, A. (1979). **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London.
- FAHN, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. **New Phytol.** **108**: 229-257.
- KOOPOWITZ, H. & MARCHANT, T. A. (1998). Postpollination nectar reabsorption in the African epiphyte *Aerangis verdickii* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** **85**: 508-512.
- LÜTTGE, U. (1971). Structure and fuction of plant glands. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **22**: 23-44.

- METCALFE, C. R. & CHALK, L. (1950). **Anatomy of dicotyledons, 2 Vols.** Oxford University Press, Oxford.
- NEPI, M.; CIAMPOLINI, F. & PACINI, E. (1996). Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers. **Ann. Bot.** **78**: 95-104.
- ROSHCHINA, V. V. & ROSHCHINA, V. D. (1993). **The excretory function of higher plants.** Springer-Verlag, Berlin.
- ROUBIK, D. W. (1989). **Ecology and natural history of tropical bees.** Cambridge University Press, Cambridge.
- SCHMID, R. (1988). Reproductive versus extra-reproductive nectaries - historical perspective and terminological recommendations. **Bot. Rev.** **54**: 179-232.
- SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. (2000). Óleos voláteis. Pp: 387-415. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Ed. da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SOLEREDER, H. (1908). **Systematic anatomy of the dicotyledons, 2 Vols.** Clarendon Press, Oxford.

- STPICZYŃSKA, M. (2003). Nectar resorption in the spur of *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.) Orchidaceae - structural and microautoradiographic study. **Plant. Syst. Evol.** **238**: 119-126.
- THOMAS, V. (1991). Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. **Ann. Bot.** **68**: 287-305.
- TOSCANO-DE-BRITO, A. L. V. & CRIBB, P. (2005). **Orquídeas da Chapada Diamantina**. Ed. Nova Fronteira, São Paulo.
- UPHOF, J. C. Th. (1962). **Plant hairs**. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- VAN DER PIJL, L. & DODSON, C. H. (1966). **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Coral Gables: University of Miami Press.
- WIST, T. J. & DAVIS, A. R. (2006). Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). **Ann. Bot.** **97**: 177-193.