



CRISTINA RIBEIRO MARINHO

**“ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS EM ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAE”**

***“FLORAL SECRETORY STRUCTURES IN SPECIES OF
LEGUMINOSAE”***

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

CRISTINA RIBEIRO MARINHO

“ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS EM ESPÉCIES DE LEGUMINOSAE”

“FLORAL SECRETORY STRUCTURES IN SPECIES OF LEGUMINOSAE”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em BIOLOGIA VEGETAL.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in PLANT BIOLOGY.

Orientador/ Supervisor: SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL

TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CRISTINA RIBEIRO MARINHO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M338e Marinho, Cristina Ribeiro, 1981-
Estruturas secretoras florais em espécies de Leguminosae / Cristina Ribeiro Marinho. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Simone de Pádua Teixeira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anatomia vegetal. 2. Flores - Crescimento e desenvolvimento. 3. Glândulas. 4. Polinização. 5. Secreção. I. Teixeira, Simone de Pádua. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Floral secretory structures in species of Leguminosae

Palavras-chave em inglês:

Plant anatomy

Flowers - Growth and development

Glands

Pollination

Secretion

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Simone de Pádua Teixeira [Orientador]

Marília Contin Ventrella

Élder Antônio Sousa e Paiva

Leandro Freitas

André Olmos Simões

Data de defesa: 24-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 24 de junho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Marília Contin Ventrella



Assinatura

Prof. Dr. Élder Antônio Sousa e Paiva



Assinatura

Dr. Leandro Freitas



Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões



Assinatura

Dra. Karen Lúcia Gama De Toni

Assinatura

Profa. Dra. Kayna Agostini

Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

Assinatura

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Luis Carlos e Rosa
pelo amor e apoio incondicional às
minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Simone de Pádua Teixeira pela confiança que depositou em mim desde o início e pela dedicada orientação que só me fez crescer tanto pessoal quanto profissionalmente.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP que possibilitou a concretização deste sonho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP, pela estrutura, material e equipamentos.

À FAPESP (processos nºs 2008/55434-7 e 2009/01057-0) pelo financiamento.

À professora Sílvia Machado pelo apoio e inclusão deste trabalho no projeto temático da FAPESP “Estruturas secretoras em espécies vegetais de cerrado: abordagens morfológica, química e ecológica” (processo nº 2008/55434-7).

Aos professores Ana Tozzi, Élder Paiva e Karen De Toni pela avaliação prévia deste trabalho e pelas valiosas sugestões que contribuíram para a sua conclusão.

Aos membros da banca de defesa pela análise, sugestões e discussões desta tese e aos suplentes pela sua leitura.

Aos Laboratórios de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pelas instalações.

Aos técnicos Edimárcio da Silva Campos (Laboratório de Botânica, FCFRP/ USP), Paulo Donato Frighetto (Laboratório de Bioengenharia, FMRP/ USP), Maria Dolores Seabra

Ferreira, José Augusto Maulin (FMRP/ USP), Rodrigo Ferreira Silva (Departamento de Química, FFCLRP/ USP) e Adriane Cristina Sarti Sprogis (Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB/ UNICAMP) pela assistência técnica.

A todas as pessoas que me ajudaram na coleta de material no campo: as professoras Elza Guimarães e Sílvia Machado, as alunas Raquel Arruda Santos e Fernanda Tresmondi (UNESP/ Botucatu), o professor Vidal Mansano e os alunos Rafael Barbosa Pinto e “Said” (Instituto de Pesquisas do JBRJ), a professora Ângela Sartori e as alunas Fábria Carvalho e Camila Orlandi (UFMS), o professor Leonardo Galetto (Universidade Nacional de Córdoba), a Dra. Cristine Benevides (Museu Nacional da UFRJ), o técnico Edimárcio da Silva Campos (FCFRP/ USP), os alunos Liana Capucho, João Paulo Basso Alves (UNICAMP), Giseli Pedersoli e Thais Cury de Barros (FFCLRP/ USP), a Dra. Juliana Paulino (Royal Botanic Gardens/ Kew), o professor Eduardo Borba (UFABC/ Centro de Ciências Naturais e Humanas) e os alunos Ariane Raquel Barbosa e Marlon Machado (UEFS).

À Dra. Rejane Barbosa de Oliveira e ao Dr. João Paulo Barreto de Sousa (FCFRP/ USP) pelo auxílio no procedimento das análises químicas.

Ao professor Dewey Litwiller (Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá) pela revisão dos textos em inglês.

À Camila Devicaro por ser minha companheira no estudo dos osmóforos.

À Thais Cury por melhorar os desenhos esquemáticos da tese.

À Juliana Milani por todas as vezes que me acolheu em sua casa quando precisei ficar em Campinas.

À Elisângela Pessine por me receber em sua casa quando estive em Campo Grande.

A todos os colegas/amigos que encontrei no Laboratório de Botânica: Ana Paula, Camila, Giseli, João Paulo, Juliana M., Juliana P., Liana, Marina, Priscila, Raquel, Thais e Viviane. Obrigada pelas discussões acadêmicas e pelas conversas descontraídas, que muito contribuíram para a conclusão deste trabalho e para minha sanidade mental.

À Erika que se aventurou em dividir as contas comigo do início ao final de minha jornada. A todos os professores que tive durante a graduação e o mestrado na UFV e durante o doutorado na UNICAMP, em especial à minha primeira orientadora, a profa. Dra. Marília Contin Ventrella da UFV, os quais foram fundamentais para a minha formação.

Aos meus pais Luis Carlos e Rosa e meus irmãos Leo, Ricardo e Marina. Amo vocês!

Por fim, agradeço a Deus, por permitir que as coisas aconteçam e por colocar pessoas especiais em meu caminho.

RESUMO

Apesar de a família Leguminosae ser rica em espécies, exibir ampla distribuição geográfica e grande variação morfológica, seus representantes têm sido pouco estudados em termos de estruturas secretoras florais. Tais estruturas podem estar localizadas em diferentes partes da flor e estão associadas à atração de polinizadores e/ ou defesa. As flores polinizadas por animais exalam odores que são produzidos e liberados por meio de glândulas de odor ou osmóforos, estruturas que apresentam grande variedade morfológica. Estudos anatômicos de tais glândulas são importantes, pois além de fornecerem informações para o entendimento das interações ecológicas de plantas e seus polinizadores, podem fornecer dados que auxiliem na determinação de relações filogenéticas entre as espécies. Assim, este trabalho objetivou (1) identificar as estruturas secretoras presentes nas flores de espécies de Leguminosae com polinização noturna, (2) levantar caracteres anatômicos florais compartilhados por essas espécies, (3) determinar se existem relações entre a polinização diurna e noturna e a morfologia dos osmóforos em Leguminosae (4) e investigar se os tricomas secretores podem atuar como osmóforos. Botões florais e flores de 14 espécies zoófilas de Leguminosae foram fixados e processados para análises em microscopias de luz, eletrônica de varredura e eletrônica de transmissão. Análises em cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência foram feitas nos tricomas secretores foliares e florais de *Bauhinia*. As flores polinizadas à noite apresentam várias características condizentes a este tipo de polinização, como antese com duração de uma noite, coloração inconspícua e forte odor. A prefloração ou fusão do perianto e a presença de hipanto em forma de copo permite o acúmulo de néctar nestas flores. A grande quantidade de néctar produzido nas espécies quiropterófilas tem relação com a estrutura robusta de seus nectários. No perianto, especialmente nas pétalas, encontram-se estruturas responsáveis pela produção do odor nas espécies de Leguminosae com polinização zoófila. A presença de regiões secretoras não especializadas na epiderme e no mesofilo das sépalas e/ou pétalas corrobora a liberação de odor difusa na maioria das espécies. Osmóforos típicos, ou seja, glândulas de perfume com estrutura anatômica especializada na emissão de fragrâncias, restritas a certas regiões da flor, foram observados em quatro das 12 espécies estudadas. Os

osmóforos estudados sempre exibiram algum tipo de célula ou tecido secretor de terpeno; porém, compostos fenólicos e proteínas também foram detectados. Outros tipos de estruturas secretoras, frequentemente associadas a mecanismos de defesa, como tricomas, cavidades e idioblastos secretores foram encontrados. Dentre elas, destacam-se os tricomas secretores cavitados em *Bauhinia*, os quais secretam as mesmas classes de compostos nas folhas e flores e, assim, apresentam função de defesa e não na atração dos polinizadores. Conclui-se que não existe relação entre o tipo de osmóforo (típico ou difuso) e o hábito do polinizador (diurno ou noturno). As estruturas secretoras florais encontradas (exceto os nectários) apresentam significado biológico e/ou taxonômico, mas não podem ser associadas à determinada síndrome. Já a anatomia dos nectários revelou correlações entre seu tamanho, a quantidade de néctar produzido e o tipo de polinizador demonstrando sua grande importância na relação flor-polinizador.

Palavras-chave: anatomia vegetal, desenvolvimento, glândulas, polinização, secreção.

ABSTRACT

Although the Leguminosae family is rich in species showing wide geographic distribution and a large morphological variation, their representatives have been poorly studied in terms of floral secretory structures. Such structures can be located in different parts of the flower and are associated with attraction of pollinators and/ or defense. Flowers pollinated by animals emit scents that are produced and released by means of scent glands or osmophores, structures that show a great morphological variety. Anatomical studies of these glands are important because besides providing information for the understanding of ecological interactions of plants and their pollinators, they can provide data to assist in the determination of phylogenetic relationships among species. This study aimed (1) to identify the secretory structures present in the flowers of Leguminosae species with nocturnal pollination, (2) to reveal floral anatomical features shared by these species, (3) to determine whether relationships exist between the diurnal and nocturnal pollination and the morphology of osmophores in Leguminosae (4) and to investigate if trichomes can function as osmophores. Flower buds and flowers of 14 zoophilic species of Leguminosae were fixed and processed for analysis in light, scanning electron and transmission electron microscopy. Analysis in CG and HPLC were performed in leaf and floral trichomes in *Bauhinia*. Flowers pollinated at night have several characteristics consistent with this type of pollination, as anthesis with duration of one night, inconspicuous coloration and strong odor. The aestivation or fusion of the perianth and the presence of cup-shaped hypanthium allows the nectar accumulation in these flowers. The large amount of nectar produced in the chiropterophilous species is related to the robust structure of their nectaries. In the perianth, especially in petals, occur structures responsible for producing the scent in the Leguminosae species with zoophilic pollination. The presence of non-specialized secretory regions in the epidermis and mesophyll of sepals and/ or petals confirms the diffuse release of scent in most species. Typical osmophores, *i.e.*, scent glands with anatomical structure specialized in the emission of fragrances, restricted to certain regions of the flower, were observed in four of the 12 species studied. The studied osmophores always exhibited some type of cell or tissue secreting terpene; but phenolic compounds and proteins were also

detected. Other types of secretory structures often associated with defense mechanisms, such as secretory trichomes, idioblasts and cavities were found. Among these are the cavitated trichomes in *Bauhinia*, which secrete the same classes of compounds in the leaves and flowers and thus have no role in the pollinator attraction but in the plant defense. It is concluded that there is no relationship between the type of osmophore (typical or diffuse) and the habit of pollinator (diurnal or nocturnal). The floral secretory structures found (except nectaries), have biological and/ or taxonomic significance, but they cannot be associated with a particular syndrome. However, the anatomy of nectaries showed correlations among their size, the amount of nectar produced and the type of pollinator demonstrating their great importance in the flower-pollinator relationship.

Keywords: development, glands, plant anatomy, pollination, secretion.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO 1: Morfologia floral e sua relação com a polinização noturna em Leguminosae	9
Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
Material e Métodos	13
Resultados	15
<i>Morfologia externa</i>	15
<i>Anatomia</i>	17
Discussão	52
Agradecimentos	57
Referências Bibliográficas	57
CAPÍTULO 2: Scent glands in legume flowers	63
ABSTRACT	63
INTRODUCTION	64
MATERIAL AND METHODS	66
<i>Plant Material</i>	66
<i>Scent Glands Detection and Analysis</i>	70
RESULTS	71
<i>Osmophores with restricted location</i>	71
<i>Osmophores with diffuse location</i>	72
DISCUSSION	90
ACKNOWLEDGEMENTS	93
REFERENCES	93
CAPÍTULO 3: Dinâmica do processo secretor em osmóforos acumuladores de fenólicos	101
Resumo	101
Abstract:	102
Introdução	103

Material e Métodos.....	104
Resultados	105
Discussão	122
Agradecimentos.....	124
Referências Bibliográficas.....	124
CAPÍTULO 4: Ontogeny resolves gland classification in two caesalpinoid legumes.....	127
Abstract	127
Introduction	128
Materials and Methods	129
Results	130
<i>Gland distribution</i>	130
<i>Gland development</i>	131
Discussion	148
Acknowledgements	151
References	152
CAPÍTULO 5: Morfologia e função do tricoma secretor cavitado em espécies de <i>Bauhinia</i> (Leguminosae, Caesalpinioideae)	155
Resumo	155
Abstract:	156
Introdução.....	157
Material e Métodos.....	159
Resultados	161
<i>Distribuição</i>	161
<i>Desenvolvimento</i>	161
<i>Conteúdo do tricoma</i>	162
<i>Processo de secreção</i>	163
Discussão.....	195
Agradecimentos.....	198
Referências Bibliográficas.....	198
CONCLUSÕES	203

INTRODUÇÃO GERAL

Estruturas secretoras são estruturas responsáveis pela produção, acúmulo e/ ou liberação de exsudato com composição química diversa e complexa, podendo ser constituído de água, soluções salinas, néctar, mucilagem, proteínas, látex e substâncias lipofílicas, que ocorrem de forma separada ou em misturas em uma determinada glândula. As estruturas secretoras estão frequentemente associadas a mecanismos de defesa, mas na flor podem também exercer papel na atração e/ ou recompensa de polinizadores (Fahn 1979). Os recursos florais mais comuns são o néctar e o pólen (Simpson & Neff 1981), enquanto que a cor e o odor constituem os principais atrativos (Maffei 2010).

Os perfumes florais são caracterizados como misturas complexas de substâncias lipofílicas, voláteis e líquidas (Knudsen *et al.* 2006, Poser & Mentz 2007). Os terpenos constituem o grupo de substâncias mais frequentemente encontradas na composição das fragrâncias florais (Simões 2007); porém, compostos alifáticos, benzenóides, fenilpropanóides, compostos nitrogenados e compostos de enxofre também podem ser liberados (Dudareva & Pichersky 2006, Knudsen *et al.* 2006). A liberação de odor pelas flores ocorre através de glândulas de perfume ou osmóforos (do grego: osmo = odor, foro = carregar). Basicamente estas glândulas podem ser divididas em duas categorias, os osmóforos típicos, constituídos de células secretoras distintas morfológicamente que se localizam em determinadas regiões florais, e os osmóforos difusos, formados por células semelhantes às demais e situadas ao longo de peças florais, tais como aquelas do perianto e brácteas adjacentes (Vogel 1983, Vogel 1990).

Os osmóforos típicos apresentam características usuais de tecidos secretores, como células com núcleos grandes, citoplasma denso, cutícula reduzida e vascularização rica (Vogel 1990). São comumente relatados nos órgãos florais de espécies de Orchidaceae, a qual reúne o maior número de trabalhos relacionados à anatomia, ultraestrutura e química destas estruturas (Pridgeon & Stern 1983, 1985, Curry *et al.* 1991, Teixeira *et al.* 2004, Ascensão *et al.* 2005, Pansarin *et al.* 2009, Wiemer *et al.* 2009, Melo *et al.* 2010). Há citação pontual de estudos para espécies de outras famílias, como *Couroupita guianensis*

(Lecythidaceae, Ormond *et al.* 1981), *Cyphomandra* sp. (Solanaceae, Sazima *et al.* 1993) *Sauromatum guttatum* (Araceae, Skubatz *et al.* 1996), *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae, Vogel & Radacek 2004), *Aristolochia* sp. (Aristolochiaceae, Vogel 1990, Trujillo & Sérsic 2006), *Passiflora* sp. (Passifloraceae, García *et al.* 2007), *Ceropegia elegans*, *Orbea variegata* e *Boucerosia indica* (Apocynaceae, Vogel 1990, Płachno *et al.* 2010). Em Leguminosae, osmóforos são relatados nas pétalas de *Exostyles godoyensis* e *Mimosa bimucronata* (Mansano & Teixeira 2008, Silva *et al.* 2011), enquanto outros estudos especulam que as estruturas elaboradas encontradas nas pétalas de *Duparquetia orchidacea* e as glândulas na antera de espécies da tribo Mimoseae também podem atuar como osmóforos (Luckow & Grimes 1997, Pires & Freitas 2008, Prenner & Klitgaard 2008). Entretanto, a escassez de estudos em Leguminosae surpreende, considerando sua riqueza em espécies (cerca de 19 mil), sua ampla distribuição geográfica e grande diversidade de hábitos, de morfologia e de agentes polinizadores (Arroyo 1981, Lewis *et al.* 2005).

A maioria dos estudos anatômicos de glândulas florais em Leguminosae abordam os nectários (Bernadello 2007), enquanto que outros tipos de glândulas como tricomas, idioblastos, cavidades e canais secretores são menos explorados. Exemplos incluem estudos dos tricomas secretores nas peças florais de *Bauhinia* (Tucker 1984), no perianto de *Indigofera* (Kumar *et al.* 1986, Marquifável *et al.* 2009), na sépala de *Dahlstedtia* (Teixeira *et al.* 2009), no ovário de *Glycine* (Healy *et al.* 2009) e nas bractéolas de *Mimosa* (Leelavathi *et al.* 1984); dos coléteres nas brácteas de *Holocalyx balansae* e *Zollernia ilicifolia* (Mansano & Teixeira 2008); dos idioblastos no perianto de *Caesalpinia echinata* (Teixeira & Machado 2007) e no ovário de *Swartzia langsdorffii* (Colpas & Oliveira 2002); e das cavidades no perianto de *Dahlstedtia* (Teixeira & Rocha 2009, Teixeira *et al.* 2009) e no ovário de *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Oliveira 2004). No entanto, apesar dessas estruturas secretoras não estarem relacionadas à síntese das fragrâncias florais nessas espécies, em outros casos como em *Jacaranda oxyphylla* (Bignoniaceae) e *Phragmopedilum grande* (Orchidaceae), foi constatado que os tricomas secretores de voláteis presentes em suas flores participam na produção do odor, atuando como osmóforos (Vogel 1990, Guimarães *et al.* 2008).

Diante da complexidade de estruturas envolvidas na síntese e liberação de odores, estudos anatômicos de tais glândulas são importantes, pois podem fornecer informações fundamentais para o entendimento das interações ecológicas de plantas e seus polinizadores. Esta opinião é compartilhada por Melo *et al.* (2010) que, ao estudarem a biologia reprodutiva, a variabilidade morfológica e a micromorfologia floral de espécies de *Acianthera* (Orchidaceae, Pleurothallidinae), concluíram que os estudos anatômicos de nectários e osmóforos das peças florais permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos de polinização dessas espécies.

O néctar é, de longe, o recurso mais importante para os visitantes florais. Dessa forma, a ocorrência, a posição e as características dos nectários nas flores são dados bastante úteis para avaliar as relações entre as plantas e seus polinizadores (Bernadello 2007). Na família Ericaceae, por exemplo, foi constatado que a morfologia, orientação e anatomia dos nectários florais estão diretamente relacionadas à sua função nos sistemas de polinização das espécies, mais especificamente aos sistemas de apresentação do néctar (Wallace 1977). Nas Leguminosae existem relatos de nectários em diversas espécies (Bernadello 2007), no entanto, não existem estudos que relacionem estas estruturas com os diferentes polinizadores da família.

As Leguminosae caracterizam-se por apresentar vários tipos de polinização zoófila diurna (Cruden & Hermann-Parker 1979, Balestieri & Machado 1998, Falcão & Clement 2000, Bonacina *et al.* 2008) e noturna (Hopkins 1984, Gibbs *et al.* 1999, Sazima *et al.* 1999, Hopkins *et al.* 2000, Ramírez 2004, Vogel *et al.* 2005, Moré *et al.* 2006, Munin *et al.* 2008). Além da antese noturna e coloração inconspícua, as espécies polinizadas à noite apresentam flores que exalam odores fortes, sendo a fragrância o principal meio de localização de suas inflorescências pelos polinizadores (Baker 1961, Faegri & van der Pijl 1979). Dessa forma, estas flores apresentam um grande potencial em apresentar osmóforos típicos, visto que a liberação de odor nestas estruturas é mais pronunciada do que nos osmóforos difusos (Vogel 1990). Além disso, é bastante difundido na literatura que as plantas polinizadas por morcegos geralmente produzem um volume de néctar maior devido à grande demanda energética destes animais (Faegri & van der Pijl 1979, Fleming *et al.*

2009). Assim, as flores destas espécies provavelmente apresentam nectários robustos, possivelmente estruturados e vascularizados.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram identificar as estruturas secretoras presentes nas flores de espécies de Leguminosae com polinização noturna, levantar caracteres anatômicos florais compartilhados por estas espécies, determinar se a polinização noturna está relacionada à presença de osmóforos típicos e determinar se os tricomas secretores encontrados podem atuar como osmóforos. Para atender estes objetivos gerais, a tese foi dividida em cinco capítulos:

➤ **Capítulo 1: Morfologia floral e sua relação com a polinização noturna em Leguminosae.** Objetivo: Comparar a morfologia floral externa e interna de leguminosas com polinizadores noturnos, enfatizando a anatomia de órgãos relacionados à atração e recompensa, e dispersão e receptividade dos grãos de pólen.

➤ **Capítulo 2: Scent glands in legume flowers.** Objetivo: Pretendeu-se localizar e caracterizar os sítios de produção e liberação de fragrâncias em flores de leguminosas, cujo odor desempenha um papel importante na polinização, e também testar se existem relações entre a estrutura da glândula de odor e o hábito dos polinizadores, diurno ou noturno.

➤ **Capítulo 3: Dinâmica do processo secretor em osmóforos acumuladores de fenólicos.** Objetivo: Estudar a dinâmica do processo secretor nos osmóforos produtores de terpenos e compostos fenólicos em espécies de Leguminosae, visto que estudos ultraestruturais deste tipo de glândula de odor são inexistentes.

➤ **Capítulo 4: Ontogeny resolves gland classification in two caesalpinoid legumes.** Objetivo: Verificar a origem e os estádios de desenvolvimento das estruturas secretoras presentes na superfície de órgãos florais em duas espécies Caesalpinieae, *Erythrostemon gilliesii* e *Poincianella pluviosa*, a fim de resolver sua terminologia.

➤ **Capítulo 5: Morfologia e função do tricoma secretor cavitado em espécies de Bauhinia (Leguminosae, Caesalpinioideae).** Objetivo: Testar se os tricomas secretores cavitados presentes nas folhas de *Bauhinia curvula* e *B. rufa* exercem função diferente daqueles presentes na flor, utilizando como ferramentas análises morfológicas, ontogenéticas, ultraestruturais e químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill R.M., Raven P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics, part 2*. Kew: Royal Botanic Garden Pp. 723–769.
- Ascensão L., Francisco A., Cotrim H., Pais M.S. 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**: 1059–1067.
- Baker H.G. 1961. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quarterly Review of Biology* **36**: 64–73.
- Balestieri F.C.L.M., Machado V.L.L. 1998. Entomofauna visitante de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth) (Leguminosae) durante o seu período de floração. *Revista Brasileira de Entomologia* **41**: 547–554.
- Bernadello G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Netherlands: Springer Pp. 19–128.
- Bonacina A.K.B., Netto J.C., Júnior V.V.A. 2008. Relações entre abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na exploração de recursos naturais em uma área de Cerrado em Dourados (MS). *Revista Brasileira de Agroecologia* **3**: 71–74.
- Colpas F.T., Oliveira D.M.T. 2002. Structure and ontogeny of *Swartzia langsdorffii* (Leguminosae) pericarp. *Nordic Journal of Botany* **22**: 313–323.
- Cruden R.W., Hermann-Parker S.M. 1979. Butterfly pollination of *Caesalpinia pulcherrima*, with observations of psychophilous syndrome. *Journal of Ecology* **67**: 155–168.
- Curry K., McDowell L.M., Judd W.S., Stern W.L. 1991. Osmophores, floral features and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **78**: 610–623.
- Dudareva N., Pichersky E. 2006. *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Faegri K., van der Pijl L. 1979. *The principles of pollination ecology*. 3 ed. Oxford/ New York/ Toronto/ Sydney/ Paris/ Braunschweig: Pergamon Press.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Falcão M.A., Clement C.R. 2000. Fenologia e produtividade do ingá-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. *Acta Amazonica* **30**: 173–180.
- Fleming T.H., Geiselman C., Kress W.J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany* **104**: 1017–1043.
- García M.T.A., Galati B.G., Hoc P.S. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora* **202**: 302–315.
- Gibbs P.E., Oliveira P.E., Bianchi M. B. 1999. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 72–78.
- Guimarães E., Di Stasi L.C., Maimoni-Rodella R.C.S. 2008. Pollination biology of *Jacaranda oxyphylla* with an emphasis on staminode function. *Annals of Botany* **102**: 699–711.

- Healy R.A., Palmer R.G., Horner H.T. 2009. Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecea. *International Journal of Plant Science* **170**: 444–456.
- Hopkins H.C. 1984. Floral biology and pollination ecology of the Neotropical species of *Parkia*. *Journal of Ecology* **72**: 1–23.
- Hopkins M.J.G., Hopkins H.C.F., Sothers C.A. 2000. Nocturnal pollination of *Parkia velutina* by *Megalopta* bees in Amazonia and its possible significance in the evolution of chiropterophily. *Journal of Tropical Ecology* **16**: 733–746.
- Knudsen J.T., Eriksson R., Gershenzon J., Ståhl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* **72**: 1–120.
- Kumar B.K.V., Prabhakar M., Ramayya N., Leelavathi P. 1986. Structure, distribution and development of cavitated trichomes in *Indigofera* L. (Fabaceae). *Geophytology* **16**: 227–231.
- Leelavathi P., Prabhakar M., Ramayya N. 1984. Structure and ontogeny of capitate hairs in *Mimosa* (L.). *Geobios New Reports* **3**: 183–185.
- Lewis G.P., Schrire B., Mackinder B., Lock M. 2005. *Legumes of the World*. Kew: The Royal Botanic Gardens.
- Luckow M., Grimes J. 1997. A survey of anther glands in the mimosoid legume tribes Parkieae and Mimoseae. *American Journal of Botany* **84**: 285–297.
- Maffei M.E. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* **76**: 612–631.
- Mansano V.F., Teixeira S.P. 2008. Floral anatomy of the *Lecointea* clade (Leguminosae, Papilionoideae, Swartzieae sensu lato). *Plant Systematic and Evolution* **273**: 201–209.
- Marquiasável F.S., Ferreira M.D.S., Teixeira S.P. 2009. Novel reports of glands in Neotropical species of *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae). *Flora* **204**: 189–197.
- Melo M.C., Borba E.L., Paiva E.A.S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141–151.
- More M., Sérsic A.N., Cocucci A.A. 2006. Specialized use of pollen vectors by *Caesalpinia gilliesii*, a legume species with brush-type flowers. *Biological Journal of the Linnean Society* **88**: 579–592.
- Munin R.L., Teixeira R.C., Sigrist M.R. 2008. Esfingofilia e sistema de reprodução de *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae: Caesalpinoideae) em cerrado no Centro-Oeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* **31**: 15–25.
- Ormond W.T., Pinheiro M.C.B., Castells A.R.C. 1981. A contribution to the floral biology and reproductive system of *Couroupita guianensis* Aubl. (Lecythidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 514–523.
- Paiva E.A.S., Oliveira D.M.T. 2004. Ontogenesis of the fruit pulp layer of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Australian Journal of Botany* **52**: 677–683.
- Pansarin L.M., Castro M.M., Sazima M. 2009. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 408–415.
- Pires J.P.A., Freitas L. 2008. Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in southeastern Brazil. *Flora* **203**: 491–498.

- Plachno B.J., Świątek P., Szymczak G. 2010. Can a stench be beautiful? – Osmophores in stem-succulent stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae-Stapeliinae). *Flora* **205**: 101–105.
- Poser G.L., Mentz L.A. 2007. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora da UFSC. Pp. 75–89.
- Prenner G., Klitgaard B.B. 2008. Towards unlocking the deep nodes of Leguminosae: Floral development and morphology of the enigmatic *Duparquetia orchidacea* (Leguminosae, Caesalpinioideae). *American Journal of Botany* **95**: 1349–1365.
- Pridgeon A.M., Stern W.L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **70**: 1233–1243.
- Pridgeon A.M., Stern W.L. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* **146**: 115–123.
- Ramírez N. 2004. Ecology of pollination in a tropical Venezuelan savanna. *Plant Ecology* **173**: 171–189.
- Sazima M., Buzato S., Sazima I. 1999. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest sites in Brazil. *Annals of Botany* **83**: 705–712.
- Sazima M., Vogel S., Cocucci A., Hausner G. 1993. The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae): pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Plant Systematics and Evolution* **187**: 51–88.
- Silva L.A., Guimarães E., Rossi M.N., Maimoni-Rodella R.C.S. 2011. Biologia da reprodução de *Mimosa bimucronata* – uma espécie ruderal. *Planta Daninha* **29**: 1011–1021.
- Simões C.M.O. 2007. Óleos voláteis. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora da UFSC. Pp. 467–495.
- Simpson B.B., Neff J.L. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301–322.
- Skubatz H., Kunkel D.D., Howald W.N., Trenkle R., Mookherjee B. 1996. The *Sauromatum guttatum* appendix as an osmophore: excretory pathways, composition of volatiles and attractiveness to insects. *New Phytologist* **134**: 631–640.
- Teixeira S.P., Borba E.L., Semir J. 2004. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 499–505.
- Teixeira S.P., Machado S.R. 2007. Glandular dots of *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae): distribution, structure and ultrastructure. *The Journal of the Torrey Botanical Society* **134**: 135–143.
- Teixeira S.P., Ranga N.T., Tucker S.C. 2009. Inflorescence and floral development of *Dahlstedtia* species (Leguminosae: Papilionoideae: Millettieae). *Flora* **204**: 769–78.
- Teixeira S.P., Rocha J.F. 2009. Oil glands in the Neotropical genus *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Revista Brasileira de Botânica* **32**: 57–64.
- Trujillo C.G., Sérsic A.N. 2006. Floral biology of *Aristolochia argentina* (Aristolochiaceae). *Flora* **201**: 374–382.

- Tucker S.C., Rugenstein S.R., Derstine K. 1984. Inflated trichomes in flowers of *Bauhinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **88**: 291–301.
- Vogel S. 1983. Ecophysiology of zoophilic pollination. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (Eds.), *Physiological plant ecology III: responses to the chemical and biological environment*. Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer-Verlag. Pp. 559–624
- Vogel S. 1990. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington: Smithsonian Institution Libraries. (Translated by S.S. Renner).
- Vogel S., Hadacek F. 2004. Contributions to the functional anatomy and biology of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) III. An ecological reappraisal of floral organs. *Plant Systematics and Evolution* **249**: 173–189.
- Vogel S., Lopes A.V., Machado I.C. 2005. Bat pollination in the NE Brazilian endemic *Mimosa lewisii* Barneby: an unusual case and first report for the genus. *Taxon* **54**: 693–700.
- Wallace G.D. 1977. Studies of the Monotropoideae (Ericaceae). Floral nectaries: anatomy and function in pollination ecology. *American Journal of Botany* **64**: 199–206.
- Wiemer A.P., Moré M., Benitez-Vieyra S., Cocucci A.A., Raguso R.A., Sérsic A.N. 2009. A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology* **11**: 506–514.

CAPÍTULO 1: Morfologia floral e sua relação com a polinização noturna em Leguminosae

Resumo

Especializações florais têm sido relacionadas ao grupo de polinizador que determinada espécie vegetal apresenta. A maioria dos trabalhos associa a morfologia externa da flor à polinização, negligenciando a anatomia floral. Assim, este trabalho teve como objetivo comparar a morfologia floral externa e interna de sete espécies de Leguminosae com polinizadores noturnos, enfatizando a estrutura de órgãos relacionados à atração e recompensa, e dispersão e receptividade dos grãos de pólen. Flores foram processadas para análises em microscopia de luz e eletrônica de varredura. As flores apresentam várias características condizentes à polinização noturna, como antese com duração de uma noite, coloração pálida (branca e esverdeada) e forte odor durante a noite. O acúmulo de néctar, como requerido por polinizadores grandes, é possibilitado pelo padrão de prefloração ou fusão no perianto e pela presença de hipanto em forma de copo. A grande quantidade de néctar produzido nas espécies quiropterófilas tem relação com a estrutura robusta de seus nectários. A presença de células secretoras na epiderme e no mesofilo das peças que compõem o perianto é uma condição que pode ser associada às síndromes zoófilas nas quais a liberação de voláteis pelas flores é comum, pois ela está relacionada aos mecanismos de produção e liberação de odor nas flores. Estruturas secretoras frequentemente associadas à defesa, como tricomas, cavidades e idioblastos, também foram encontradas nas flores. O estigma apresenta uma grande variação morfológica, que parece ter um forte valor taxonômico para o grupo. Conclui-se que os caracteres de morfologia externa da flor podem ser relacionados às síndromes de polinização noturna em Leguminosae; já os caracteres de morfologia interna apresentaram significado sistemático nas espécies estudadas.

Palavras-chave: estrutura secretora, flor, morfologia, nectário, polinização.

Abstract

Floral specializations have been related to the group of pollinator that particular plant species presents. Most studies associate the external morphology of the flower to the pollination, overlooking the floral anatomy. This study aimed to compare the external and internal floral morphology of seven species of Leguminosae with nocturnal pollinators, emphasizing the structure of organs related to attraction and reward, and dispersion and receptivity of pollen grains. Flowers were processed for analysis in light and scanning electron microscopy. The flowers show several characteristics consistent with nocturnal pollination, as anthesis with duration of one night, pale coloration (white and green) and strong odor during the night. The accumulation of nectar, as required by large pollinators, is consistently achieved via the pattern of aestivation or fusion of the perianth and by the presence of cup-shaped hypanthium. The large amount of nectar produced in the chiropterophilous species is related to its robust structure of nectaries. The presence of secretory cells in the epidermis and in the mesophyll of the parts composing the perianth is a condition which may be associated with zoophilic syndromes in which the release of volatiles by the flowers is common, as it is related to the mechanisms of production and release of scents in flowers. Secretory structures often associated with defense, as trichomes, idioblasts and cavities, were also found in the flowers. The stigma presents a large morphological variation, which seems to have a strong taxonomic value to the group. It is concluded that the characters from external morphology of the flower may be related to the pollination syndromes in Leguminosae; and the characters from internal morphology showed systematic significance in the studied species.

Keywords: flower, morphology, nectary, pollination, secretory structure.

Introdução

Do século XIX até quase o final do século XX muitos autores estavam certos de que algumas combinações de traços florais refletiam o tipo de polinizador de determinada espécie (Müller & Delpino 1869; Baker 1963; Stebbins 1970, Faegri & van der Pijl 1979, Vogel 1990a). A atividade de diferentes polinizadores teria selecionado diversas formas florais, o que resultou em uma gama de síndromes de polinização. As flores foram, então, classificadas em esfingófilas, fanelófilas, miiófilas, melitófilas, cantarófilas, ornitófilas, quiropterófilas, anemófilas, hidrófilas, entre outros, com base na cor, no odor, na simetria, na orientação, na forma da corola, na apresentação do néctar, e na localização das flores entre a folhagem, entre outros (Stebbins 1970, Faegri & van der Pijl 1979, Vogel 1990a).

No entanto, no final da década de 90, a visão de que a especialização floral era dominante na evolução dos sistemas de polinização foi colocada em cheque, e a conexão adaptativa entre os traços florais e os polinizadores foi considerada mais complexa que o esperado (Waser *et al.* 1996, Ollerton 1996, Herrera 1996, Wilson & Thomson 1996). De acordo com esses autores, muitas flores, apesar de apresentarem várias especializações, são visitadas por diferentes espécies animais, contrariando o esperado nas síndromes de polinização.

Com o aumento das contribuições ao conhecimento dos mecanismos de polinização aumentaram também as controvérsias relativas ao tema. Estudos mais recentes mostram que, além dos sistemas de polinização generalistas, existem também os sistemas especialistas (Hingston & McQuillan 2000, Martins & Batalha 2006, Ford & Johnson 2008, Okamoto *et al.* 2008, Reynolds *et al.* 2009), nos quais são válidas as síndromes de polinização (ver Johnson & Steiner 2000). O termo síndrome de polinização foi resgatado no trabalho de Fenster *et al.* (2004) com algumas modificações. Estes autores classificaram os polinizadores em grupos funcionais, ou seja, grupos que apresentam comportamento de visita similar em uma flor e exercem pressões seletivas semelhantes, as quais geram correlações de caracteres florais.

Apesar das modificações no termo síndrome de polinização, a maioria dos trabalhos associa apenas os caracteres de morfologia externa da flor à polinização, embora

alguns estudos relacionam as síndromes à anatomia floral. Associação entre entomofilia e vascularização, presença de esclerênquima, ráfides e taninos foi encontrada em espécies de Arecaceae por Uhl & Moore (1997). Segundo esses autores, a vascularização está diretamente relacionada ao tamanho e à morfologia do perianto, à atividade dos polinizadores e à fenologia, enquanto que esclerênquima, ráfides e taninos provavelmente atuam na proteção de ovários e pólen em desenvolvimento contra seus próprios polinizadores e outros predadores. Portanto, o estudo da anatomia floral pode ser muito útil para complementar os dados obtidos em campo sobre os polinizadores, obtendo-se um melhor entendimento das síndromes de polinização (Wallace 1977, Uhl & Moore 1997, Dute *et al.* 2002).

Leguminosae é a terceira família de plantas em número de espécies, sendo representada por aproximadamente 730 gêneros e cerca de 19000 espécies subordinadas a três subfamílias muito distintas entre si: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Lewis *et al.* 2005). Além da grande diversidade de hábitos, morfologia floral, tipos de frutos e ampla distribuição geográfica (Lewis *et al.* 2005), representantes de Leguminosae apresentam vários tipos de polinização zoófila, como melitofilia (Carvalho & Oliveira 2003, Oliveira & Sigrist 2008, Borges *et al.* 2009, Lau *et al.* 2009), psicofilia (Cruden & Hermann-Parker 1979, Lau *et al.* 2009), esfingofilia (Cocucci *et al.* 1992, Munin *et al.* 2008), ornitofilia (Bruneau 1997, Agostini *et al.* 2006) e quiropterofilia (Hopkins 1984, Gibbs *et al.* 1999, Vogel *et al.* 2005). Geralmente, a visita dos polinizadores às flores é restrita a um período, diurno ou noturno; entretanto, existem espécies que são visitadas tanto durante o dia quanto à noite (Faegri & van der Pijl 1971).

Na polinização noturna, representantes de Leguminosae destacam-se por apresentar diferentes polinizadores como morcegos, mariposas e abelhas crepusculares (Hopkins 1984, Sazima *et al.* 1999, Hopkins *et al.* 2000, Ramírez 2004, Vogel *et al.* 2005, Moré *et al.* 2006, Munin *et al.* 2008). As flores de espécies polinizadas à noite apresentam algumas características em comum, como coloração inconspícua e liberação de forte odor durante a noite (Baker 1961, Stebbins 1970, Faegri & van der Pijl 1979), e diferenças, como maior produção de néctar detectada nas flores quiropterófilas (Fleming *et al.* 2009).

Considerando a escassez de estudos anatômicos de flores com antese noturna, este trabalho teve como objetivo verificar se caracteres de anatomia floral podem ser associados à polinização noturna em espécies de Leguminosae enquadradas em sistemas especialistas, enfatizando órgãos relacionados à atração e recompensa, e dispersão e receptividade dos grãos de pólen. Caracteres anatômicos semelhantes no grupo foram ressaltados, com o propósito de indicar possíveis eventos de convergência relacionados aos mecanismos de polinização noturna.

Material e Métodos

Flores em antese de sete espécies de Leguminosae com polinização noturna, pertencentes às três subfamílias, foram coletadas entre 18:00 e 20:00 h e processadas para observações em microscopias eletrônica de varredura e fotônica. Pelo menos dois indivíduos foram investigados por espécie. As coletas foram realizadas de acordo com os períodos de floração obtidos de trabalhos recentemente publicados. Materiais testemunhas foram herborizados e depositados em herbários (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies de Leguminosae selecionadas para o presente estudo.

Espécies	Subfamília	Polinizador/ Referência	Herbário	Localidade	Data da Coleta
<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	Caesalpinioideae	morcego/ Gibbs <i>et al.</i> (1999)	S.P. Teixeira 46, 47, 48 (SPFR)	Pratânia, SP (Reserva Particular de Cerrado Fazenda Palmeira da Serra)	Dez/ 2009, 2010 e 2011, Mai/ 2010
<i>Bauhinia curvula</i> Benth.	Caesalpinioideae	mariposa/ Munin <i>et al.</i> (2008)	S.P. Teixeira 59 (SPFR)	Campo Grande, MS (Reserva Particular de Patrimônio Natural da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul)	Set/ 2010 e 2011
<i>Hymenaea</i> <i>courbaril</i> L.	Caesalpinioideae	morcego/ Crestana <i>et al.</i> (83/85), López-Forment (1985)	S.P. Teixeira 45, 55, 56 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)	Set – Out/ 2009
<i>Erythrostemon</i> <i>gilliesii</i> (Wall. ex Hook.) Klotzsch	Caesalpinioideae	mariposa/ Cocucci <i>et al.</i> (1992), Moré <i>et al.</i> (2006)	L. Galetto 2245 (CORD)	Alta Gracia, Argentina	Out/ 2010
<i>Mucuna urens</i> (L.) Medik.	Papilionoideae	morcego/ Sazima <i>et al.</i> (1999)	S.P. Teixeira 58 (SPFR)	BR 101 km 11-13	Dez/ 2010
<i>Mimosa lewisii</i> Barneby	Mimosoideae	morcego/ Vogel <i>et al.</i> (2005)	S.P. Teixeira 76 (SPFR)	Morro do Chapéu, BA	Jul./ 2012
<i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth. ex Walp.	Mimosoideae	morcego/ Hopkins (1984), Piechowski <i>et al.</i> (2010)	H.C. Lima 5693 (RB)	Rio de Janeiro, RJ (Arboreto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro)	Out – Nov./ 2009, 2010 e 2011

O exame da superfície dos órgãos florais foi realizado em amostras de 1 cm² fixadas em FNT (formalina neutra tamponada; Lillie 1965) por 72h, desidratadas em série etanólica crescente e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂, utilizando-se equipamento Bal Tec, CPD030. Após a montagem das amostras em suportes metálicos foi feita a deposição com ouro em metalizador Bal Tec, SCD050. A análise e a captura de imagens foram realizadas em microscópios eletrônicos de varredura Zeiss EVO/MA10 e Jeol JSM-5800 LV.

A anatomia floral foi estudada em flores fixadas em FNT por 72 horas, desidratadas em série etanólica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). O material emblocado foi cortado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina 0,05% (O'Brien *et al.* 1964) e montado sob lamínula com resina sintética. A histolocalização de polissacarídeos (PAS, McManus 1948 e vermelho de rutênio, Johansen 1940) e proteínas (xylidine Ponceau, Vidal 1977) foi realizada nos nectários encontrados. As imagens foram obtidas em microscópio de luz Leica DM5000-B, acoplado à câmera fotográfica digital Leica DFC295 e a um microcomputador.

A descrição morfológica dos órgãos florais foi realizada seguindo a terminologia de Bell (1993), sendo que para *Parkia pendula* a descrição seguiu os trabalhos de Hopkins (1984) e Luckow & Hopkins (1995).

Resultados

Morfologia externa

Na maioria das espécies estudadas as inflorescências são do tipo racemo (Fig. 1A, C-D), exceto *Hymenaea courbaril* (Fig. 1B) que apresenta inflorescência corimbiforme e *Parkia pendula*, cujas flores estão reunidas em um capítulo (Fig. 1E). *Mimosa lewisii* é a única espécie com inflorescência composta, exibindo um racemo de glomérulos (Fig. 1F). Em todas as espécies as inflorescências estão expostas em relação à folhagem e em *Mucuna urens* e *Parkia pendula*, elas são pendentes (Tabela 2, Fig. 1D). O número de flores por inflorescência varia de 10 a 20 em *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Hymenaea courbaril*,

de 20 a 30 em *Erythrostemon gilliesii* e de 36 a 54 em *Mucuna urens* (Agostini 2008); *Parkia pendula* apresenta 1320 flores por capítulo (Hopkins 1984) e *Mimosa lewisii* contém 14 a 20 flores por capítulo (Vogel *et al.* 2005).

As flores de todas as espécies estudadas são perfeitas, incluindo os dois morfotipos florais de *Parkia pendula*, as flores com nectários, localizadas na região distal do capítulo, e as sem nectários, presentes na região proximal e mediana (Fig. 1E). A maioria das espécies exibem flores actinomorfas, exceto *Erythrostemon gilliesii* e *Mucuna urens*. Com exceção das Mimosoideae, as espécies exibem flores grandes, variando de 4,5 cm (*Hymenaea courbaril* e *Mucuna urens*) a 9 cm (*Bauhinia rufa*) (Tabela 2). As sépalas são em número de quatro (*Hymenaea courbaril*) a cinco (demais espécies) e podem ser livres como em *Hymenaea courbaril* e *Erythrostemon gilliesii* ou unidas, seja somente no botão (*Bauhinia curvula* e *Bauhinia rufa*) ou na flor (*Mucuna urens*, *Parkia pendula* e *Mimosa lewisii*). São verdes, com tricomas tectores e/ou secretores e apresentam prefloração valvar ou imbricada, podendo ter consistência papirácea (*Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Mimosa lewisii*), coriácea (*Hymenaea courbaril*, *Mucuna urens* e *Parkia pendula*) ou membranácea (*Erythrostemon gilliesii*). Todas as espécies apresentam cinco pétalas membranáceas de coloração pálida (Tabela 2, Fig. 1), que são fundidas na base somente em *Mimosa lewisii*. A prefloração das pétalas é aberta em *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Parkia pendula*, imbricada em *Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii* e *Mucuna urens* e valvar em *Mimosa lewisii*. Os estames, em número de 10, geralmente apresentam filetes brancos e anteras amarelas (Fig. 1A-B), exceto *Erythrostemon gilliesii* que exhibe estames vermelhos e *Parkia pendula*, cuja região apical dos filetes e anteras é vinácea (Fig. 1C, E). Os filetes podem ser fundidos na base (*Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Parkia pendula*), livres (*Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii* e *Mimosa lewisii*) ou constituírem um androceu diadelfo (*Mucuna urens*). As anteras de todas as espécies são conspícuas e com deiscência longitudinal e a inserção dorsifixa dos filetes predomina, sendo basifixa somente em *Mucuna urens* e *Parkia pendula*. O carpelo apresenta uma diversidade de cores (verde em *Bauhinia curvula* e *Bauhinia rufa*, branco em *Hymenaea courbaril*, *Mucuna urens* e *Mimosa lewisii*, vermelho em *Erythrostemon gilliesii* e vináceo em *Parkia pendula*) e o estigma é apical podendo ser

conspícuo (*Bauhinia curvula* – Fig. 1A e *B. rufa*) ou discreto (demais espécies). Néctar é produzido de forma abundante nas espécies e geralmente se apresenta armazenado em compartimentos florais formados pelo hipanto de *Bauhinia curvula* e *Bauhinia rufa*, pela disposição imbricada do perianto em *Hymenaea courbaril* e *Erythrostemon gilliesii* e pela fusão de sépalas em *Mucuna urens*. Com exceção de *Mimosa lewisii*, as flores de todas as espécies liberam odor durante a antese (Tabela 2).

Anatomia

As sépalas de todas as espécies analisadas apresentam epiderme secretora unisseriada, composta de células curtas e justapostas (Figs. 2A-D; 3A-B, D; 4A, D-E). Estômatos anomocíticos são frequentes ao longo das sépalas de *Bauhinia curvula* e *Bauhinia rufa* (Fig. 2A, D). Nas demais espécies os estômatos são escassos ocorrendo em ambas as superfícies (*Hymenaea courbaril* e *Mimosa lewisii*) ou na superfície abaxial (*Erythrostemon gilliesii* – Fig. 3E e *Mucuna urens*). Tricomas tectores unisseriados são observados em todas as espécies e tricomas secretores ocorrem em *Bauhinia* e *Erythrostemon gilliesii* (Tabela 2; Figs. 2B-C, E-F; 3C-E; 4B-C, F). O mesofilo das sépalas é parenquimático, podendo apresentar espaços intercelulares conspícuos como em *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Hymenaea courbaril* (Figs. 2B-C; 3A-B) ou pode ser compacto como em *Erythrostemon gilliesii*, *Mucuna urens*, *Parkia pendula* e *Mimosa lewisii* (Figs. 3D; 4A, D-E). Em *Hymenaea courbaril* esses espaços intercelulares são preenchidos por substâncias polissacarídicas (Fig. 3B). Em *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Parkia pendula* e *Mimosa lewisii* há uma grande quantidade de células na epiderme e no mesofilo com conteúdo fenólico (Tabela 2; Figs. 2B-D; 3A; 4D-E). Em *M. lewisii* as células epidérmicas dos lobos sepalares também apresentam conteúdo mucilaginoso (Fig. 4E). Os feixes vasculares são colaterais e, com exceção de *Hymenaea courbaril*, apresentam calibre proporcional à espessura das sépalas.

As pétalas apresentam epiderme secretora unisseriada, composta de células arredondadas e curtas em *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Hymenaea courbaril* (Fig. 5), arredondadas e alongadas em *Erythrostemon gilliesii* (Fig. 6A-C), *Parkia pendula* e

Mimosa lewisii (Fig. 7) e tabulares e papilosas (margem do perianto e superfície abaxial da ala) em *Mucuna urens* (Fig. 6D-F). *Erythrostemon gilliesii* e *Mucuna urens* exibem células epidérmicas com núcleo conspícuo (Fig. 6B, E) e não apresentam estômatos, que são frequentes nas pétalas de *Hymenaea courbaril* (Tabela 2; Fig. 5F). Cutícula fina e lisa predomina (Figs. 5C; 7C, E); no entanto, cutícula estriada é observada em *Hymenaea courbaril* e *Erythrostemon gilliesii* (Figs. 5F; 6C) e cutícula espessa com deposição de ceras epicuticulares ocorre em *Mucuna urens*, principalmente no estandarte (Fig. 6G-H) e na quilha. Tricomas secretores cavitados são observados somente em *Bauhinia curvula*, na superfície abaxial, e tricomas tectores ocorrem na face abaxial da região apical das pétalas de *Parkia pendula*. A maioria das espécies apresenta espaços intercelulares conspícuos, exceto *Mucuna urens* e *Mimosa lewisii* que apresentam mesofilo compacto (Figs. 6D; 7D). *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Parkia pendula* e *Mimosa lewisii* exibem na epiderme e no mesofilo células com conteúdo fenólico (Tabela 2; Figs. 5A-B, D-E; 7A-B, D). Todas as espécies exibem feixes vasculares colaterais neste órgão.

As anteras são compostas de duas tecas biloculares com deiscência longitudinal lateral (Tabela 2; Figs. 8A; 9D; 10A; 11A, D). Tricomas tectores são observados ao longo das tecas de *Parkia pendula* e na região basal do conectivo de *Mucuna urens*, o qual exhibe estômatos (Figs. 10A-B; 11A). O estigma apresenta uma grande diversidade morfológica (ver Tabela 2; Figs. 8B; 9A, E-F; 10C; 11B, E) e pode ser constituído por papilas (*Bauhinia curvula* e *Bauhinia rufa* – Fig. 8C), tricomas (*Hymenaea courbaril* – Fig. 9B-C), papilas e tricomas marginais (*M. urens* – Fig. 10C-D), ou células prismáticas (*Erythrostemon gilliesii* – Fig. 9F-G, *P. pendula* – Fig. 11C e *Mimosa lewisii* – Fig. 11F). As células estigmáticas apresentam núcleo conspícuo, citoplasma denso e numerosos pequenos vacúolos. Células com conteúdo fenólico foram encontradas em *B. curvula* (Fig. 8E), *B. rufa* e *H. courbaril* (Fig. 9C). Na maioria das espécies, as células do estigma estão expostas na antese, exceto em *P. pendula* (Fig. 11B-C) e *M. lewisii* (Fig. 11E-F), em que estas células estão ocultas em uma cavidade estigmática. A liberação do exsudato estigmático ocorre pela lise de células em *B. curvula*, *B. rufa*, *H. courbaril* e *M. urens* (Figs. 8D-E; 10C). Em *E. gilliesii*, *P. pendula* e *M. lewisii* o exsudato é liberado para a superfície sem lise celular (Figs. 9G, 11C). Na região do ovário, tricomas tectores unisseriados são detectados em *B. rufa*, *E.*

gilliesii, *M. urens* e *M. lewisii*, e secretores ocorrem em *B. curvula*, *B. rufa* (tricomas cavitados) e *E. gilliesii* (tricomas não cavitados) (Tabela 2).

Dois tipos de estruturas secretoras foram detectados no mesofilo dos órgãos florais: cavidades e idioblastos (Tabela 2). Cavidades secretoras, constituídas de epiderme unisseriada que delimita um lúmen onde o material produzido é depositado, são encontradas em *Hymenaea courbaril* no hipanto, ao longo do mesofilo das sépalas e pétalas, voltadas para a face abaxial e na região do ovário (Figs. 3A; 5D). Idioblastos fenólicos ocorrem próximos aos feixes vasculares da sépala, pétala, filete e ovário de *Mucuna urens* (Fig. 4A).

Com exceção de *Mimosa lewisii*, as espécies apresentam nectários estruturados que ocupam grande parte da flor, sendo compostos por epiderme, mesofilo parenquimático e sistema vascular próprio. Os nectários de *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Erythrostemon gilliesii* ocorrem no hipanto e mostram-se no mesmo nível dos tecidos adjacentes (Fig. 13E). Em *Bauhinia*, o tecido nectarífero apresenta epiderme constituída de células fenólicas horizontalmente alongadas e estômatos modificados (Fig. 12A-B), e parênquima, composto por células com núcleo conspicuo e grandes vacúolos, que pode ser subdividido em duas regiões: (1) 5-8 camadas de células subepidérmicas alongadas (2) várias camadas de células isodiamétricas com conteúdo fenólico e grãos de amido associadas a um sistema vascular rico em elementos de floema (Fig. 12C-G). O nectário de *Erythrostemon gilliesii* é formado por células epidérmicas vacuoladas e tecido parenquimático constituído de células pequenas com núcleo conspicuo, citoplasma denso e pequenos vacúolos e sistema vascular com terminações de floema (Fig. 13F). Em *Hymenaea courbaril*, *Mucuna urens* e *Parkia pendula*, o tecido nectarífero é formado pela dilatação de tecidos do hipanto, do receptáculo e da base dos filetes respectivamente, e, portanto, constituem protuberâncias na flor. O nectário de *Hymenaea courbaril* mostra-se fundido entre os tecidos do receptáculo, perianto e ginóforo (Fig. 13A), sendo que somente sua porção apical voltada para o ginóforo apresenta epiderme formada por células prismáticas com conteúdo fenólico e estômatos modificados (Fig. 13B). No parênquima nectarífero é observada uma mistura de células com núcleo conspicuo, citoplasma denso e pequenos vacúolos repletos de polissacarídeos e células vacuoladas com conteúdo fenólico

(Fig. 13C-D), além de diversos feixes vasculares com terminações floemáticas. Em *Mucuna urens* o nectário é constituído por uma protuberância localizada entre o androceu e o gineceu, cuja epiderme e mesofilo exibem células isodiamétricas vacuoladas repletas de grãos de amido (Fig. 14A, C). Os feixes vasculares se localizam no centro da estrutura e as células próximas se caracterizam por apresentar núcleo conspícuo, citoplasma denso e pequenos vacúolos com conteúdo denso (Fig. 14B). O tecido nectarífero de *Parkia pendula* restringe-se às flores apicais do capítulo (Fig. 1E), é fundido ao ginóforo (Fig. 14D) e exibe uma epiderme fenólica na porção apical e um parênquima constituído por células pequenas com núcleo conspícuo, citoplasma denso com grãos de amido e pequenos vacúolos (Fig. 14F). Nesta espécie, os feixes vasculares do ginóforo e dos estames não emitem traços para o nectário, o qual é caracterizado como não vascularizado (Fig. 14E). Nectários não foram observados na flor de *Mimosa lewisii*.

Tabela 2: Caracteres morfológicos (externos e internos) provenientes de flores de espécies de Leguminosae com polinização noturna. FP = flor sem nectário, FN = flor com nectário.

Características	Espécies						
	<i>B. rufa</i>	<i>B. curvula</i>	<i>H. courbaril</i>	<i>E. gilliesii</i>	<i>M. urens</i>	<i>P. pendula</i>	<i>M. lewisii</i>
Inflorescência:							
1. tipo	racemo	racemo	corimbo	racemo	racemo	capítulo	racemo de glomérulos
2. localização	exposta	exposta	exposta	exposta	exposta	exposta	exposta
Flores (morfologia externa)							
3. forma	tubular	tubular	tubular	rosácea	papilionácea	tubular	tubular
4. comprimento (média/ n = 5)	8,6 ($\pm 0,8$)	6,0 ($\pm 0,6$)	4,8 ($\pm 0,4$)	9,8 ($\pm 0,5$)	5,0 ($\pm 0,2$)	FP = 1,6 ($\pm 0,1$) FN = 1,3 ($\pm 0,1$)	1,0 (± 0)
5. simetria	actinomorfa	actinomorfa	actinomorfa	zigomorfa	zigomorfa	actinomorfa	actinomorfa
6. prefloração	valvar (sépalas) e aberta (pétala)	valvar (sépalas) e aberta (pétala)	imbricada	imbricada	imbricada	imbricada (sépalas) e aberta (pétala)	valvar
7. coloração	sépalas verdes e pétalas brancas	sépalas verdes e pétalas brancas	sépalas verdes e pétalas brancas	sépalas verdes e pétalas creme	sépalas marrons e pétalas brancas	perianto branco, ápice vináceo	sépalas verdes e pétalas brancas
8. n°. morfotipos	1	1	1	1	1	2	1
9. posição da antera no filete	dorsifixa	dorsifixa	dorsifixa	dorsifixa	basifixa	basifixa	dorsifixa
10. localização dos nectários	hipanto	hipanto	hipanto	hipanto	receptacular e intraestaminal	base dos filetes	?
11. odor na antese	semelhante a alho	semelhante a alho	adocicado fétido	adocicado fétido	pútrido	adocicado	ausente

(Continuação – Tabela 2)

	<i>B. rufa</i>	<i>B. curvula</i>	<i>H. courbaril</i>	<i>E. gilliesii</i>	<i>M. urens</i>	<i>P. pendula</i>	<i>M. lewisii</i>
Flores (morfologia interna)							
12. ocorrência de estômatos	frequente na sépala	frequente na sépala	frequente na pétala	sépala	sépala e conectivo	pétala	sépala e pétala
13. distribuição de tricomas tectores	sépala (face abaxial), ovário e estilete	sépala (face abaxial)	sépala (ambas as faces)	sépala (ambas as faces) e ovário	sépala (ambas as faces), conectivo, ovário e estigma	ápice de sépala e pétala (face abaxial)	sépala (margem) e ovário
14. distribuição de tricomas secretores	sépala (face abaxial) e pistilo	perianto (face abaxial) e pistilo	-	sépala (face abaxial) e ovário	-	-	-
15. aparência da cutícula (pétala)	finha e lisa	finha e lisa	estriada	estriada	espessa, com ceras	finha e lisa	finha e lisa
16. órgão com espaços intercelulares conspicuos	sépala e pétala	sépala e pétala	sépala e pétala	pétala	mesofilo compacto	pétala	mesofilo compacto
17. tecido com células fenólicas	epiderme e mesofilo de todos os órgãos	epiderme e mesofilo de todos os órgãos	epiderme e mesofilo de todos os órgãos	-	-	epiderme e mesofilo de todos os órgãos	epiderme e mesofilo de todos os órgãos
18. ocorrência de estruturas secretoras internas	-	-	cavidades (sépala, pétala e ovário)	-	idioblastos (sépala, pétala, filete e ovário)	-	-
19. morfologia do estigma	clavado, papiloso, secretor	clavado, papiloso, secretor	capitado, tricomático, secretor	crateriforme, papiloso, secretor	capitado, papiloso, secretor	puntiforme, não papiloso, secretor	puntiforme, não papiloso, secretor

Figura 1: Fotografias de flores em antese de *Bauhinia curvula* (A), *Hymenaea courbaril* (B), *Erythrostemon gilliesii* (C), *Mucuna urens* (D), *Parkia pendula* (E) e *Mimosa lewisii* (F). al = alas, an = antera, bo = botão, et = estandarte, qu = quilha, fn = flor com nectário, fs = flor sem nectário, pe = pétala, se = sépala, st = estigma. Barras: 2 cm.

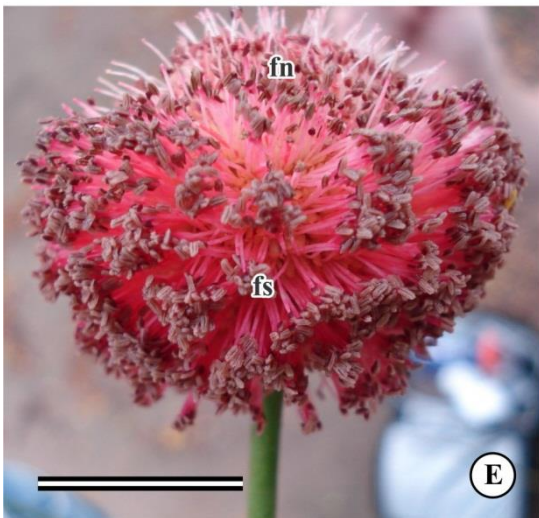
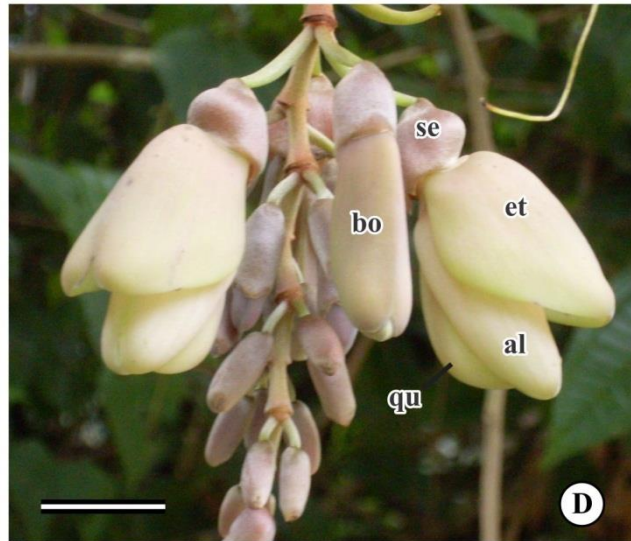
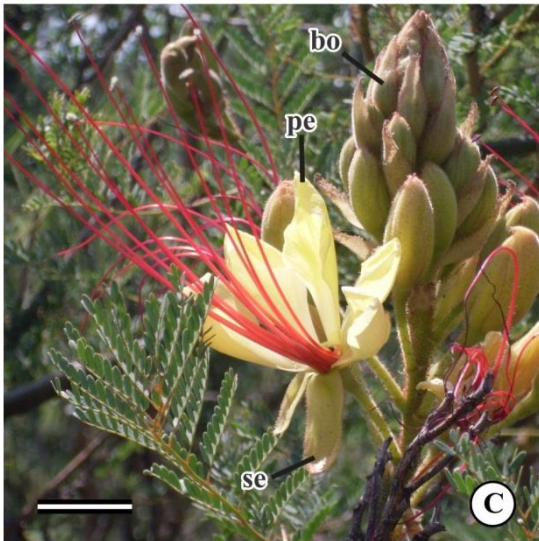
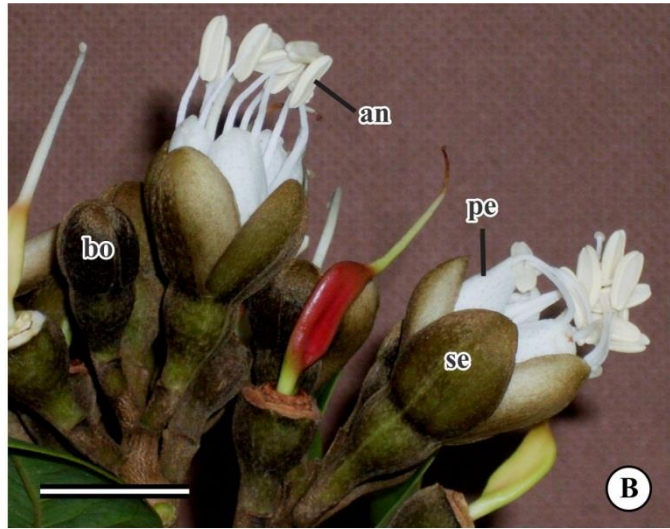
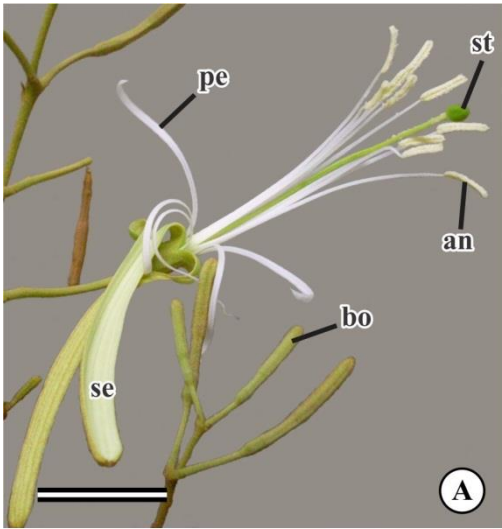


Figura 2: Eletromicrografias de varredura (A, E-F) e fotomicrografias (B-D – cortes transversais, coloração: azul de Toluidina) da sépala de flores de *Bauhinia rufa* (A-B, D, F) e *Bauhinia curvula* (C, E). A: Face adaxial da sépala com estômatos. B-C: Visão geral das sépalas mostrando as células epidérmicas e mesofílicas com conteúdo fenólico e os tricomas secretores cavitados na face abaxial da epiderme. D: Detalhe da epiderme na face adaxial da região do ápice da sépala evidenciando os estômatos e as células com conteúdo no tecido subepidérmico. E-F: Face abaxial da sépala com tricomas tectores e secretores cavitados. es = estômatos, fv = feixe vascular, sc = conteúdo, ts = tricoma secretor, tt = tricoma tector. Barras: 20 μm (A, E); 50 μm (B-C); 30 μm (D); 100 μm (F).

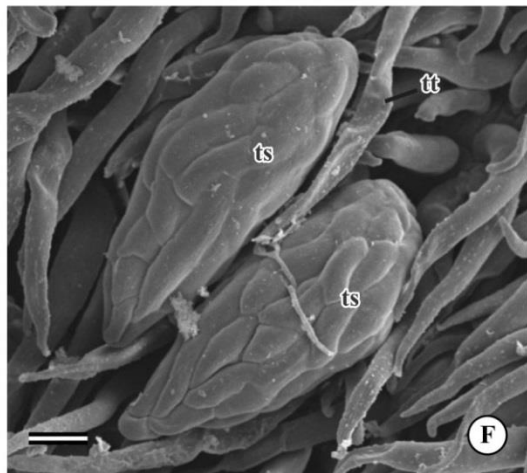
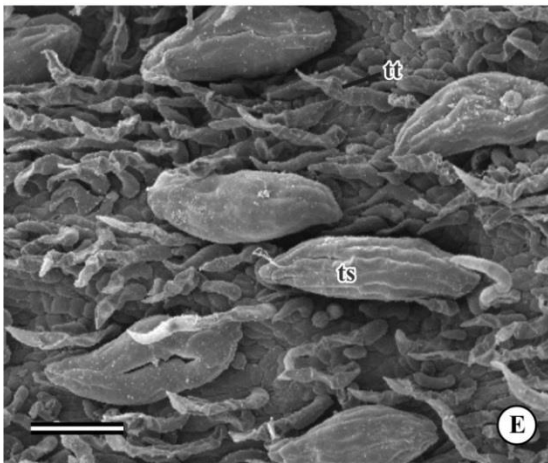
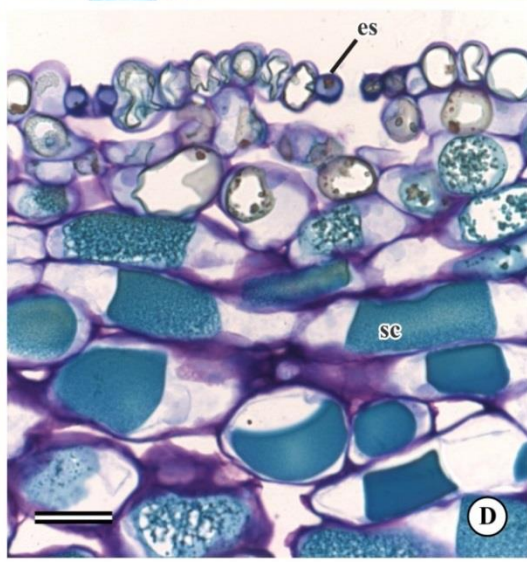
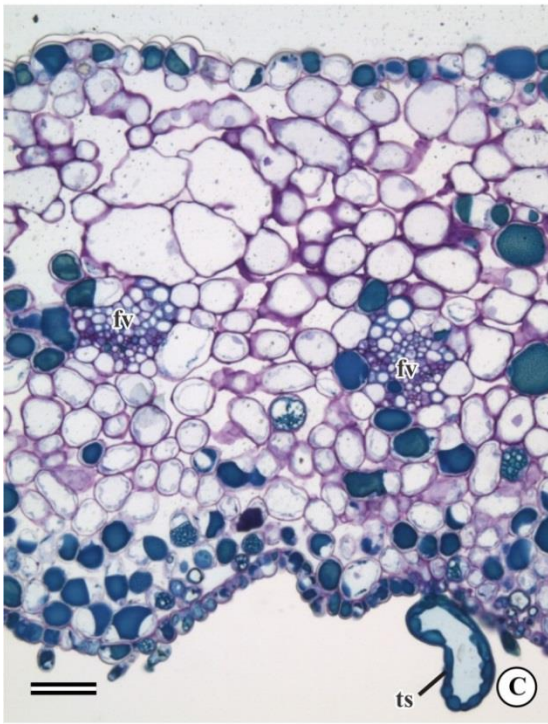
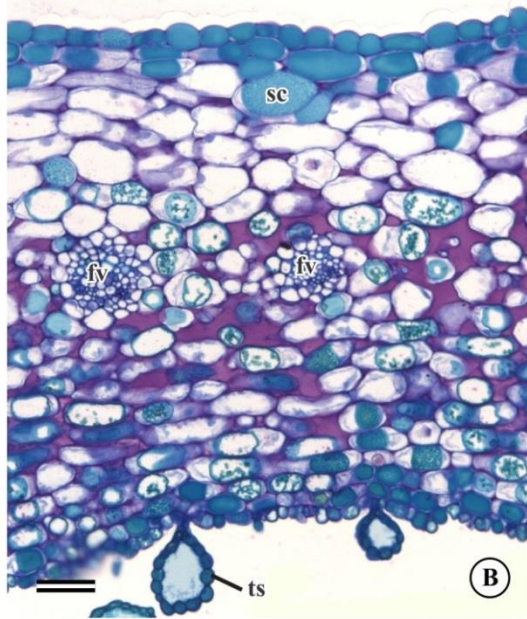
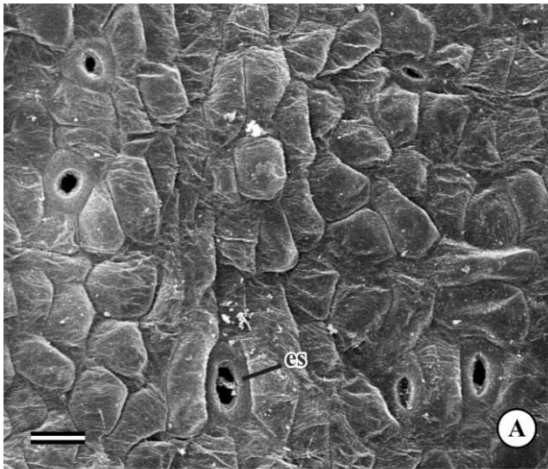


Figura 3: Fotomicrografias (A-B, D – cortes transversais, coloração: azul de Toluidina) e eletromicrografias de varredura (C-E) das sépalas de flores de *Hymenaea courbaril* (A-C) e *Erythrostemon gilliesii* (D-E). A: Visão geral da sépala. Observe as células com conteúdo fenólico, os espaços intercelulares preenchidos por mucilagem e a cavidade secretora próxima à face abaxial. B: Detalhe da região próxima ao bordo da sépala com mucilagem na superfície adaxial. C: Face abaxial da sépala recoberta por tricomas tectores. D: Visão geral da sépala com tricoma secretor na face abaxial. E: Face abaxial da sépala com tricomas tectores e estômatos. ca = cavidade secretora, es = estômato, mu = mucilagem, ts = tricoma secretor, tt = tricoma tector. Barras: 100 μm (A, C); 50 μm (B); 30 μm (D-E).

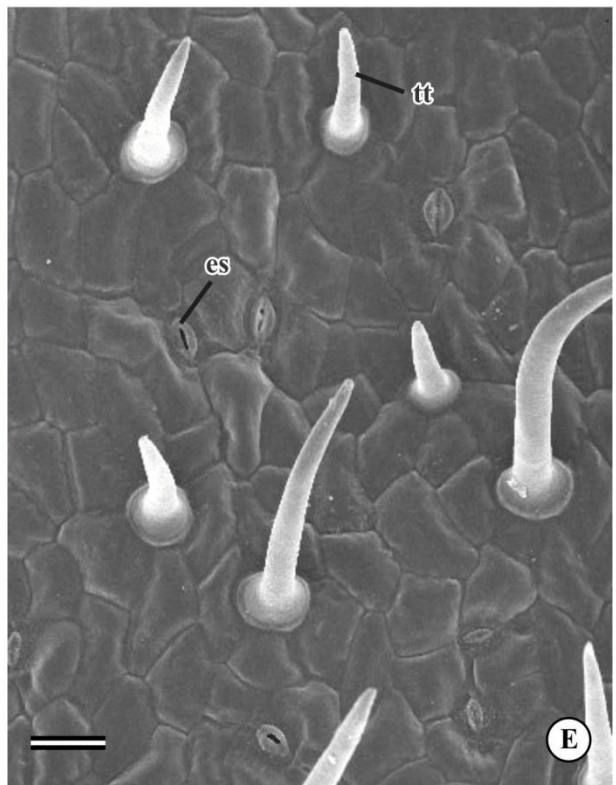
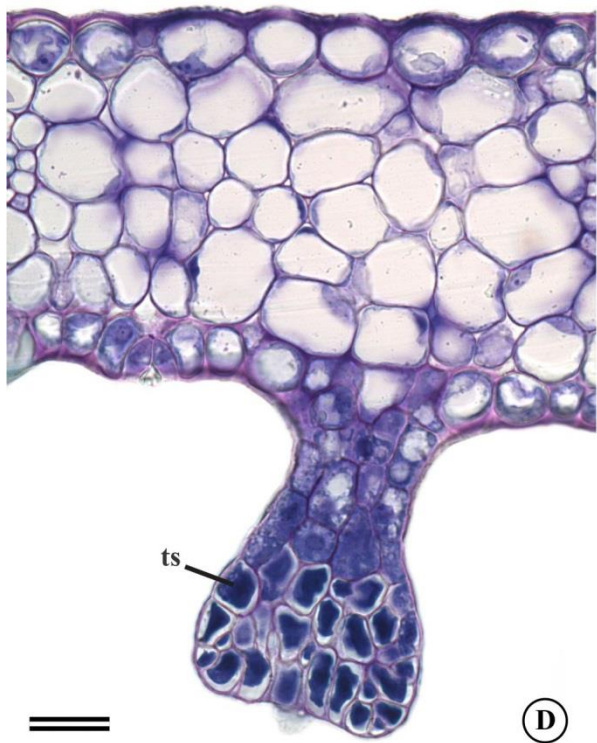
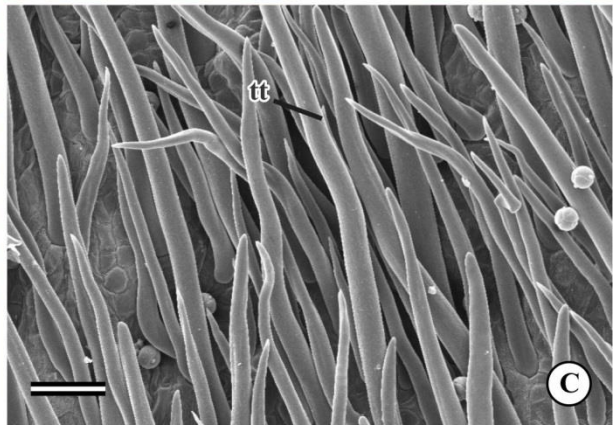
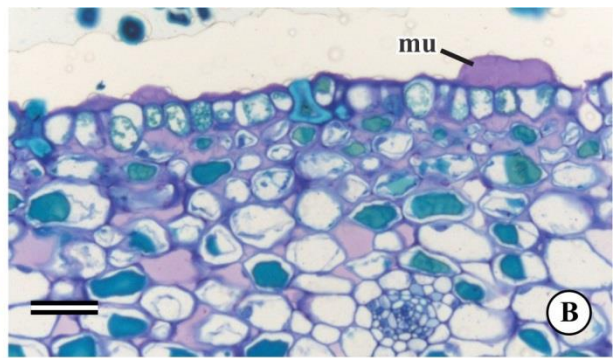
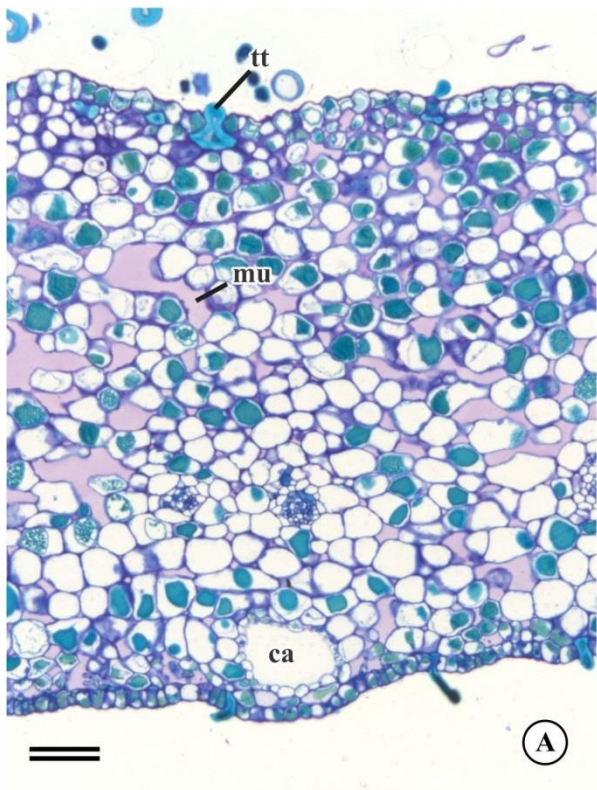


Figura 4: Fotomicrografias (A, D-E – cortes transversais, coloração: azul de Toluidina) e eletromicrografias de varredura (B-C, F) da sépala de flores de *Mucuna urens* (A-B), *Parkia pendula* (C) e *Mimosa lewisii* (D-E). A: Visão geral da sépala com idioblasto fenólico associado ao feixe vascular. B: Superfície adaxial da sépala mostrando os tricomas tectores unisseriados. C: Superfície abaxial da sépala evidenciando os tricomas tectores unisseriados na região apical. D: Região mediana do lobo sepalar com células com conteúdo fenólico na epiderme e no mesofilo. E: Região lateral do lobo sepalar mostrando células epidérmicas com conteúdo fenólico e mucilaginoso. F: Visão geral da sépala evidenciando os tricomas tectores na margem dos lobos sepalaes. fv = feixe vascular, id = idioblasto, pe = pétala, se = sépala, tt = tricoma tector. Barras: 100 µm (A); 200 µm (B, F); 300 µm (C) 50 µm (D-E).

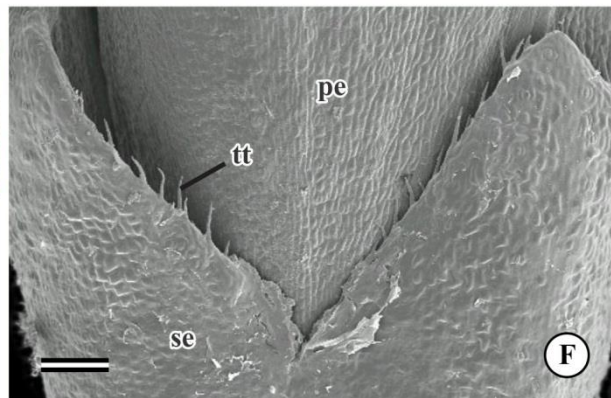
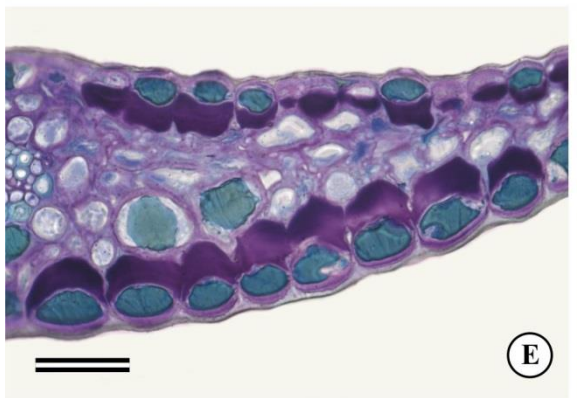
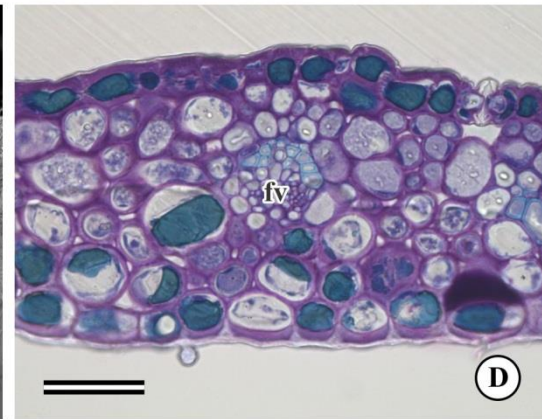
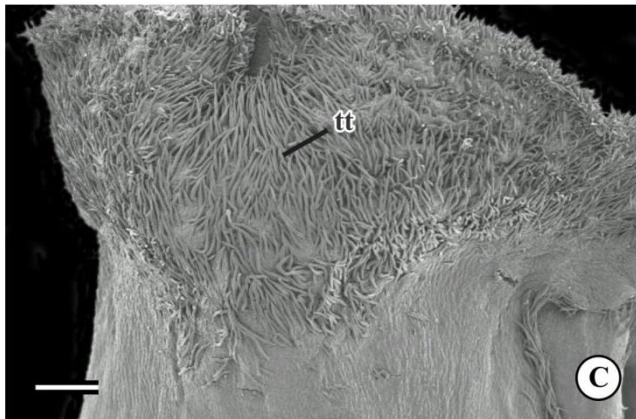
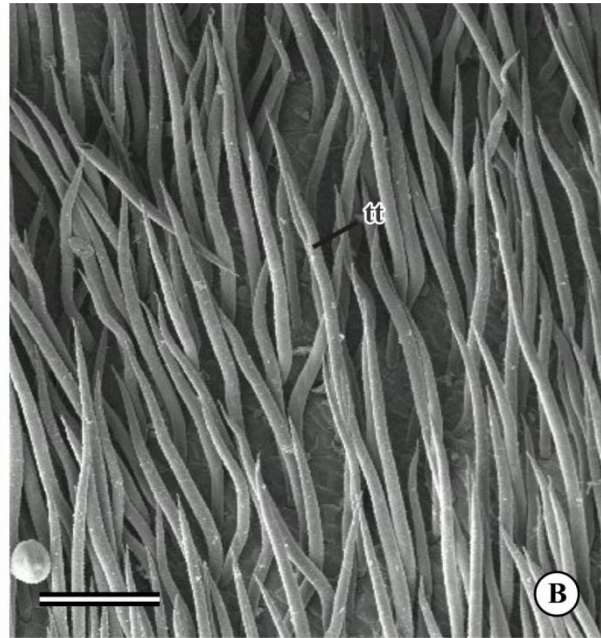
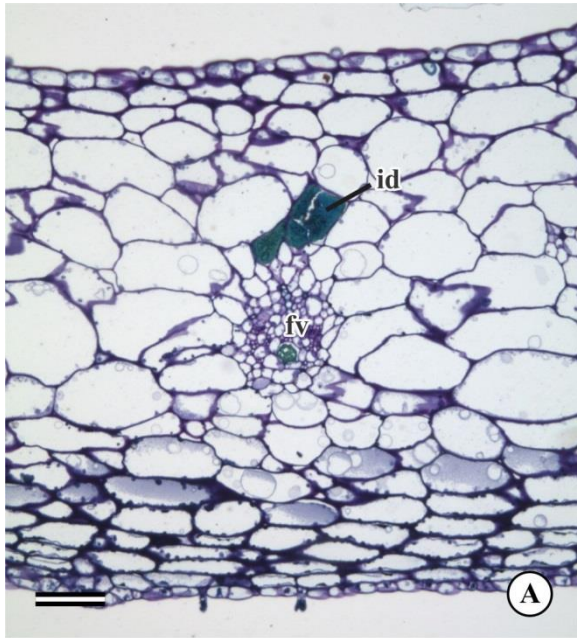


Figura 5: Fotomicrografias (A-B, D-E – cortes transversais, coloração: azul de Toluidina) e eletromicrografias de varredura (C, F) da pétala de flores de *Bauhinia curvula* (A), *Bauhinia rufa* (B-C) e *Hymenaea courbaril* (D-F). A: Visão geral da região basal da pétala evidenciando as células com conteúdo fenólico na epiderme e no mesofilo. B: Visão geral da região apical da pétala. C: Face adaxial da pétala com cutícula lisa. D: Visão geral da pétala com células com conteúdo fenólico no mesofilo e a cavidade secretora. E: Detalhe da epiderme da face adaxial da pétala com células com conteúdo na forma de gotas. F: Face adaxial da pétala com cutícula estriada mostrando estômatos com ostíolo aberto. ca = cavidade secretora, es = estômato, sc = secretado. Barras: 50 μm (A); 30 μm (B, E-F); 20 μm (C); 100 μm (D).

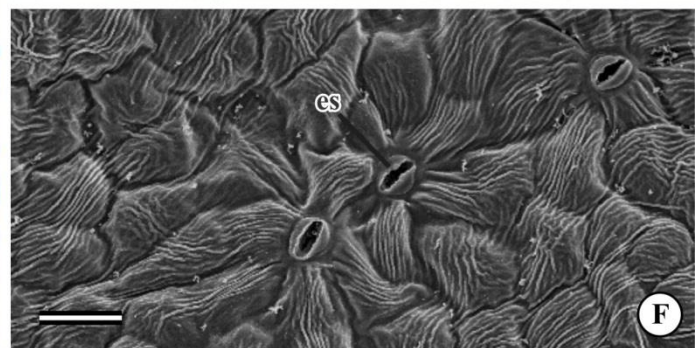
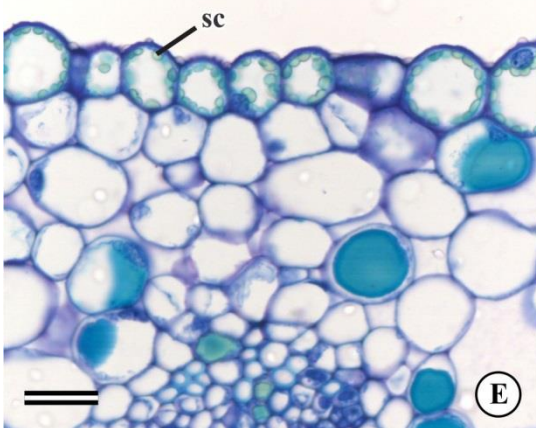
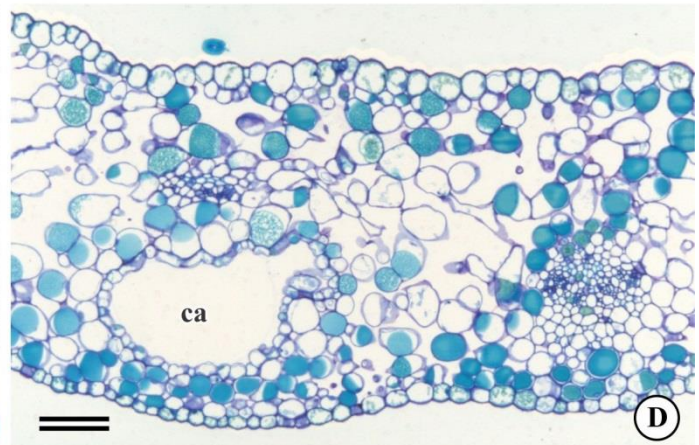
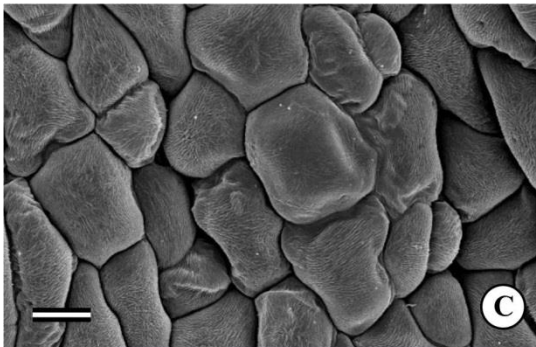
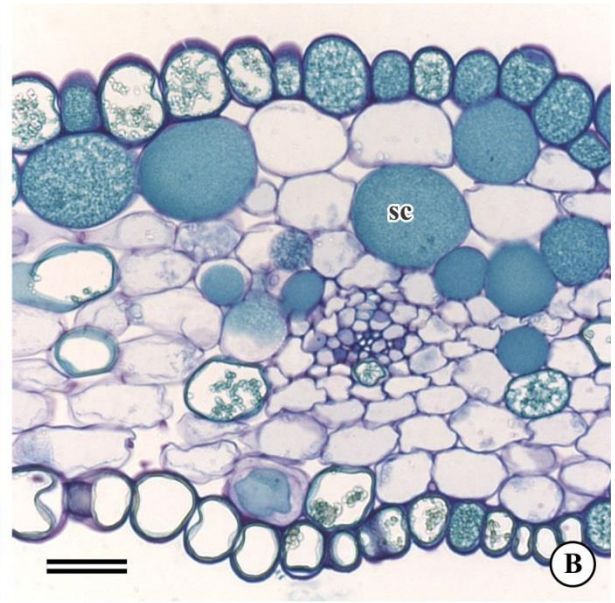
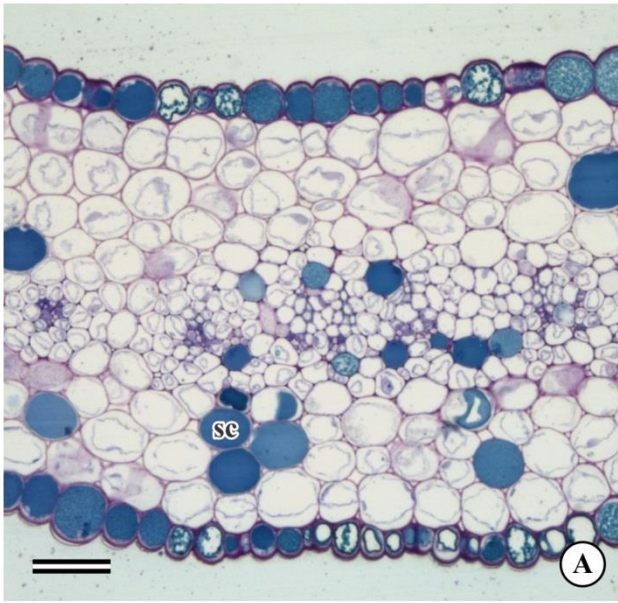


Figura 6: Fotomicrografias (A-B, D-F – cortes transversais, coloração: azul de Toluidina) e eletromicrografias de varredura (C, G-H) da pétala de flores de *Erythrostemon gilliesii* (A-C) e *Mucuna urens* (D-H). A: Visão geral da pétala. B: Detalhe da epiderme adaxial da pétala com células com núcleo conspícuo. C: Face adaxial da pétala mostrando as células epidérmicas alongadas com cutícula estriada. D: Visão geral do estandarte. E: Detalhe da epiderme da face adaxial do estandarte evidenciando as células epidérmicas tabulares com núcleos conspícuos. F: Detalhe da epiderme da face abaxial da ala com células papilosas. G-H: Superfície adaxial (G) e abaxial (H) do estandarte mostrando os diferentes padrões de deposição de ceras epicuticulares. fv = feixe vascular. Barras: 30 μm (A, E-F); 20 μm (B-C, G-H); 100 μm (D).

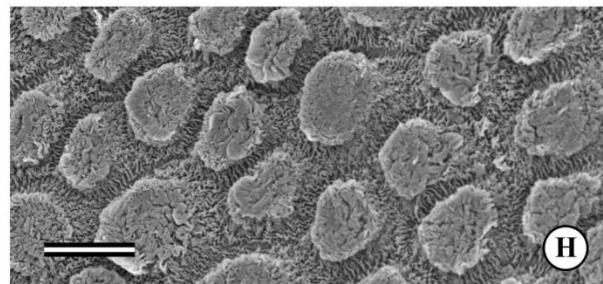
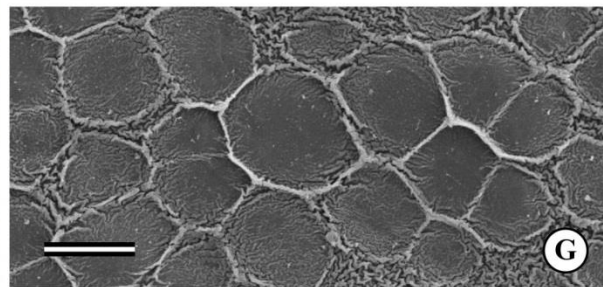
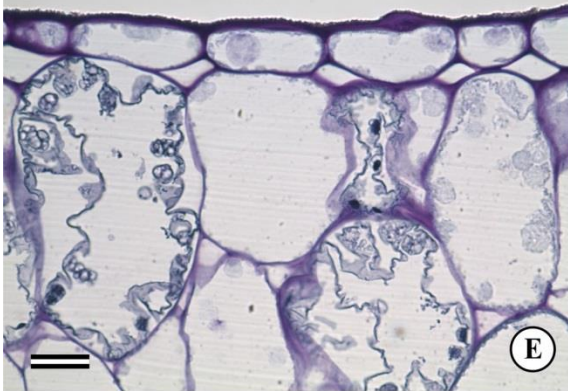
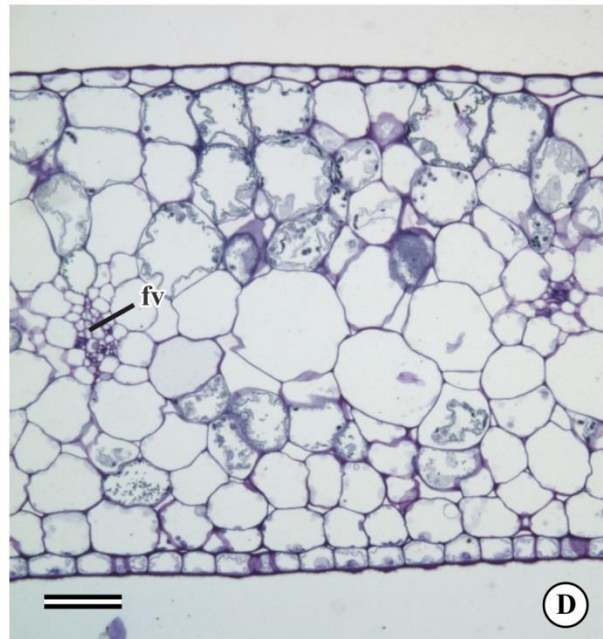
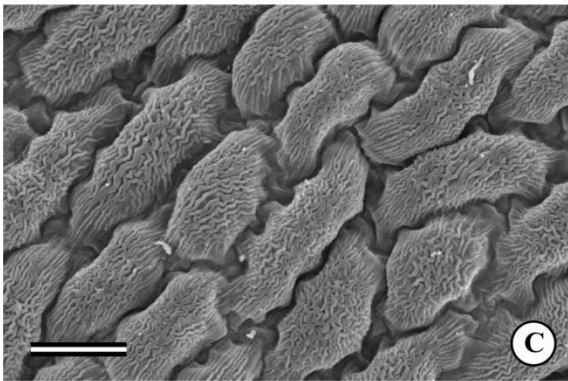
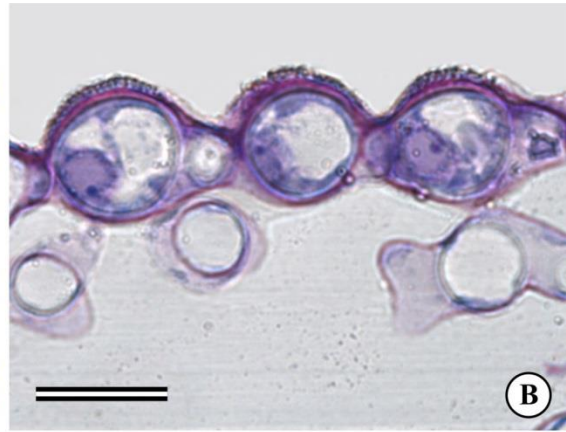
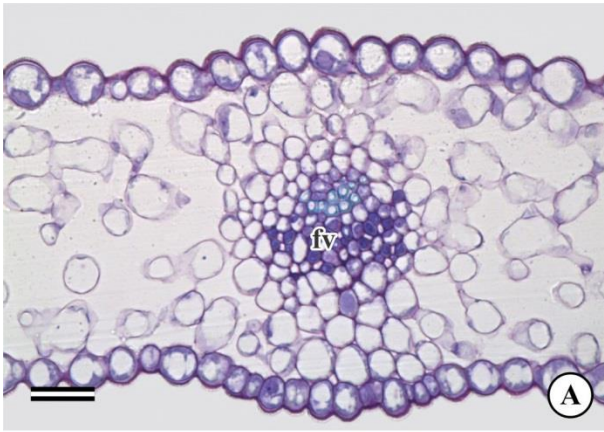


Figura 7: Fotomicrografias (A-B, D – cortes transversais, coloração: azul de Toluidina) e eletromicrografias de varredura (C, E) da pétala de flores de *Parkia pendula* (A-C) e *Mimosa lewisii* (D-E). A: Visão geral da pétala da flor com nectário. B: Detalhe da pétala da flor sem nectário evidenciando a epiderme e mesofilo com células com conteúdo fenólico. C: Superfície abaxial da pétala da flor sem nectário mostrando os estômatos. D: Região apical da pétala mostrando as células com compostos fenólicos na epiderme e no mesofilo. E: Superfície adaxial da pétala com estômatos. fv = feixe vascular, es = estômato, tt = tricoma tector. Barras = 100 μm (A); 30 μm (B-C, E); 50 μm (D).

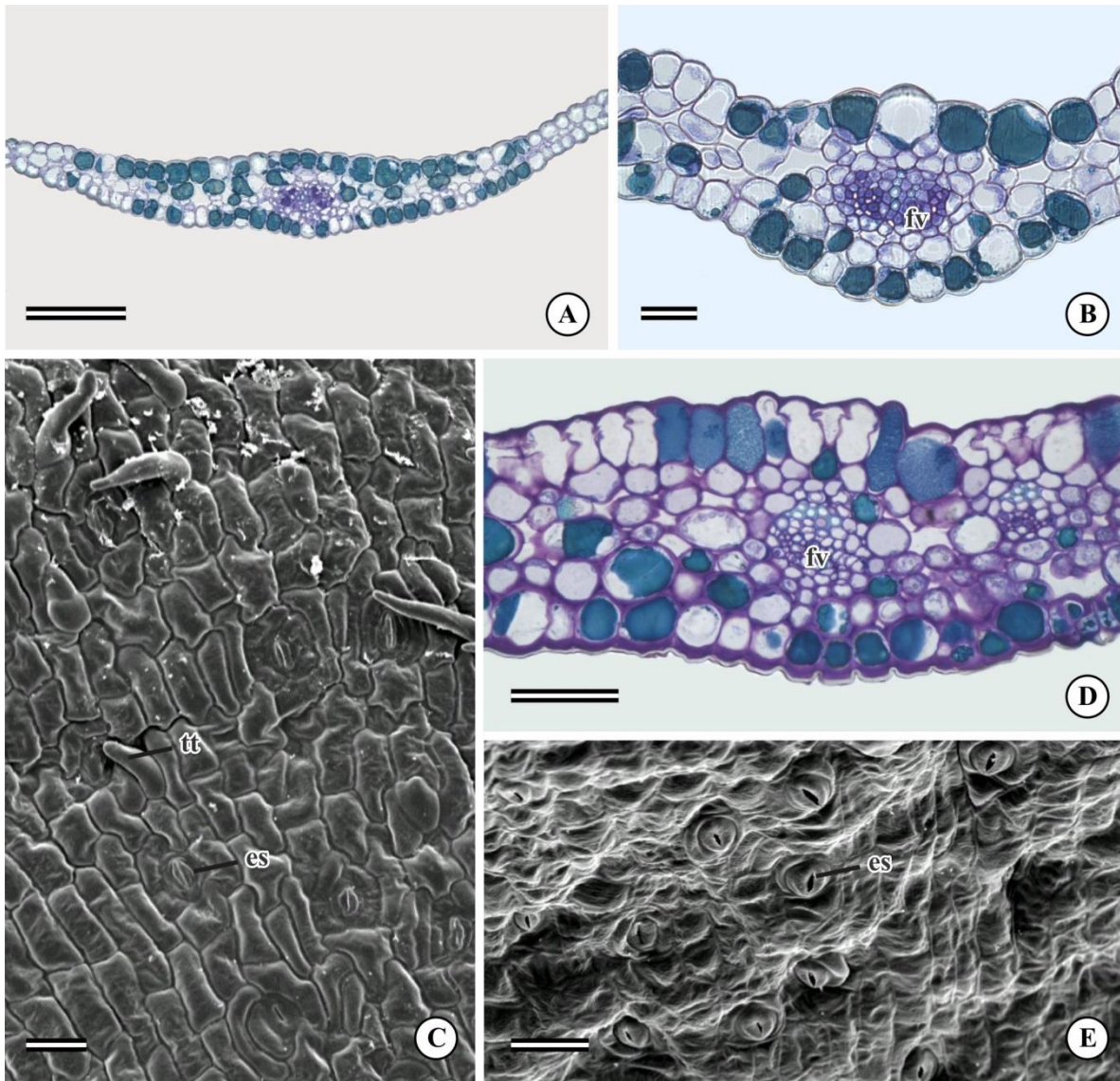


Figura 8: Eletromicrografias de varredura (A-D) e fotomicrografia (E – corte longitudinal, coloração: azul de Toluidina) dos verticilos reprodutivos de flores de *Bauhinia rufa* (A, C) e *Bauhinia curvula* (B, D-E). A: Visão geral da antera com deiscência longitudinal lateral. B: Visão geral do estigma com fenda. C: Detalhe da fenda estigmática com células papilosas. D: Detalhe de material secretado proveniente do rompimento das células papilosas do estigma. E: Detalhe das papilas estigmáticas mostrando o conteúdo fenólico. fe = fenda estigmática, pa = papila, po = pólen, ts = tricoma secretor. Barras 0,5 mm (A-B); 100 µm (C-D); 50 µm (E).

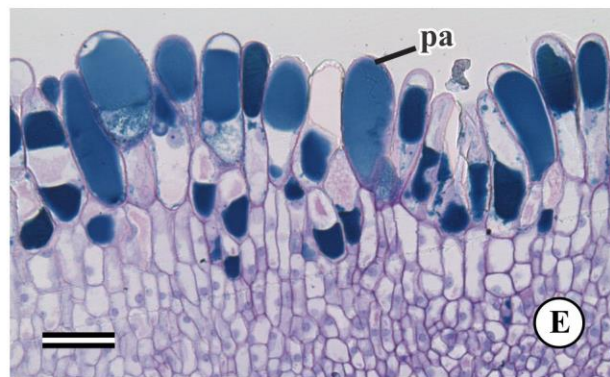
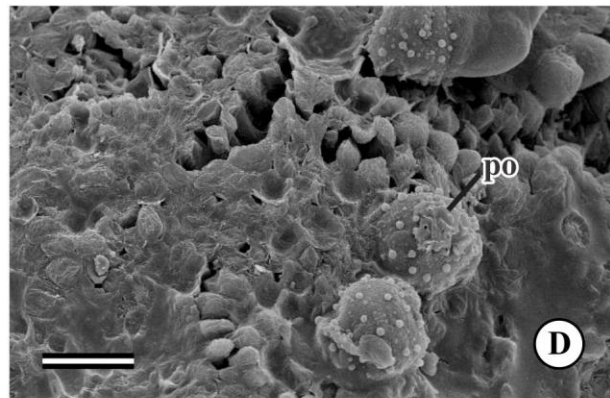
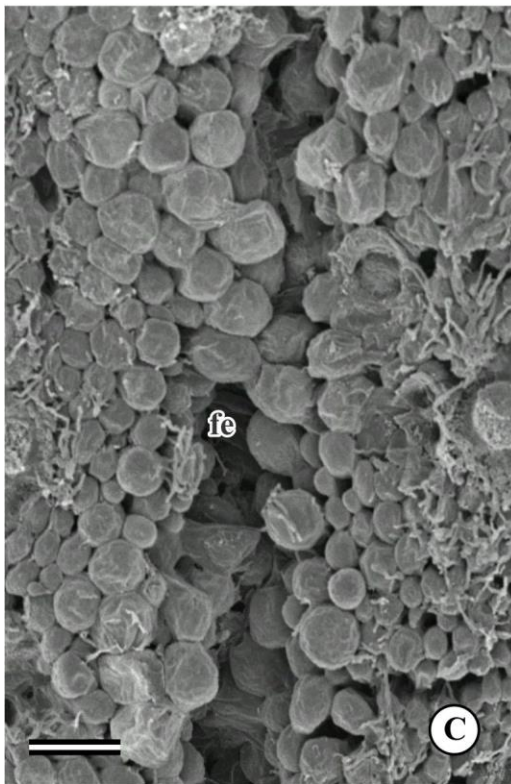
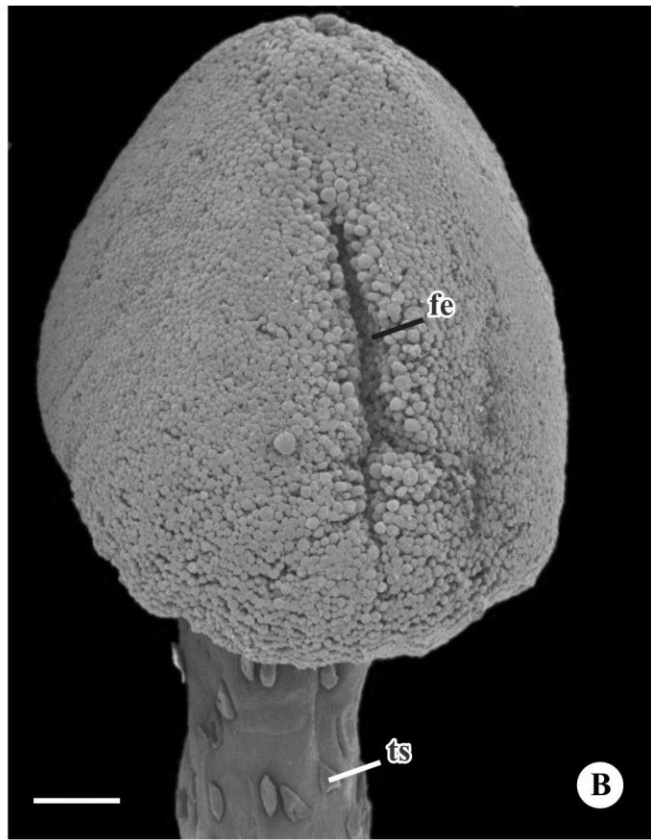
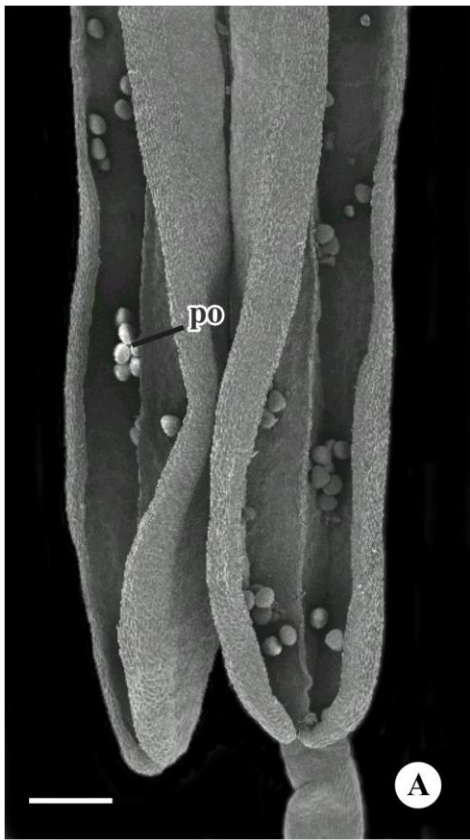


Figura 9: Eletromicrografias de varredura (A-B, D, F) e fotomicrografias (C, E, G – cortes longitudinais, coloração: azul de Toluidina) dos verticilos reprodutivos de flores de *Hymenaea courbaril* (A-C) e *Erythrostemon gilliesii* (D-G). A: Visão geral do estigma. B-C: Detalhes dos tricomas unicelulares com conteúdo fenólico (C) ao longo da superfície estigmática. D: Visão geral da antera dorsifixa. E: Visão geral do estigma. F-G: Detalhe das células secretoras do estigma mostrando células com citoplasma denso (G). an = antera, fi = filete, st = estigma, ts = tricoma secretor. Barras: 200 μm (A, D-E); 20 μm (B); 30 μm (C); 100 μm (F) 50 μm (G).

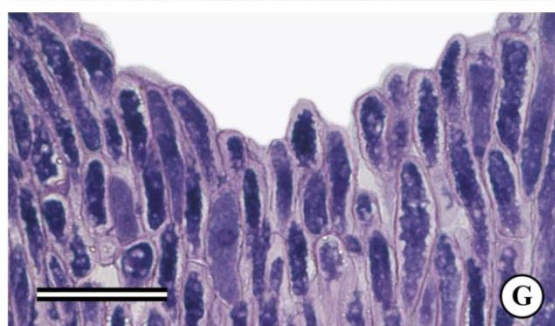
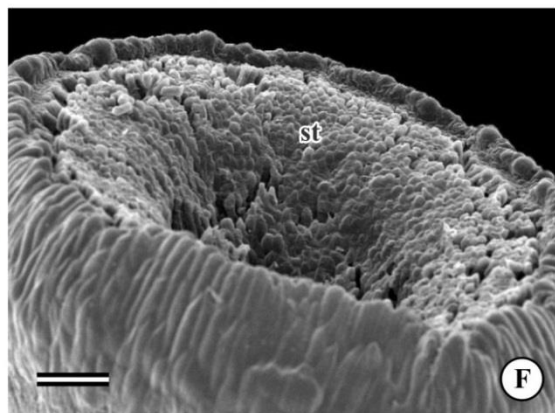
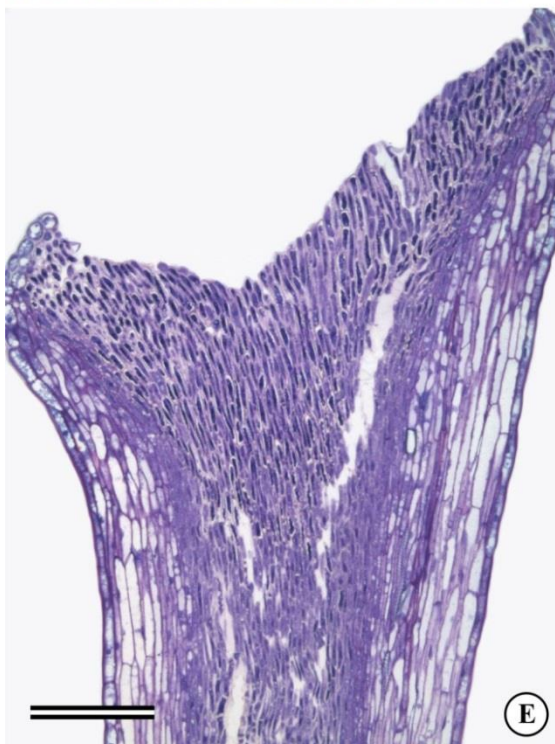
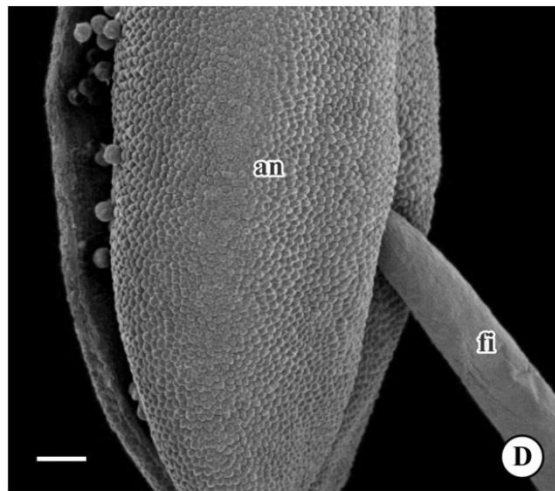
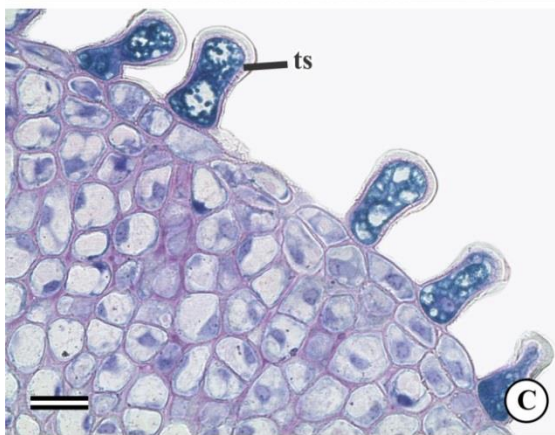
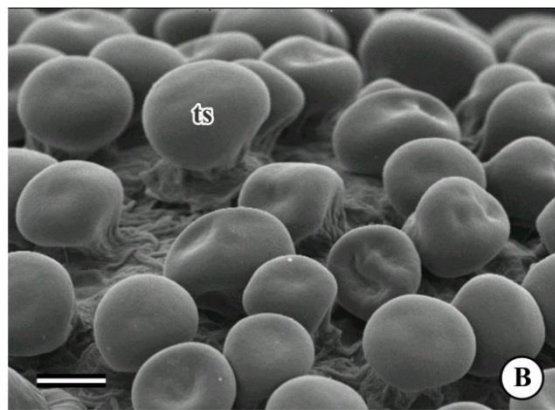
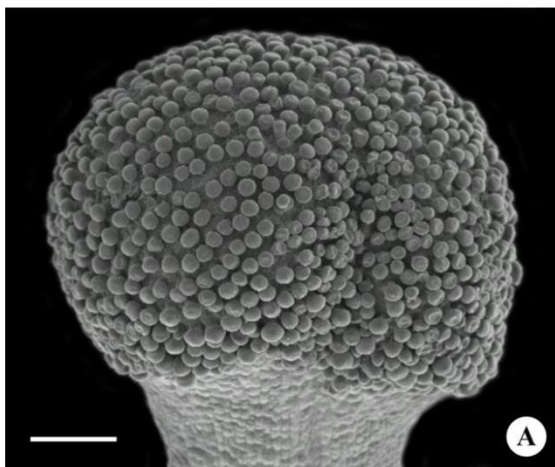


Figura 10: Eletromicrografias de varredura (A-B, D) e fotomicrografia (C – corte longitudinal, coloração: azul de Toluidina) dos verticilos reprodutivos de flores de *Mucuna urens*. A: Visão da base da antera com deiscência longitudinal lateral. B: Detalhe do conectivo com estômatos. C: Estigma com tricomas tectores marginais e exsudato. D: Tricomas tectores em detalhe mostrando a ornamentação na parede. es = estômato, sc = secretado, tt = tricoma tector. Barras: 200 μm (A); 40 μm (B); 100 μm (C); 10 μm (D).

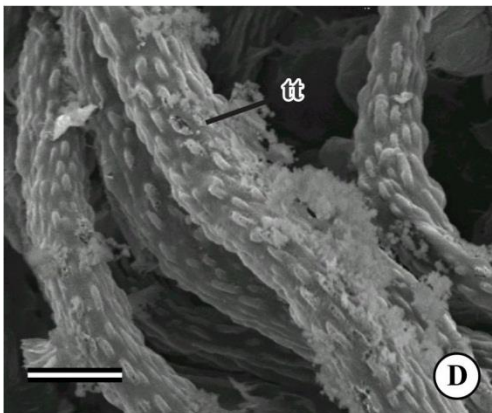
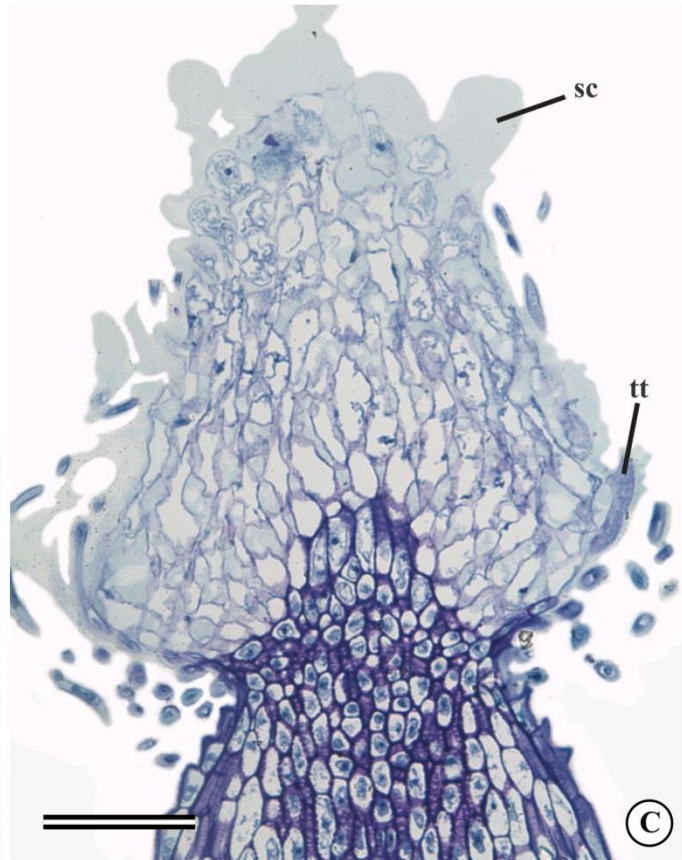
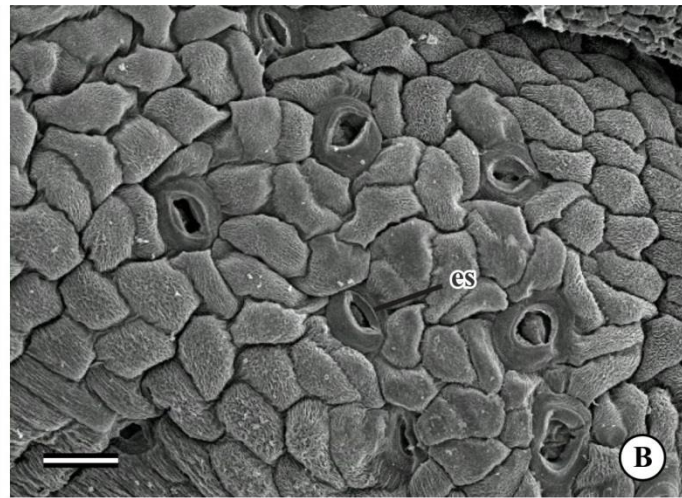


Figura 11: Eletromicrografias de varredura (A-B, D-E) e fotomicrografias (C, F – cortes longitudinais, coloração: azul de Toluidina) dos verticilos reprodutivos de flores de *Parkia pendula* (A-C) e *Mimosa lewisii* (D-F). A: Visão geral da antera da flor sem nectário mostrando os tricomas tectores ao longo das tecas. B: Visão geral do estigma da flor com nectário. C: Estigma da flor com nectário demonstrando o conteúdo na superfície. D: Visão geral da antera. E-F: Estigma mostrando células com núcleo conspícuo e citoplasma denso (F). an = antera, fi = filete, pl = políade, sc = secretado. Barras: 200 µm (A); 50 µm (B); 10 µm (C); 100 µm (D); 20 µm (E-F).

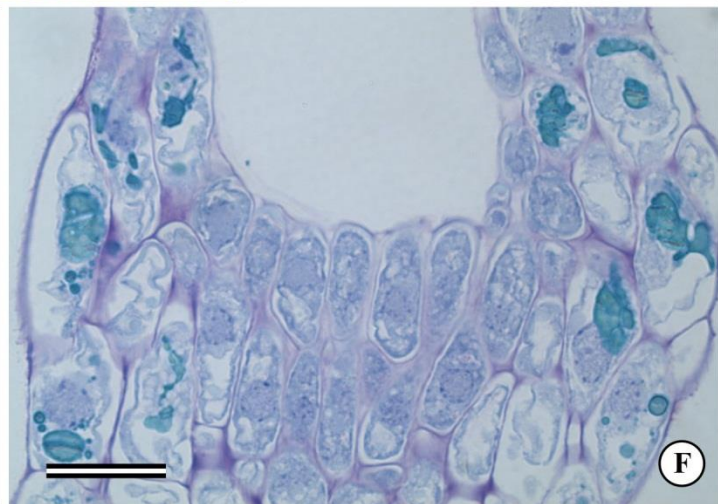
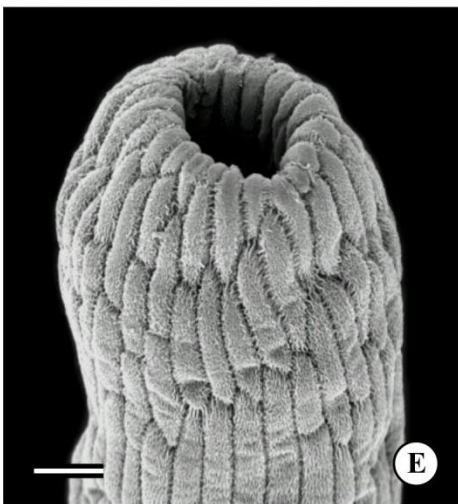
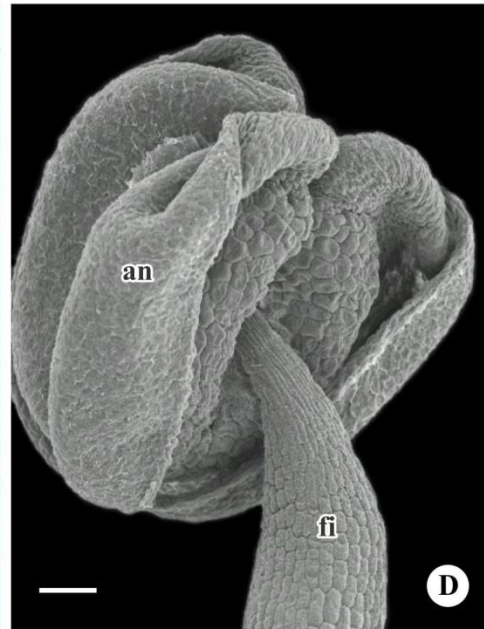
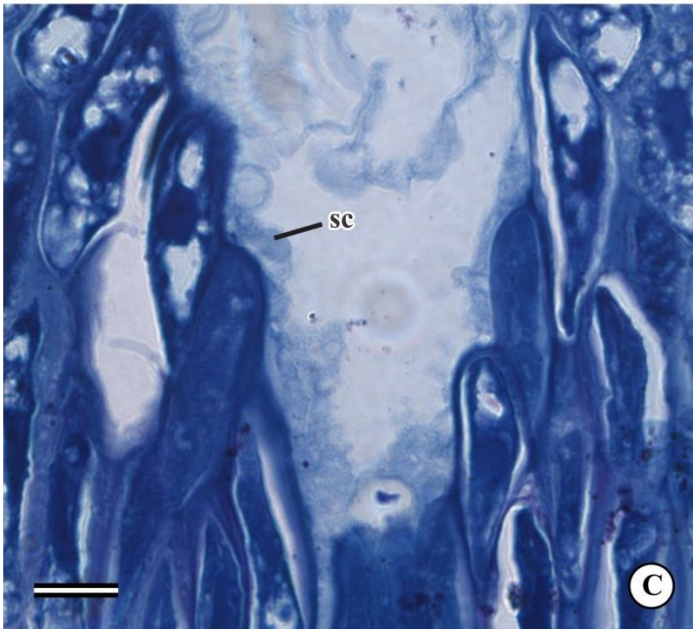
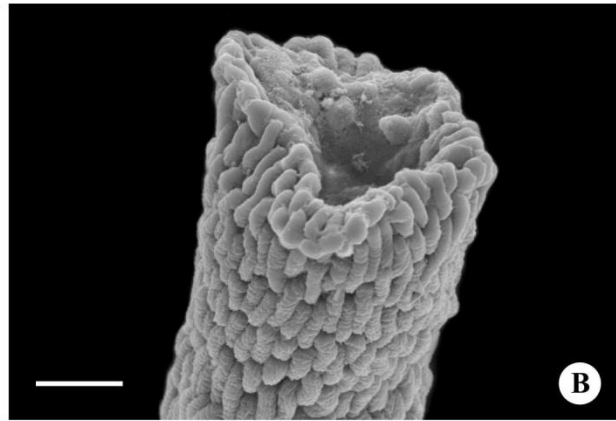
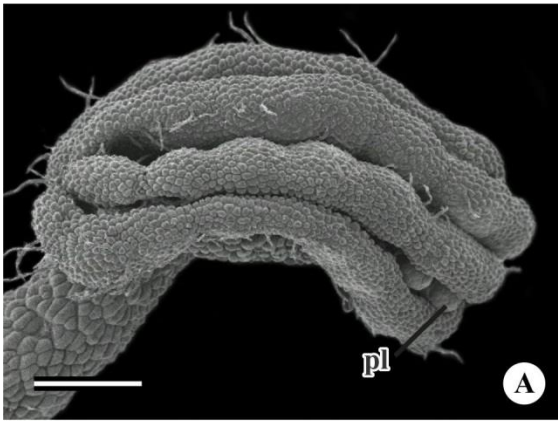


Figura 12: Eletromicrografias de varredura (A-B) e fotomicrografias (C, G – cortes longitudinais, D-F – cortes transversais) do nectário de *Bauhinia curvula* (A, C) e *B. rufa* (B, D-G). A-B: Superfície do nectário evidenciando a epiderme nectarífera com células alongadas e estômatos modificados (coloração: azul de Toluidina). C-D: Visão geral do nectário composto de epiderme, parênquima nectarífero com células fenólicas e feixes vasculares (coloração: azul de Toluidina). E: Detalhe de D (retângulo em destaque) mostrando o sistema vascular com terminações de floema (coloração: azul de Toluidina). F: Parênquima nectarífero repleto de grãos de amido (seta, coloração: PAS). G: Parênquima nectarífero subepidérmico mostrando células metabolicamente ativas (cabeça de seta, coloração: xylidine Ponceau). cf = células fenólicas, en = epiderme nectarífera, es = estômato, fl = floema, fv = feixe vascular. Barras: 100 µm (A, C); 30 µm (B); 500 µm (D); 50 µm (E-F); 20 µm (G).

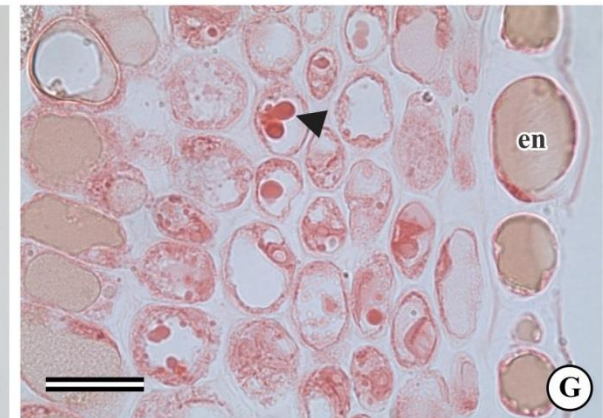
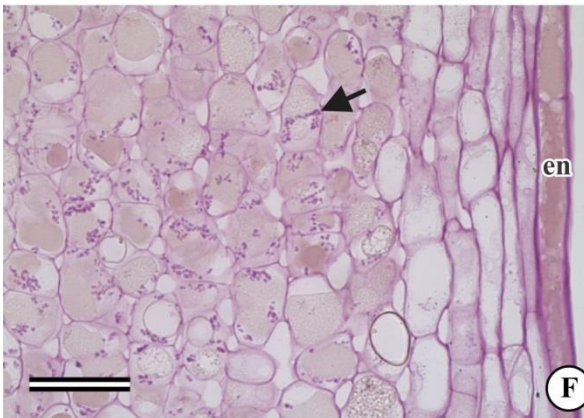
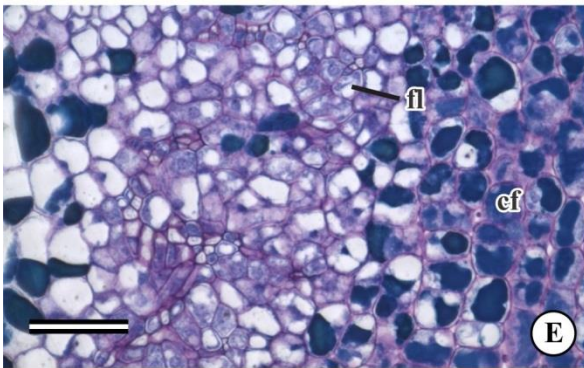
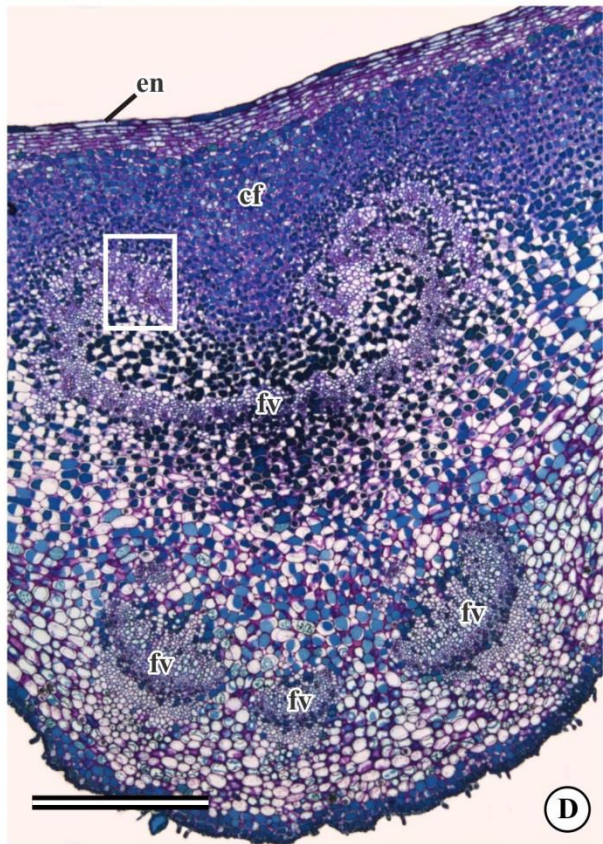
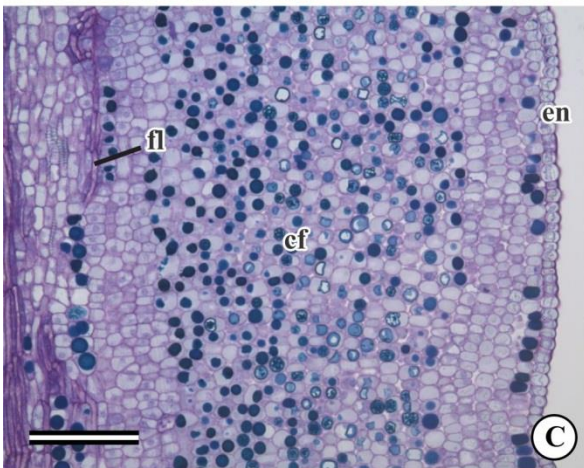
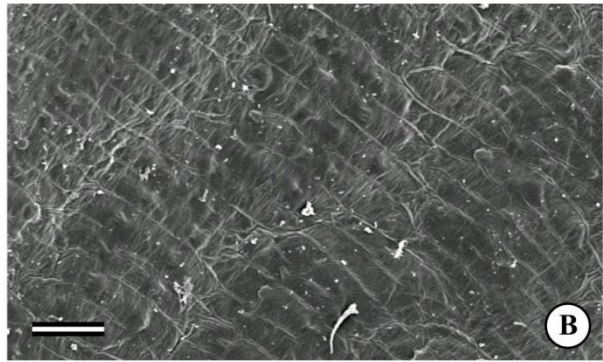
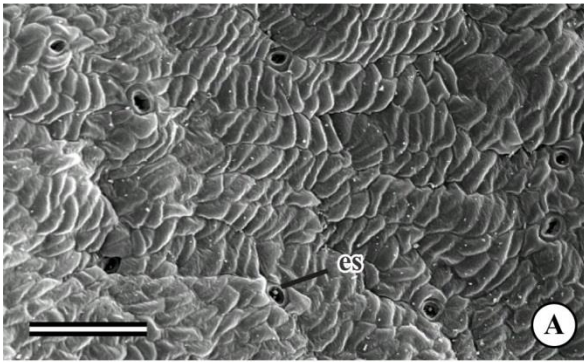


Figura 13: Fotomicrografias (A-B, E-F – cortes longitudinais, C-D – cortes transversais) do nectário de *Hymenaea courbaril* (A-D) e *Erythrostemon gilliesii* (E-F). A: Visão geral do nectário constituindo o hipanto. B: Detalhe de A (retângulo em destaque) mostrando o nectário com estômatos modificados (coloração: azul de Toluidina). C: Parênquima nectarífero evidenciando células com núcleo conspícuo e citoplasma denso, e células fenólicas vacuoladas (coloração: azul de Toluidina). D: Células do parênquima nectarífero com vacúolo repleto de polissacarídeos (seta, coloração: PAS). E: Visão geral do nectário no hipanto. F: Detalhe do nectário mostrando a epiderme, parênquima e feixes vasculares com elementos floemáticos (coloração: azul de Toluidina). cf = células fenólicas, en = epiderme nectarífera, es = estômato, fl = floema, gi = ginóforo, ne = nectário. Barras: 2 mm (A); 200 μ m (B); 100 μ m (C, F); 20 μ m (D); 500 μ m (E).

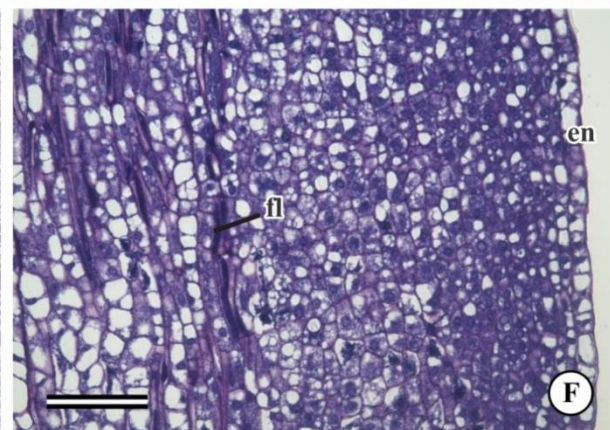
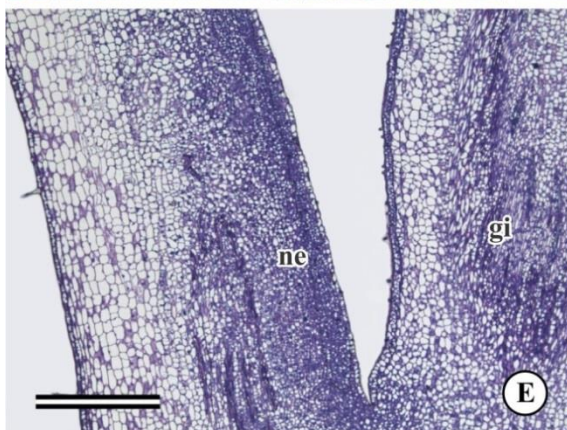
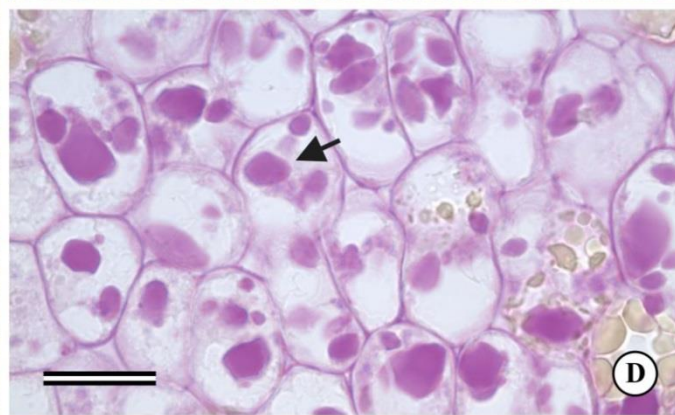
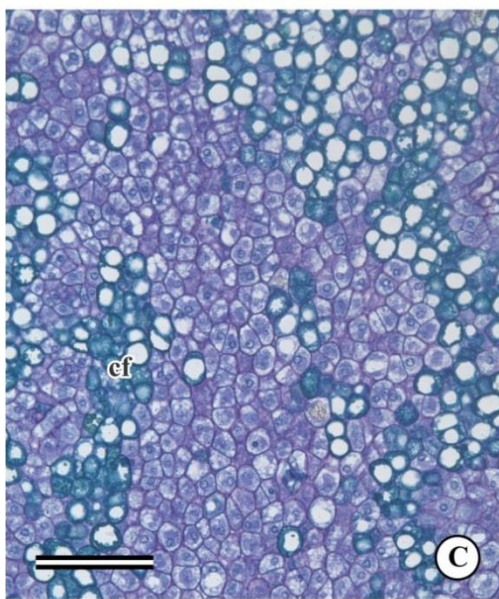
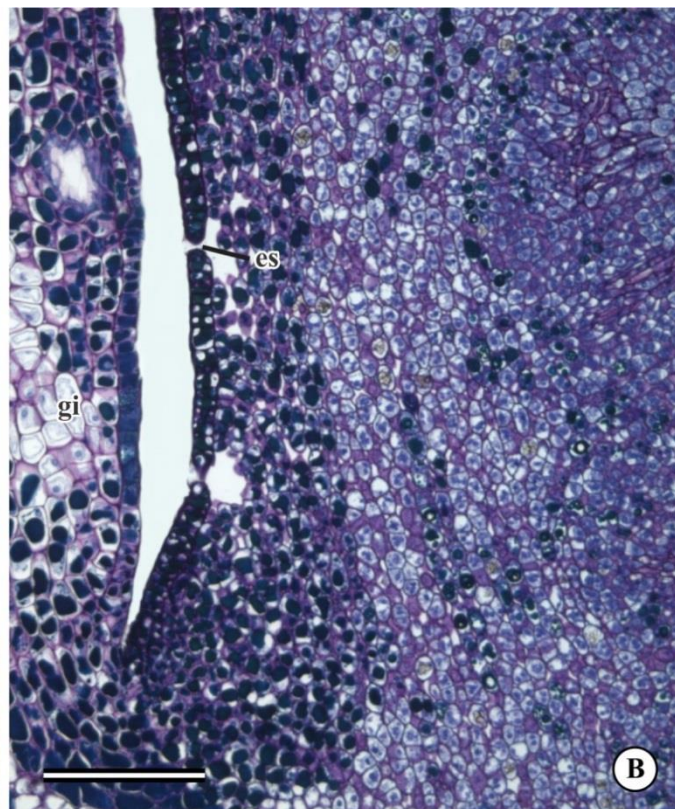
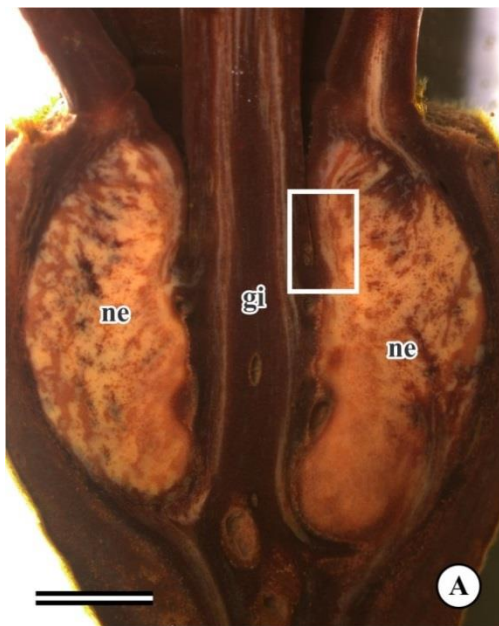
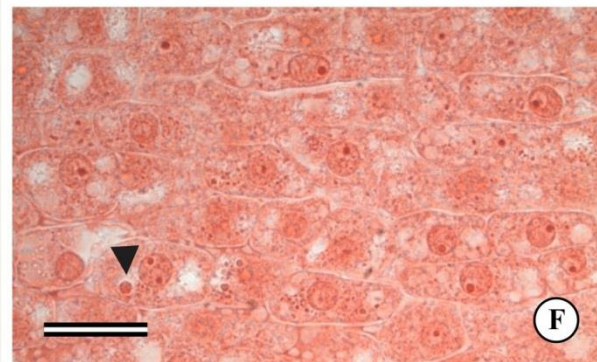
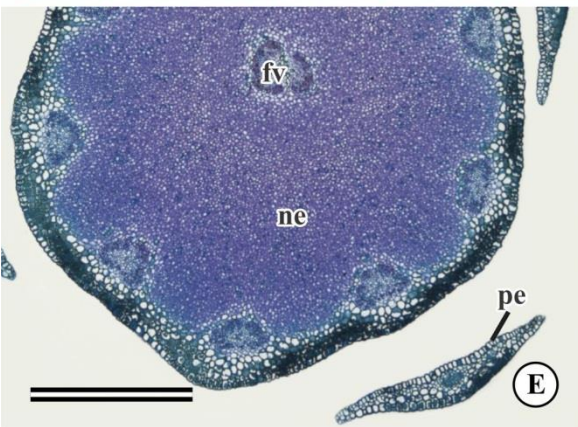
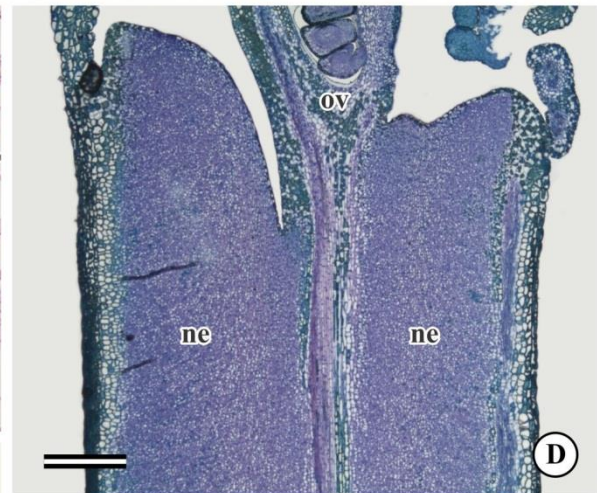
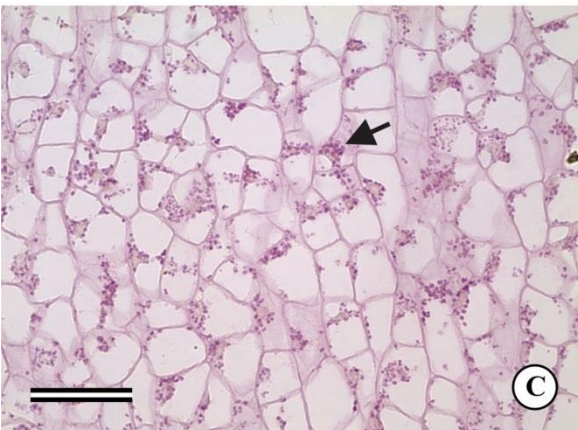
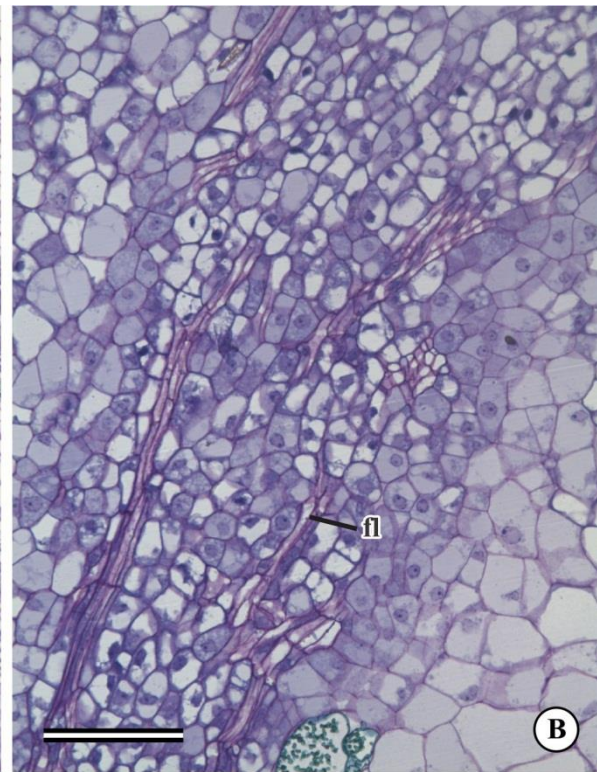
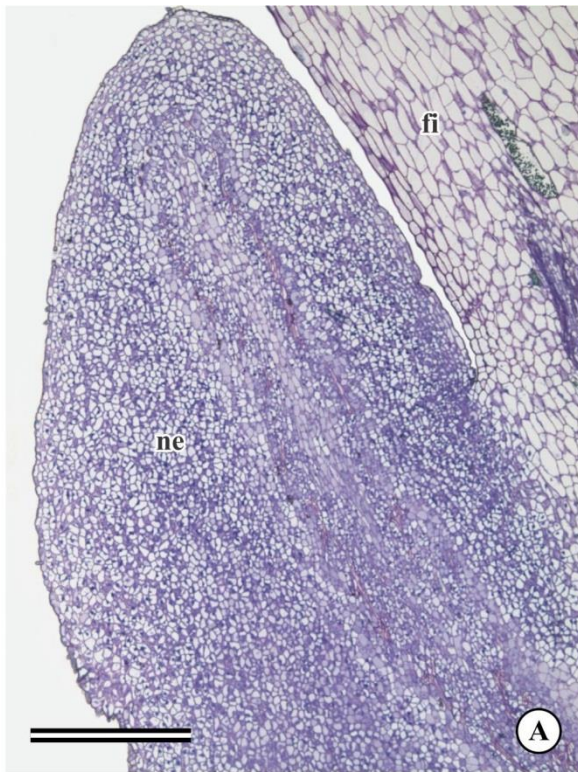


Figura 14: Fotomicrografias (A-D, F – cortes longitudinais, E – corte transversal) do nectário de *Mucuna urens* (A-C) e *Parkia pendula* (D-F). A: Visão geral do nectário localizado entre os filetes e o ovário. B: Detalhe do nectário mostrando as células do parênquima próximas ao floema com conteúdo denso (coloração: azul de Toluidina). C: Células do parênquima nectarífero com grãos de amido (seta, coloração: PAS). D-E: Visão geral do nectário na base dos filetes com numerosos feixes vasculares (coloração: azul de Toluidina). F: Detalhe das células do parênquima nectarífero com atividade metabólica (cabeça de seta, coloração: xyloidine Ponceau). fi = filete, fl = floema, fv = feixe vascular, ne = nectário, ov = ovário. Barras: 500 μ m (A, E); 100 μ m (B); 50 μ m (C); 300 μ m (D), 20 μ m (F).



Discussão

Nas espécies de Leguminosae estudadas, caracteres de morfologia externa da flor podem ser relacionados às síndromes de polinização noturna, pelo menos nas espécies que apresentam sistemas de polinização especialistas. Já os caracteres de morfologia interna apresentam significado predominantemente sistemático.

As flores das espécies quiropterófilas (*Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Mucuna urens*, *Parkia pendula* e *Mimosa lewisii*) e esfingófilas (*Bauhinia curvula* e *Erythrostemon gilliesii*) analisadas apresentam vários caracteres frequentemente associados às síndromes de polinização noturna, citados por Baker (1961), Stebbins (1970) e Faegri & van der Pijl (1979). Entre eles estão a antese noturna, com duração de uma noite; coloração pálida (branca e esverdeada), exceto *P. pendula* que apresenta estames e carpelo vináceos; e liberação de forte odor durante a noite (exceto *M. lewisii* que não apresenta fragrância). Caracteres típicos da síndrome de quiropterofilia, como o arranjo exposto das inflorescências em relação às folhas e aos ramos, a presença de flores ou inflorescências grandes e robustas, de anteras grandes em relação ao tamanho da flor e da produção de grande quantidade de néctar, foram encontrados nas espécies polinizadas por morcegos. Além disso, a longa distância entre os órgãos sexuais e o néctar, encontrada em *B. curvula* e *E. gilliesii*, é considerada um caráter típico da síndrome de esfingofilia, pois de acordo com Faegri & van der Pijl (1979), a presença desse caráter nas flores pode atuar no direcionamento da probóscide das mariposas.

Com a ampliação do conhecimento sobre as características das flores polinizadas por morcegos, sabe-se que a coloração é um caráter muito variável (Fleming *et al.* 2009), fato este ilustrado por *Parkia pendula*, cujas flores apresentam coloração vinácea, quando o esperado seria coloração branca ou esverdeada. Essa variação de cor tem sido atribuída a um remanescente da síndrome de polinização da qual a espécie quiropterófila evoluiu (Tripp & Manos 2008), o que não pode ser aplicado a *P. pendula*, visto que sua condição ancestral é a melitofilia (Luckow & Hopkins 1995) e, nesta síndrome, são esperadas flores amarelas e azuis (Faegri & van der Pijl 1979). A mudança das anteras dorsifixas e ovais para anteras basifixas e elípticas pode ser correlacionada à transição de

síndromes em *Parkia*. Anteras dorsifixas são frágeis e quebradiças nas Mimosoideae, enquanto que as anteras basifixas são mais resistentes, sugerindo uma adaptação aos danos mecânicos causados por mamíferos polinizadores (Luckow & Hopkins 1995).

Alguns caracteres, embora frequentemente observados nas espécies estudadas, como perianto com prefloração imbricada, cujos órgãos são revestidos por cutícula fina, presença de espaços intercelulares no mesofilo e de células secretoras, têm sido pouco discutidos quanto a sua associação às síndromes de polinização. Nossos dados trazem novas perspectivas a respeito destas condições, em especial se forem analisadas em conjunto com outros caracteres.

A prefloração imbricada é uma condição compartilhada por membros das subfamílias Caesalpinioideae e Papilionoideae e, em *Parkia* (Mimosoideae), a presença dessa condição no cálice pode ser considerada uma reversão, vista sua posição derivada na tribo Mimoseae (Lewis *et al.* 2005). Assim, por ser uma condição comum nas Leguminosae, a disposição imbricada do perianto tem sido pouco associada às síndromes de polinização na família. No entanto, em *Hymenaea courbaril* e em *Erythrostemon gilliesii*, a disposição imbricada das sépalas e pétalas possibilita a formação de um recipiente onde o néctar é armazenado. O cálice gamossépalo de *Mucuna urens* e *Mimosa lewisii* e o copo formado pelo hipanto em *Bauhinia rufa* e *B. curvula* também funcionam como um local para armazenar néctar. Em *Parkia pendula*, o néctar, que é secretado pelo tecido presente na base dos filetes das flores com nectário, escorre pela força da gravidade e se acumula em forma de gotas no estigma e estilete dessas flores. Assim, a presença de estruturas florais relacionadas ao armazenamento de néctar pode ser correlacionada às síndromes de polinização nas quais ocorre grande produção de néctar, como quiropterofilia, esfingofilia e ornitofilia (Faegri & van der Pijl 1979).

A produção de néctar pelas flores das espécies estudadas é reconhecida na literatura (Crestana *et al.* 1983/85, Jausoro & Galetto 2000, Vogel *et al.* 2005, Munin *et al.* 2008, Piechowski *et al.* 2010, Agostini *et al.* 2011, E.M. Guimarães comunicação pessoal), o que permitiu inferir correlações entre a quantidade de néctar produzido e a estrutura dos nectários florais. Nectários massivos predominam nas flores das espécies quiropterófilas, cuja quantidade de néctar produzido é maior (ex. 310 µl/flor em *Mucuna urens* – Agostini

et al. 2011 e 8900 µl/capítulo em *Parkia pendula* – Piechowski *et al.* 2010), enquanto que nas espécies esfingófilas ocorrem nectários florais mais discretos que secretam volumes de néctar menores (26 µl/flor em *Bauhinia curvula* – Munin *et al.* 2008 e 29,4 µl/flor em *Erythrostemon gilliesii* – Jausoro & Galetto 2000). Apesar de não terem sido detectados nectários florais em *Mimosa lewisii*, a espécie provavelmente apresenta nectários não estruturados, visto que cada glomérulo produz cerca de 170 µl de néctar durante a antese (Vogel *et al.* 2005). A dificuldade na identificação de nectários não estruturados é reconhecida na literatura, visto que existem poucos relatos deste tipo de nectário nas espécies, incluindo Leguminosae (Ancibor 1969, Bernadello 2007).

Apesar do tamanho do nectário floral refletir o grupo de polinizador que as espécies apresentam, sua anatomia interna está mais relacionada ao grupo taxonômico de determinada espécie. No presente trabalho, este fato pode ser ilustrado pela semelhança anatômica dos nectários de *Bauhinia curvula* (esfingófila) e *B. rufa* (quiropterófila). Além disso, a presença de nectários hipantiais nas Caesalpinioideae estudadas é comumente observada em outras espécies da subfamília na qual é relatada a presença de hipanto; e, em *Mucuna urens* e em outras espécies de Papilionoideae, a estrutura e a localização do nectário (receptacular e intraestaminal) e a presença do androceu diadelfo tem relação com o modo de apresentação do néctar na subfamília, que se acumula entre a base dos filetes e do carpelo, flui pelas duas aberturas da coluna estaminal e fica disponível para o polinizador no cálice gamossépalo (Bernadello 2007, Agostini 2008, Paiva e Machado 2008). No entanto, *Parkia pendula* é uma exceção, visto que o surgimento de dois morfotipos florais no gênero, um com nectário e outro sem nectário, está intimamente relacionado à evolução da síndrome de quiropterofilia no grupo (Hopkins 1984).

Células secretoras presentes nas sépalas e/ ou pétalas das espécies estudadas (exceto *Mimosa lewisii*) atuam na liberação de odores para atração de polinizadores e se constituem de osmóforos, considerando que a liberação de substâncias ocorre durante a antese (ver Capítulo 2). A presença destas células nas sépalas e pétalas de espécies filogeneticamente próximas como *Bauhinia rufa* e *B. curvula* e em espécies pouco relacionadas (Queiroz 2009) como *Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii*, *Mucuna*

urens e *Parkia pendula*, sugere que esta condição pode ser considerada plesiomórfica para o grupo.

A presença de cutícula fina e de células secretoras no perianto são condições geralmente associadas aos mecanismos de produção de odor nas flores (ver Vogel 1990b). Como as flores de *Bauhinia rufa*, *B. curvula*, *Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii*, *Mucuna urens* e *Parkia pendula* liberam odor durante a antese, a presença desses caracteres florais envolvidos na síntese e liberação de voláteis é esperada. Entretanto, tais caracteres não podem ser relacionados a síndromes de polinização individuais, pois provavelmente ocorrem em espécies polinizadas por diferentes grupos de animais, como besouros, abelhas, borboletas, morcegos e mariposas, cuja liberação de odor pelas flores é comum (Stebbins 1970, Faegri & van der Pijl 1979, Vogel 1990a).

Outros tipos de estruturas secretoras, frequentemente associadas a mecanismos de defesa (Fahn 1979), foram encontrados nas espécies estudadas, como tricomas secretores em *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Erythrostemon gilliesii*, cavidades secretoras em *Hymenaea courbaril*, e idioblastos fenólicos em *Mucuna urens*. Os tricomas secretores cavitados de *B. curvula* e *B. rufa* são estruturas raras, registradas em apenas cinco gêneros de Leguminosae até o momento (*Caesalpinia*, *Cordeauxia*, *Hoffmannseggia*, *Bauhinia* e *Indigofera*) (Tucker *et al.* 1984, Lersten & Curtis 1994, Lersten & Curtis 1995, Curtis *et al.* 1996, Marquias *et al.* 2009). A ocorrência deste tipo de tricoma em gêneros pouco relacionados filogeneticamente sugere que esta estrutura tenha surgido de forma independente nos grupos, ao contrário dos tricomas secretores não cavitados e das cavidades secretoras de resina encontradas em *E. gilliesii* e *H. courbaril*, respectivamente. Tricomas secretores semelhantes aos observados em *E. gilliesii* também foram relatados em outras espécies da tribo Caesalpinieae (Lersten & Curtis 1994, Lersten & Curtis 1995, ver Capítulo 4), e, as cavidades secretoras de resina de *H. courbaril* também ocorrem em espécies relacionadas, inseridas no grupo Detariae (Lewis *et al.* 2005), como *Hymenaea stigonocarpa*, *Copaifera langsdorfii*, e *Copaifera trapezifolia* (Paiva & Machado 2004, Paiva & Oliveira 2004, Rodrigues *et al.* 2011, Milani *et al.* 2012).

Interessante notar a grande diversidade de formas de estigma nas espécies estudadas, o que indica, por um lado, ausência de associação ao grupo de polinizador, e, por

outro, um forte valor taxonômico (Costa *et al.* dados não publicados). *Bauhinia curvula* e *B. rufa* apresentam estigmas com formas semelhantes e polinizadores distintos, enquanto que *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Mucuna urens* e *Parkia pendula* (espécies pouco relacionadas) apresentam estigma com morfologia diferente e o mesmo grupo de polinizador. Apesar de *P. pendula* e *M. lewisii* apresentarem estigmas semelhantes, seu formato puntiforme é comum nos representantes de Mimosoideae, o que tem relação com os mecanismos de adesão das políades no estigma (Koptur 1984, Pennington 1997). No entanto, todos os estigmas podem ser classificados como produtores de exsudato, que pode ficar exposto ao ambiente como em *B. curvula*, *B. rufa*, *H. courbaril*, *E. gilliesii*, *P. pendula* e *M. lewisii*, ou ficar retido pela cutícula como observado em *M. urens*, em que é necessário o rompimento dessa barreira para que ocorra a adesão e germinação do grão-de-pólen (Basso-Alves *et al.* 2011, Costa 2011). Embora se acredite que o rompimento da cutícula é favorecido pela atividade do polinizador na flor, não há na literatura dados suficientes para se correlacionar a presença deste tipo de estigma encontrado em *M. urens* à zoofilia, visto que esta condição é observada de forma predominante nas Papilionoideae e, portanto, parece ter valor taxonômico (Costa *et al.* dados não publicados).

Concluindo, caracteres de morfologia externa da flor, como coloração, intensidade do odor, disposição e tamanho das flores ou inflorescências são semelhantes entre as espécies com polinização noturna. As estruturas secretoras florais encontradas apresentam significado biológico e/ou taxonômico, mas não podem ser associadas a determinada síndrome. A anatomia dos nectários revelou correlações entre seu tamanho, a quantidade de néctar produzido e o tipo de polinizador (morcego *versus* mariposa), demonstrando sua grande importância na relação flor-polinizador; no entanto, com exceção de *Parkia pendula*, a estrutura interna dos nectários está relacionada com o grupo taxonômico das espécies.

Agradecimentos

Agradecemos aos técnicos Edimárcio da Silva Campos (Laboratório de Botânica, FCFRP/ USP), Paulo Donato Frighetto (Laboratório de Bioengenharia, FMRP/ USP) e Adriane Cristina Sarti Sprogis (Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB/ UNICAMP) pela assistência técnica e à FAPESP (processos nºs 2008/55434-7 e 2009/01057-0) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Agostini K. 2008. *Ecologia da reprodução de duas espécies de Mucuna (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae) – embriologia, citogenética e variabilidade genética – do litoral norte de São Paulo*. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.
- Agostini K., Sazima M., Sazima I. 2006 Bird pollination of explosive flowers while foraging for nectar and caterpillars. *Biotropica* **38**: 674–678.
- Agostini K., Sazima M., Galetto L. 2011. Nectar production dynamics and sugar composition in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae) with different specialized pollinators. *Naturwissenschaften* **98**: 933–942.
- Ancibor E. 1969. Los nectarios florales en Leguminosae – Mimosoideae. *Darwiniana* **15**: 128–142.
- Baker H.G. 1961. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quarterly Review of Biology* **36**: 64–73.
- Baker H.G. 1963. Evolutionary mechanisms in pollination biology. *Science* **139**: 877–883.
- Basso-Alves J.P., Agostini K., Teixeira S.P. 2011. Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biology* **13**: 602–610.
- Bell A.D. 1993. *Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology*. Oxford/ New York/ Tokyo: Oxford University Press.
- Bernadello G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Pp. 19–128.
- Borges L.A., Sobrinho M.S., Lopes A.V. 2009. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. *Flora* **204**: 111–130.
- Bruneau A. 1997. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* **84**: 54–71.
- Carvalho D.A., Oliveira P.E. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 319–328.

- Cocucci A.A., Galetto L., Sérsic A. 1992. El síndrome floral de *Caesalpinia gilliesii* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Darwiniana* **31**: 111–135.
- Costa M.F.B. 2011. *Interação pólen-pistilo em espécies neotropicais de Indigofera L. (Leguminosae, Papilionoideae) sob enfoque morfológico*. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.
- Crestana C.S.M., Dias I.S., Mariano G. 1983/1985. Ecologia de polinização de *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, o Jatobá. *Silvicultura de São Paulo* **17/19**: 31–37.
- Cruden R.W., Hermann-Parker S.M. 1979. Butterfly pollination of *Caesalpinia pulcherrima*, with observations on a psychophilous syndrome. *Journal of Ecology* **67**: 155–168.
- Curtis J.D., Lersten N.R., Lewis G.P. 1996. Leaf Anatomy, emphasizing unusual ‘concertina’ mesophyll cells, of two east African legumes (Caesalpinieae, Caesalpinioideae, Leguminosae). *Annals of Botany* **78**: 55–59.
- Dute R.R., Folkerts D.R., Watkins J.E., Saxon M.E., Boyd R.S. 2004. Floral anatomy and pollination biology of *Cyrtilla racemiflora* (Cyrtillaceae). *Southeastern Naturalist* **3**: 309–326.
- Faegri K., van der Pijl L. 1979. *The principles of pollination ecology*, 3rd ed. Oxford/ New York/ Toronto/ Sydney/ Paris/ Braunschweig: Pergamon Press.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fenster C.B., Armbruster W.S., Wilson P., Dudash M.R., Thomson J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **35**: 375–403.
- Fleming T.H., Geiselman C., Kress W.J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany* **104**: 1017–1043.
- Ford C.M., Johnson S.D. 2008. Floral traits, pollinators and breeding systems in *Syncolostemon* (Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **275**: 257–264.
- Gibbs P.E., Oliveira P.E., Bianchi M. B. 1999. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 72–78.
- Herrera C.M. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil’s advocate approach. In: Lloyd D.G., Barrett S.C.H. (Eds.), *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-pollinated Plants*. Pp. 65–87.
- Hingston A.B., McQuillan P.B. 2000. Are pollination syndromes useful predictors of floral visitors in Tasmania? *Austral Ecology* **25**: 600–609.
- Hopkins H.C. 1984. Floral biology and pollination ecology of the Neotropical species of *Parkia*. *Journal of Ecology* **72**: 1–23.
- Hopkins M.J.G., Hopkins H.C.F., Sothers C.A. 2000. Nocturnal pollination of *Parkia velutina* by Megalopta bees in Amazonia and its possible significance in the evolution of chiropterophily. *Journal of Tropical Ecology* **16**: 733–746.
- Jausoro M., Galetto L. 2000. Estudio comparativo de nectario y néctar en flores perfectas y estaminadas de *Caesalpinia gilliesii* (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **35**: 107–114.
- Johansen D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Johnson S.D., Steiner K.E. 2000. Generalization vs. specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 140–143.

- Koptur S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of Neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution* **38**: 1130–1143.
- Lau C.P.Y., Saunders R.M.K., Ramsden L. 2009. Floral biology, breeding systems and population genetic structure of three climbing *Bauhinia* species (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Hong Kong, China. *Journal of Tropical Ecology* **25**: 147–159.
- Lersten N.R., Curtis J.D. 1994. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. *Plant Systematics and Evolution* **192**: 231–255.
- Lersten N.R., Curtis J.D. 1996. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **200**: 21–39.
- Lewis G.P., Schrire B., Mackinder B., Lock M. 2005. *Legumes of the World*. Kew: The Royal Botanic Gardens.
- Lillie R.D. 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 3rd ed. New York/ Toronto/ Sydney/ London: McGraw-Hill Book Company.
- López-Forment W. 1985. Pollination of *Hymenaea courbaril* by frugivorous bats on the Pacific coast of Mexico. *Acta Zoologica Fennica* **173**: 291–292.
- Luckow M., Hopkins H.C.F. 1995. A Cladistic Analysis of *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae). *American Journal of Botany* **82**: 1300–1320.
- McManus J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**: 99–108.
- Marquiasfável F.S., Ferreira M.D.S., Teixeira S.P. 2009. Novel reports of glands in neotropical species of *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae). *Flora* **204**: 189–197.
- Martins F.Q., Batalha M.A. 2006. Pollination systems and floral traits in cerrado woody species of the upper Taquari region (Central Brazil). *Brazilian Journal of Biology* **66**: 543–552.
- Milani, J.F., Rocha, J.F., Teixeira, S.P. 2012. Oleoresin glands in copaiba (*Copaifera trapezifolia* Hayne: Leguminosae), a Brazilian rainforest tree. *Trees* **26**: 769–775.
- More M., Sérsic A.N., Cocucci A.A. 2006. Specialized use of pollen vectors by *Caesalpinia gilliesii*, a legume species with brush-type flowers. *Biological Journal of the Linnean Society* **88**: 579–592.
- Müller H., Delpino F. 1869. Application of the Darwinian theory to flowers and the insects which visit them. (Transl. RL Packard. 1871). *The American Naturalist* **5**: 271–297.
- Munin R.L., Teixeira R.C., Sigrist M.R. 2008. Esfingofilia e sistema de reprodução de *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae: Caesalpinioideae) em cerrado no Centro-Oeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* **31**: 15–25.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- Okamoto T., Kawakita A., Kato M. 2008. Floral adaptations to nocturnal moth pollination in *Diplomorpha* (Thymelaeaceae). *Plant Species Biology* **23**: 192–201.
- Oliveira M.I.B., Sigrist M.R. 2008. Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **31**: 195–207.

- Ollerton J. 1996. Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant–pollinator systems. *Journal of Ecology* **84**: 767–769.
- Paiva E.A.S., Machado S.R. 2004. Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae–Caesalpinioideae) leaves. *Nordic Journal of Botany* **24**: 423–431.
- Paiva E.A.S., Machado S.R. 2008. The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Annals of Botany* **101**: 125–133.
- Paiva E.A.S., Oliveira D.M.T. 2004. Ontogenesis of the fruit pulp layer of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Australian Journal of Botany* **52**: 677–683.
- Pennington, T. D. 1997. *The Genus Inga - Botany*. Kew: The Royal Botanic Gardens.
- Piechowski D., Dötterl S., Gottsberger G. 2010. Pollination biology and floral scent chemistry of the Neotropical chiropterophilous *Parkia pendula*. *Plant Biology* **12**: 172–182.
- Queiroz L.P. 2009. *Leguminosas da Caatinga*. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Ramírez N. 2004. Ecology of pollination in a tropical Venezuelan savanna. *Plant Ecology* **173**: 171–189.
- Reynolds R., Westbrook M.J., Rohde A.S., Cridland J.M., Fenster C.B., Dudash M.R. 2009. Pollinator specialization and pollination syndromes of three related North American *Silene*. *Ecology* **90**: 2077–2087.
- Rodrigues T.M., Teixeira S.P., Machado S.R. 2011. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). *Flora* **206**: 585–594.
- Sazima M., Buzato S., Sazima I. 1999. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest sites in Brazil. *Annals of Botany* **83**: 705–712.
- Stebbins G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. 1. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **1**: 307–326.
- Tripp E.A., Manos P.S. 2008. Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution* **62**: 1712–1736.
- Tucker S.C., Rugenstein S.R., Derstine K. 1984. Inflated trichomes in flowers of *Bauhinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **88**: 291–301.
- Uhl N.W., Moore H.E. 1977. Correlations of inflorescence, flower structure, and floral anatomy with pollination in some palms. *Biotropica* **9**: 170–190.
- Vidal B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* **22**: 45–64.
- Vogel S. 1990a. Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias* **59**: 5–30.
- Vogel S. 1990b. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington: Smithsonian Institution Libraries. (Translated by S.S. Renner).

- Vogel S., Lopes A.V., Machado I.C. 2005. Bat pollination in the NE Brazilian endemic *Mimosa lewisii* Barneby: an unusual case and first report for the genus. *Taxon* **54**: 693–700.
- Wallace G.D. 1977. Studies of the Monotropoideae (Ericaceae). Floral nectaries: anatomy and function in pollination ecology. *American Journal of Botany* **64**: 199–206.
- Waser N.M., Chittka L., Price M.V., Williams N.M., Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**: 1043–1060.
- Wilson P., Thomson J.D. 1996. How do flowers diverge? In: Lloyd D.G., Barret S.C.H. (Eds.), *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-pollinated Plants*. Pp. 88–111.

CAPÍTULO 2: Scent glands in legume flowers

Publicado – Plant Biology (2013) doi 10.1111/plb.12000

ABSTRACT

Scent glands or osmophores are predominantly floral secretory structures that secrete volatile substances during anthesis, and therefore act in interactions with pollinators. The Leguminosae family, despite being the third largest Angiosperm family, with a wide geographical distribution and diversity of habits, morphology and pollinators, has been ignored with respect to these glands. Thus, we intended to localize and characterize the sites of fragrance production and release in flowers of legumes, in which the scent plays an important role in pollination, and also test whether there are relations between the structure of the scent gland and the pollinator habit, diurnal or nocturnal. Flowers in pre-anthesis and anthesis of 12 legume species were collected and analyzed by immersion in neutral red, by olfactory tests and by anatomical studies (light and scanning electron microscopies). The main production site of floral scent is the perianth, especially the petals. The scent glands are distributed in a restricted way in *Caesalpinia pulcherrima*, *Anadenanthera peregrina*, *Inga edulis* and *Parkia pendula*, constituting mesophilic osmophores, and in a diffuse way in *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii*, *Poincianella pluviosa*, *Pterodon pubescens*, *Platycyamus regnellii*, *Mucuna urens* and *Tipuana tipu*. These glands are comprised of cells of the epidermis and mesophyll that secrete mainly terpenes, nitrogen compounds and phenols. Relations between the presence of osmophores and type of anthesis (diurnal and nocturnal) and the pollinator were not found. Our data on the scent glands in Leguminosae are original and detail the type of diffuse release, which has been very poorly studied.

Keywords: anatomy, fragrance, Leguminosae, osmophores, pollination, secretory structure, volatiles.

INTRODUCTION

Flowers exhibit different types of secretory structures, among them scent glands or osmophores, which produce and release volatile substances that act to attract or reward pollinators (Vogel 1990; Nilsson 1992; Endress 1994; Teixeira & Machado 2007; Mansano & Teixeira 2008; Marquifável *et al.* 2009; Teixeira & Rocha 2009). Osmophores are commonly found in flowers, although they have also been described in leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae, Dufaÿ *et al.* 2003; Caissard *et al.* 2004). Apart of their organ location, such glands can be divided into two main categories: (1) the typical osmophores, which are comprised of specialized and morphologically distinct secretory tissues located in restricted areas of the flower or leaves, and (2) the diffuse osmophores, composed of ordinary epidermal and parenchyma cells diffusely distributed throughout the floral parts as sepals, petals and adjacent bracts (Fahn 1979; Vogel 1983; Vogel 1990; Endress 1994; Caissard *et al.* 2004).

The typical osmophores are the most prominent structures for presenting the usual features of secretory tissues, such as cells with proportionately large nuclei, dense cytoplasm, reduced cuticle and rich vascularization (Vogel 1990). These glands are commonly reported in floral organs of Orchidaceae, which brings together the largest number of papers related to the anatomy, ultrastructure and chemical composition of the exudate (Pridgeon & Stern 1983, 1985; Vogel 1990; Curry *et al.* 1991; Stpiczńska 2001; Teixeira *et al.* 2004; Ascensão *et al.* 2005; Pansarin *et al.* 2009; Wiemer *et al.* 2009; Melo *et al.* 2010). However, there are occasional citations of studies in flowers of other families, such as Lecythidaceae (*Couroupita guianensis*, Ormond *et al.* 1981), Solanaceae (*Cyphomandra* sp., Sazima *et al.* 1993), Araceae (*Sauromatum guttatum*, Skubatz *et al.* 1996; Hadacek & Weber 2002), Nelumbonaceae (*Nelumbo nucifera*, Vogel & Hadacek 2004), Smilacaceae (*Smilax fluminensis*, Souza *et al.* 2005). Aristolochiaceae (*Aristolochia* sp., Vogel 1990; Trujillo & Sérsic 2006), Passifloraceae (*Passiflora* sp., García *et al.* 2007), Annonaceae (*Unonopsis stipitata*, Teichert *et al.* 2009), Apocynaceae (*Ceropegia elegans*, Vogel 1990; *Orbea variegata*, *Boucerosia indica*, Płachno *et al.* 2010) and Hydnoraceae (*Hydnora* sp., Bolin *et al.* 2009; Seymour 2010; Williams *et al.* 2011). In legumes,

osmophores are reported in petals of *Exostyles godoyensis* (Mansano & Teixeira 2008), while other works speculate that the elaborate structures found in the *Duparquetia orchidacea* petals and the anther glands in species of the Mimoseae tribe may also act as osmophores (Luckow & Grimes 1997; Pires & Freitas 2008; Prenner & Klitgaard 2008). Nevertheless, the scarcity of studies of Leguminosae is surprising, considering its wealth of species (about 19,000), broad geographic distribution and diversity of habits, morphology and pollinator agents (Arroyo 1981; Lewis *et al.* 2005).

Anatomical studies revealed the presence of other types of glands in legume flowers, such as secretory trichomes in *Bauhinia* (Tucker *et al.* 1984), in the perianth of *Indigofera* (Kumar *et al.* 1986; Marquiefável *et al.* 2009), in the sepal of *Dahlstedtia* (Teixeira *et al.* 2009), in the ovary of *Glycine* (Healy *et al.* 2009) and in the bracteoles of *Mimosa* (Leelavathi *et al.* 1984); colleters in the bracts of *Holocalyx balansae* and *Zollernia ilicifolia* (Mansano & Teixeira 2008); secretory idioblasts in the perianth of *Caesalpinia echinata* (Teixeira & Machado 2007) and in the ovary of *Swartzia langsdorffii* (Colpas & Oliveira 2002); and cavities in the perianth of *Dahlstedtia* (Teixeira & Rocha 2009; Teixeira *et al.* 2009) and in the ovary of *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Oliveira 2004). However, these secretory structures are not related to the synthesis of floral fragrances in these species, although in other cases, such as in *Jacaranda oxyphylla* (Bignoniaceae) and *Phragmopedilum grande* (Orchidaceae), floral trichomes secreting volatiles participate in the scent production, acting as osmophores (Vogel 1990; Guimarães *et al.* 2008).

The scent emitted by the flowers is characterized as complex mixtures of lipophilic, volatile and liquid substances (Knudsen *et al.* 2006; Poser & Mentz 2007). Rarely is a unique substance responsible for the released fragrance, and in the mixture of several substances, a few are dominant and responsible for the characteristic floral scent (Vogel 1983). Terpenes are the group of substances most commonly found in the composition of floral scents (Simões 2007), but aliphatic compounds, benzenoids, phenylpropanoids, nitrogen compounds and sulfur compounds can also be released (Dudareva & Pichersky 2006; Knudsen *et al.* 2006).

The scent glands are probably restricted to the flowers of species that have zoophilic types of pollination, such as cantharophily, melittophily, psycophily, phalaenophily and chiropterophily, in which the release of fragrances is important to attract the pollinator. Thus, considering that the Leguminosae family stands out for the diversity of animal pollinators, like bees (Martins & Batalha 2007; Bonacina *et al.* 2008; Lau *et al.* 2009), butterflies (Cruden & Hermann-Parker 1979; Lau *et al.* 2009), moths (Cocucci *et al.* 1992) and bats (Gibbs *et al.* 1999), their flowers have a great potential to present secretory structures specialized in the synthesis and release of scents.

The aim of this study was to localize, characterize and compare the sites of production and emission of scents in legume flowers during the anthesis and the stage immediately prior to the anthesis; therefore, playing an important role in attracting pollinators. It is intended to determine whether relations exist between the morphology of the scent gland and the diurnal and nocturnal pollinators, taking into account that plant species with nocturnal flowers usually emit strong scents (scent is the primary means of locating flowers by their pollinators - Faegri & van der Pijl 1979) and that flowers with typical osmophores tend to emit scents in large quantity (Vogel 1990).

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

Flowers of 12 species of Leguminosae, comprising the three subfamilies, whose occurrence of zoophilic pollination is well established in the literature, were collected and processed, according to the flowering periods. Voucher materials were deposited in the herbaria SPFR, RB and CORD (Table 1).

Table 1. Legume species selected for this study.

Species	Subfamily	Tribe	Pollinator/Reference	Anthesis	Voucher	Location
<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	Caesalpinioideae	Cercideae	bat/ Gibbs <i>et al.</i> (1999)	Nocturnal	S.P. Teixeira <i>et al.</i> 46, 47, 48 (SPFR)	Pratânia, SP (Reserva Particular de Cerrado Fazenda Palmeira da Serra)
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Caesalpinioideae	Detarieae	bat/ Crestana <i>et al.</i> (83/85), López-Forment (1985)	Nocturnal	S.P. Teixeira <i>et al.</i> 45, 55, 56 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (DC.) Swartz.	Caesalpinioideae	Caesalpinieae	butterfly/ Cruden & Hermann-Parker (1979)	Diurnal	S.P. Teixeira <i>et al.</i> 50 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)
<i>Erythrostemon gilliesii</i> (Wall. ex Hook.) Klotzsch	Caesalpinioideae	Caesalpinieae	moth/ Cocucci <i>et al.</i> (1992), Moré <i>et al.</i> (2006)	Nocturnal	L. Galetto 2245 (CORD)	Alta Gracia, Argentina
<i>Poincianella pluviosa</i> (DC.) L.P. Queiroz	Caesalpinioideae	Caesalpinieae	bee/ Balestieri & Machado (1998)	Diurnal	S. P. Teixeira <i>et al.</i> 49 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.	Mimosoideae	Mimoseae	bee/ Bonacina <i>et al.</i> (2008)	Diurnal	S.P. Teixeira <i>et al.</i> 52 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)

(Continuation Table 1)

<i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth. ex Walp.	Mimosoideae	Mimoseae	bat/ Hopkins (1984), Piechowski <i>et al.</i> (2010)	Nocturnal	H.C. Lima 5693 (RB)	Rio de Janeiro, RJ (Arboreto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro)
<i>Inga edulis</i> Mart.	Mimosoideae	Ingeae	bee/ Falcão & Clement (2000)	Diurnal	S.P. Teixeira <i>et</i> <i>al.</i> 53 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)
<i>Pterodon pubescens</i> <i>Benth. (Benth.)</i>	Papilionoideae	Dipterygeae	bee/ Martins & Batalha (2007)	Diurnal	S.P. Teixeira & V.G. Leite38 (SPFR)	Sacramento, MG (Fazenda Nova Califórnia)
<i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	Papilionoideae	Dalbergieae	bee / Carvalho & Marchini (1999)	Diurnal	S.P. Teixeira <i>et</i> <i>al.</i> 51 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)
<i>Platycamus regnelli</i> Benth.	Papilionoideae	Millettieae	bee/ Bortoluzzi (2000)	Diurnal	S.P. Teixeira <i>et</i> <i>al.</i> 54 (SPFR)	Ribeirão Preto, SP (campus da Universidade de São Paulo)
<i>Mucuna urens</i> (L.) Medik.	Papilionoideae	Phaseoleae	bat/ Sazima <i>et al.</i> (1999)	Nocturnal	S.P. Teixeira <i>et</i> <i>al.</i> 58 (SPFR)	Ubatuba, SP (BR 101 km 11- 13)

Scent Glands Detection and Analysis

Fresh flowers (anthesis) were immersed in a solution of neutral red (1:10,000) *in situ* for 1 hour (Vogel 1990) and observed in a stereomicroscope for a preliminary detection of the scent glands. This dye accumulates in the vacuoles of metabolically active cells, binding to temporary intermediate products and hydrophilic subproducts (Vogel 1990). The species with diurnal anthesis were collected between 2.00 and 3.00 PM (6 hours after the anthesis initiation), whereas species with nocturnal anthesis were collected between 6.00 and 8.00 PM (1 hour after the anthesis initiation). To assist in the identification of the floral whorl responsible for producing the odor, floral parts of each whorl were placed separately in sealed containers and after half an hour the containers were opened and the samples were smelled. The flowers in which organs showed a positive reaction with neutral red and presented scent by the olfactory test were fixed in buffered formalin (Lillie 1965) for 72 h in two developmental stages: immediately prior the anthesis (pre-anthesis) and anthesis. These samples were prepared for analysis of the surface (SEM), anatomy and histolocalization of substances.

For scanning electron microscopy (SEM), samples of mature flowers were fixed in buffered formalin, dehydrated in an increasing ethanol series and critical point dried in a Bal Tec CPD 030 critical point dryer. The samples were mounted on stubs, sputter coated with gold (Bal Tec SCD 050), observed and documented in Zeiss EVO/MA10, Zeiss IVO50 and Jeol JSM-5800 LV scanning electron microscopes.

For the anatomical analysis and histolocalization of substances, samples of pre-anthetic and anthetic flowers which were fixed in buffered formalin were part cross-sectioned on a table-microtome (Rolemberg & Bhering Comércio e Importação LPC) and part dehydrated in an ethanol series, embedded in methacrylate-based resin (Leica Histoiresin) and sectioned transversely and longitudinally 5-6 μm thick on a rotary microtome (Leica RM2245). These samples were stained with the following reagents: 0.05% Toluidine blue as general stain (O'Brien *et al.* 1964), ferric trichloride (Johansen 1940) to detect phenolic compounds, Sudan III (Sass 1951) and Sudan black B (Pearse 1985) to detect lipophilic substances, NADI reagent (David & Carde 1964) to detect

essential oils and oleoresins, PAS reagent (Feder & O'Brien 1968) to detect polysaccharides and xyloidine Ponceau (Vidal 1977) to detect proteins. Appropriate controls were conducted simultaneously with the tests. Images were obtained using a light microscope (Leica DM5000 B) coupled to a digital camera (Leica DFC295).

Detailed aspects of the secretory cells were studied in petals of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* with transmission electron microscopy (TEM). For TEM small portions of petals from pre-anthetic flowers were fixed in Karnovsky (Karnovsky 1965) for 24 hours, post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and embedded in Araldite. The ultrathin sections (60-70 nm) were obtained with a Leica Reichert Ultracut S ultramicrotome and collected on copper grids, contrasted with 2% uranyl acetate and lead citrate for 15 min each and observed in a Jeol 100CXII transmission electron microscope.

RESULTS

The test with neutral red showed metabolically active cells in bracts, sepals and especially petals, distributed in a restricted or diffused way (Fig. 1). The olfactory, anatomical and histolocalization of substances studies carried out indicate that these cells correspond to the osmophores and are located in the epidermis and/or mesophyll of floral organs. The epidermis, besides acting in a more pronounced way in the synthesis and release of the floral fragrance, shows a greater variation in the shape of the cells involved in this process (Table 2).

The descriptions of osmophores are presented by floral organ, grouped according to the restricted or diffused location of these glands.

Osmophores with restricted location

Restricted osmophores are observed in the standard and the margins of the other petals of *Caesalpinia pulcherrima*, in the petal lobes of *Anadenanthera peregrina* and *Inga edulis* and in the apex of the bracts, sepals and petals of *Parkia pendula* (Fig. 1A-E, Table 2).

In *Caesalpinia pulcherrima*, *Anadenanthera peregrina* and *Inga edulis* glands consist of secretory uniseriate epidermis and mesophyll cells. The epidermal cells in *C. pulcherrima* are markedly papillose at the standard apex and isodiametric in the basal region (Figs. 2A-C). In *A. peregrina* the epidermal cells are rounded (Figs. 2D-E). In this species, unicellular and marginal papillae-like trichomes also participate in the odor production (Figs. 2F-H). In *I. edulis* the epidermal cells on the adaxial surface are rounded and large (Figs. 3A-B) and on the abaxial surface the cells are isodiametric (Fig. 3C); in the margins those cells have conspicuous nuclei and dense cytoplasm (Fig. 3B). In the mesophyll of these three species there are ordinary secretory cells, in addition to large secretory idioblasts found in *C. pulcherrima* (Table 2).

In *Parkia pendula* volatile secreting structures are comprised of cells located in the mesophyll close to the vascular bundles of bracts and sepals, and by cells in the epidermis and in the subepidermal tissue of the petals (Figs. 3D-H, Table 2).

The scent is constituted by terpenes which are detected in all restricted osmophores (Table 2). Phenolic compounds are also present in these structures, except in *Anadenanthera peregrina*. Proteins are found in the mesophilic idioblasts of *Caesalpinia pulcherrima* and inside plastids of *A. peregrina* and *Inga edulis*. Polysaccharides were detected in *Caesalpinia pulcherrima* and *Parkia pendula* (Figs. 2-3, Table 2) and starch is observed in the mesophyll of the standard of *C. pulcherrima*.

Osmophores with diffuse location

Osmophores occur diffusely in the corolla of *Poincianella pluviosa*, *Pterodon pubescens*, *Platycyamus regnellii* and *Mucuna urens*, and throughout the calyx and corolla of *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii* and *Tipuana tipu* (Fig. 1F-L).

The petals of *Poincianella pluviosa*, *Pterodon pubescens* and *Platycyamus regnellii* and the standard and wings of *Mucuna urens* have secretory cells in the uniseriate epidermis, which are rounded and with striated cuticle in *P. pluviosa* and *P. pubescens* (Figs. 4A-F); and tabular with conspicuous nucleus and a thick ornamented cuticle in *P. regnellii* and *M. urens*. In the abaxial surface of the *M. urens* wings the epidermal cells are

rounded (Figs. 5A-F). Secretory cells are also found in the mesophyll of *P. pluviosa*, *P. regnelli* and *M. urens* (Table 2).

In the perianth of *Tipuana tipu*, *Erythrostemon gilliesii*, *Bauhinia rufa* and *Hymenaea courbaril* secretory cells occur in uniseriate epidermis and mesophyll. In petals the epidermal cells are rounded with conspicuous nucleus and striate cuticle in *T. tipu* and *E. gilliesii*, and present an isodiametric shape in *B. rufa* and *H. courbaril*. The secretory cells in the mesophyll of this organ are isodiametric in such species (Figs. 6A-G, Figs. 7A-B, D-E). In sepals the secretory cells of the epidermis and mesophyll are isodiametric (Figs. 7C, F-G, Table 2).

TEM images of the secretory cells in the epidermis of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* show a peripheral nucleus, when the vacuoles are large, and a central and large nucleus, when vacuoles are small (Fig. 4B). The cell wall is thick, covered with a thin cuticle and crossed by some plasmodesmata. The cytoplasm is rich in smooth endoplasmic reticulum and elongated plastids with evident thylakoids, starch and many oil droplets (Fig. 4C); Golgi complexes, mitochondria and rough endoplasmic reticulum are also observed, besides of numerous small and full-content vacuoles.

Terpenes are found in all diffuse osmophores studied and in *Bauhinia rufa* and *Hymenaea courbaril* such compound occurs together with phenols (Table 2). Proteins are observed occupying the entire mesophyll cells of *Platycyamus regnellii* and the plastids of *Mucuna urens*. Polysaccharides were detected only in the *Hymenaea courbaril* sepal (Figs. 4-7, Table 2) and starch were observed in the perianth of *Bauhinia rufa*, *H. courbaril* and *Tipuana tipu*, and in the petals of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa*.

Table 2. Anatomical and histochemical characterization of osmophores in legume flowers with diurnal and nocturnal pollination.

+ = positive, - = negative reaction to the reagent, ab = abaxial surface; ad = adaxial surface; pl = plastid.

Anthesis	Species	Scent gland	Floral part (reactive for neutral red)	Secretory tissue	Secretory cell form	Lipids (Sudan)	Terpenes (NADI)	Phenolic compounds (FeCl ₃)	Polysaccharides (PAS)	Nitrogen compounds (xylidine Ponceau)
Diurnal	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Restricted osmophore	Standard (petal)	Epidermis	Papillose	+	+	+	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	-	-
				Idioblast	Large	+	+	-	+	+
	<i>Poincianella pluviosa</i>	Diffuse osmophore	Petal	Epidermis	Roundish	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	-
	<i>Anadenanthera peregrina</i>	Restricted osmophore	Petal	Epidermis	Roundish	+	+	-	-	+ (pl)
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	+ (pl)
				Trichome	Unicellular	+	+	-	-	-
	<i>Inga edulis</i>	Restricted osmophore	Petal	Epidermis	Roundish and large	+ (ab)	+ (ab)	+ (ad)	-	+ (pl)
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	-	+ (pl)
	<i>Pterodon pubescens</i>	Diffuse osmophore	Petal	Epidermis	Roundish	+	+	-	-	-
	<i>Tipuana tipu</i>	Diffuse osmophore	Sepal	Epidermis	Isodiametric	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	-
			Petal	Epidermis	Roundish	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	-
	<i>Platycyamus regnellii</i>	Diffuse osmophore	Petal	Epidermis	Tabular	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	+

(Continuation Table 2)

Anthesis	Species	Scent gland	Floral part (reactive for neutral red)	Secretory tissue	Secretory cell form	Lipids (Sudan)	Terpenes (NADI)	Phenolic compounds (FeCl ₃)	Polysaccharides (PAS)	Nitrogen compounds (xylidine Ponceau)
Nocturnal	<i>Bauhinia rufa</i>	Diffuse osmophore	Sepal	Epidermis	Isodiametric	+	-	+	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	-	+	-	-
			Petal	Epidermis	Isodiametric	+	+	+	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	-	-
	<i>Hymenaea courbaril</i>	Diffuse osmophore	Sepal	Epidermis	Isodiametric	+	-	+	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	-	+	+	-
			Petal	Epidermis	Isodiametric	+	+	+	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	-	-
	<i>Erythrostemon gilliesii</i>	Diffuse osmophore	Sepal	Epidermis	Isodiametric	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	-
			Petal	Epidermis	Roundish	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	-	-	-
	<i>Parkia pendula</i>	Restricted osmophore	Bract	Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	+	-
			Sepal	Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	+	-
			Petal	Epidermis	Roundish	+	+	+	+	-
				Mesophyll	Isodiametric	+	+	+	+	-
	<i>Mucuna urens</i>	Diffuse osmophore	Standard (petal)	Epidermis	Tabular	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric and large	+	+	-	-	+ (pl)
			Wing (petal)	Epidermis	Tabular/ roundish	+	+	-	-	-
				Mesophyll	Isodiametric and large	+	+	-	-	+ (pl)

Fig. 1. Legume flowers with diurnal (A-C, F-G) and nocturnal (D-E, H-L) pollination tested with neutral red. A-E: Restricted reaction in the standard and margins of petals of *Caesalpinia pulcherrima* (A, right – treated flower, left – untreated flower), in the petal lobes of *Anadenanthera peregrina* (B) and *Inga edulis* (C), and at the petal apex of *Parkia pendula* (E). In D, note the inflorescence of *P. pendula* without the dye with filaments and anthers naturally red. F-L: Diffuse reaction in the corolla of *Platycyamus regnelii* (F, left – treated flower, right – untreated flower), *Tipuana tipu* (G, left – treated flower, right – untreated flower) and *Mucuna urens* (H, bottom – treated flower, top – untreated flower) and in the perianth of *Erythrostemon gilliesii* (I, bottom – treated flower, top – untreated flower), *Hymenaea courbaril* (J-K) and *Bauhinia rufa* (L).

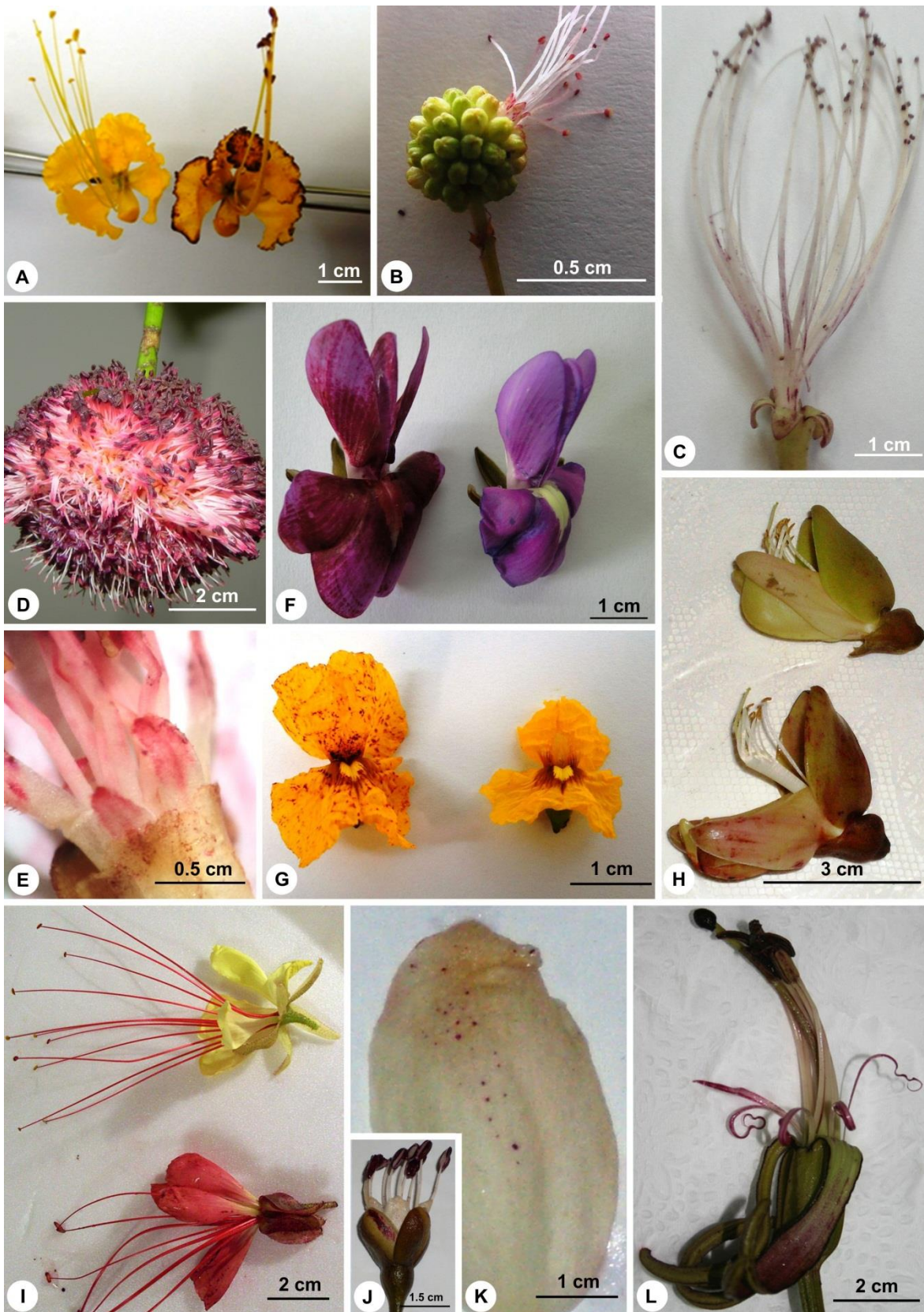


Fig. 2. Osmophores with restricted location. Scanning electron micrographs (A, F) and photomicrographs (B-E, G-H, cross sections). A-B: Standard apex of *Caesalpinia pulcherrima* showing the epidermal papillae secreting terpenes (stain: NADI reagent in B). C: Basal region of *C. pulcherrima* standard showing the epidermal and mesophyll cells secreting lipids (stain: Sudan III). D-E: Petal lobes of *Anadenanthera peregrina*. Note the cells secreting terpenes in the epidermis and mesophyll. (stain: Toluidine blue in D and NADI reagent in E). F-H: Papillae-like trichomes on the petal margins of *A. peregrina* at different stages of the secretory process. In G, note the terpene content of the trichome (stain: NADI reagent). The black arrowheads indicate accumulated terpenes.

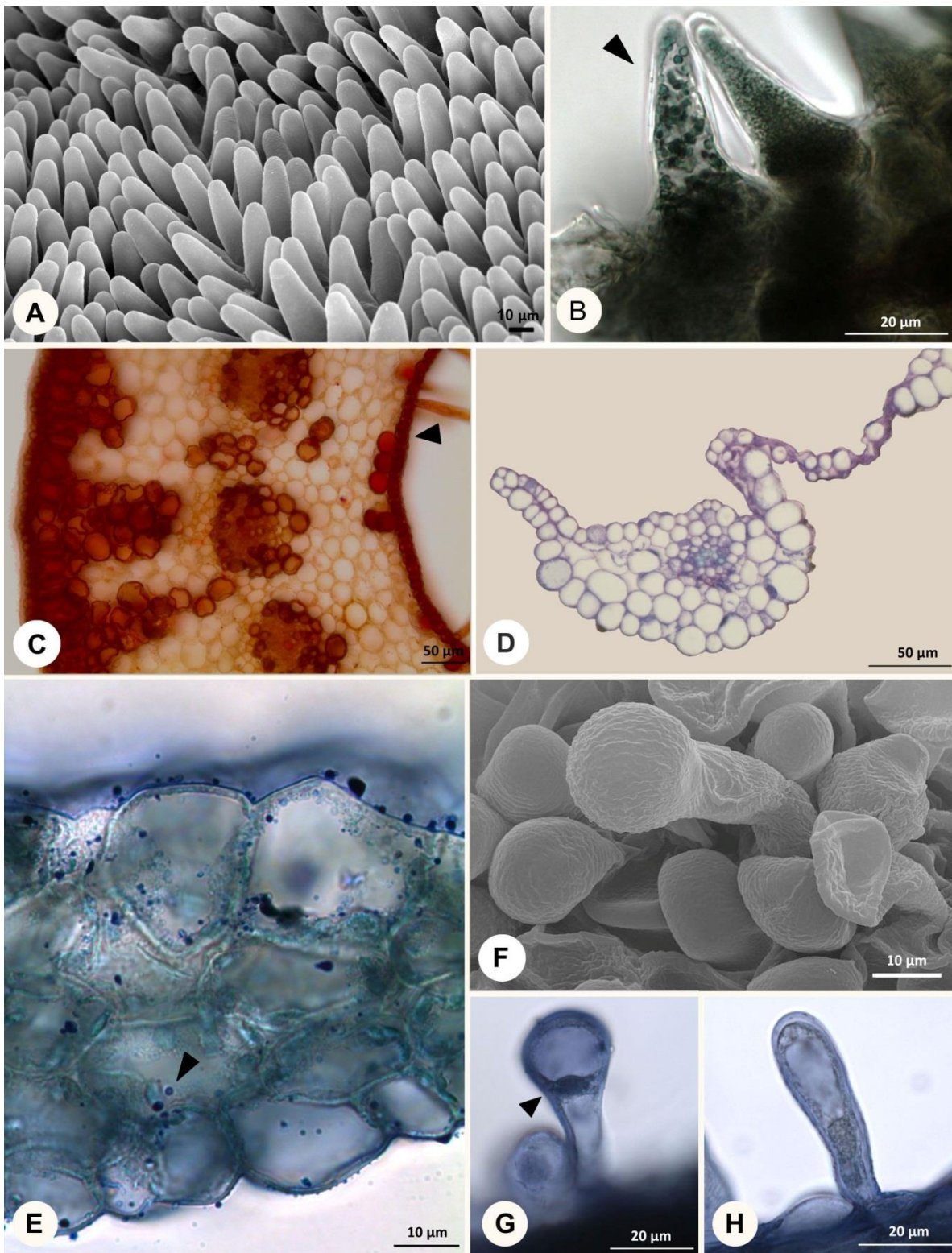


Fig. 3. Osmophores with restricted location. Photomicrographs (A-C, F-H: cross sections; D-E: longitudinal sections). A-C: Petal lobes of *Inga edulis*. In A, note the phenolic epidermis in the adaxial surface (stain: ferric trichloride); in B, see the marginal epidermis with conspicuous nucleus and dense cytoplasm and proteins in the mesophyll (stain: xyloidine Ponceau); and in C, detail of cells with terpene content in the epidermis and mesophyll (stain: NADI reagent). D-F: Apical region of *Parkia pendula* bracts. Note the cells with phenolic compounds in the epidermis and mesophyll (D) and the terpene content in the mesophyll (E-F), close to the vascular bundles (stain: ferric trichloride in D, NADI reagent in E and Sudan III in F). G-H: *P. pendula* petal showing the secretory cells of polysaccharides (stain: PAS control in G and PAS reagent in H). The white arrowheads show phenolic compounds, the white arrows show proteins, the black arrowheads indicate terpenes and the black arrows indicate polysaccharides.

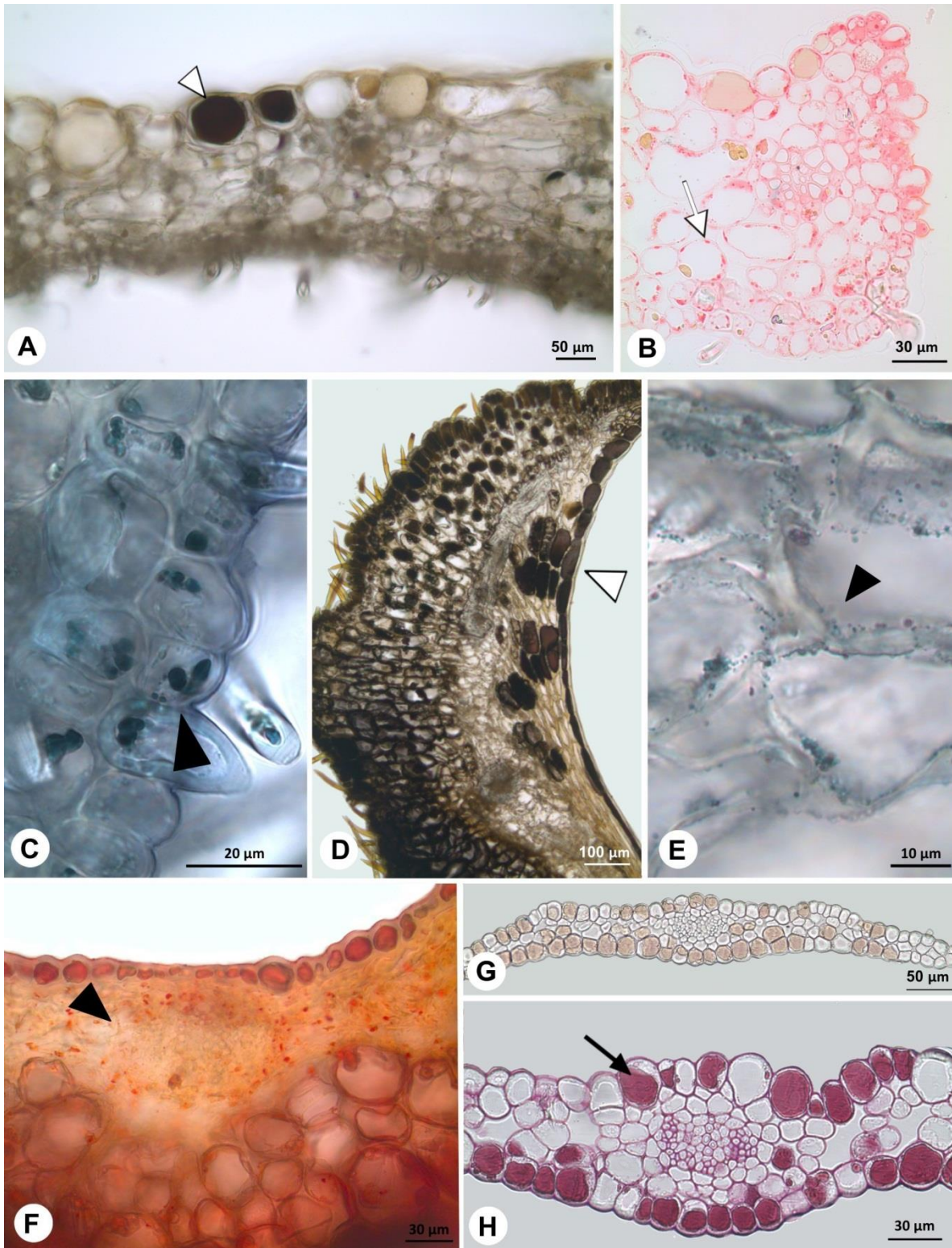


Fig. 4. Osmophores with diffuse location. Photomicrographs (A, D-F, cross sections) and electron micrographs (B-C) A-C: *Poincianella pluviosa* corolla showing the rounded epidermal cells with lipid content in A (stain: Sudan III) and with cells slightly or very vacuolated in B (cw = cell wall, n = nucleus, v = vacuole); in C, secretory epidermis detail showing plastid (p) with starch (s) and oil droplets (o), mitochondria (m), rough endoplasmic reticulum (rer) and Golgi apparatus (go). D-F: Wing (D) and standard (E-F) of *Pterodon pubescens* showing the epidermis with exudates accumulated under the cuticle, arrows (D-E, stain: Toluidine blue) and terpenes within the cells (F, stain: NADI reagent). The black arrowheads indicate accumulated terpenes.

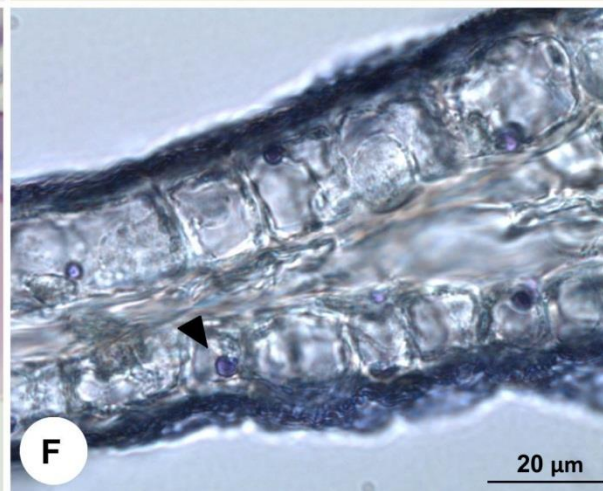
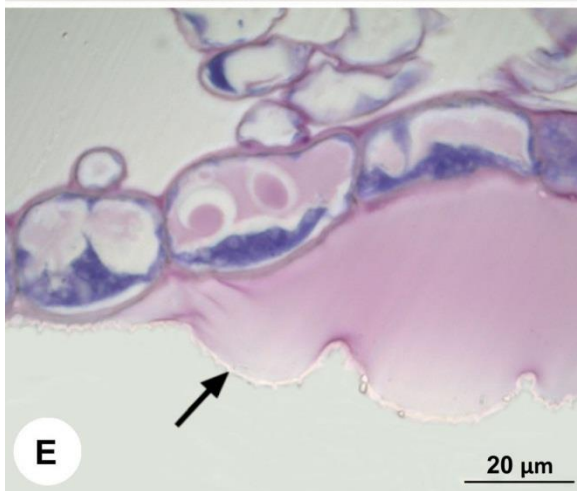
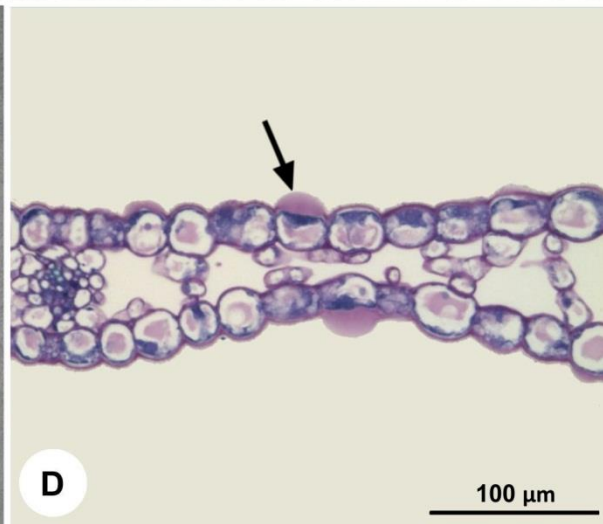
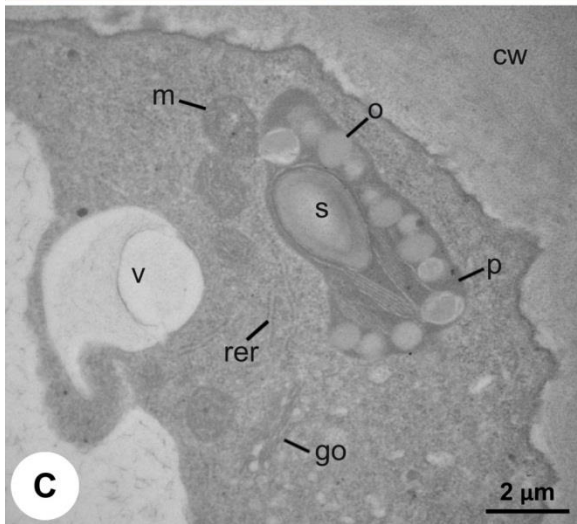
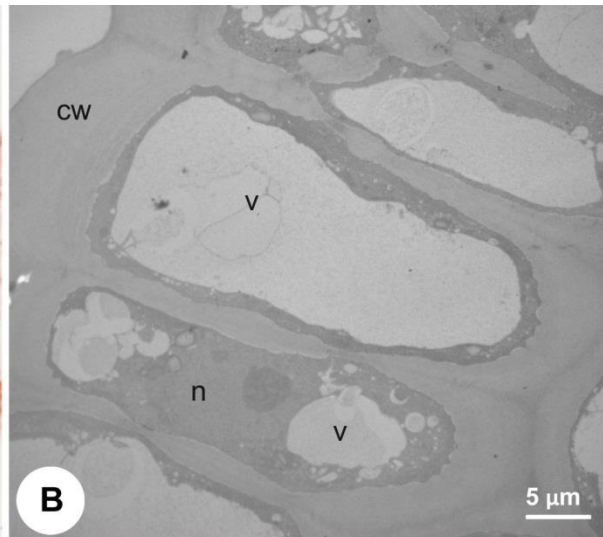
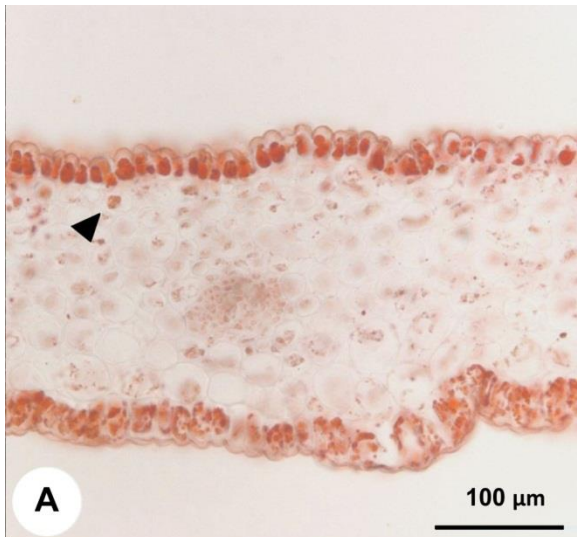


Fig. 5. Osmophores with diffuse location. Photomicrographs (A-B, D-F, cross sections) and scanning electron micrograph (C). A-B: *Platycyamus regnelli* keel showing the secretory cells of proteins in the mesophyll (A, stain: xyloidine Ponceau) and the cells secreting terpenes in the epidermis (B, stain: NADI reagent). C-F: *Mucuna urens*. In C, note the wing epidermal cells with striated cuticle and rounded shape on the abaxial surface; in D, see the standard epidermal cells with conspicuous nuclei; and in E-F observe the protein (E) and lipid (F) content in the mesophyll (stain: Toluidine blue in D, xyloidine Ponceau in E and Sudan III in F). The white arrows show the proteins and the black arrowheads indicate accumulated terpenes.

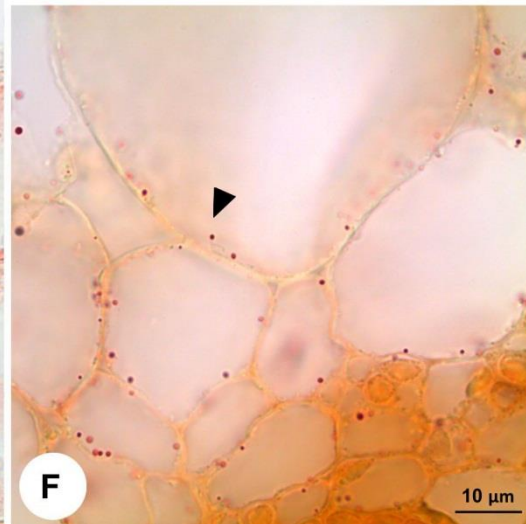
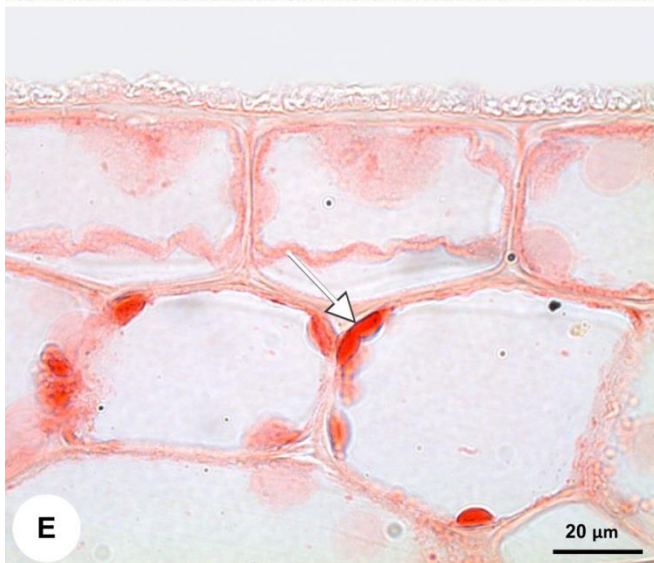
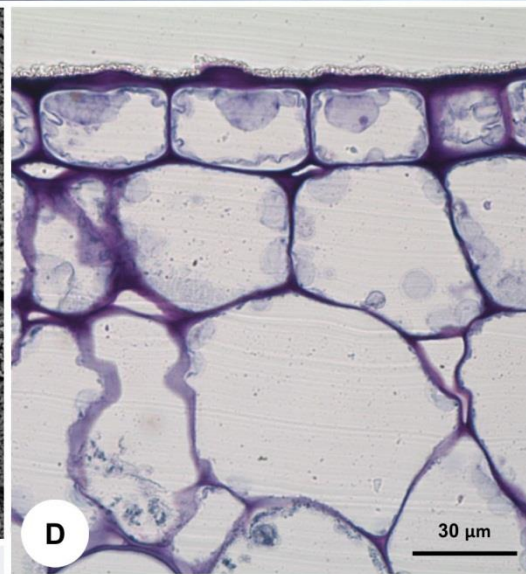
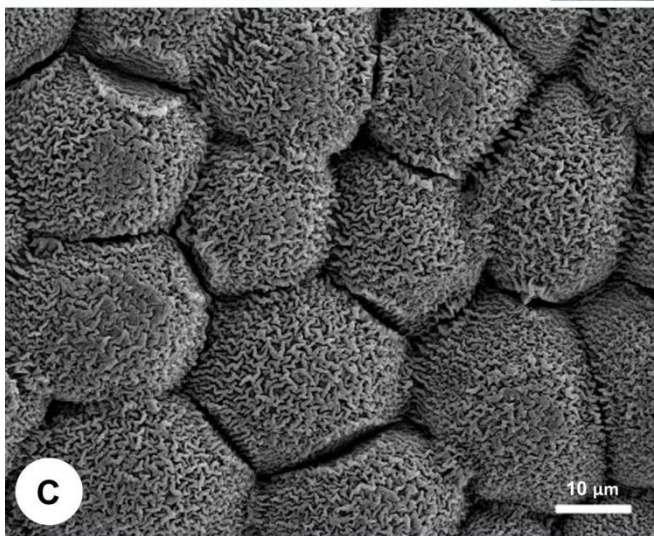
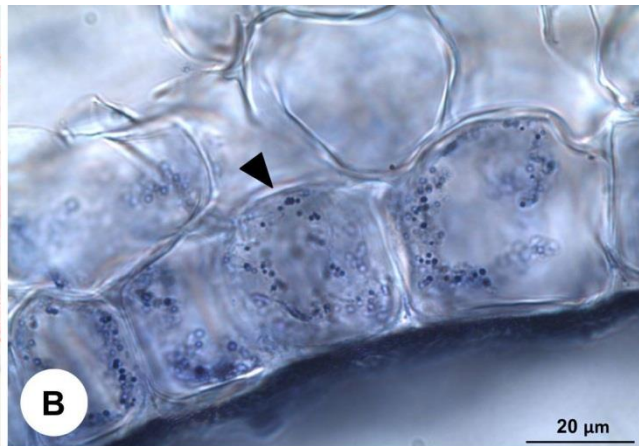
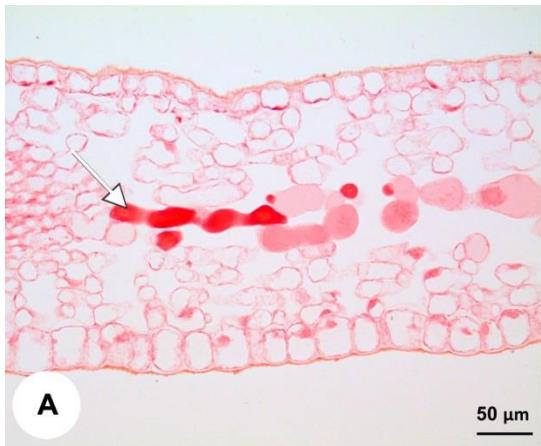


Fig. 6. Osmophores with diffuse location. Scanning electron micrograph (A), transmission electron micrographs (E-F) and photomicrographs (B-D, G, cross sections). A-B: *Tipuana tipu*. Note the wing epidermal cells with striated cuticle (A) and standard with lipophilic content (B, stain: Sudan III). C-D: *Erythrostemon gilliesii* petal showing cells in the epidermis and mesophyll with lipid content in C (pre-anthesis) and epidermis with lipid droplets above the cuticle in D (anthesis) (stain: Sudan III). E-F: Epidermal cell of *E. gilliesii* petal in pre-anthesis stage with conspicuous nucleus (n) and dense cytoplasm; in F, see the smooth endoplasmic reticulum (ser) and plastid (p) filled with oil droplets. G: *E. gilliesii* sepal showing cells with terpenic content in the epidermis and mesophyll (stain: NADI reagent). The black arrowheads indicate terpenes.

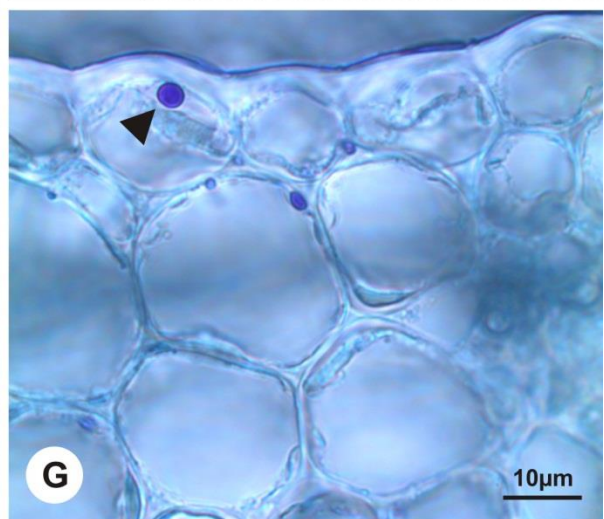
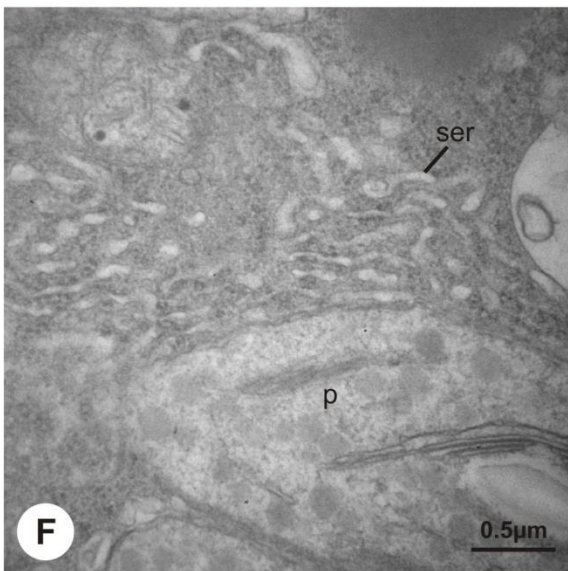
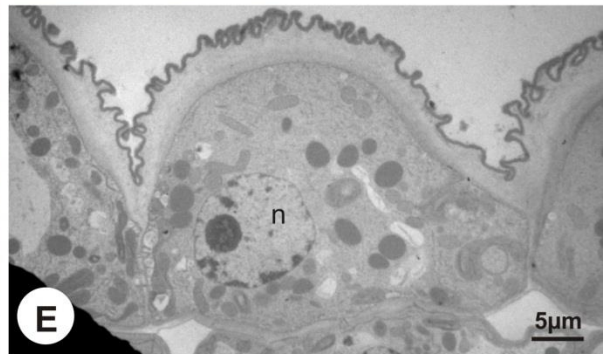
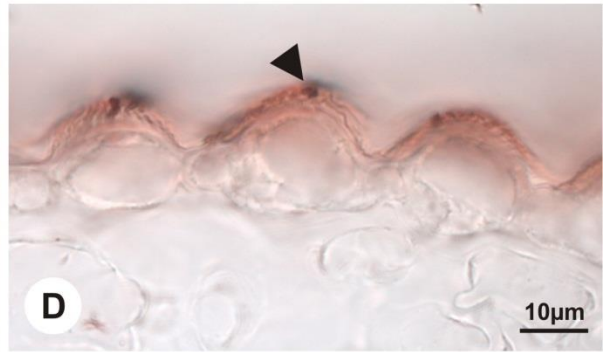
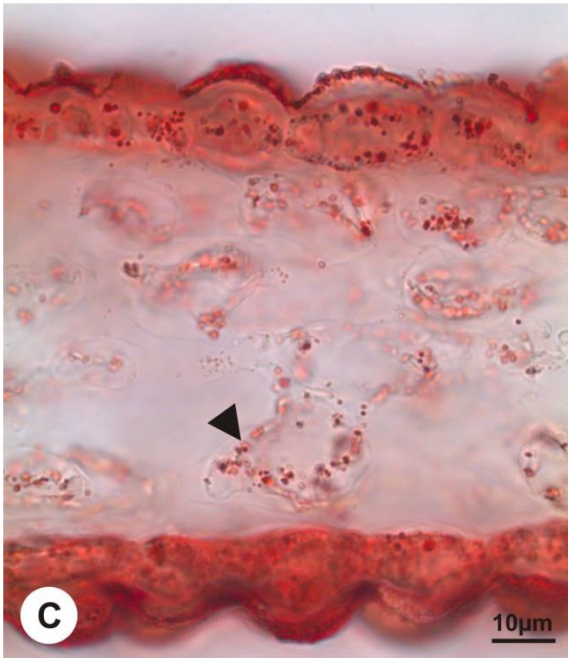
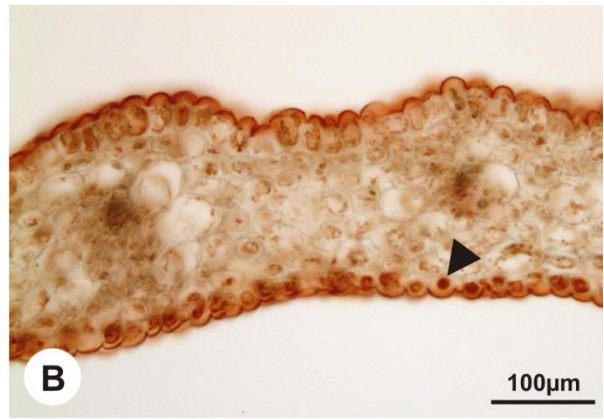
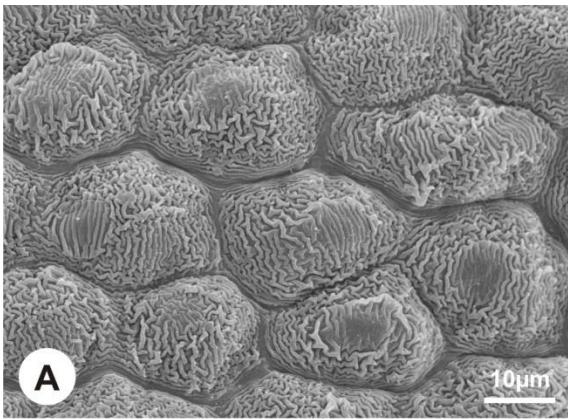
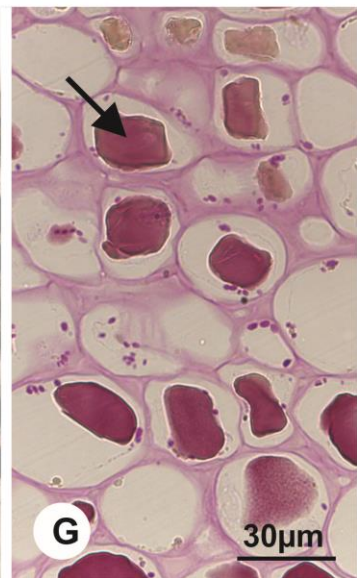
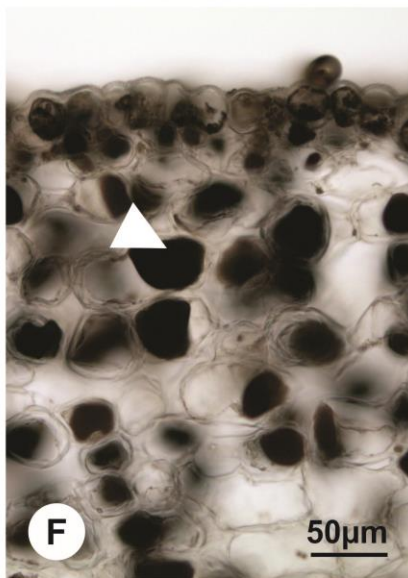
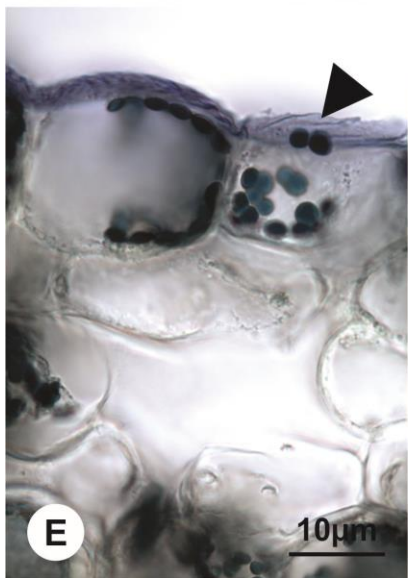
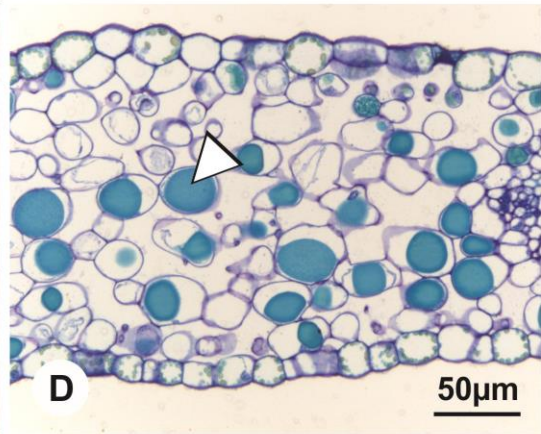
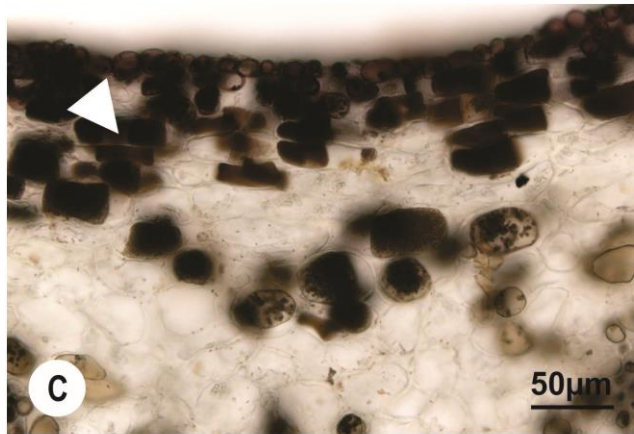
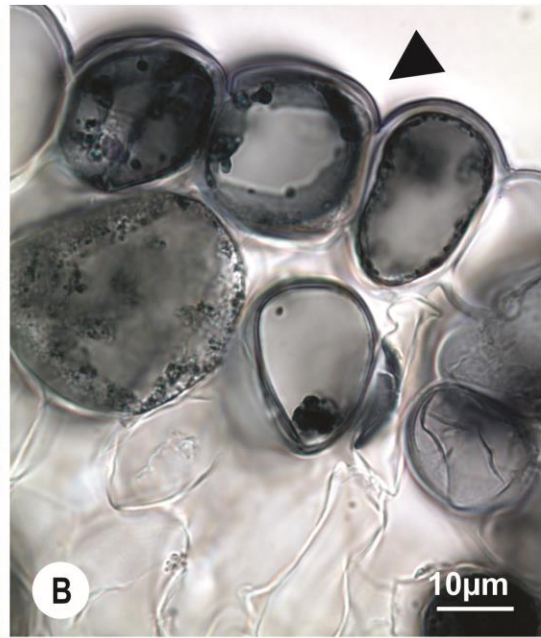
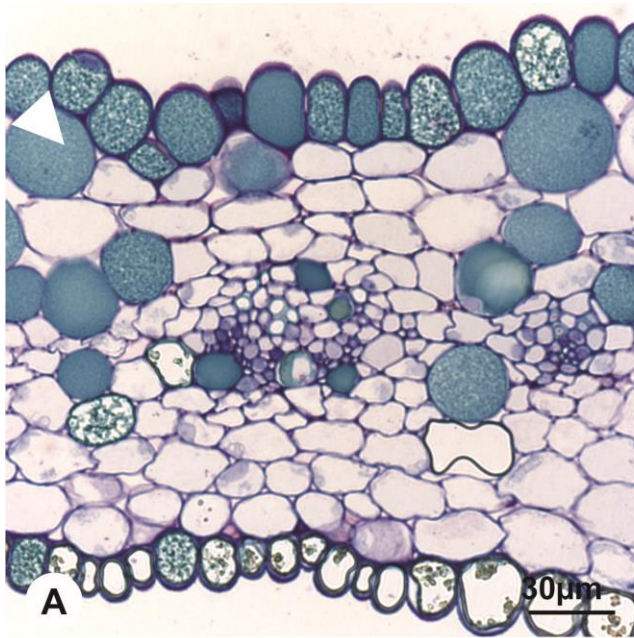


Fig. 7. Osmophores with diffuse location. Photomicrographs (cross sections). A-C: *Bauhinia rufa*. Note the petal with phenols (A) and terpenes (B) in the cells of the epidermis and mesophyll and the sepal with phenolic compounds (C) (stain: Toluidine blue in A, NADI reagent in B and ferric trichloride in C). D-G: *Hymenaea courbaril*. Petal showing the epidermis and mesophyll with phenolics (D) and terpenes (E) and sepal demonstrating the phenolic (F) and polysaccharide (G) contents (stain: Toluidine blue in D, NADI reagent in E, ferric trichloride in F and PAS reagent in G). The white arrowheads show phenolic compounds, the black ones indicate terpenes, and the black arrow shows polysaccharides.



DISCUSSION

The main site of production of floral fragrance in Leguminosae is the perianth, especially petals, regardless of the pollinator and the location, restricted or not, of the osmophores. The petals exhibit other types of components attractive to pollinators, such as colors, shapes and contrasting sizes (Endress 1994), but have been reported as the primary source of floral scents (Dudareva & Pichersky 2006). Interestingly, even the mimosoids (*Anadenanthera peregrina*, *Inga edulis* and *Parkia pendula*), despite numerous colored stamens, showed secretory tissue in the corolla, which was somewhat conspicuous in this group. However, it is important to consider that the present study is the first step towards a better understanding of this interesting phenomenon in legumes and there might be other, not yet discovered sites of scent emission in this group.

The types of structures involved in the production of floral fragrance in the legumes studied here include cells in the epidermis and mesophyll (present in all species), idioblasts (seen in the mesophyll of *Caesalpinia pulcherrima* standard) and unicellular trichomes (occurring at the margins of the petal lobes of *Anadenanthera peregrina*). These structures have secretory activity restricted to periods of anthesis and the stage immediately prior to anthesis, the defining characteristic of scent glands (Vogel 1990). Considerable variation was found in the shape of the cells that comprise the secretory epidermis, which is probably related to the efficiency of scent release into the environment. The thickness of the outer periclinal walls of these cells in *Erythostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* is surprising and initially gives the impression of difficulty in the scent emission. But considering that volatiles are composed by substances of low molecular weight (30 to 300 amu) (Dudareva & Pichersky 2006), such compounds are readily able to diffuse through the cell wall microfibrils. Still concerning these two species, the variation in the position of the epidermal cell nuclei, which is determined by the condition of the vacuole, reflects the different metabolic levels of epidermal cells. The vacuolated cells probably do not have any secretory function, unlike the cells with dense cytoplasm and central nucleus (see Fahn 1979).

Of the 12 studied species, only four (*Caesalpinia pulcherrima*, *Anadenanthera peregrina*, *Inga edulis* and *Parkia pendula*) showed osmophores in restricted areas of bracts, sepals and petals, characterized as mesophilic, since the mesophyll participates in the production of volatiles (Vogel 1990, Endress 1994, Pansarin *et al.* 2009). However, if we consider the strict concept of mesophilic osmophores (*sensu* Endress 1994), typical mesophilic osmophores occurred only in *P. pendula*, since in the other species the epidermis is also involved in the scent production.

In the majority of species studied (*Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Erythrostemon gilliesii*, *Poincianella pluviosa*, *Pterodon pubescens*, *Platycyamus regnellii*, *Tipuana tipu* and *Mucuna urens*), the osmophores occur diffusely in the sepals and/or petals. This supports the statement of Vogel (1983) that the diffuse liberation of scent is the most common pattern of floral fragrances emission. However, despite the prevalence, there are few papers that detail this type of scent release, which may be related to the difficulty in locating the secretory tissues that do not have contrasting differences in morphology. Examples are found in *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae, Goodwin *et al.* 2003), in species of *Rosa* (Rosaceae, Bergougnoux *et al.* 2007), in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae, Effmert *et al.* 2005), in *Osmanthus fragans* (Oleaceae, Dong *et al.* 2006), in *Trollius europaeus* (Ranunculaceae, Ibanez *et al.* 2010), in *Crocus vernus* (Iridaceae, Weryszko-Chmielewska & Chwil 2011) and in *Anacamptis pyramidalis* (Orchidaceae, Kowalkowska *et al.* 2012). In these species, the perianth or petals are also the organs responsible for the synthesis and release of scent; however, the cells that produce fragrances are restricted to the epidermis.

In Leguminosae the osmophores always exhibited some type of cell or tissue secreting terpene, a compound commonly reported in fragrances of flowers pollinated by bees, butterflies and moths (see Knudsen & Tollsten 1993; Dudareva & Pichersky 2006). The presence of terpenes in the floral scent glands of the chiropterophilous legumes is unexpected since the unpleasant odor similar to decomposing plant material found in these species generally consists of sulfuric substances, such as dimethyldisulphide, dimethyltrisulphide and dimethyltetrasulphide (Knudsen & Tollsten 1995; Bestmann *et al.* 1997). This result is supported by the chemical profile obtained from the floral scent of

Parkia pendula, in which monoterpenes, such as the β -ocimene, are the dominant compound (Piechowski *et al.* 2010). Phenolic compounds are common in legumes and often associated with plant defense (Haslam 2007; Judd *et al.* 2009). However, the degradation of this substance in the cells in flowers of *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Inga edulis* raises the possibility of their participation in the scent composition. As observed in osmophores of Apocynaceae (Jürgens *et al.* 2006; Castro & Demarco 2008) and discussed by Vogel (1983), the release of phenols and proteins by the flowers can confer them a fetid odor, as noted in *B. rufa*, *H. courbaril*, *Platycyamus regnelli* and *M. urens*.

Although the non-starch polysaccharides detected in some species have any relation to the scent (Vogel 1983, Knudsen *et al.* 2006), the starch observed in the mesophyll cells of *Bauhinia rufa*, *Hymenaea courbaril*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Erythrostemon gilliesii*, *Poincianella pluviosa* and *Tipuana tipu* can provide the energy supply for their osmophores. However, it is important to consider that the energy source for the synthesis of substances may come from other sites, like the phloem (Fahn 1979), which is considerably common in the osmophore regions of the studied species.

Our findings showed no relationship between the presence of osmophores, type of anthesis (diurnal and nocturnal) and the pollinator (see Table 2). We expected to find restricted osmophores in the nocturnal flowers, since these flowers emit strong scents and the scent emission processes tend to be more pronounced in this type of osmophore (Baker 1961; Faegri & van der Pijl 1979; Vogel 1990); but we only found them in *Parkia pendula*. However, it is worth noting that, despite the inconspicuous coloration (except *P. pendula*), the exposed arrangement of the nocturnal flowers in relation to the branches and leaves facilitates their detection by bats and moths (Fleming *et al.* 2009), and the corolla shape is of great importance to bats that use echolocation (von Helversen & von Helversen 1999, species of *Mucuna*). We also expected to find some sort of scent gland in diurnal pollinated species; however, the fragrance in these species is probably not the main way pollinators locate these flowers since the nectar guides in the standard of *Caesalpinia pulcherrima*, *Poincianella pluviosa*, *Pterodon pubescens*, *Tipuana tipu* and *Platycyamus regnelli* and the stamens of *Anadenanthera peregrina* and *Inga edulis* form contrasting structures in the

flower. In addition, the nectar offered by the flowers of all studied species (C.R. Marinho, *pers. obs.*) may be partly responsible for the attraction of pollinators. Thereby, it seems that most of the time fragrance is only one part of a more complex attractive pattern exhibited by flowers.

Our data on the scent glands in Leguminosae are unprecedented and detail the type of diffuse liberation which has been very poorly studied. Taking into account that Leguminosae is a large and extremely diverse taxon, we believe that further studies should be performed to get a better understanding of scent production and floral ecology in this family. The Mimoseae tribe is an interesting group of study and exhaustive analysis about the anther glands of their members is being conducted in our laboratory. Moreover, detailed phytochemical investigation of the volatile contents and studies about the genetics of scent production are some unexplored topics in legumes and even in other plant groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to FAPESP (process numbers 2008/55434-7, 2009/01057-0 and 2009/17642-0) for financial support; Maria Dolores Seabra Ferreira, José Augusto Maulin (Laboratory of Electron Microscopy, FMRP/ USP), Paulo Donato Frighetto (Laboratory of Bioengineering, FMRP/ USP), Rodrigo Ferreira Silva (Department of Chemistry, FFCLRP/ USP) and Adriane Cristina Sarti Sprogis (Laboratory of Electron Microscopy, IB/ UNICAMP) for technical assistance; and Dewey Litwiller (University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada) for English review.

REFERENCES

- Arroyo M.T.K. (1981) Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill R.M., Raven P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics, part 2*. Royal Botanic Garden, Kew: 723–769.
- Ascensão L., Francisco A. Cotrim H., Pais M.S. (2005) Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **92**, 1059–1067.

- Baker H.G. (1961) The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quarterly Review of Biology*, **36**, 64–73.
- Balestieri F.C.L.M., Machado V.L.L. (1998) Entomofauna visitante de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth) (Leguminosae) durante o seu período de floração. *Revista Brasileira de Entomologia*, **41**, 547–554.
- Bergougnoux V., Caissard J., Jullien F., Magnard J., Scalliet G., Cock J.M., Hugueney P., Baudino S. (2007) Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta*, **226**, 853–866.
- Bestmann H.J., Winkler L., von Helversen O. (1997) Headspace analysis of flower scent constituents of bat-pollinated plants. *Phytochemistry*, **46**, 1169–1172.
- Bolin J.F., Maass E., Musselman L.J. (2009) Pollination biology of *Hydnora africana* Thunb. (Hydnoraceae) in Namibia: brood-site mimicry with insect imprisonment. *International Journal of Plant Sciences*, **170**, 157–163.
- Bonacina A.K.B., Netto J.C., Júnior V.V.A. (2008) Relações entre abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na exploração de recursos naturais em uma área de Cerrado em Dourados (MS). *Revista Brasileira de Agroecologia*, **3**, 71–74.
- Bortoluzzi R.L.C. (2000) *Papilionoideae (Leguminosae) no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais*. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 120pp.
- Caissard J., Meekijjironenroj A., Baudino S., Anstett M. (2004) Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *American Journal of Botany*, **91**, 1190–1199.
- Carvalho C.A.L., Marchini L.C. (1999) Tipos polínicos coletados por *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Scientia Agricola*, **6**, 717–722.
- Castro M., Demarco D. (2008) Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications*, **3**, 1273–1284.
- Cocucci A.A., Galetto L., Sérsic A. (1992) El síndrome floral de *Caesalpinia gilliesii* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Darwiniana*, **31**, 111–135.
- Colpas F.T., Oliveira D.M.T. (2002) Structure and ontogeny of *Swartzia langsdorffii* (Leguminosae) pericarp. *Nordic Journal of Botany*, **22**, 313–323.
- Crestana C.S.M., Dias I.S., Mariano G. (1983/1985) Ecologia de polinização de *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, o Jatobá. *Silvicultura de São Paulo*, **17/19**, 31–37.
- Cruden R.W., Hermann-Parker S.M. (1979) Butterfly pollination of *Caesalpinia pulcherrima*, with observations of psychophilous syndrome. *Journal of Ecology*, **67**, 155–168.
- Curry K., McDowell L.M., Judd W.S., Stern W.L. (1991) Osmophores, floral features and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **78**, 610–623.
- David R., Carde J.P. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris*, **D258**, 1338–1340.
- Dong M., Yuan W., Ma Y., Shang F. (2006) Petal secretory structure of *Osmanthus fragrans* Lour. *Life Science Journal*, **3**, 81–84.
- Dudareva N., Pichersky E. (2006) *Biology of Floral Scent*. Taylor & Francis Group, Boca Raton: 346 pp.

- Dufaÿ M., Hossaert-McKey M., Anstett M.C. (2003) When leaves act like flowers: how dwarf palms attract their pollinators. *Ecology Letters*, **6**, 28–34.
- Effmert U., Grobe J., Röse U.R., Ehrig F., Kägi R., Piechulla B. (2005) Volatile composition, emission pattern and localization of floral scent emission in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, **92**, 2–12.
- Endress P.K. (1994) *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, New York: 511 pp.
- Faegri K., van der Pijl L. (1979) *The principles of pollination ecology*, 3rd ed. Pergamon Press, Oxford/ New York/ Toronto/ Sydney/ Paris/ Braunschweig: 244 pp.
- Fahn A. (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London: 302 pp.
- Falcão M.A., Clement, C.R. (2000) Fenologia e produtividade do ingá-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, **30**, 173–180.
- Feder N., O'Brien T.P. (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, **55**, 123–142.
- Fleming T.H., Geiselman C., Kress W.J. (2009) The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, **104**, 1017–1043.
- García M.T.A., Galati B.G., Hoc P.S. (2007) Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora*, **202**, 302–315.
- Gibbs P.E., Oliveira P.E., Bianchi M.B. (1999) Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, 72–78.
- Goodwin S.M., Kolosova N., Kish C.M., Wood K.V., Dudareva N., Jenks M.A. (2003) Cuticle characteristics and volatile emissions of petals in *Antirrhinum majus*. *Physiologia Plantarum*, **117**, 435–443.
- Guimarães E., Di Stasi L.C., Maimoni-Rodella R.C.S. (2008) Pollination biology of *Jacaranda oxyphylla* with an emphasis on staminode function. *Annals of Botany*, **102**, 699–711.
- Hadacek F., Weber M. (2002) Club-shaped organs as additional osmophores within the *Sauromatum* inflorescence: odour analysis, ultrastructural changes and pollination aspects. *Plant Biology*, **4**, 367–383.
- Haslam E. (2007) Vegetable tannins – lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**, 2713–2721.
- Healy R.A., Palmer R.G., Horner H.T. (2009) Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecia. *International Journal of Plant Science*, **170**, 444–456.
- Hopkins H.C. (1984) Floral biology and pollination ecology of the Neotropical species of *Parkia*. *Journal of Ecology*, **72**, 1–23.
- Ibanez S., Dötterl S., Anstett M., Baudino S., Caissard J., Gallet C., Després L. (2010) The role of volatile organic compounds, morphology and pigments of globe-flowers in the attraction of their specific pollinating flies. *New Phytologist*, **188**, 451–463.
- Johansen D.A. (1940). *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. (2009) *Plants systematics: A Phylogenetic Approach*, 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.

- Jürgens A., Dötterl S., Meve U. (2006) The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae – Asclepiadoideae – Ceropegieae). *New Phytologist*, **172**, 452–468.
- Karnovsky M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **27**, 137–138.
- Knudsen J.T., Tollsten L. (1993) Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113**, 263–284.
- Knudsen J.T., Tollsten L. (1995) Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **119**, 45–57.
- Knudsen J.T., Eriksson R., Gershenzon J., Ståhl B. (2006) Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, **72**, 1–120.
- Kowalkowska A.K., Margońska H.B., Kozieradzka-Kiszkurno M., Bohdanowicz J. (2012) Studies on the ultrastructure of a three-spurred *fumeauxiana* form of *Anacamptis pyramidalis*. *Plant Systematics and Evolution*, **298**, 1025–1035.
- Kumar B.K.V., Prabhakar M., Ramayya N., Leelavathi P. (1986) Structure, distribution and development of cavitated trichomes in *Indigofera* L. (Fabaceae). *Geophytology*, **16**, 227–231.
- Lau C.P.Y., Saunders R.M.K., Ramsden L. (2009) Floral biology, breeding systems and population genetic structure of three climbing *Bauhinia* species (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Hong Kong, China. *Journal of Tropical Ecology*, **25**, 147–159.
- Leelavathi P., Prabhakar M., Ramayya N. (1984) Structure and ontogeny of capitate hairs in *Mimosa* (L.). *Geobios New Reports*, **3**, 183–185.
- Lewis G.P., Schrire B., Mackinder B., Lock M. (2005) *Legumes of the World*. The Royal Botanic Gardens, Kew: 577 pp.
- Lillie R.D. (1965) *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 3rd ed. McGraw-Hill Book Company, New York/ Toronto/ Sydney/ London: 715 pp.
- López-Forment W. (1985) Pollination of *Hymenaea courbaril* by frugivorous bats on the Pacific coast of Mexico. *Acta Zoologica Fennica*, **173**, 291–292.
- Luckow M., Grimes J. (1997) A survey of anther glands in the mimosoid legume tribes Parkieae and Mimoseae. *American Journal of Botany*, **84**, 285–297.
- Mansano V.F., Teixeira S.P. (2008) Floral anatomy of the *Lecointea* clade (Leguminosae, Papilionoideae, Swartzieae sensu lato). *Plant Systematic and Evolution*, **273**, 201–209.
- Marquiasável F.S., Ferreira M.D.S., Teixeira S.P. (2009) Novel reports of glands in Neotropical species of *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae). *Flora*, **204**, 189–197.
- Martins F.Q., Batalha M.A. (2007) Vertical and horizontal distribution of pollination systems in cerrado fragments of Central Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **50**, 503–514.
- Melo M.C., Borba E.L., Paiva E.A.S. (2010) Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution*, **286**, 141–151.
- More M., Sérsic A.N., Cocucci A.A. (2006) Specialized use of pollen vectors by *Caesalpinia gilliesii*, a legume species with brush-type flowers. *Biological Journal of the Linnean Society*, **88**, 579–592.

- Nilsson L.A. (1992) Orchid Pollination Biology. *TREE*, **7**, 255–259.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**, 368–373.
- Ormond W.T., Pinheiro M.C.B., Castells A.R.C. (1981) A contribution to the floral biology and reproductive system of *Couroupita Guianensis* Aubl. (Lecythidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **68**, 514–523.
- Paiva E.A.S., Oliveira D.M.T. (2004) Ontogenesis of the fruit pulp layer of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Australian Journal of Botany*, **52**, 677–683.
- Pansarin L.M., Castro M.M., Sazima M. (2009) Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catsetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **159**, 408–415.
- Pearse A.G.E. (1985) *Histochemistry theoretical and applied*, Vol. 2, 4th ed. Churchill Livingston, Edinburgh: 1055 pp.
- Piechowski D., Dötterl S., Gottsberger G. (2010) Pollination biology and floral scent chemistry of the Neotropical chiropterophilous *Parkia pendula*. *Plant Biology*, **12**, 172–182.
- Pires J.P.A., Freitas L. (2008) Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in southeastern Brazil. *Flora*, **203**, 491–498.
- Plachno B.J., Świątek P., Szymczak G. (2010) Can a stench be beautiful? – Osmophores in stem-succulent stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae-Stapeliinae). *Flora*, **205**, 101–105.
- Poser G.L., Mentz L.A. (2007) Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed. Editora UFRGS, Porto Alegre/ Editora da UFSC, Florianópolis: 75–89.
- Prenner G., Klitgaard B.B. (2008) Towards unlocking the deep nodes of Leguminosae: Floral development and morphology of the enigmatic *Duparquetia orchidacea* (Leguminosae, Caesalpinioideae). *American Journal of Botany*, **95**, 1349–1365.
- Pridgeon A.M., Stern W.L. (1983) Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **70**, 1233–1243.
- Pridgeon A.M., Stern W.L. (1985) Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, **146**, 115–123.
- Sass J.E. (1951) *Botanical microtechnique*, 2nd ed. The Iowa State College Press: Ames: 228 pp.
- Sazima M., Buzato S., Sazima I. (1999) Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest sites in Brazil. *Annals of Botany*, **83**, 705–712.
- Sazima M., Vogel S., Cocucci A., Hausner G. (1993) The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae): pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Plant Systematics and Evolution*, **187**, 51–88.
- Seymour R.S. (2010) Scaling of heat production by thermogenic flowers: limits to floral size and maximum rate of respiration. *Plant, Cell and Environment*, **33**, 1474–1485.
- Simões C.M.O. (2007) Óleos voláteis. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed. Editora UFRGS, Porto Alegre/ Editora da UFSC, Florianópolis: 467–495.

- Skubatz H., Kunkel D.D., Howald W.N., Trenkle R., Mookherjee B. (1996) The *Sauromatum guttatum* appendix as an osmophore: excretory pathways, composition of volatiles and attractiveness to insects. *New Phytologist*, **134**, 631–640.
- Souza R.C.O.S., De Toni K.L.G., Andreata R.H.P., Costa C.G. (2005) Anatomia e vascularização das flores estaminadas e pistiladas de *Smilax fluminensis* Steudel (Smilacaceae). *Rodriguésia*, **56**, 107–121.
- Stpiczyńska M. (2001) Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **70**, 91–96.
- Teichert H., Dötterl S., Zimma B., Ayasse M., Gottsberger G. (2009) Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology*, **11**, 29–37.
- Teixeira S.P., Borba E.L., Semir J. (2004) Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). *Annals of Botany*, **93**, 499–505.
- Teixeira S.P., Machado S.R. (2007) Glandular dots of *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae): distribution, structure and ultrastructure. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, **134**, 135–143.
- Teixeira S.P., Ranga N.T., Tucker S.C. (2009) Inflorescence and floral development of *Dahlstedtia* species (Leguminosae: Papilionoideae: Millettieae). *Flora*, **204**, 769–78.
- Teixeira S.P., Rocha J.F. (2009) Oil glands in the Neotropical genus *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Revista Brasileira de Botânica*, **32**, 57–64.
- Trujillo C.G., Sérsic A.N. (2006) Floral biology of *Aristolochia argentina* (Aristolochiaceae). *Flora*, **201**, 374–382.
- Tucker S.C., Rugenstein S.R., Derstine K. (1984) Inflated trichomes in flowers of *Bauhinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **88**, 291–301.
- Vidal B.C. (1977). Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology*, **22**, 45–64.
- Vogel S. (1983) Ecophysiology of zoophilic pollination. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (Eds.), *Physiological Plant Ecology III: responses to the chemical and biological environment*. Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York: 559–624.
- Vogel S. (1990) *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Smithsonian Institution Libraries, Washington: 202 pp. (Translated by S.S. Renner).
- Vogel S., Hadacek F. (2004) Contributions to the functional anatomy and biology of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) III. An ecological reappraisal of floral organs. *Plant Systematics and Evolution*, **249**, 173–189.
- von Helversen D., von Helversen O. (1999) Acoustic guide in bat-pollinated flower. *Nature*, **398**, 759–760.
- Weryszko-Chmielewska E., Chwil M. (2011) Structure of the floral parts of *Crocus vernus* (L.) Hill. *Acta Agrobotanica*, **64**, 35–46.

- Wiemer A.P., Moré M., Benitez-Vieyra S., Cocucci A.A., Raguso R.A., Sérsic A.N. (2009) A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology*, **11**, 506–514.
- Williams V.L., Wojtasik E.M., Witkowski E.T.F. (2011) Ethno-ecological evidence for *Hydnora abyssinica* occurring in Johannesburg and Durban traditional medicine markets. *South African Journal of Botany*, **77**, 268–279.

CAPÍTULO 3: Dinâmica do processo secretor em osmóforos acumuladores de fenólicos

Resumo

A dinâmica do processo secretor nos osmóforos produtores de terpenos e fenólicos foi verificada em três espécies de Leguminosae utilizando-se estudos ultraestruturais, inexistentes para este tipo de glândula. Pétalas de *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* e *Hymenaea courbaril* em três fases de desenvolvimento foram fixadas em Karnovsky e processadas para análises em microscopia eletrônica de transmissão. Características subcelulares típicas de glândulas de odor secretoras de terpenos, como abundância de mitocôndrias com cristas conspicuas, de plastídios com plastoglóbulos, de retículo endoplasmático rugoso e presença de vesículas e gotas de óleo no citoplasma foram detectadas. Caracteres subcelulares inéditos para osmóforos foram encontrados, tais como a vacuolização celular em estádios muito anteriores à antese floral e a riqueza de dictiossomas em *H. courbaril*. A mobilização dos compostos fenólicos do vacúolo durante a antese levanta a possibilidade das células dos osmóforos destas espécies também estarem liberando voláteis com compostos aromáticos. A presença de plastoglóbulos e de gotas de óleo próximas aos plastídios indicam sua participação na síntese de terpenos. O transporte dos precursores de voláteis é granulocrino, sendo que provavelmente o retículo endoplasmático rugoso está envolvido neste processo. O presente trabalho traz informações inéditas a respeito do processo secretor de voláteis em osmóforos que acumulam terpenos e compostos fenólicos.

Palavras-chave: glândulas de odor, odores florais, plastídios, plastoglóbulos, secreção, terpenos.

Abstract:

The dynamics of the secretory process in osmophores producing terpenes and phenols was verified in three species of Leguminosae using ultrastructural studies, which are lacking for this type of gland. Petals of *Bauhinia curvula*, *Bauhinia rufa* and *Hymenaea courbaril* in three stages of development were fixed in Karnovsky and processed for analysis in transmission electron microscopy. Typical subcellular features of scent glands secreting terpenes, such as abundance of mitochondria, plastids with plastoglobuli, rough endoplasmic reticulum and the presence of vesicles and oil droplets in the cytoplasm were detected. Novel subcellular characters to osmophores were found, such as the cellular vacuolation in stages far prior to the anthesis and the richness of dictyosomes in *H. courbaril*. The mobilization of phenolic compounds of the vacuole during anthesis raises the possibility that the osmophore cells of these species are also releasing volatiles with aromatic compounds. The presences of plastoglobuli and oil droplets next to the plastids indicate their involvement in the synthesis of terpenes. The transport of volatile precursors is granulocrine and probably the rough endoplasmic reticulum is involved in this process. This work brings new information about the secreting process of volatiles in osmophores that accumulate terpenes and phenolic compounds.

Keywords: floral scents, plastids, plastoglobuli, scent glands, secretion, terpenes.

Introdução

Osmóforos (do grego: osmo = odor, foro = carregar) são estruturas secretoras de compostos voláteis que atuam em interações planta-polinizador, principalmente na atração à longa distância (Vogel 1990, Endress 1994, ver Capítulo 2). Nas Angiospermas ocorrem predominantemente nos órgãos florais, onde são constituídos por células secretoras presentes na epiderme e/ ou mesofilo (Vogel 1990, Endress 1994); no entanto existe um relato da presença destas estruturas nos órgãos foliares de *Chamaerops humilis* (Arecaceae, Dufaÿ *et al.* 2003, Caissard *et al.* 2004).

Uma grande diversidade de substâncias é produzida por estas glândulas, que podem ser agrupadas em: compostos lipofílicos (terpenos e alifáticos), compostos aromáticos (benzenóides e fenilpropanóides), compostos contendo nitrogênio ou enxofre e compostos C5-ramificados. Tal diversidade está relacionada com a grande variedade de polinizadores que as espécies vegetais apresentam (Knudsen *et al.* 2006, Knudsen & Gershenzon 2006). Entretanto, a presença de substâncias de natureza lipofílica é frequente na composição do odor floral, sendo independente do tipo de polinizador que as espécies apresentam (Knudsen & Gershenzon 2006, Simões 2007). De fato, estudos ultraestruturais de osmóforos sempre relatam características subcelulares de células secretoras de compostos lipofílicos nestas estruturas, tais como: abundância de mitocôndrias, de retículo endoplasmático liso e rugoso e de plastídios que contém amido e/ ou plastoglôbulos, poucos dictiossomas e presença de vesículas e gotas óleo no citoplasma (Fahn 1979, Pridgeon & Stern 1983, Pridgeon & Stern 1985, Stern *et al.* 1987, Stpiczyńska 2001, Hadacek & Weber 2002, García *et al.* 2007, Melo *et al.* 2010, Płachno *et al.* 2010).

Em Leguminosae osmóforos são relatados nas sépalas e/ ou pétalas de 14 espécies, estando localizados de forma difusa ou em regiões restritas das pétalas principalmente (Mansano & Teixeira 2008, Silva *et al.* 2011, ver Capítulo 2). Estas estruturas secretam predominantemente terpenos, sendo que em algumas espécies compostos fenólicos também foram detectados (Capítulo 2). É bem comum a presença de fenólicos nos órgãos vegetativos e reprodutivos de representantes da família (Judd *et al.* 2009), sendo atribuída a tais substâncias as funções de defesa contra herbivoria e de

proteção contra a radiação ultravioleta (Haslam 2007, Castro & Demarco 2008, Pollastri & Tattini 2011). Na flor estes compostos podem exercer também a função de atração de polinizadores, já que nos osmóforos de Leguminosae estudados anteriormente (ver Capítulo 2), tais compostos acumulados em estádios muito anteriores à antese floral, desaparecem na antese, sugerindo sua participação na composição do odor floral.

Embora existam relatos de osmóforos produtores de compostos fenólicos em Apocynaceae (Jürgens *et al.* 2006, Castro & Demarco 2008), estudos ultraestruturais do processo secretor nestas estruturas são inexistentes. O mesmo se aplica aos osmóforos com conteúdo misto composto de fenólicos e terpenos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica do processo secretor nas glândulas de odor de espécies de Leguminosae produtoras de compostos fenólicos. Com o propósito de avaliar a diversidade de mecanismos de secreção nestes osmóforos, foram escolhidas espécies de gêneros distintos ou que apresentam diferentes tipos de polinizador e que produzem classes distintas de substâncias voláteis nas glândulas de odor, tais como *Bauhinia curvula* Benth. – polinizada por mariposas, *B. rufa* (Bong.) Steud. e *Hymenaea courbaril* L. – polinizadas por morcegos.

Material e Métodos

Três espécies de Leguminosae nativas do Cerrado nas quais foram detectados compostos fenólicos nos osmóforos das pétalas (ver Capítulo 2) foram escolhidas para o presente estudo: *Bauhinia curvula*, *B. rufa* e *Hymenaea courbaril*. Os materiais testemunha foram depositados no herbário SPFR com os números S.P. Teixeira *et al.* 59 para *B. curvula*, S.P. Teixeira *et al.* 46, 47, 48 para *B. rufa* e S.P. Teixeira *et al.* 45, 55, 56 para *H. courbaril*.

As análises ultraestruturais foram realizadas em pequenas porções de pétalas de flores em três fases de desenvolvimento: botão floral em desenvolvimento, botão imediatamente anterior à antese e flor em antese. Os materiais foram fixados em Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e infiltrados em Araldite. As seções ultrafinas (60-70 nm) obtidas em um

micrótomo Leica Reichert Ultracut S foram coletadas em grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo por 15 minutos cada e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100CXII.

Resultados

Diferenças nos mecanismos de secreção foram detectadas nos osmóforos das espécies estudadas. Porém, semelhanças neste processo também foram observadas, principalmente entre *Bauhinia curvula* e *B. rufa*.

Em fases iniciais do desenvolvimento floral e antes da produção dos terpenos, as células epidérmicas das pétalas de *Bauhinia curvula*, *B. rufa* e *Hymenaea courbaril* já mostram conteúdo fenólico armazenado em vacúolos, que se fundem formando um único grande vacúolo repleto de conteúdo elétron-denso (Figs. 1A, 2A-B). Neste estágio as células epidérmicas dos osmóforos de *B. curvula* e *B. rufa* apresentam citoplasma com características semelhantes, como presença de plastídios com grãos de amido (Fig. 1B) e pouco retículo endoplasmático e ribossomos (Fig. 1C-D). Em *H. courbaril* os compostos fenólicos presentes no vacúolo começam a desaparecer já nesta fase (Fig. 2B). Os plastídios são pequenos e não apresentam amido, as mitocôndrias já são numerosas, e, assim como em *Bauhinia*, o retículo endoplasmático é discreto (Fig. 2C-F).

Em *B. curvula* e *B. rufa* a síntese de terpenos ocorre concomitantemente aos processos de perda de elétron-densidade (Fig. 1E) e da mobilização dos compostos fenólicos presentes no vacúolo (Figs. 3A-B, 4A). Nesta fase, as células osmofóricas destas espécies exibem diferenças relacionadas ao plastídio, que apresenta plastoglóbulos em *B. rufa* (Figs. 1F, 3C) e, em *B. curvula*, são ameboides e ocorrem muito próximos ao retículo endoplasmático rugoso e gotas de terpenos (Fig. 4B-C). Semelhanças também foram observadas entre estas espécies neste estágio, como consumo do amido presente nos plastídios, abundância de mitocôndrias com cristas conspícuas e de retículo endoplasmático rugoso na periferia celular (Figs. 3C, 4E). Durante a produção dos terpenos nos osmóforos de *H. courbaril*, pouco conteúdo fenólico é observado no vacúolo das células secretoras

(Fig. 5A). Os plastídios apresentam grãos de amido evidentes (Fig. 5B) e, semelhante às espécies de *Bauhinia*, o citoplasma exibe abundância de mitocôndrias e retículo endoplasmático periférico (Fig. 5C-F). Nas três espécies os terpenos produzidos são armazenados no citoplasma na forma de gotas elétron-opacas, sendo que em *H. courbaril* gotas de terpenos também ocorrem no vacúolo (Figs. 3D, 4D, 5B-C). O surgimento de invaginações na membrana plasmática, de vesículas no vacúolo e no citoplasma e de glóbulos no espaço periplasmático sugere o transporte de substâncias para o meio extracelular enquanto os terpenos ainda estão sendo sintetizados (Figs. 3E-F, 4E-F, 5E-F).

Em *B. curvula* e *B. rufa* a síntese de terpenos termina na antese e as células dos osmóforos mostram-se altamente vacuoladas, com os compostos fenólicos remanescentes concentrados próximo ao tonoplasto (Fig. 6A); o citoplasma não mais apresenta gotas elétron-opacas. Os plastídios tornam-se elétron-densos, a quantidade de retículo endoplasmático rugoso diminui e as mitocôndrias continuam abundantes (Fig. 6B-C). Em *H. courbaril* a produção de terpenos continua durante a antese, sendo que somente neste estágio as cristas das mitocôndrias apresentam-se conspícuas e o amido dos plastídios é consumido e ocorre o surgimento de plastoglóbulos nestas estruturas (Fig. 7A-C). Gotas de óleo são observadas somente no vacúolo, e o citoplasma, mais elétron-denso, mostra-se rico em retículo endoplasmático periférico e vesículas (Fig. 7D-F). A presença de corpos multivesiculares em contato com o vacúolo (Fig. 6D) indica a mobilização dos compostos fenólicos e a liberação de substâncias para o meio externo é mais pronunciada, como demonstrado pela maior quantidade de vesículas no citoplasma, de glóbulos no espaço periplasmático e pela presença de exsudato na superfície celular (Figs. 6E-F, 7F).

Em todas as fases do desenvolvimento dos osmóforos observam-se plasmodesmas entre as células adjacentes (Figs. 1D, 2D, 4B, 5C). Poucos dictiossomas ocorrem nestas células em *Bauhinia* (Figs. 3E, 4E); porém, em *H. courbaril* vários são detectados em todas as fases do desenvolvimento dos osmóforos (Fig. 2E, 5C-D, 7E-F).

Figura 1: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Bauhinia rufa*. A-D: Célula na fase anterior à síntese dos terpenos. Observe a célula com substâncias fenólicas já depositadas no vacúolo (A), o plastídio com grão de amido (B), o retículo endoplasmático rugoso na periferia celular (C) e as mitocôndrias no citoplasma pobre em ribossomos (D). E-F: Célula em início da síntese dos terpenos. Note a célula mostrando o conteúdo fenólico menos elétron-denso no vacúolo (E) e detalhe de plastídio com plastoglóbulos e tilacóides evidentes próximo ao corpo de Golgi com vesículas (F). a = amido, f = composto fenólico, g = corpo de Golgi, m = mitocôndria, n = núcleo, p = plastídio, pe = parede periclinal externa, pl = plasmodesma, rer = retículo endoplasmático rugoso. Barras: 5 μm (A, E), 1 μm (B-D, F).

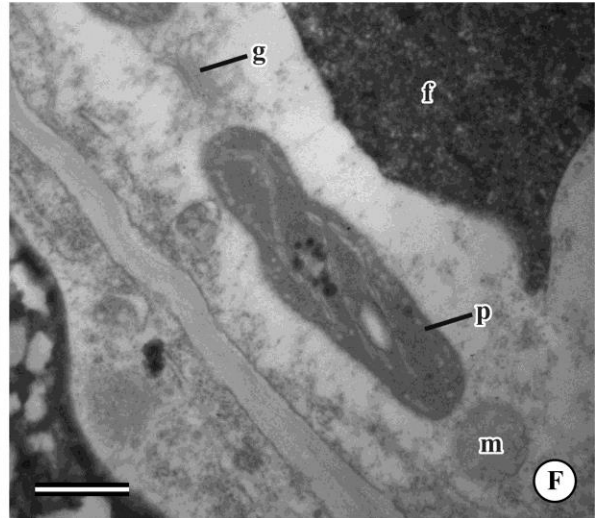
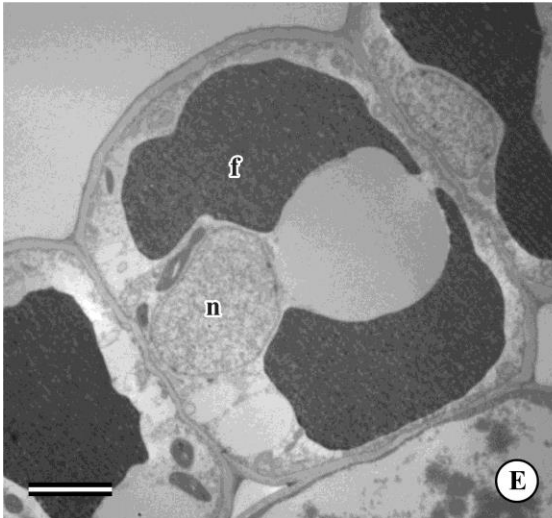
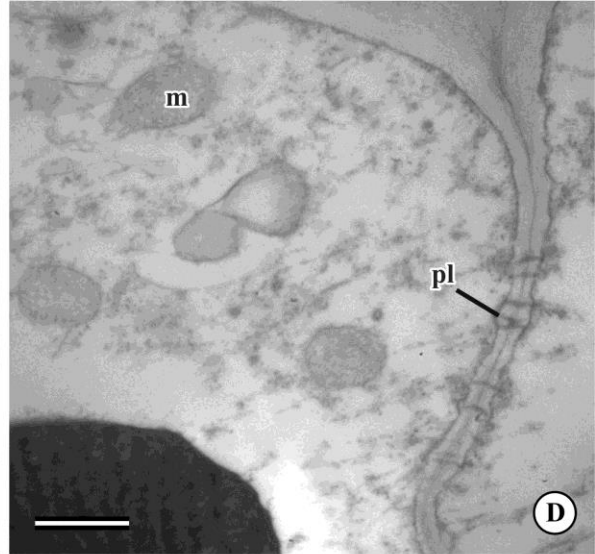
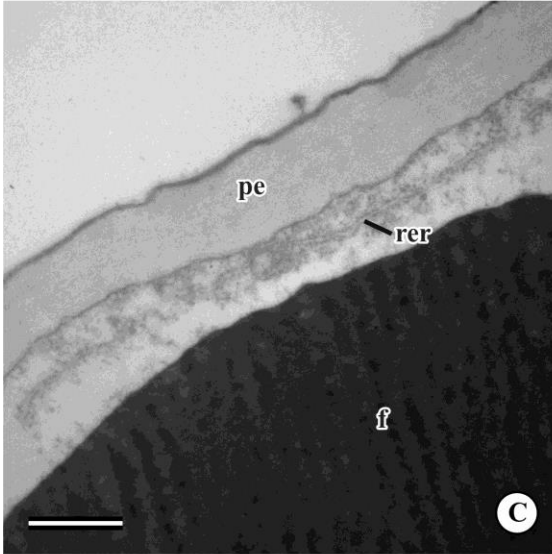
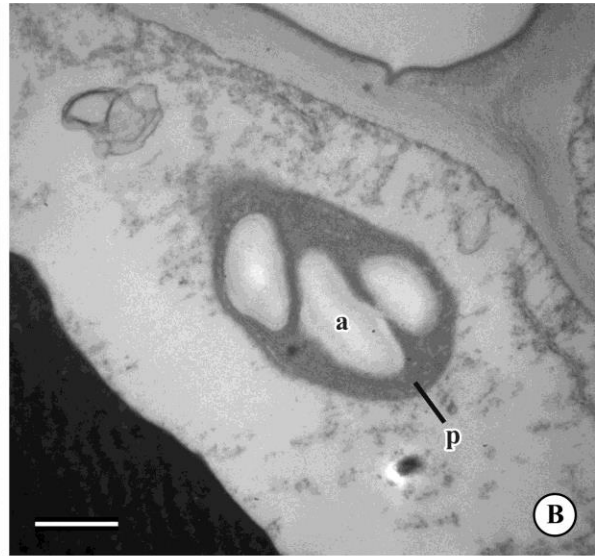
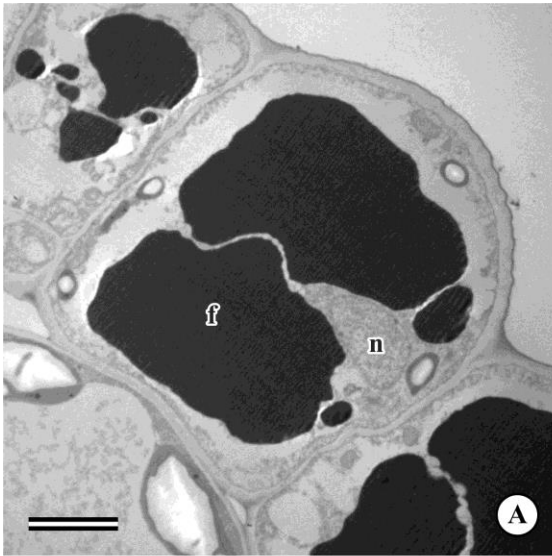


Figura 2: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Hymenaea courbaril*. A-F: Célula na fase anterior à síntese dos terpenos. Observe a célula com pequenos vacúolos com acúmulo de fenólicos (A) e a célula com grande vacúolo com conteúdo fenólico em início de fragmentação (B). Note o citoplasma com plastídios elétron-densos (C), mitocôndrias (D) e diversos corpos de Golgi (E, cabeças de seta). Observe o retículo endoplasmático rugoso e a invaginação da membrana plasmática (F, seta). f = compostos fenólicos, m = mitocôndria, n = núcleo, p = plastídio, pl = plasmodesma, rer = retículo endoplasmático rugoso, v = vacúolo. Barras: 5 μm (A-B), 1 μm (C-E), 0,5 μm (F).

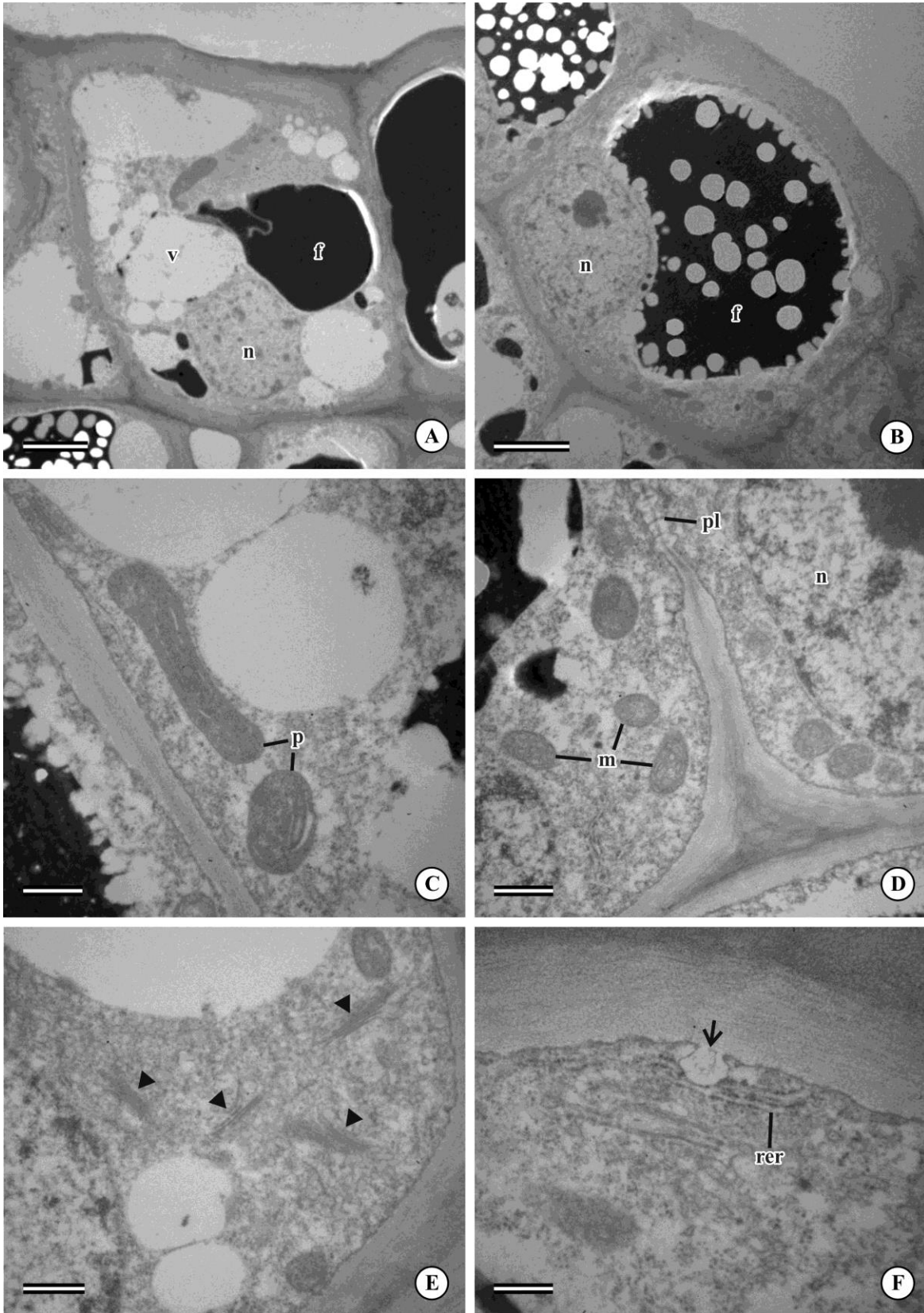


Figura 3: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Bauhinia rufa*. A-F: Célula na fase de síntese dos terpenos. Observe a célula com fenólicos em início de fragmentação no vacúolo (A) e a célula com compostos fenólicos em estágio avançado de fragmentação (B). Observe o plastídio com plastoglóbulos, as mitocôndrias com cristas evidentes e o retículo endoplasmático rugoso (C). Note o detalhe da região celular próxima à parede periclinal externa evidenciando as gotas de óleo no citoplasma e os compostos fenólicos em degradação no vacúolo (D). Observe o corpo de Golgi (E), o retículo endoplasmático rugoso na periferia celular (F) e os glóbulos no espaço periplasmático (E-F, setas). f = composto fenólico, g = corpo de Golgi, m = mitocôndria, mp = membrana plasmática, n = núcleo, o = gota de óleo, p = plastídio, pe = parede periclinal externa, rer = retículo endoplasmático rugoso. Barras: 5 μm (A-B), 1 μm (C-D), 0,5 μm (E-F).

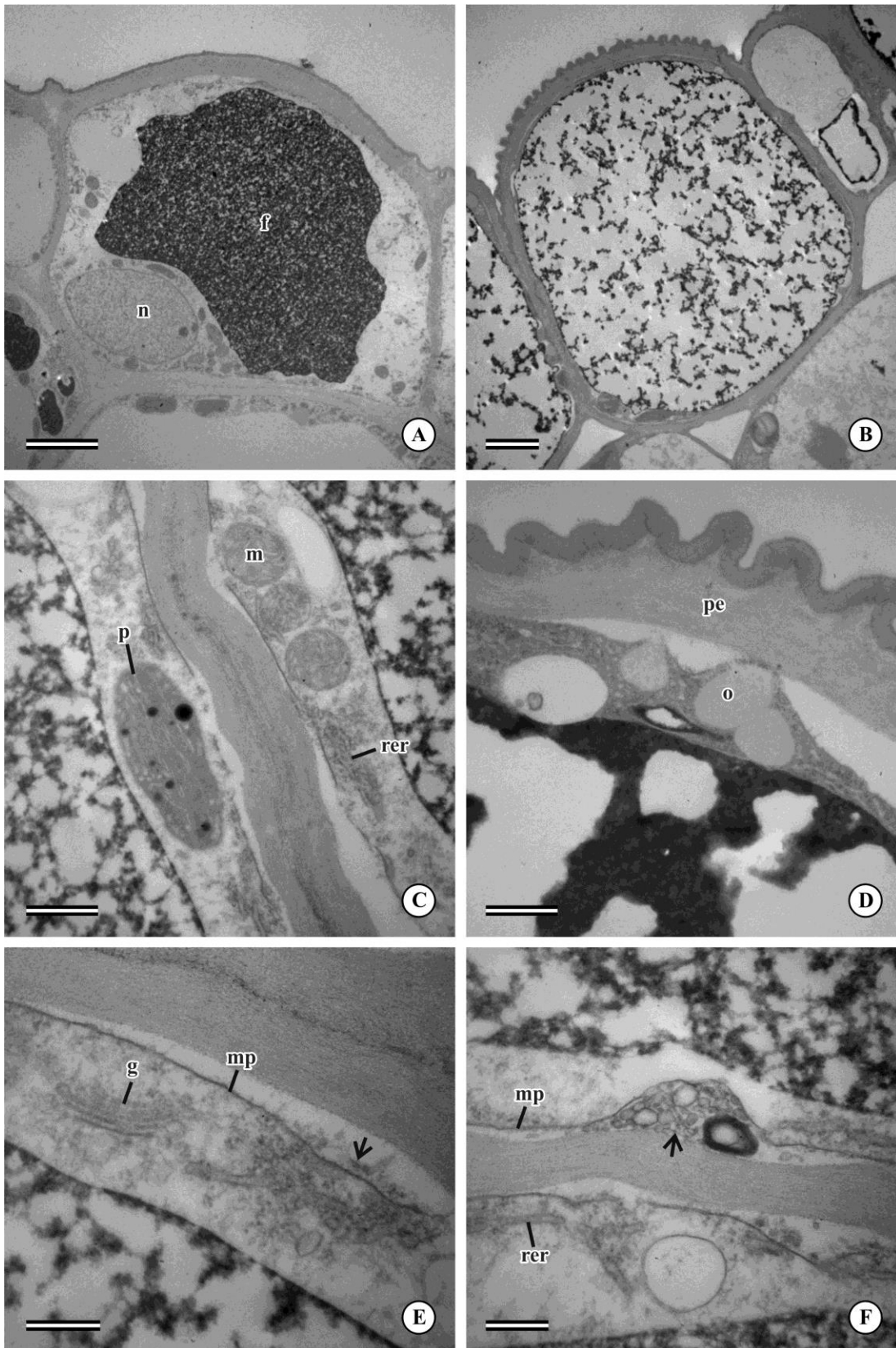


Figura 4: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Bauhinia curvula*. A-F: Célula na fase de síntese dos terpenos. Observe a célula com conteúdo fenólico fragmentado no vacúolo (A) e o plastídio ameboide próximo ao retículo endoplasmático rugoso (B). Note o detalhe da região celular próxima à parede periclinal externa mostrando plastídios ameboides, à direita, próximos ao retículo endoplasmático rugoso e gota de óleo, e à esquerda, associados a porções do citoplasma com figuras de mielina (C). Observe o citoplasma com retículo endoplasmático ruго, gotas de óleo e mitocôndrias com cristas evidentes (D). Note o corpo de Golgi (E), o retículo endoplasmático rugoso próximo à membrana plasmática, as vesículas no citoplasma e os glóbulos no espaço periplasmático (E-F, setas); note as vesículas no vacúolo (F, seta). f = composto fenólico, g = corpo de Golgi, m = mitocôndria, mp = membrana plasmática, n = núcleo, o = gota de óleo, p = plastídio, pe = parede periclinal externa, rer = retículo endoplasmático rugoso. Barras: 5 μm (A), 1 μm (B-D), 0,5 μm (E-F).

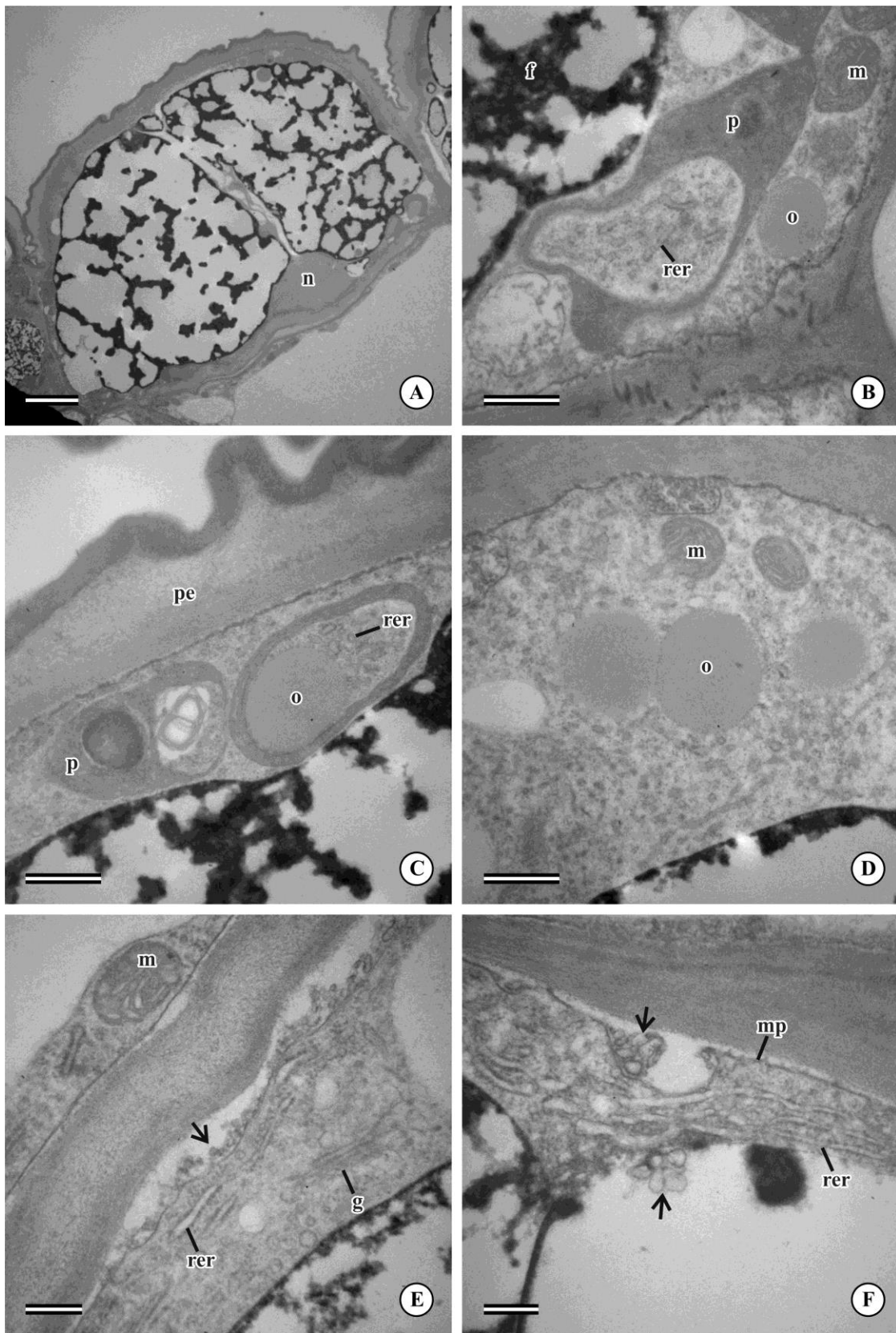


Figura 5: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Hymenaea courbaril*. A-F: Célula na fase de síntese dos terpenos. Observe a célula com o grande vacúolo exibindo substâncias fenólicas nas proximidades do tonoplasto (A), o plastídio com amido e a gota de óleo em contato com o tonoplasto (B). Note o citoplasma com as gotas de óleo (C) e os corpos de Golgi, (C-D, cabeças de seta). Observe as vesículas em contato com o tonoplasto e a gota de óleo no vacúolo (E). Note o detalhe da porção celular próxima à parede periclinal externa mostrando as vesículas em contato com a membrana plasmática e o retículo endoplasmático rugoso periférico (F). a = amido, f = compostos fenólicos, m = mitocôndria, n = núcleo, o = gota de óleo, p = plastídio, rer = retículo endoplasmático rugoso, v = vacúolo. Barras: 5 μm (A), 1 μm (B-C, E), 0,5 μm (D, F).

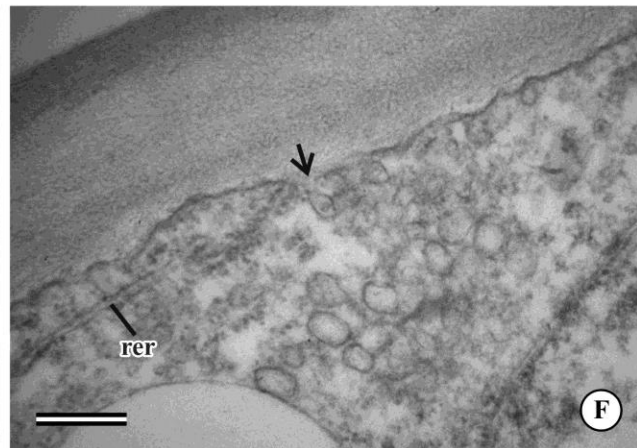
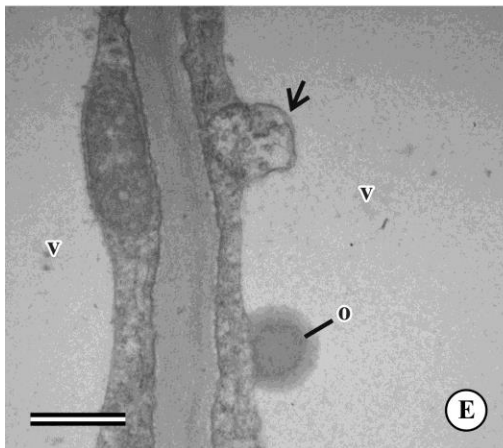
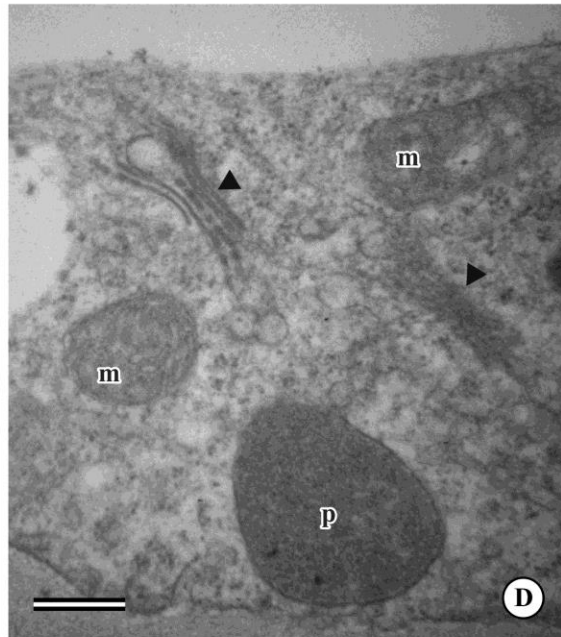
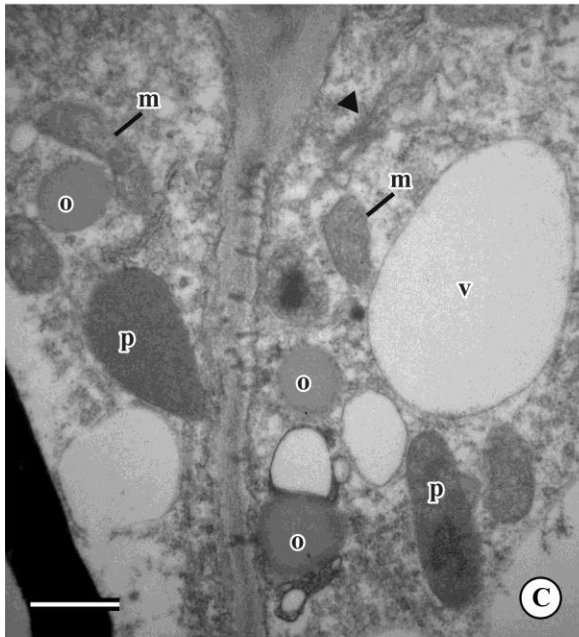
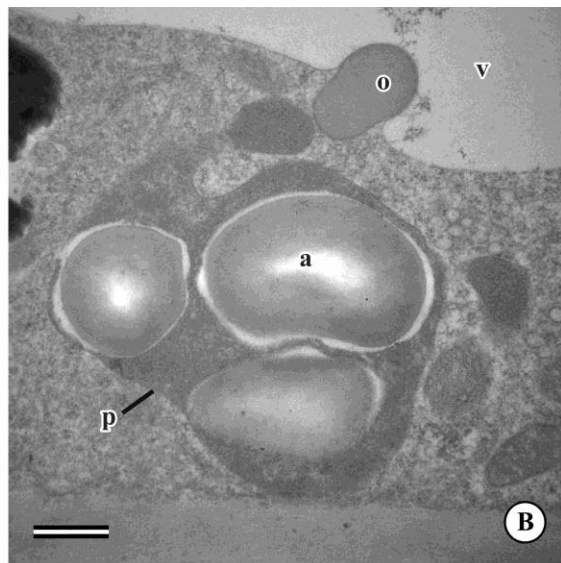
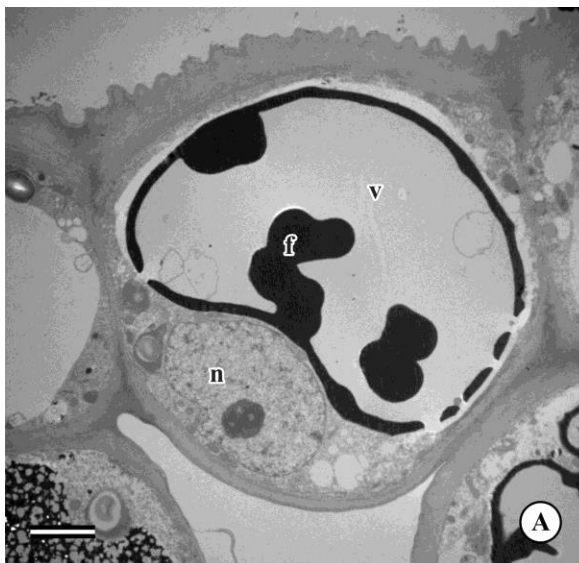


Figura 6: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Bauhinia rufa* (A-D, F) e *Bauhinia curvula* (E). A-F. Fase de liberação de compostos. A: Visão geral da célula com grande vacúolo e compostos fenólicos concentrados na periferia do tonoplasto. B-C: Detalhe do citoplasma com plastídios elétron-densos (B), retículo endoplasmático rugoso e corpo de Golgi (C). D-E: Observe as vesículas em contato com o vacúolo (D, seta) e os glóbulos no espaço periplasmático (E, seta). F: Detalhe da célula próxima à parede periclinal externa mostrando conteúdo elétron-denso na superfície (seta). e = espaço periplasmático, f = composto fenólico, g = corpo de Golgi, m = mitocôndria, n = núcleo, p = plastídio, pe = parede periclinal externa, rer = retículo endoplasmático rugoso, v = vacúolo. Barras: 5 μm (A), 1 μm (B-C, E-F), 0,5 μm (D).

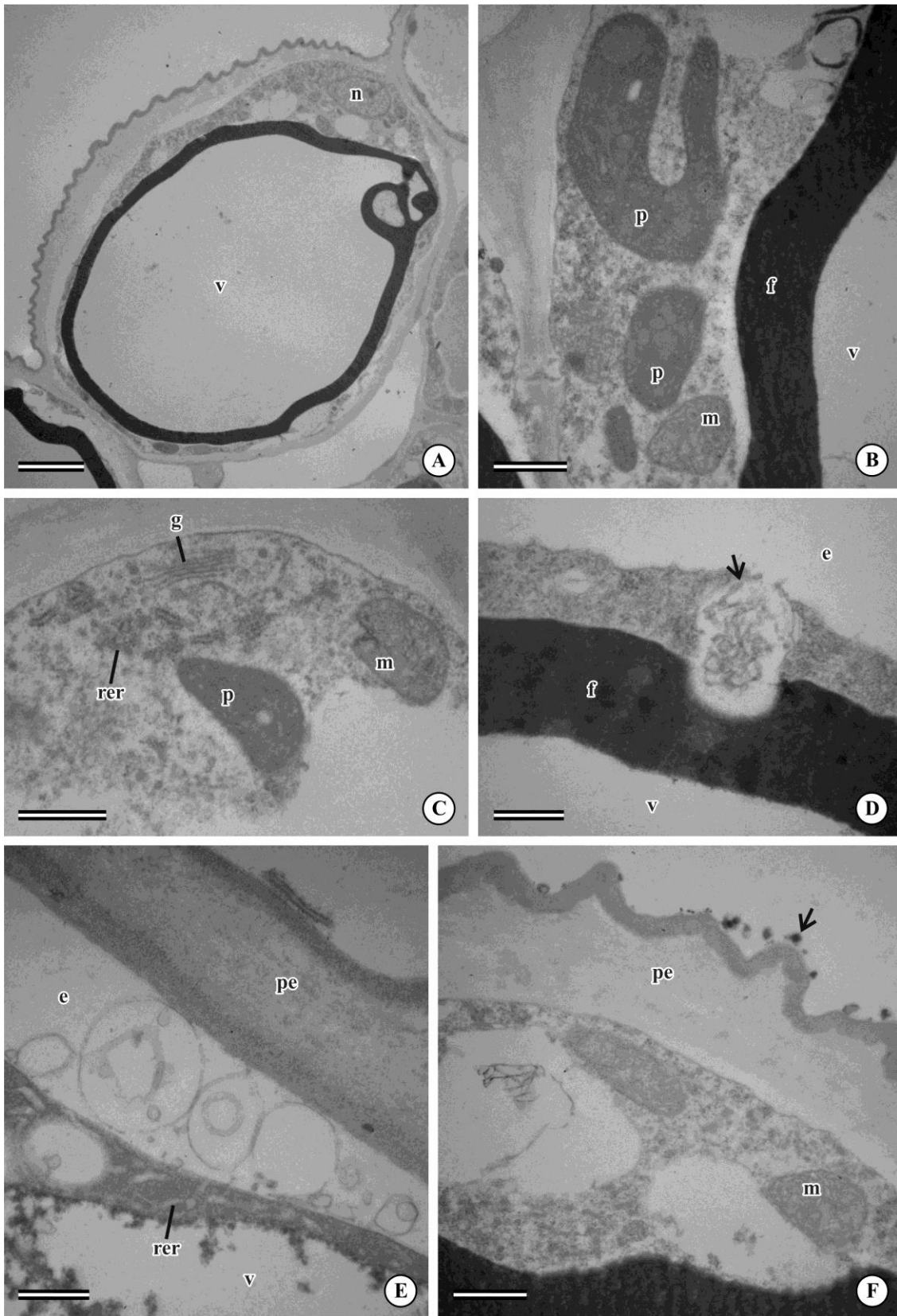
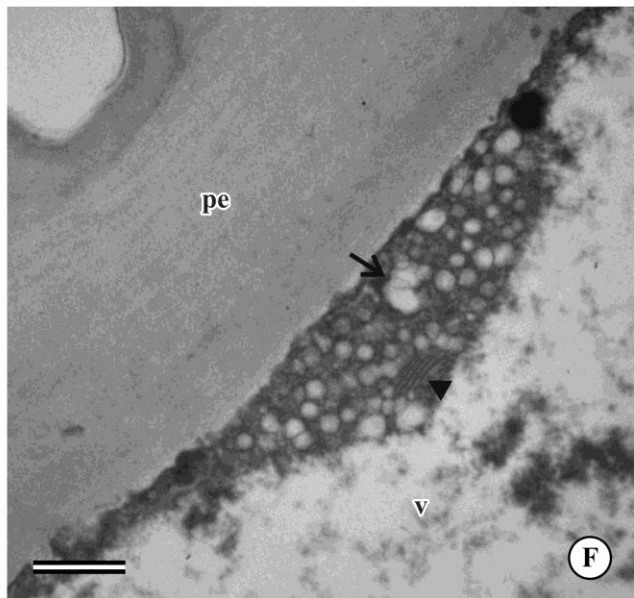
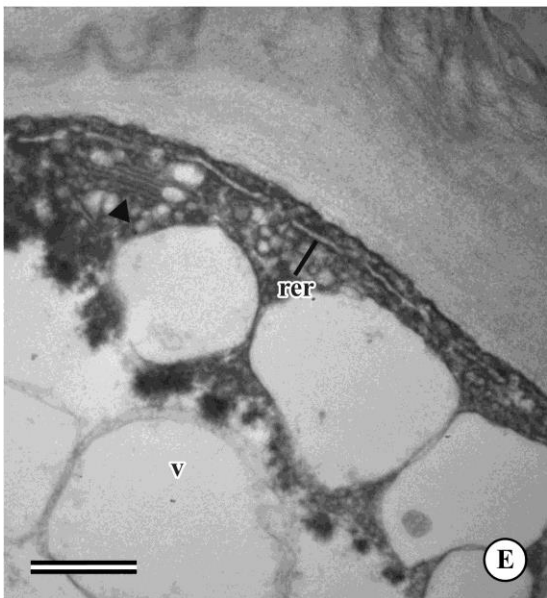
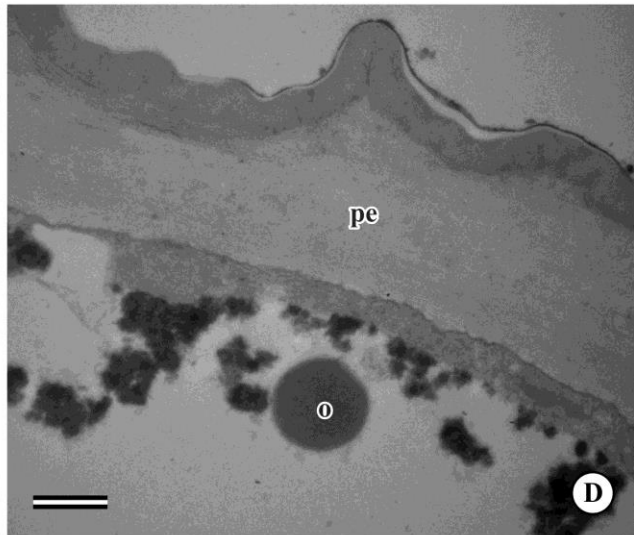
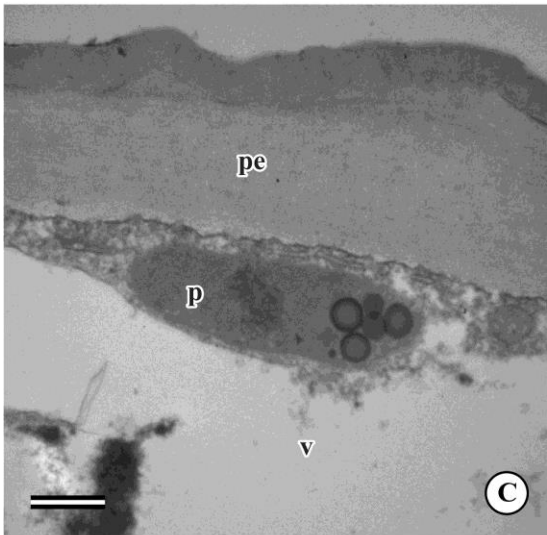
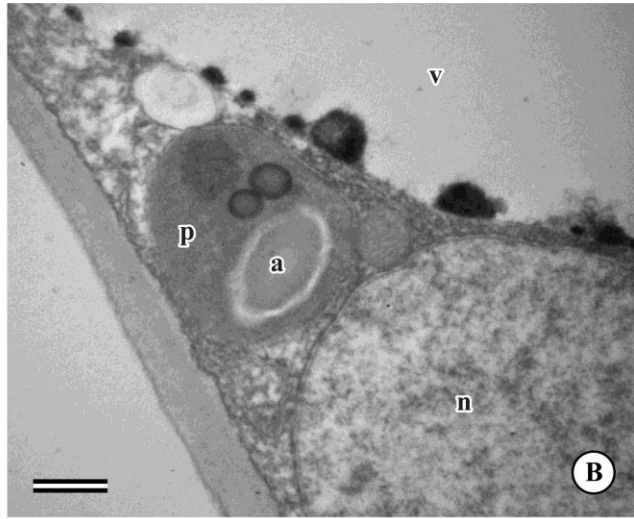
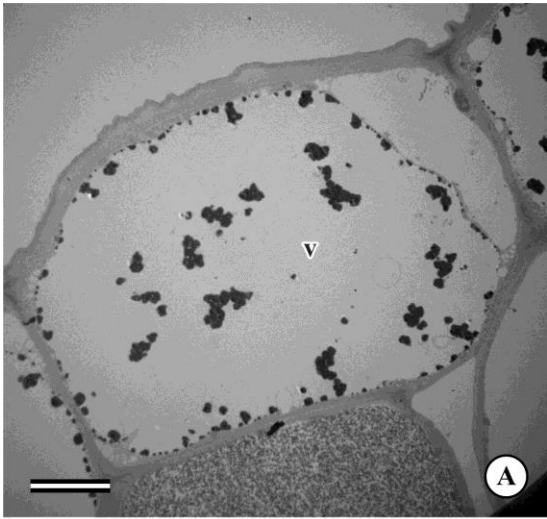


Figura 7: Eletromicrografias de osmóforos em pétalas de *Hymenaea courbaril*. A-F. Fase de liberação de compostos. A: Visão geral da célula com um grande vacúolo. B-C: Detalhe do citoplasma mostrando os plastídios com amido (B) e plastoglóbulos (B-C). D: Note a gota de óleo no vacúolo. E-F: Observe o citoplasma elétron-denso com retículo endoplasmático rugoso (E), várias vesículas (F) e corpo de Golgi (E-F, cabeças de seta). a = amido, n = núcleo, o = gota de óleo, p = plastídio, pe = parede periclinal externa, rer = retículo endoplasmático rugoso, v = vacúolo. Barras: 10 μm (A), 1 μm (B-F).



Discussão

A mobilização dos compostos fenólicos presentes no vacúolo, principalmente durante a antese (fase em que foi detectada a presença de pacotes de vesículas em contato com o tonoplasto), levanta a possibilidade das células dos osmóforos de *Bauhinia curvula*, *B. rufa* e *Hymenaea courbaril* estarem liberando voláteis com compostos aromáticos. Compostos fenólicos são frequentemente associados à defesa do vegetal, seja na proteção contra herbívoros e patógenos ou contra os danos causados pela radiação UV (Haslam 2007, Castro & Demarco 2008, Pollastri & Tattini 2011). No entanto, sabe-se que uma mesma estrutura secretora pode apresentar diferentes funções, o que depende de vários fatores, entre eles da fase de desenvolvimento do tecido/ órgão onde ela ocorre. Assim, considerando que as pétalas das espécies estudadas são expostas somente durante a noite e, portanto, não são sujeitas à radiação UV, o acúmulo prévio de compostos fenólicos no vacúolo das células osmofóricas destas espécies sugere que tais substâncias agem na defesa da flor contra fitófagos até o seu desenvolvimento completo e sua liberação na antese indica que participam da composição do odor floral responsável pela atração dos polinizadores. Apesar dos voláteis florais serem frequentemente associados à atração de polinizadores, estudos recentes demonstram que tais compostos podem desempenhar funções tanto na atração como na defesa da flor (Raguso 2009, Lucas-Barbosa *et al.* 2011). Essa função dupla dos voláteis é relatada, por exemplo, em *Ophrys sphegodes* (Orchidaceae), cuja flor emite substâncias voláteis atrativas ao polinizador durante a antese e desencorajadoras no período pós-polinização (Pichersky & Gershenzon 2002).

Características subcelulares comumente relatadas em osmóforos secretores de terpenos (ver Pridgeon & Stern 1983, Pridgeon & Stern 1985, Stern *et al.* 1987, Stpiczyńska 2001, Hadacek & Weber 2002, García *et al.* 2007, Melo *et al.* 2010, Plachno *et al.* 2010) foram detectadas nas espécies estudadas, tais como abundância de mitocôndrias com cristas conspicuas, presença de plastídios com plastoglóbulos, riqueza de retículo endoplasmático rugoso que podem ocorrer associados aos plastídios (ex. *Bauhinia curvula*) e presença de vesículas e gotas de óleo no citoplasma. A presença de plastoglóbulos nos plastídios corrobora o papel desta organela na produção dos terpenos, assim como o

consumo dos grãos de amido dos plastídios no decorrer da antese indica seu papel como fonte de carbono e energia para a produção dos voláteis, o que é bem relatado na literatura (Pridgeon & Stern 1983, Stern *et al.* 1987, Vogel 1990, Effmert *et al.* 2006, Melo *et al.* 2010, Płachno *et al.* 2010).

Porém, algumas características inéditas foram relatadas para os osmóforos. A vacuolização celular em estádios muito anteriores à antese floral, ocasionada pela deposição de compostos fenólicos no vacúolo, é incomum, visto que geralmente as células dos osmóforos se tornam vacuoladas somente durante ou após a antese, em consequência da liberação das substâncias produzidas (Pridgeon & Stern 1983, Vogel 1990, Effmert *et al.* 2006, García *et al.* 2007). Interessante notar também a riqueza de dictiossomos detectados em todas as fases do desenvolvimento das células dos osmóforos de *Hymenaea courbaril*, o que parece incomum em tal estrutura secretora (Pridgeon & Stern 1983, Pridgeon & Stern 1985, Stern *et al.* 1987, Stpiczyńska 2001, Hadacek & Weber 2002, García *et al.* 2007, Melo *et al.* 2010, Płachno *et al.* 2010). A presença de dictiossomos é frequentemente relatada em tecidos secretores que acumulam grande quantidade de amido (Fahn 1979), o que é o caso desta espécie, visto que o tamanho e número dos grãos em seus amiloplastos são maiores quando comparado com as outras espécies estudadas.

Em *Bauhinia curvula*, *B. rufa* e *Hymenaea courbaril* o transporte dos voláteis é granulócrino (Fahn 1979), considerando a presença de invaginações da membrana plasmática e de vesículas em contato com a membrana, assim como pela presença de conteúdo secretor no espaço periplasmático. As estruturas micelares (glóbulos) observadas neste compartimento se devem à presença de substâncias lipofílicas e hidrofílicas. O retículo endoplasmático rugoso observado na periferia celular indica sua participação no transporte, como relatado nos osmóforos de *Sauromatum guttatum* (Araceae, Skubatz *et al.* 1996). Além disso, a presença de corpos multivesiculares em contato com o tonoplasto e com a membrana plasmática indica não só a mobilização das gotas de óleo nestas estruturas (Skubatz *et al.* 1996, Hadacek & Weber 2002, Effmert *et al.* 2006), mas dos compostos fenólicos também.

O presente estudo traz informações inéditas a respeito do processo secretor de voláteis em osmóforos que acumulam terpenos e compostos fenólicos. Como esperado,

algumas características presentes nos osmóforos secretores de terpenos se repetem nas espécies estudadas. Entretanto, análises químicas dos voláteis liberados por estas espécies são necessárias a fim de se confirmar a participação dos compostos fenólicos na composição do odor.

Agradecimentos

Agradecemos à Fapesp (processos n°s 2008/55434-7 e 2009/01057-0) pelo apoio financeiro e aos técnicos Maria Dolores Seabra Ferreira e José Augusto Maulin (FMRP/ USP) pela assistência técnica.

Referências Bibliográficas

- Caissard J., Meekijjironenroj A., Baudino S., Anstett M. 2004. Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *American Journal of Botany* **91**: 1190–1199.
- Castro M., Demarco D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* **3**: 1273–1284.
- Dufaÿ M., Hossaert-McKey M., Anstett M.C. 2003. When leaves act like flowers: how dwarf palms attract their pollinators. *Ecology Letters* **6**: 28–34.
- Effmert U., Buss D., Rohrbeck D., Piechulla B. 2006. Localization of the synthesis and emission of scent compounds within the flower. In: Dudareva N., Pichersky E. (Eds.), *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: Taylor & Francis Group. Pp. 105–124.
- Endress P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. New York: Cambridge University Press.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- García M.T.A., Galati B.G., Hoc P.S. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora* **202**: 302–315.
- Hadacek F., Weber M. 2002. Club-shaped organs as additional osmophores within the *Sauromatum* inflorescence: odour analysis, ultrastructural changes and pollination aspects. *Plant Biology* **4**: 367–383.
- Haslam E. 2007. Vegetable tannins – lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* **68**: 2713–2721.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. 2009. *Plants systematics: A Phylogenetic Approach, 3rd ed.* Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.

- Jürgens A., Dötterl S., Meve U. 2006. The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae – Asclepiadoideae – Ceropegieae). *New Phytologist* **172**: 452–468.
- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137–138.
- Knudsen J.T., Gershenzon J. 2006. The chemical diversity of floral scent. In: Dudareva N., Pichersky E. (Eds.), *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: Taylor & Francis Group. Pp. 27–52.
- Knudsen J.T., Eriksson R., Gershenzon J., Ståhl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* **72**: 1–120.
- Lucas-Barbosa D., van Loon J.J.A., Dicke M. 2011. The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. *Phytochemistry* **72**: 1647–1654.
- Mansano V.F., Teixeira S.P. 2008. Floral anatomy of the *Lecointea* clade (Leguminosae, Papilionoideae, Swartzieae sensu lato). *Plant Systematic and Evolution* **273**: 201–209.
- Melo M.C., Borba E.L., Paiva E.A.S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141–151.
- Pichersky E., Gershenzon J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 237–243.
- Plachno B.J., Świątek P., Szymczak G. 2010. Can a stench be beautiful? – Osmophores in stem-succulent stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae-Stapeliinae). *Flora* **205**: 101–105.
- Pollastri S., Tattini M. 2011. Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany* **108**: 1225–1233.
- Pridgeon A.M., Stern W.L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **70**: 1233–1243.
- Pridgeon A.M., Stern W.L. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* **146**: 115–123.
- Raguso R. A. 2009. Floral scent in a whole-plant context: moving beyond pollinator attraction. *Functional Ecology* **23**: 837–840.
- Silva L.A., Guimarães E., Rossi M.N., Maimoni-Rodella R.C.S. 2011. Biologia da reprodução de *Mimosa bimucronata* – uma espécie ruderal. *Planta Daninha* **29**: 1011–1021.
- Simões C.M.O. 2007. Óleos voláteis. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora da UFSC. Pp. 467–495.
- Skubatz H., Kunkel D.D., Howald W.N., Trenkle R., Mookherjee B. 1996. The *Sauromatum guttatum* appendix as an osmophore: excretory pathways, composition of volatiles and attractiveness to insects. *New Phytologist* **134**: 631–640.
- Stern W.L., Curry K.J., Pridgeon A.M. 1987. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **74**: 1323–1331.
- Stpiczyńska M. 2001. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **70**: 91–96.

Vogel S. 1990. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington: Smithsonian Institution Libraries (Translated by S.S. Renner).

CAPÍTULO 4: Ontogeny resolves gland classification in two caesalpinoid legumes

Publicado – Trees (2013) 27:801–813/ doi 10.1007/s00468-012-0835-z

Abstract

Robust glandular appendages are reported in legumes of the Caesalpinieae tribe. Most studies only attempt to describe the external morphology of these structures, without providing a distinction between glandular trichomes and emergences. This study employed ontogeny to resolve the terminology of these structures present in flowers of two tropical woody legumes of Caesalpinieae, *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa*, through surface, anatomical and ultrastructural analyses. Flowers of both species exhibit branched and non-branched glandular trichomes since these structures originate from a single protodermal cell. Non-branched glandular trichomes occur on the inflorescence axis, pedicel, sepals and ovary; in *P. pluviosa* they also occur in the unguicle of wings and standard, filaments, anthers and style. This type of trichome shows a non-secretory multiseriate stalk and a secretory multicellular head. Branched glandular trichomes, with similar morphology but exhibiting non-secretory branches, occur in the inflorescence axis, pedicel and sepals; in *P. pluviosa* they also occur in the unguicle of wings. During the secretory phase, the trichome head cells have large nuclei, cytoplasm rich in vacuoles, oleoplasts, mitochondria, rough endoplasmic reticulum and free ribosomes. The content is released in the intercellular spaces of the head in a merocrinous mechanism and reaches the surface through cuticle rupture. We emphasized the importance of ontogenetic studies to clarify the terminology of secretory structures. This type of study should be performed in other caesalpinoids so that such robust glandular appendages can be correctly interpreted and used with phylogenetic value in the group.

Keywords: anatomy, Caesalpinieae, glandular emergences, ontogeny, glandular trichomes, ultrastructure.

Introduction

Superficial and robust secretory structures, similar to glandular trichomes, are found in approximately 100 species of Leguminosae belonging to the Caesalpinieae tribe (see Ragonese 1973; Leelavathi and Ramayya 1983; Lersten and Curtis 1994, 1996; Rudall et al. 1994; Lewis and Schrire 1995; Simpson and Miao 1997; Pascal et al. 2000; Warwick and Lewis 2009; Melo et al. 2010). Of these species only 11 present robust secretory structures on floral organs, what thus may constitute a synapomorphy, given their exclusive distribution in this group (S. P. Teixeira, unpublished data), which currently comprises 436 species (Lewis et al. 2005). Most studies focus only on the external morphology of such structures and little is known about their origin and developmental stages, which compromise their classification in glandular trichomes or emergences (see Fahn 1992).

Trichomes and emergences can be very similar with respect to shape and function, especially in fully developed organs (Werker 2000; Alquini et al. 2003; Souza 2003). The distinction between them can be solved with ontogenetic studies, according to the participation of different sets of meristematic cells during this process (Esau 1974; Fahn 1992; Werker 2000; Alquini et al. 2003; Souza 2003). Trichomes are derived from protodermal cells and have a highly variable structure, from uni- to multicellular, glandular or non-glandular, sessile or stalked. In addition to the shape, they can vary in number, location and function in the plant, which can be utilized for taxonomic purposes (Esau 1974; Fahn 1992; Glover and Martin 2000; Werker 2000; Alquini et al. 2003; Souza 2003). Unlike the trichomes, emergences result from protodermal and ground meristematic cells, are multicellular and can also vary in number, location and function in the plant (Ramayya 1964; Esau 1974; Fahn 1979; Werker 2000; Alquini et al. 2003; Souza 2003; Bottega et al. 2004; Noguera-Savelli et al. 2009).

The terminological confusion between trichome and emergence is longstanding. Fahn (1979), for instance, mentions the presence of glandular trichomes in *Cannabis sativa* (Cannabaceae), but drawings of these structures suggest that subepidermal cells also participate on the composition of the stalk, which thus indicates that they are emergences. Bottega (2004), investigating the ontogeny of floral glandular appendages of *Hypericum*

elodes (Hypericaceae), concluded that they are secretory emergences, although their morphology is similar to a glandular trichome.

There is an evident need for ontogenetic studies elucidating the origin of superficial secretory structures in order to correctly classify them. Thus, the aim of this study was to verify the origin and development stages to resolve the terminology of the secretory structures present on the surface of floral organs in two woody Caesalpinieae species, *Erythrostemon gilliesii* (Wall. ex Hook) Klotzsch and *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P.Queiroz. Ultrastructural aspects of these structures were also investigated in order to contribute to the knowledge of their subcellular characterization and secretion process. We also tried to open new taxonomic and phylogenetic discussions about this character in Caesalpinieae, a tribe of difficult circumscription.

Materials and Methods

Floral meristems, buds, flowers, inflorescence axes and vegetative branches of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* were collected in Alta Gracia, Argentina (31° 66' 67" S; 64° 43' 33" W), and Ribeirão Preto, Brazil (21° 17' 67" S; 47° 82' 08" W), respectively, fixed and processed for analyses under light microscopy, and scanning and transmission electron microscopy. Vouchers were deposited in herbaria under register numbers L. Galetto 2245 (CORD) for *E. gilliesii* and S.P. Teixeira et al. 49 (SPFR) for *P. pluviosa*.

The distribution and morphology of the glandular appendages were checked under scanning electron microscopy (SEM). Samples of flowers fixed in buffered formalin for 72 hours (Lillie 1965) were dehydrated by increasing ethanol series (Tucker 1993) and dried to the critical point with CO₂ in a Bal Tec CPD 030 dryer. The samples were mounted on stubs and gold-coated in a Bal Tec SCD 050 sputter coater (Robards 1978). The results were examined and documented in Jeol JSM-5800 LV and Zeiss IVO 50 scanning electron microscopes.

The origin and developmental stages of the glandular appendages were verified in meristems and buds previously fixed in buffered formalin, dehydrated in an ethanol series, embedded in historesin (Gerrits 1991) and sectioned on a rotatory microtome (4-5 μm thick). The sections were stained with 0.05% Toluidine Blue (O'Brien et al. 1964), and the images were obtained using a Leica DM 4500 B photomicroscope coupled to a Leica DFC 320 digital camera.

The subcellular characterization and secretion process of the glandular appendages were studied under transmission electron microscopy (TEM). Small portions of the floral organs from buds and flowers were fixed in Karnovsky's fixative (Karnovsky 1965) for 24 hours, post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) and embedded in araldite. The ultrathin sections (60 to 70 nm thick) were obtained using a Leica Reichert Ultracut S ultramicrotome, collected on copper grids covered with Formvar, contrasted with 2% uranyl acetate and lead citrate for 15 min each (Reynolds 1963) and examined in a Jeol 100CXII transmission electron microscope.

Results

Gland distribution

Glandular appendages with a robust stalk and large head occur on the inflorescence axis (Fig. 1a-c), flower pedicel, sepal abaxial surface (Fig. 1d) and ovary. In *Poincianella pluviosa* they have a wider distribution, also occurring on the wings and standard, especially on the unguicle surface (Fig. 1e, f), along the filaments (Fig. 1g), on the dorsal and ventral regions of the anthers and along the style (Fig. 1h). Such structures are also found on vegetative organs of *Erythrostemon gilliesii*, more specifically on the rachis and rachilla of the leaves, but they are less numerous and their distribution is more dispersed.

Similar glandular appendages, but with several non-secretory branches, were observed in both species, on the axis of the inflorescences, flower pedicel and sepal margin. In *Poincianella pluviosa* they are also seen on the unguicle of wings (Fig. 1f). They were also found on the rachis and rachilla of *P. pluviosa* leaves, but they are less frequent and

more dispersed.

Gland development

Throughout the whole development of the flowers of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa*, it is possible to observe the presence of totally developed glandular appendages together with others still in development.

Glandular appendages originate from a single protodermal cell, without participation of ground meristematic cells (Figs. 2a, 3a). The protodermal cell is distinguished from the adjacent cells by its dense cytoplasm, large and central nucleus and conspicuous nucleolus. This cell undergoes an anticlinal division, and the two resulting cells also undergo anticlinal divisions (Figs. 2b, 3b). The following divisions alternate in anticlinal and periclinal divisions (Figs. 2c-e, 3c-e), first resulting in an elongated multiseriate structure, without distinction between head and stalk (Figs. 2f, 3f). Posterior divisions occur at the apical region, resulting in a robust glandular trichome composed of a massive multicellular cup-shaped head in *Erythrostemon gilliesii* and spherical to cup-shaped head in *Poincianella pluviosa*, and an erect to procumbent multiseriate stalk, both covered by a thin cuticle (Figs. 2g, h and 3g, h).

The development of branched trichomes is the same as described above, the difference being that at the final stage some surface cells of the stalk elongate, forming unicellular non-secretory branches covered by cuticle (Figs. 2i, 3i).

Between the secretory (Figs. 4a-d, 6a-d) and post secretory (Figs. 5a-f, 7a-d) stages, a change in the size, shape and position of the nuclei and in the amount of some organelles is evident. During the secretory activity, cells of the trichome head present large and central nuclei (Figs. 4a, 6a). The cytoplasm displays numerous small vacuoles, mitochondria with evident cristae, rough endoplasmic reticulum, free ribosomes and large plastids. The plastids are spherical, with non-conspicuous thylakoids and small oil droplets, differing between the two species in terms of size, being larger in *P. pluviosa*. Golgi bodies with 3-4 cisternae and large drops of electron-dense lipids are also observed, but less often (Figs. 4b, c and 6b-d). In *E. gilliesii* cell walls are thick and the cellulose microfibrils are

loosely arranged (Fig. 4d); in *P. pluviosa* the walls are thin, with pectin and cellulose microfibrils closely packed. Both exhibit great amounts of plasmodesmata (Figs. 5e, 7b). In the post secretory phase, secretory cells present lobed nuclei (Fig. 5a), several mitochondria (Fig. 5b) and small vacuoles containing myelin-like structures (Figs. 5c, d and 7c). The release of substances occurs through granulocrine secretion; vesicles full of substances (Fig. 4d) fuse with the plasmalemma releasing their content to the intercellular spaces, without cell lysis. In these spaces the degradation of the middle lamella is notable, although the cell wall remains intact (Figs. 5d, 7a). After filling the intercellular spaces, the substances reach the plant surface by cuticle rupture (Fig. 5f).

The cells of the trichome stalk are non-secretory, have numerous vacuoles and a nucleus on the cell periphery. The cytoplasm has few mitochondria and elongated plastids (without osmiophilic inclusions) and the cell walls are thick, with numerous plasmodesmata, and covered by a thin layer of cuticle (Fig. 7d).

Fig 1 Distribution of glandular trichomes in flowers of *Erythrostemon gilliesii* (A-B, D) and *Poincianella pluviosa* (C, E-H). Photographs (A-C) and electron micrographs (D-H). A-C: Inflorescences. In B, note the reddish glandular trichomes on the stalk of the inflorescence and pedicel of flowers. D: Abaxial surface of the sepal. E: Abaxial surface of the standard unguicle. F: Abaxial surface of the wing unguicle. G: Filament. H: Style. The arrows indicate the non-branched glandular trichomes and the arrowheads (F) show the branched glandular trichomes.

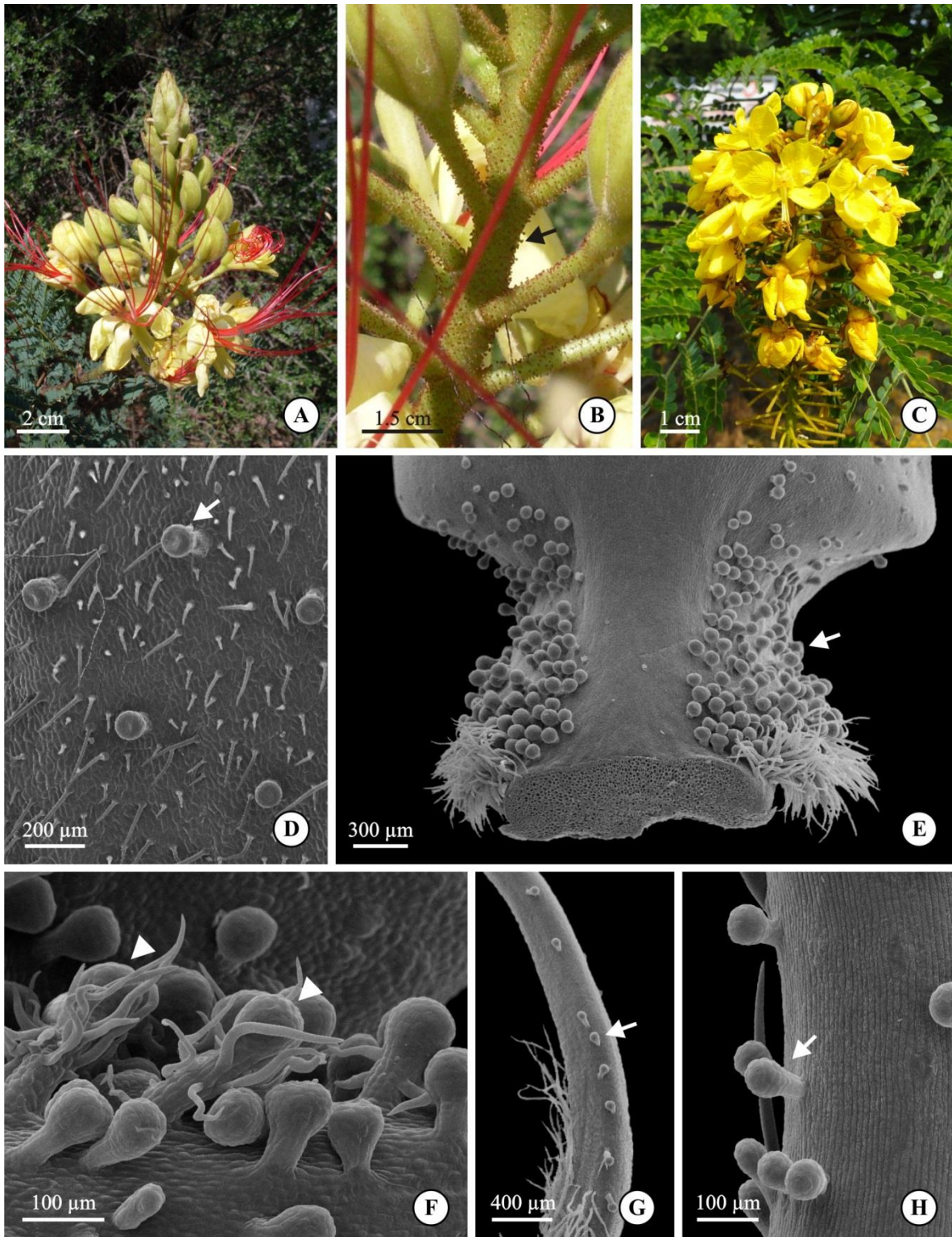


Fig 2 Photomicrographs of the developing glandular trichome in *Erythrostemon gilliesii*. A: Protodermal cell in anticlinal division. B: Second and third anticlinal divisions. C-F: Successive anticlinal and periclinal divisions cause the elongation of the trichome. G-H: Developed trichome. Note the cup-shaped head (G) and the cells with conspicuous central nucleus and small vacuoles (H). I: Branched trichomes at the initial development of non-secretory branches (arrowheads).

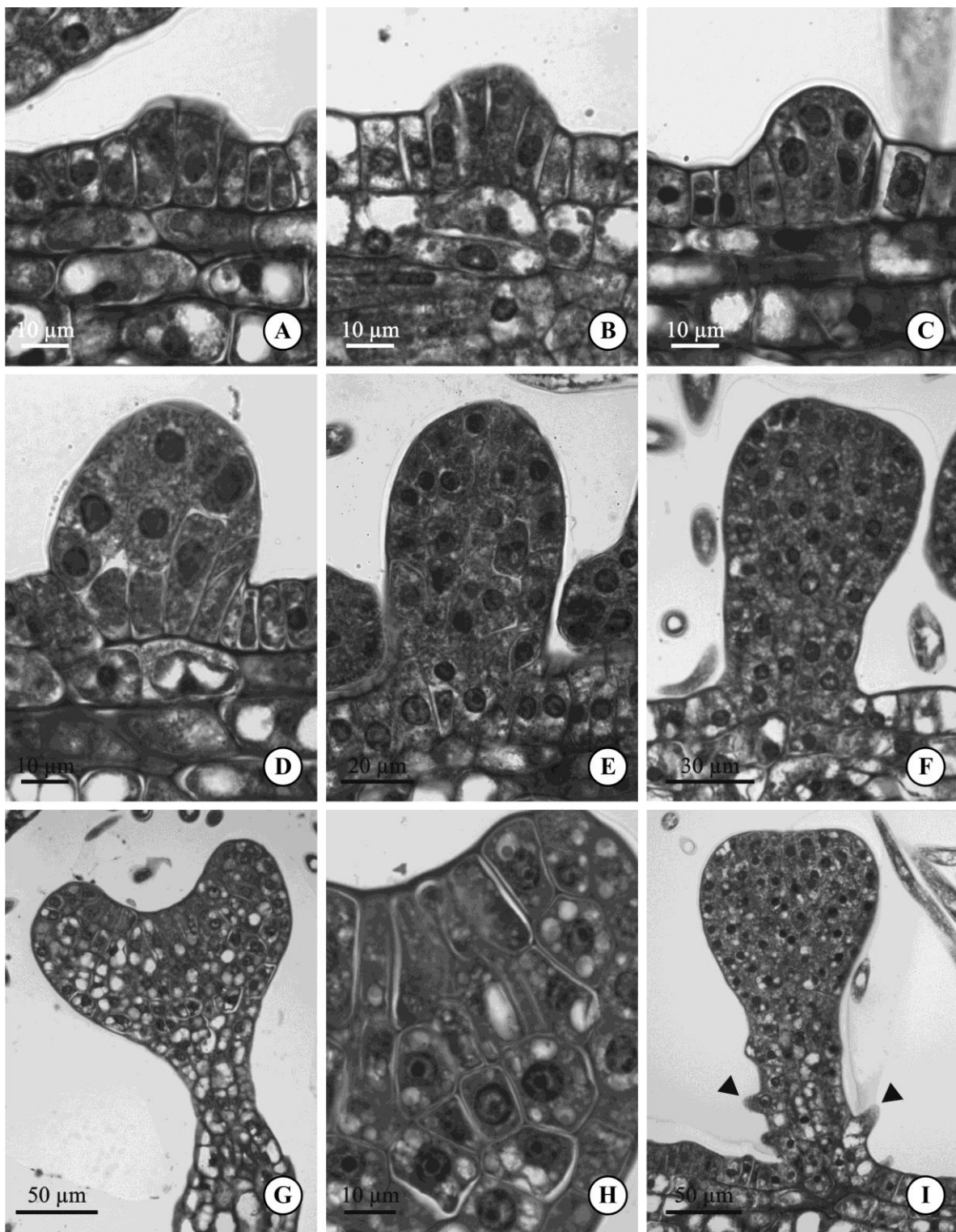


Fig 3 Photomicrographs of the developing glandular trichome in *Poincianella pluviosa*. A: First anticlinal division of a protodermal cell resulting in two cells. B: Second anticlinal division. C-F: Successive anticlinal and periclinal divisions. G-H: Developed trichome. Note the spherical shape of the head (G) containing cells with plastids and small vacuoles (H). I: Branched trichome at the first developmental stage of a non-secretory branch (arrowhead).

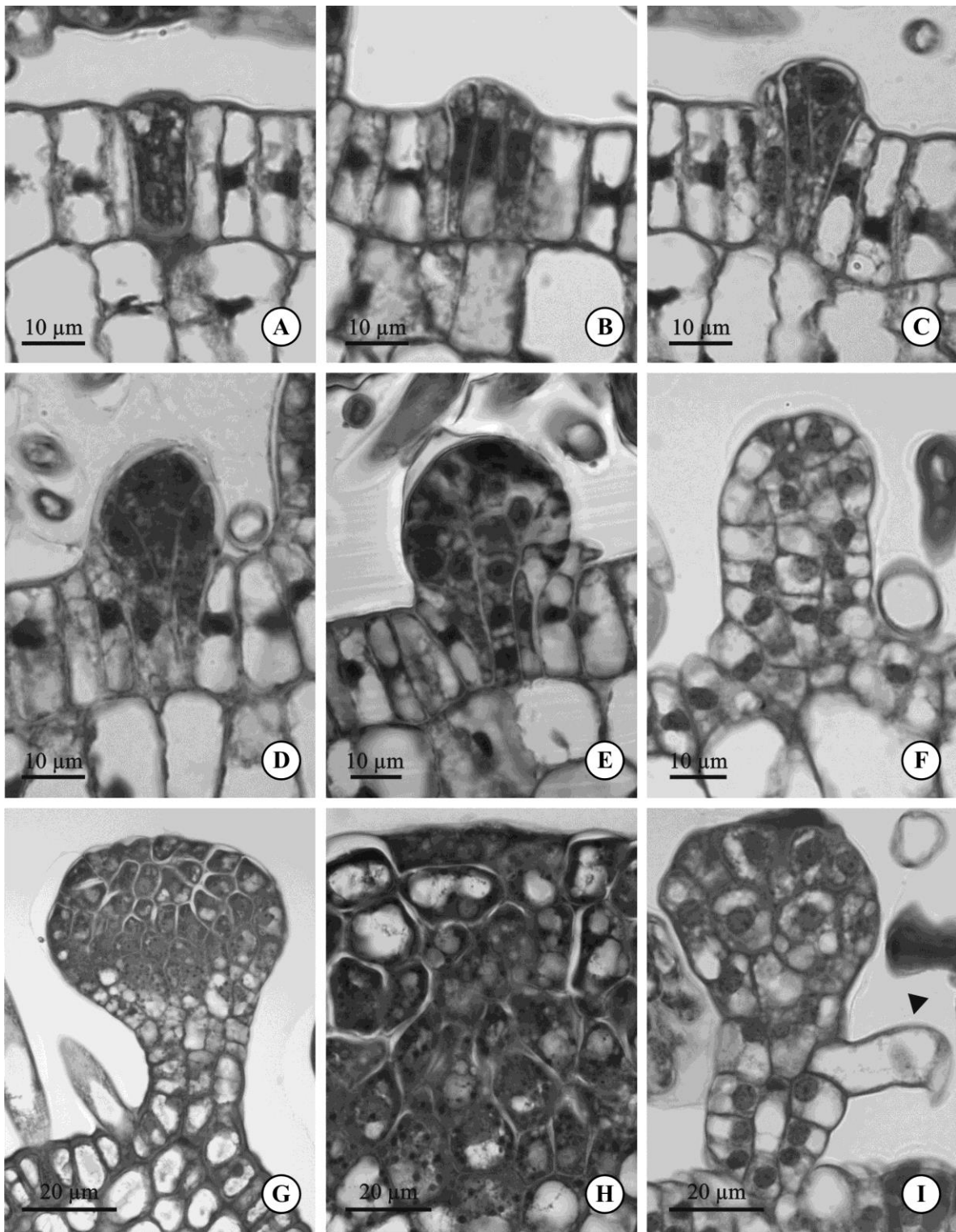


Fig 4 Electron micrographs of the secretory cells of *Erythrostemon gilliesii* trichome head at the secretory phase. A: An overview of the cell with conspicuous and centralized nucleus (n) and numerous small vacuoles (v). B-C: Details of the cytoplasm with plastids (p) containing osmiophilic inclusions and associated rough endoplasmic reticulum (rer), mitochondria (m), Golgi body (g) and oil droplets (o). D: Detail of the cell wall between two secretory cells showing the loose arrangement of cellulose microfibrils and the fusion of filled vesicles with the plasmalemma (arrowheads).

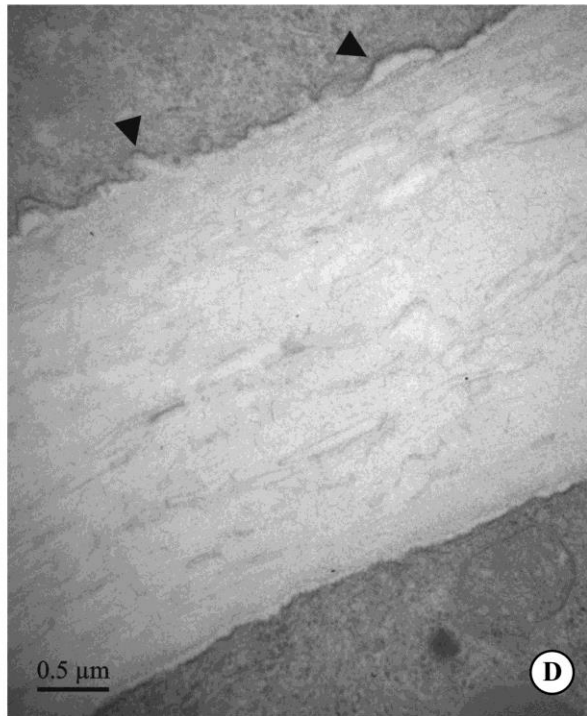
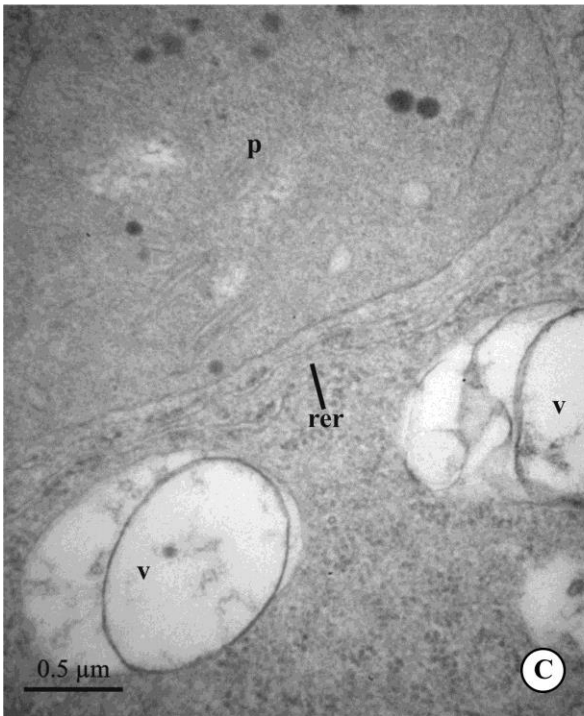
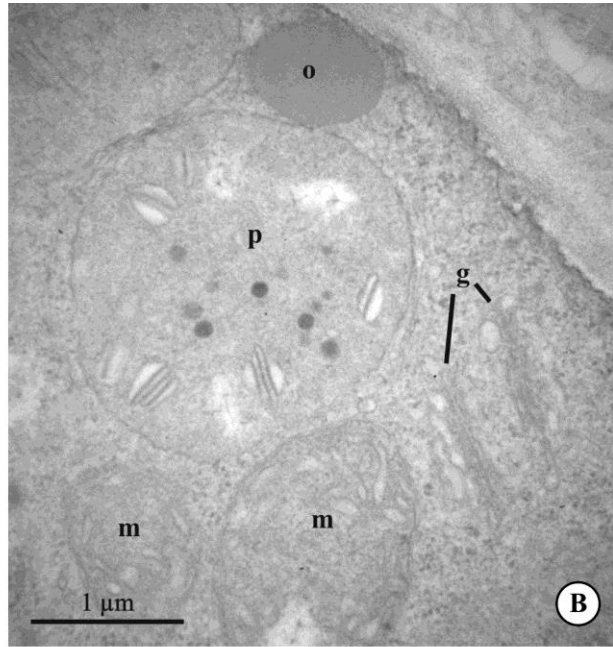
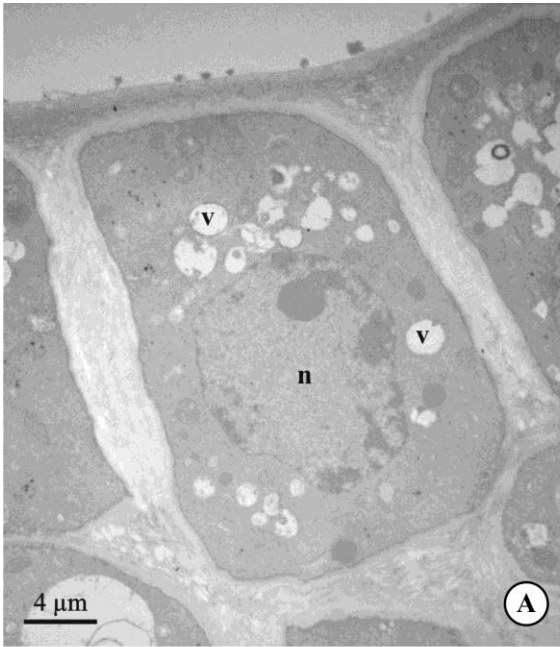


Fig 5 Electron micrographs of the secretory cells of *Erythrostemon gilliesii* trichome head in the post secretory phase. A: Overview of the cell showing the lobed nucleus (n). B-C: Details of the cytoplasm containing plastids (p), oil droplets (o), several mitochondria (m) and myelin-like structures in vacuoles (mf). D-E: Details of the cell wall between secretory cells showing substances accumulated in the intercellular space (D, arrowhead) and plasmodesmata (E, arrow). F: Detail of the trichome head showing the cuticle rupture (arrowhead) through which the produced substances are released.

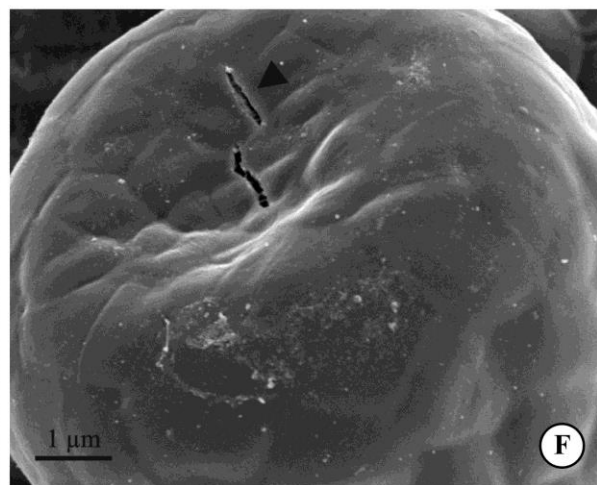
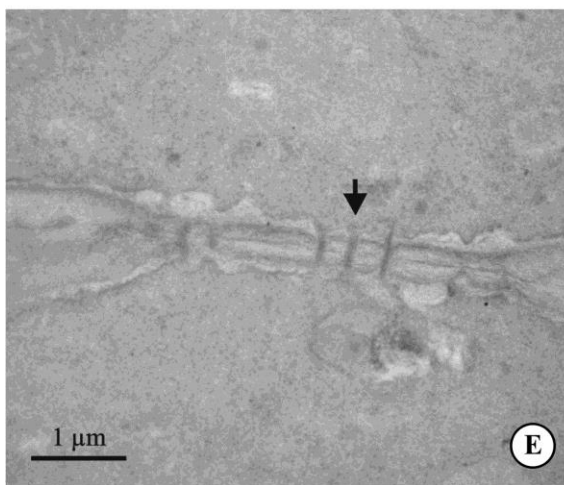
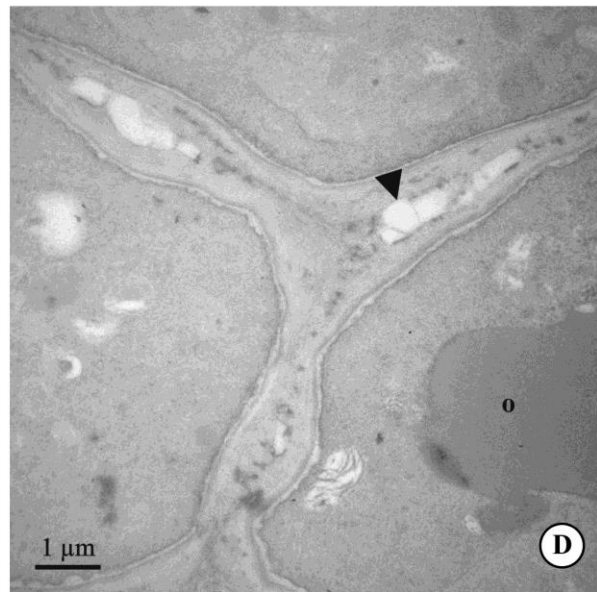
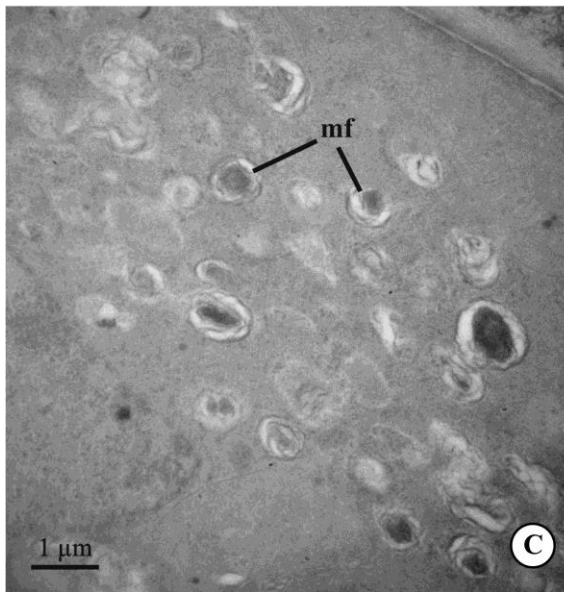
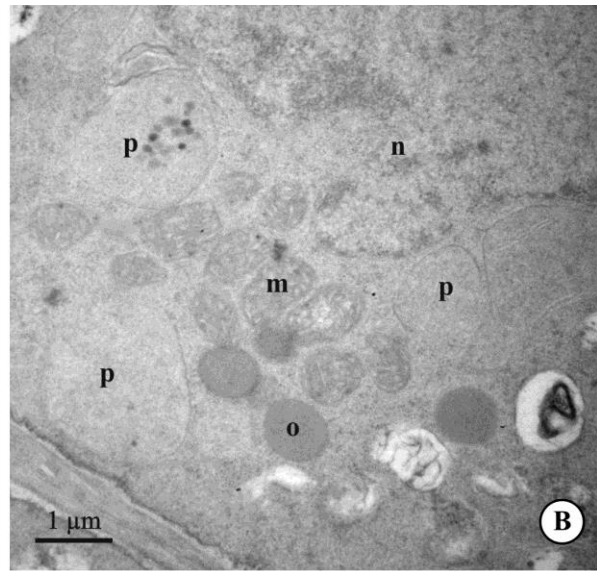
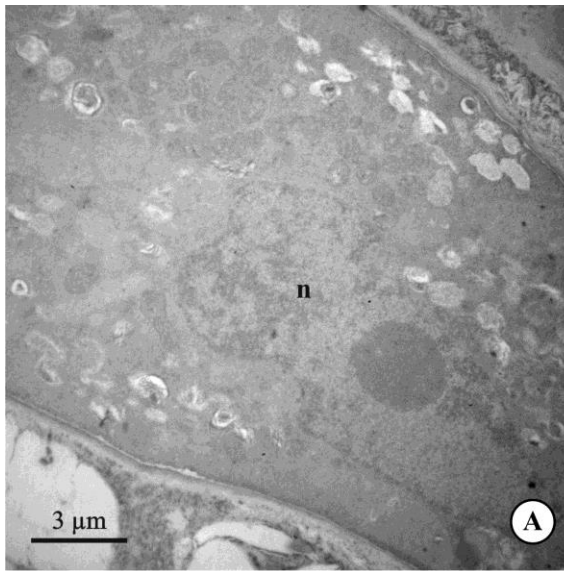


Fig. 6: Electron micrographs of the secretory cells of *Poincianella pluviosa* trichome head in the secretory phase. A: Overview of the cell showing the central nucleus (n) and many plastids (p). B-D: Details of the cytoplasm containing plastids (p) with osmiophilic inclusions, oil droplets (o), mitochondria (m), Golgi body (g) and rough endoplasmic reticulum (rer).

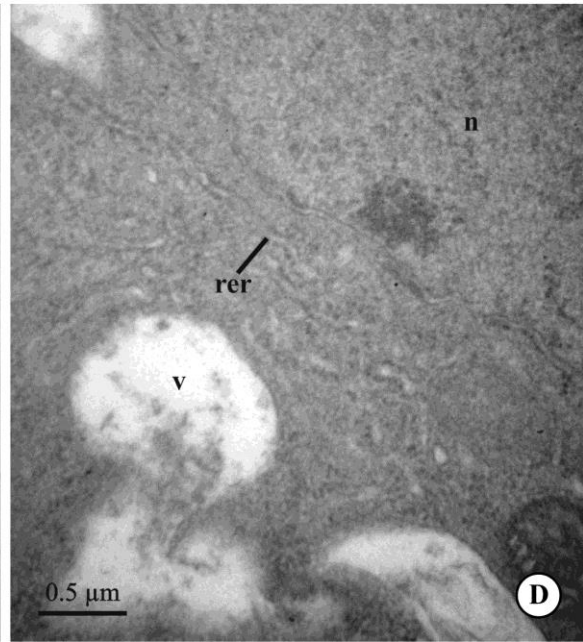
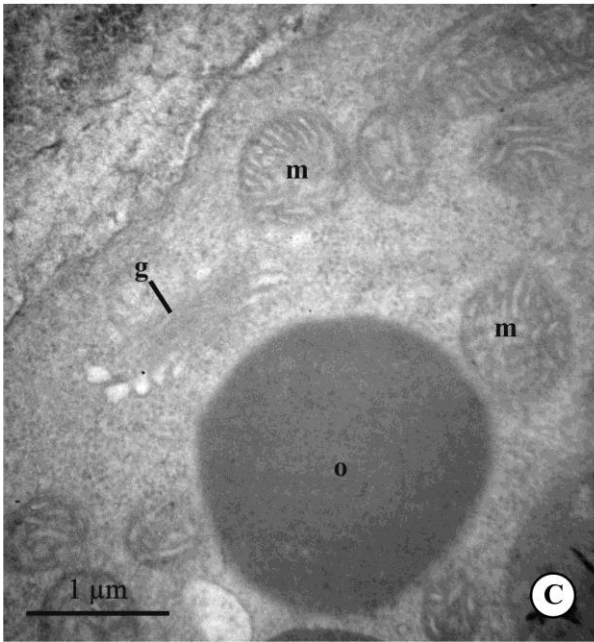
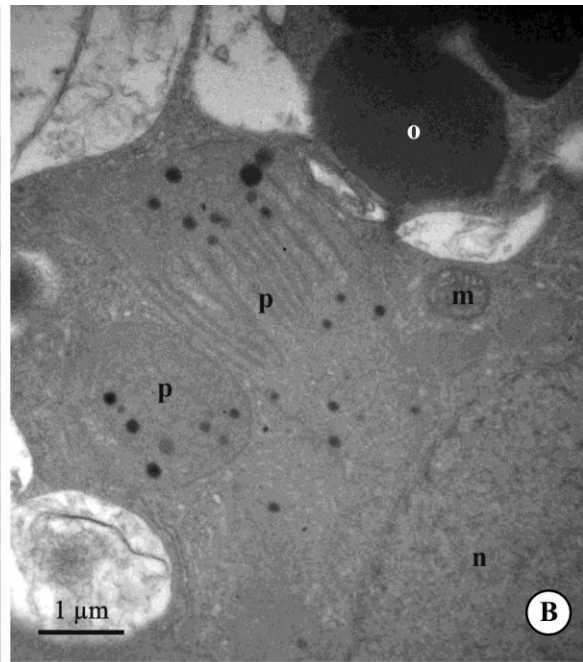
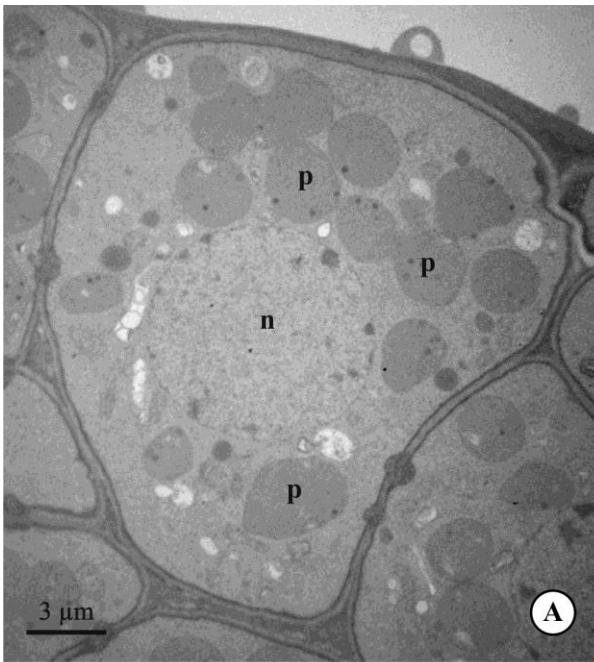
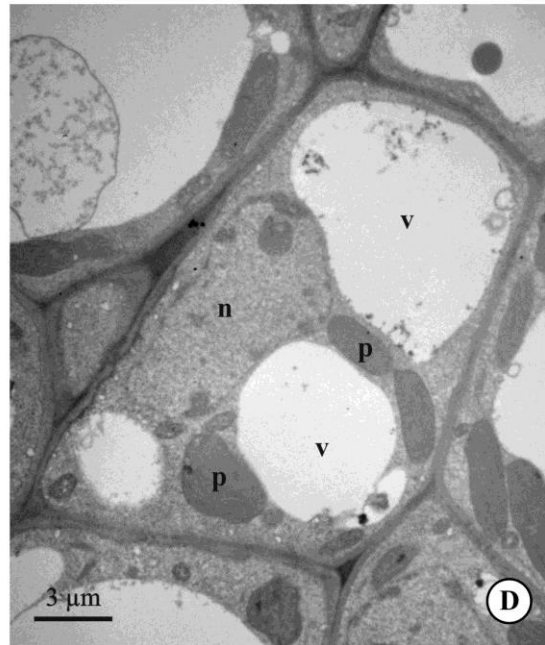
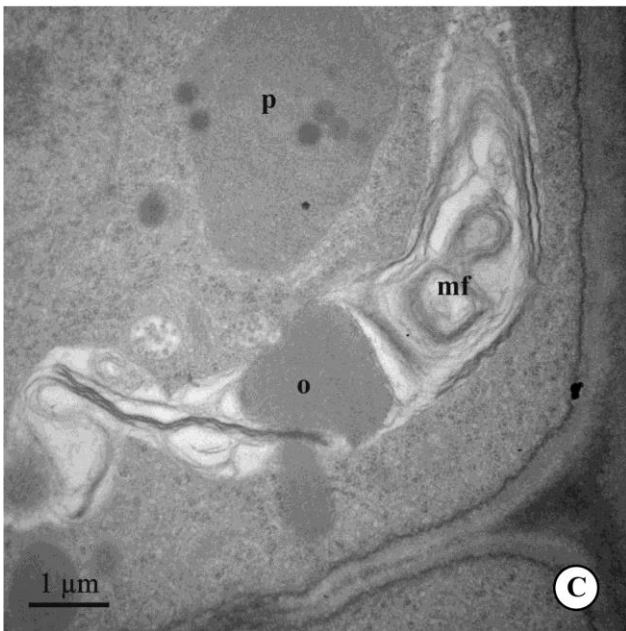
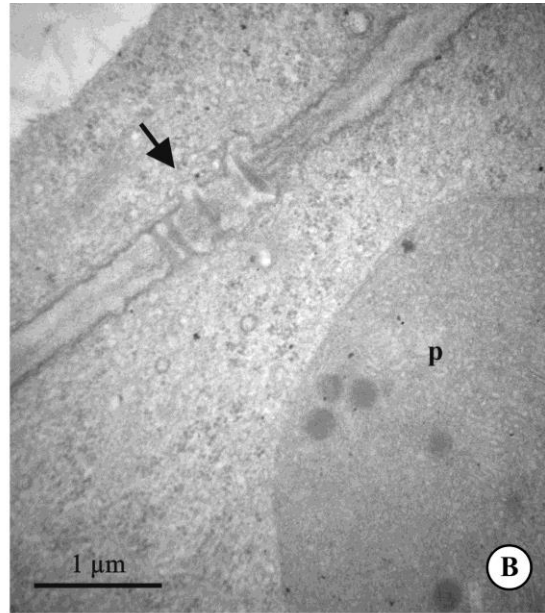
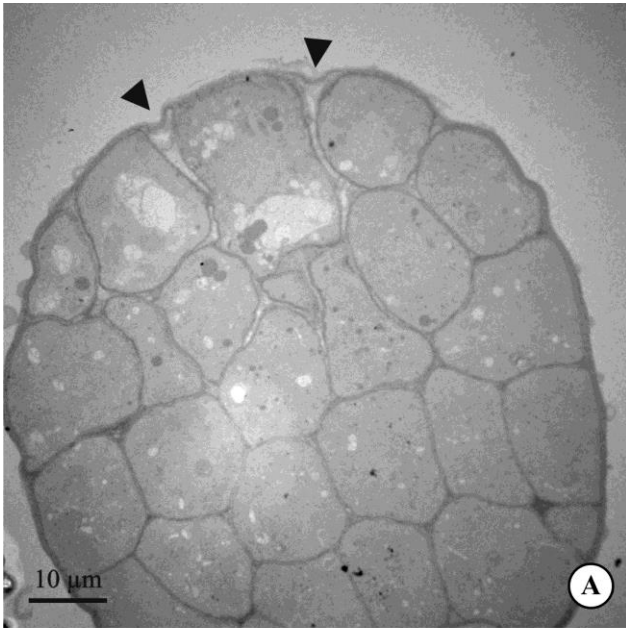


Fig 7 Electron micrographs of the secretory trichome cells of *Poincianella pluviosa* in post secretory phase. A: Overview of the secretory head; arrowheads indicate the intercellular spaces where the release of substances produced takes place. B-C: Details of the cytoplasm of the head cells showing plasmodesmata (B, arrow), plastids (p) and vacuole containing oil droplets (o) and myelin-like structures (mf). D: Overview of a non-secretory cell of the stalk with peripheral nuclei (n), large vacuoles (v) and plastids (p) without osmiophilic inclusions.



Discussion

Erythrostemon gilliesii and *Poincianella pluviosa* exhibit robust glandular trichomes widely distributed in their floral organs and sparsely distributed in their vegetative organs. The classification as glandular trichomes has followed the definitions of Esau (1974), Fahn (1979), Werker (2000), Alquini et al. (2003) and Souza (2003), with morphology consistent with that of a typical multicellular glandular trichome, composed of a multicellular secretory head, multiseriate stalk and basal cells (Werker 2000). The similarity between these trichomes and secretory emergences is due to the presence of a robust multiseriate stalk, which in this case is the result of the first anticlinal division of the protodermal cell, as is also observed in *Artemisia campestris* (Asteraceae – Ascensão and Pais 1987), *A. annua* (Asteraceae – Duke and Paul 1993) and *Leonotis leonurus* (Lamiaceae – Ascensão and Pais 1998). The following alternating anti- and periclinal divisions provide the robust aspect observed in the trichomes.

The glandular branched trichome is rarely found in the studied species and other legumes and consists of a variation of the basic morphology of the robust glandular trichome, in which non-secretory branches originate from a stalk cell. Unlike the robust glandular trichome, found in approximately 100 species of the Caesalpinieae tribe, the branched glandular trichome was only described in flowers of two other caesalpiniods: *Caesalpinia exostemma* and *Cenostigma gardnerianum* (Rudall et al. 1994).

Both species studied present inconsistencies regarding the genera which they are circumscribed, thereby demonstrating their involvement in complex and still undefined taxonomic issues. Valid combinations are the following: *Erythrostemon gilliesii* presents as basionym *Poinciana gilliesii* Wall. ex Hook. and as valid combination *Caesalpinia gilliesii* (Wall. ex Hook.) D. Dietr.; *Poincianella pluviosa* presents as basionym *Caesalpinia pluviosa* DC. The taxonomic position of several other species belonging to the Caesalpinieae tribe, which also exhibit a similar robust glandular trichome, are also subjected to debate, for example, those belonging to the genera *Balsamocarpon*, *Brasilettia*, *Delonix*, *Hoffmanseggia*, *Libidibia*, *Schizolobium* and *Stahlia*. The search for characters with taxonomic value already established in the literature, as glandular trichomes, would

greatly facilitate the circumscription of these groups in the tribe (Lewis et al. 2005; Queiroz 2009; Tropicos.org 2012). Moreover, the difference on the distribution of non-branched and branched glandular trichomes in the vegetative organs of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* reinforces its importance as an additional support to resolve taxonomic problems among the genera of Caesalpinieae.

The ultrastructural distinctions noted between the cells of the head and the stalk of the glandular trichomes in *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* showed that the stalk is non-secretory, as observed in *Artemisia annua* (Asteraceae – Duke and Paul 1993). The high metabolic activity in the secretory cells of the trichome head related to the production of certain substances can be demonstrated by the presence of a dense cytoplasm, conspicuous and large nucleus, numerous small vacuoles and mitochondria (Lüttge 1971; Akers et al. 1978; Pridgeon and Stern 1983; Endress 1994; Fahn 2000). The presence and quantity of other organelles may vary according to the substances secreted (Fahn 1992). The large amount of rough endoplasmic reticulum, free ribosomes and Golgi bodies suggests that secretory cells of trichomes produce mucilage (Ascensão and Pais 1998) and/or protein substances (Fahn 1988; Healy et al. 2009). The presence of numerous large plastids containing osmiophilic inclusions also indicates that the trichomes are involved in the synthesis of lipophilic substances (Werker and Fahn 1981; Fahn 1988). Glandular trichomes actually exhibit a great diversity in the chemical nature of exudate, such as polysaccharides, sugars, salts, resins, lipids and proteins, and can secrete more than one type of substance (Werker 2000). *Leonotis leonurus* (Lamiaceae - Ascensão and Pais 1998) and *Inula viscosa* (Asteraceae - Werker 2000) are other examples of species that exhibit trichomes producing mixed nature substances (lipophilic, protein and polysaccharide).

During the post secretory phase, the cytoplasm densification, appearance of vacuoles with myelin-like structures and proliferation of mitochondria in the head cells of the *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* trichomes demonstrate the beginning of cellular degeneration, probably by programmed cell death (Baird et al. 1978; Winter 1982; Ascensão and Pais 1998; van Doorn and Woltering 2005; Papini et al. 2010), a phenomenon already reported in cells of secretory structures in post-secretory stages (Paiva

and Machado 2004; Marinho et al. 2011; Rodrigues et al. 2011; Denardi et al. 2012; Liu et al. 2012).

The functions of glandular trichomes can be highly variable according to their location, secreted substances and time of activity (Werker 2000). The presence of lipids and mucilage indicates they could act as repellents against herbivores (Fahn 1979), as previously found for the glandular trichomes of *Salvia officinalis* (Labiatae, Corsi and Bottega 1999) and *Zeyheria montana* (Bignoniaceae) (Machado et al. 2006). This together with the fact that the glandular trichomes are secreting from the very early stages of the flower development to its maturity and are distributed over the entire abaxial surface of the sepals suggests that in *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* these structures may have a chemical defense function against herbivores and pathogens (Werker and Fahn 1981; Werker 2000). However, ecophysiological studies are necessary to confirm these inferences.

The large number of plasmodesmata found in the glandular trichomes of the studied species characterizes the high transport activity that occurs between cells, due to the need to mobilize sources of energy and carbon for the exudates synthesis (Waigmann and Zambryski 2000; Wagner et al. 2004), in addition to allowing the mobility of the content produced until they reach the release sites. Plasmodesmata are structures commonly found in trichomes specialized in secretion of nectar, terpenes and phenolic compounds (Waigmann and Zambryski 2000).

Erythrostemon gilliesii and *Poincianella pluviosa* are species that have an unusual way of releasing the substances produced in the head of their glandular trichomes, since generally the release of content produced by trichomes occurs through the accumulation of substances in the subcuticular space and their subsequent release to the external environment through the cuticle rupture (Ascensão and Pais 1987; Fahn 1988; Duke and Paul 1993; Ascensão et al. 2001; Machado et al. 2006; Appezzato-da-Glória et al. 2012), cuticle pores (Fahn 1979; 1988; Ascensão and Pais 1998) or even by diffusion when the cuticle that covers the trichome is thin (Fahn 1988; 2000; 2002). In the studied species, the secretion products are collected in small vesicles that fuse with the plasmalemma, characterizing the granulocrine secretion type, according to Fahn (1979). They accumulate

in the intercellular spaces located at the most apical region of the trichome head. As the intercellular space region is more fragile than regions where there are cells, reentrances are formed in these areas. Despite this different site of substance accumulation (intercellular spaces at the apical region of the trichome head), the release of substances to the outside of the trichome occurs through cuticle rupture, which is commonly found in glandular trichomes of other plant species (see Ascensão and Pais 1987; Fahn 1988; Duke and Paul 1993; Ascensão et al. 2001; Machado et al. 2006; Appezzato-da-Glória et al. 2012).

Careful studies concerning the distribution, morphology and ontogeny of glandular trichomes in certain taxa could be important tools in an attempt to elucidate taxonomic questions (Dickinson 2000). The similarities in the development, the population of organelles and the manner of releasing the content of trichomes of *Erythrostemon gilliesii* and *Poincianella pluviosa* suggest that the robust glandular trichomes are a homologous condition in the Caesalpinieae tribe. This tribe is paraphyletic and has been constantly re-examined and investigated as to its generic and infrageneric subdivisions (Lewis et al. 2005). Developmental studies of the glandular appendages should be conducted in other members of the tribe in order to interpret them correctly and determine if they are homologue structures and considered as a synapomorphy for the group.

Acknowledgements

We thank to Edimárcio S. Campos (FCFRP/USP), Maria Dolores S. Ferreira, José Augusto Maulin (FMRP/USP) and Rodrigo F. Silva (FFCLRP/USP) for technical assistance; and Dewey Litwiller (University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada) for English review. This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process numbers 2008/55434-7, 2009/01057-0, 2009/17642-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (process number 301960/2009-7).

References

- Akers CP, Weybrew JA, Long RC (1978) Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L., cv Xanthi. *Am J Bot* 65:282–292
- Alquini Y, Bona C, Boeger MRT, Costa CG, Barros CF (2003) Epiderme. In: Appezzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM (eds) *Anatomia Vegetal*, 2nd ed. UFV, Viçosa, pp 87–107
- Appezzato-da-Glória B, Costa FB, Silva VC, Gobbo-Neto L, Rehder VLG, Hayashi AH (2012) Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena* species (Vernonieae – Asteraceae): Structure, ultrastructure and chemical composition. *Flora* 207:878–887
- Ascensão L, Pais MSS (1987) Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Bot Gaz* 148:221–227
- Ascensão L, Pais MS (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonorus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann Bot* 81:263–271
- Ascensão L, Silva JAT, Barroso JG, Figueiredo AC, Pedro LG (2001) Glandular trichomes and essential oils of *Helichrysum stoechas*. *Isr J Plant Sci* 49:115–122
- Baird LAM, Reid PD, Webster BD (1978) Ultrastructural modifications associated with the induction of abscission in *Coleus*. *Bot Gaz* 139:165–170
- Bottega S, Garbari F, Pagni AM (2004) *Hypericum elodes* L. (Clusiaceae): the secretory structures of the flower. *Isr J Plant Sci* 52:51–57
- Corsi G, Bottega S (1999) Glandular hairs of *Salvia officinalis*: new data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Ann Bot* 84:657–664
- Denardi JD, Oliveira DMT, Paiva EAS (2012) Glandular trichomes in *Connarus suberosus* (Connaraceae): distribution, structural organization and probable functions. *Rev Biol Trop* 60:505–513
- Dickison WC (2000) *Integrative plant anatomy*. Academic Press, San Diego
- Duke OS, Paul RN (1993) Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci* 154:107–118
- Endress PK (1994) *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge
- Esau K (1974) *Anatomia das plantas com sementes*. Edgard Blucher, São Paulo
- Fahn A (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London
- Fahn A (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol* 108:229–257
- Fahn A (1992) *Plant anatomy*, 4th ed. Pergamon Press, Oxford
- Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. *Adv Bot Res* 31:37–75
- Fahn A (2002) Functions and location of secretory tissues in plants and their possible evolutionary trends. *Isr J Plant Sci* 50:59–64
- Gerrits PO (1991) The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology, State University Groningen, Netherlands
- Glover BJ, Martin C (2000) Specification of epidermal morphology. *Adv Bot Res* 31:193–217

- Healy RA, Palmer RG, Horner HT (2009) Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecea. *Int J Plant Sci* 170:444–456
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138
- Leelavathi P, Ramayya N (1983) Structure, distribution and classification of plant trichomes in relation to taxonomy II. Caesalpinioideae. *Indian J For* 6:43–56
- Lersten NR, Curtis JD (1994) Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. *Plant Syst Evol* 192:231–255
- Lersten NR, Curtis JD (1996) Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Syst Evol* 200: 21–39
- Lewis GP, Schrire BD (1995) A reappraisal of the *Caesalpinia* group (Caesalpinioideae: Caesalpinieae) using a phylogenetic analysis. In: Crisp MD, Doyle JJ (eds) *Advances in Legume Systematics: Phylogeny*, part 7. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp 41–52
- Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005) *Legumes of the world*. The Royal Botanic Gardens, Kew
- Lillie RD (1965) *Histopathologic technic and practical histochemistry*, 3rd ed. McGraw-Hill Book Company, New York
- Liu P, Liang S, Yao N, Wu H (2012) Programed cell death of secretory cavity cells in fruits of *Citrus grandis* cv. Tomentosa is associated with activation of caspase 3-like protease. *Trees - Struct Funct* 26:1821–1835
- Lüttge U (1971) Structure and function of plant glands. *Ann Rev Plant Physio* 22:23–44
- Machado SR, Gregório EA, Guimarães E (2006) Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Ann Bot* 97:357–369
- Marinho CR, Zacaro AA, Ventrella MC (2011) Secretory cells in *Piper umbellatum* (Piperaceae) leaves: a new example for the development of idioblasts. *Flora* 206:1052–1062
- Melo Y, Machado SR, Alves M (2010) Anatomy of extrafloral nectaries in Fabaceae from dry-seasonal forest in Brazil. *Bot J Linn Soc* 163:87–98
- Noguera-Savelli E, Jáuregui D, Ruiz-Zapata T (2009) Caracterización del indumento de nueve especies de Loasaceae de Venezuela. *Rev Mex Biodivers* 80:751–762
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373
- Paiva EAS, Machado SR (2004) Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) leaves. *Nord J Bot* 24:423–431
- Papini A, Tani G, Falco PD, Brighigna L (2010) The ultrastructure of the development in *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. *Flora* 205:94–100
- Pascal LM, Motte-Florac EF, McKey DB (2000) Secretory structures on the leaf rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): implications for the evolution of nectary glands. *Am J Bot* 87:327–338
- Pridgeon AM, Stern WL (1983) Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *Am J Bot* 70(8):1233–1234
- Queiroz LP (2009) *Leguminosas da Caatinga*. Print Mídia, Feira de Santana.

- Ragonese AM (1973) Systematic anatomical characters of the leaves of *Dimorphandra* and *Mora* (Leguminosae: Caesalpinioideae). Bot J Linn Soc 67:255–274
- Ramayya N (1964) Morphology of the emergences. Curr Sci India 33:577–580
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208–212
- Robards AW (1978) An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In Hall JL (ed) Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells. Elsevier, New York, pp 343–403
- Rodrigues TM, Santos DC, Machado SR (2011) The role of the parenchyma sheath and PCD during the development of oil cavities in *Pterodon pubescens* (Leguminosae-Papilionoideae). C R Biol 334:535–543
- Rudall PJ, Myers G, Lewis GP (1994) Floral secretory structures in *Caesalpinia sensu lato* and related genera. In Ferguson IK, Tucker S (eds) Advances in Legume Systematics, part 6. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp 41–52
- Simpson BB, Miao BM (1997) The circumscription of *Hoffmannseggia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae) and its allies using morphological and cpDNA restriction site data. Plant Syst Evol 205:157–178
- Souza LA (2003) Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula. UEPG, Ponta Grossa
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. Accessed 15 Aug 2012
- Tucker SC (1993) Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). I. *Myroxylon* (Myroxylon group) and *Castanospermum* (Angylocalyx group). Am J Bot 80:65–75
- Van Doorn WG, Woltering EJ (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Sci 10:117–122
- Wagmann E, Zambryski P (2000) Trichome plasmodesmata: a model system for cell-to-cell movement. Adv Bot Res 31:262–283
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. Ann Bot 93:3–11
- Warwick MC, Lewis GP (2009) A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae – Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. Kew Bull 64:135–146
- Werker E (2000) Trichome diversity and development. Adv Bot Res 31:1–35
- Werker E, Fahn A (1981) Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. – Development, ultrastructure, and secretion. Bot Gaz 142:461–476
- Winter E (1982) Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. III. Effects of salt on ultrastructure of phloem and xylem transfer cells in petioles and leaves. Aust J Plant Physiol 9:239–250

CAPÍTULO 5: Morfologia e função do tricoma secretor cavitado em espécies de *Bauhinia* (Leguminosae, Caesalpinioideae)

Resumo

Tricomas secretores cavitados são caracterizados por apresentar um pedúnculo curto ou ausente conectado a uma cabeça secretora oca. São estruturas raras, sendo que em Leguminosae (família numerosa em espécies e gêneros) foram registrados em apenas cinco gêneros, dentre eles *Bauhinia*. Considerando que *Bauhinia curvula* e *B. rufa* apresentam estruturas responsáveis pela atração de polinizadores nas flores, este trabalho teve como objetivo testar se os tricomas secretores cavitados presentes nas flores destas espécies exercem função de atração, utilizando análises comparativas de morfologia, ontogenia, ultraestrutura e perfil químico dos tricomas presentes nas flores e folhas. Foi constatado que os tricomas secretores cavitados apresentam morfologia externa e desenvolvimento semelhantes, independente do órgão e da espécie analisados. Entretanto, diferenças interespecíficas no processo de secreção e no perfil químico do conteúdo foram encontradas. Se por um lado tais diferenças entre as espécies indicam que os tricomas cavitados secretam compostos distintos; por outro, as semelhanças encontradas nestes tricomas entre órgãos vegetativos e reprodutivos indicam que estas estruturas exibem funções ecológicas equivalentes na espécie, provavelmente na defesa da planta ao longo do desenvolvimento dos órgãos. Assim, conclui-se que as funções ecológicas dos tricomas cavitados não estão relacionadas ao fato de *B. curvula* ser esfingófila e *B. rufa* quiropterófila, visto que sua função não parece estar associada à atração, mas sim à defesa da planta.

Palavras-chave: anatomia, cromatografia, flor, folha, glândula, ontogenia, ultraestrutura.

Abstract:

Cavitated secretory trichomes are characterized by presenting a short or absent stalk connected to a secretory hollow head. They are rare structures, and in Leguminosae (large family in species and genera) were recorded in only five genera, including *Bauhinia*. Considering that *Bauhinia curvula* and *B. rufa* exhibit structures responsible for attracting pollinators in flowers, this study aimed to test whether the cavitated secretory trichomes present in the flowers of these species exert attraction function, using comparative analyzes of morphology, ontogeny, ultrastructure and chemical profile of the trichomes present in flowers and leaves. It was found that the cavitated secretory trichomes show similar external morphology and development, regardless of the organ and the species analyzed. However, interspecific differences in the secretion process and in the chemical profile of the content were found. If on one hand the differences between species indicate that the cavitated trichomes secrete distinct compounds; on the other, the similarities found in these trichomes between vegetative and reproductive organs indicate that these structures exhibit equivalent ecological functions in the specie, probably in plant defense during the organ development. Thus, it is concluded that the ecological functions of the cavitated trichomes are not related to the fact that *B. curvula* is sphingophilous and *B. rufa* is chiropterophilous, since its function does not appear to be associated with attraction, but to plant defense.

Keywords: anatomy, chromatography, flower, gland, leaf, ontogeny, ultrastructure.

Introdução

Tricomas secretores cavitados, também denominados glândulas externas ocas (Lersten & Curtis 1994, Lersten & Curtis 1996), tricomas ocos naviculados (Leelavathi & Ramayya 1983) e tricomas inflados (Tucker *et al.* 1984), são estruturas secretoras externas incomuns, caracterizadas por apresentar um pedúnculo curto ou mesmo ausente conectado a uma cabeça secretora oca. Tais tricomas têm sido considerados por alguns autores como estruturas morfológicamente análogas às cavidades secretoras, pois sua cabeça é composta de um lúmen delimitado por células secretoras (Kumar *et al.* 1986, Lersten & Curtis 1996). O tamanho e a forma do lúmen variam de acordo com a espécie, sendo influenciado pelo grau de separação das células que o delimitam. Em *Hoffmannseggia jamesi* a separação das células da cabeça do tricoma é tão pequena, que o lúmen pode ser facilmente confundido por um espaço intercelular (Lersten & Curtis 1994), enquanto que em algumas espécies de *Indigofera* e de *Bauhinia*, a separação é ampla, formando um lúmen oval (Tucker *et al.* 1984, Marquiefável *et al.* 2009).

Existem relatos deste tipo de tricoma em Asteraceae (Carlquist 1959), Leguminosae, Lythraceae (Uphof 1962) e Portulacaceae (Prabhaker & Ramayya 1975 *apud* Leelavathi & Ramayya 1983). Em Leguminosae, tricomas cavitados foram registrados em apenas cinco gêneros e cerca de 30 espécies pertencentes às subfamílias Papilionoideae e Caesalpinioideae (Leelavathi & Ramayya 1983, Tucker *et al.* 1984, Kumar *et al.* 1986, Lersten & Curtis 1994, Lersten & Curtis 1996, Curtis *et al.* 1996, Marquiefável *et al.* 2009). Dentre as Caesalpinioideae, destaca-se o gênero *Bauhinia*, no qual existem descrições destas estruturas nos órgãos florais de 13 espécies (Leelavathi & Ramayya 1983, Tucker *et al.* 1984) e nas folhas de sete espécies (Baitello 1981, Leelavathi & Ramayya 1983, Rezende *et al.* 1994, Lusa & Bona 2009, Sá *et al.* 2009).

Os poucos trabalhos publicados sobre este tipo de tricoma frequentemente abordam aspectos de sua distribuição e morfologia na planta (ver Metcalfe & Chalk 1950, Uphof 1962, Curtis *et al.* 1996, Leelavathi & Ramayya 1983, Lersten & Curtis 1994, Lersten & Curtis 1996, Marquiefável *et al.* 2009) e, mais raramente, aspectos de desenvolvimento (ver Carlquist 1959, Tucker *et al.* 1984, Kumar *et al.* 1986). Não existem

trabalhos a respeito da natureza química do conteúdo produzido pelos tricomas cavitados ou sobre o processo de secreção, o que impede que sejam feitas inferências sobre as funções biológicas exercidas por este tricoma nas folhas e/ ou flores.

Considerando que um mesmo tipo de estrutura secretora pode ocorrer em vários órgãos da planta, diferenças em sua morfologia interna, ontogênese e conteúdo produzido podem ocorrer de acordo com sua localização (Ciccarelli *et al.* 2001, Łotocka & Osińska 2010), refletindo diferenças funcionais. Nas folhas, os tricomas secretores são frequentemente relacionados à defesa do vegetal (Levin 1973, Fahn 1979); já nas flores, os tricomas secretores podem apresentar funções que vão além da defesa, o que depende da natureza do conteúdo produzido. Em *Lundia cordata* (Bignoniaceae), por exemplo, os tricomas secretores presentes nas pétalas produzem néctar, constituindo nectários substitutivos (Lopes *et al.* 2002), enquanto que em espécies de *Angelonia* (Scrophulariaceae), os tricomas presentes nas pétalas produzem óleos não voláteis, constituindo elaióforos (Vogel & Machado 1991). Nos trabalhos de Vogel (1990) e Guimarães *et al.* (2008) foi sugerido que os tricomas secretores de voláteis encontrados nas pétalas de *Phragmopedilum grande* (Orchidaceae) e nos estaminódios de *Jacaranda oxyphylla* (Bignoniaceae), respectivamente, estariam atuando como osmóforos.

Bauhinia curvula Benth. e *B. rufa* (Bong.) Steud. apresentam tricomas secretores cavitados nas flores e folhas (Baitello 1981, Rezende *et al.* 1994, Capítulo 1) e são espécies com flores noturnas polinizadas por mariposas e morcegos, respectivamente (Gibbs *et al.* 1999, Munin *et al.* 2008). Espécies zoófilas noturnas apresentam flores com aroma intenso (Baker 1961, Faegri & van der Pijl 1979), o que pressupõe estruturas responsáveis pela síntese e liberação do odor em seus órgãos florais. A grande maioria de estudos refere-se a estas glândulas de odor como osmóforos (Vogel 1990, Endress 1994), com raros relatos de tricomas atuando na atração à longa distância (Vogel 1990, Guimarães *et al.* 2008). No entanto, considerando a escassez de estudos sobre glândulas florais, é possível que também desempenhem outras funções, como atração de polinizadores.

Assim, este trabalho pretende verificar se os tricomas secretores cavitados previamente observados na flor de *Bauhinia curvula* e *B. rufa* podem atuar na atração dos polinizadores. Para tal, a morfologia, o desenvolvimento, o processo de secreção e a

composição química do conteúdo produzido por estes tricomas foram comparados aos de tricomas secretores cavitados presentes nas folhas destas espécies. Espera-se encontrar diferenças entre os órgãos indicando que as funções exercidas pelos tricomas em órgãos vegetativos e reprodutivos são distintas.

Material e Métodos

A terminologia adotada para os tricomas secretores seguiu Kumar *et al.* (1986).

Foram utilizadas folhas e órgãos florais em diferentes fases de desenvolvimento (ápice meristemático até o órgão completamente desenvolvido) de duas espécies de *Bauhinia* nativas do Cerrado, sendo uma arbustiva - *Bauhinia curvula* (coletada na Reserva Particular de Patrimônio Natural da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em Campo Grande, MS) e a outra arbórea - *B. rufa* (coletada na Reserva Particular de Cerrado Fazenda Palmeira da Serra em Pratânia, SP). Os materiais foram fixados em FNT (formalina neutra tamponada; Lillie 1965) e solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) e processados para análises em microscopias de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). *Vouchers* foram depositados no herbário da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto em Ribeirão Preto, SP, sob os números S.P. Teixeira 59 (SPFR) para *B. curvula* e S.P. Teixeira 46, 47, 48 (SPFR) para *B. rufa*.

Para checar a distribuição dos tricomas nos órgãos, as amostras de folhas completamente expandidas e de flores em antese (sépalas, pétalas, estames e carpelo) fixadas em FNT foram desidratadas em série etanólica crescente, secas em um aparelho de secagem em ponto crítico de CO₂ Bal Tec CPD 030, montadas em suportes metálicos, metalizadas com ouro em metalizador Bal Tec SCD 050 e analisadas em microscópios eletrônicos de varredura Zeiss EVO/MA10 e Jeol JSM-5800 LV.

Para o estudo das fases de desenvolvimento, ápices meristemáticos de ramos vegetativos e de inflorescências, além de folhas e botões de diferentes tamanhos fixados em FNT foram incluídos em historresina (Leica), cortados transversalmente em micrótomo rotativo com 3 µm de espessura, corados com azul de Toluidina (O'Brien *et al.* 1964) e

observados em microscópio fotônico Leica DME. A fim de determinar a natureza das substâncias produzidas ao longo do desenvolvimento do tricoma, parte do material cortado foi submetida aos reagentes Sudan III (Sass 1951) e Sudan Black B (Pearse 1980) para detecção de lipídios totais, reagente PAS (Feder & O' Brien 1968) para polissacarídeos neutros, vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para polissacarídeos ácidos e xylidine Ponceau (Vidal 1977) para proteínas. Material proveniente de folhas expandidas e de sépalas de flores em antese também foi cortado em micrótomo de mesa e corado com reagente de NADI (David & Carde 1964) para óleos essenciais e oleorresinas e cloreto de ferro III (Johansen, 1940) para compostos fenólicos gerais. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio Leica DM5000 B, acoplado a câmera fotográfica digital Leica DFC295.

Análises do processo de secreção foram realizadas em amostras de folhas e de sépalas em diferentes fases de desenvolvimento fixadas em Karnovsky. O material, depois de pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) e incluído em Araldite, foi seccionado em ultramicrotomo Leica Reichert Ultracut S a 60-70 nm, coletado em grades de cobre e contrastado com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo por 15 min. As eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100CXII.

Para o estudo químico do conteúdo dos tricomas, folhas completamente expandidas e botões em pré-antese foram coletados e secos em estufa FANEM 515. Após a secagem, 1400 tricomas secretores cavitados foram microcoletados nas folhas e nas sépalas (órgão floral escolhido devido à maior densidade dos tricomas) com auxílio de um estereomicroscópio Leica MZ 75. Os tricomas removidos foram transferidos para solução de acetona e ultrassonificados em aparelho Unique Maxiclean 16000 por 10 min para a lise das células. Este material foi, então, centrifugado e o sobrenadante foi separado e filtrado para a realização de análises em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 6890N acoplado a um detector de ionização em chama, e em um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a um detector de ultravioleta em arranjo de diodos (CLAE/UV/DAD, Shimadzu SCL-10Avp). Para as análises em CG foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 5% fenil-metil-siloxano, de dimensões: 30,0 m x 320 µm x 0,25 µm). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 2,0 ml/min. A temperatura do

forno foi programada para ir de 55 °C até 120 °C a 20 °C/ min, em seguida de 120 °C até 150 °C a 1,5 °C/min e de 150 °C a 180 °C a 20 °C/min, mantendo a 180 °C por 5 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 210 °C e 250 °C, respectivamente. As condições de análise em CLAE/UV/DAD foram: fase estacionária – coluna C18 Shim-pack ODS; fase móvel – água (solvente A) e acetonitrila (solvente B); o gradiente de eluição iniciou-se com 50% de B até completar 100% de B em 60 min. Os cromatogramas foram registrados a 310 nm.

Resultados

Diferenças anatômicas e de desenvolvimento dos tricomas secretores cavitados de *Bauhinia curvula* e *B. rufa* não foram observadas. No entanto, a distribuição no corpo da planta, o aspecto e a natureza do conteúdo, assim como o processo de secreção destes tricomas diferem entre as espécies (Tabela 1).

Distribuição

Bauhinia curvula apresenta tricomas secretores cavitados no pecíolo, na superfície abaxial do limbo foliar, da sépala e da pétala, no ovário e no estilete. Em *B. rufa* estes tricomas ocorrem em todos estes órgãos, com exceção das pétalas (Tabela 1).

Desenvolvimento

O tricoma secretor cavitado tem origem em uma célula protodérmica que cresce anticlinalmente e passa por uma divisão oblíqua, originando duas células assimétricas. A célula com núcleo apical passa por outra divisão oblíqua, resultando em um tricoma com duas células basais e uma apical triangular, que se expande e passa por uma divisão longitudinal (Fig. 1A-D). No estágio de quatro células (duas no pedúnculo e duas na cabeça) (Fig. 1D), as duas primeiras células da cabeça passam por várias divisões periclinais, plano de divisão que contribui para o alongamento do tricoma (Fig. 1E-F). A

célula mais apical continua apresentando um formato triangular em seção longitudinal determinado pelas divisões oblíquas de sua célula adjacente (Fig. 1E-F). O pedúnculo é formado por divisões oblíquas das duas primeiras células produzidas. As células da cabeça e do pedúnculo iniciam o processo de produção de substâncias antes de o tricoma estar completamente desenvolvido (Fig. 1F). A formação do espaço interno na cabeça ocorre por meio da separação de células a partir da porção apical da cabeça em direção à basal (Fig. 1G-I). A partir deste estágio, o alongamento do tricoma ocorre somente devido ao aumento do volume celular. As células secretoras da cabeça estão repletas de conteúdo nos estádios finais do desenvolvimento do tricoma (Fig. 1J-K). O tricoma completamente desenvolvido apresenta um pedúnculo curto, bisseriado, constituído por 10 a 15 células, conectado a uma cabeça formada por uma camada de células lenticulares secretoras que se dispõem ao redor de um lúmen ovalado (Fig. 1J-K). Uma fina cutícula recobre o tricoma. As células da cabeça apresentam espessamento na parede periclinal externa, enquanto as células do pedúnculo apresentam todas as paredes igualmente espessadas (Fig. 1J).

Conteúdo do tricoma

As análises histoquímicas revelaram que o conteúdo presente no lúmen da cabeça de tricomas cavitados no limbo foliar e na sépala apresenta natureza fenólica e terpênica. Estes compostos são produzidos pela mesma célula secretora, armazenados no vacúolo, liberados para o lúmen e expostos ao ambiente por meio de uma abertura formada pela separação das células mais apicais da cabeça (Fig. 2).

As análises em CG mostraram que os perfis dos tricomas secretores cavitados apresentam picos concentrados em duas regiões (Fig. 3). Na região 1 concentram-se os picos com menores tempos de retenção (entre 2,028 e 3,009 min.), os quais representam as substâncias mais voláteis (55 °C a 120 °C) provavelmente monoterpenos (Duarte-Almeida *et al.* 2004). Estes picos foram idênticos entre os órgãos (sépala e folha) e entre as espécies estudadas (Fig. 4). Na região 2 ocorrem os picos com tempos de retenção maiores (entre 8,159 e 19,115 min.) e referem-se às substâncias com temperatura de volatilização mais elevada (120 a 180 °C), provavelmente sesquiterpenos (Duarte-Almeida *et al.* 2004). Nesta

região os picos diferem entre as espécies, sendo que *Bauhinia curvula* apresenta somente um com tempo de retenção de 19,107 min., enquanto que em *B. rufa* ocorre, além deste, vários outros anteriores (Fig. 5).

As análises em CLAE/UV/DAD mostraram que os perfis dos tricomas secretores da flor e da folha de *Bauhinia curvula* foram idênticos, com dois picos majoritários, tendo o pico 1 um tempo de retenção de 32,97 min. e o pico 2 um tempo de 40,46 min. (Fig. 6). Os picos 1 e 2 apresentaram dois máximos de absorção no ultravioleta (269 e 336 nm para o pico 1 e 264 e 343 nm para o pico 2), característicos de compostos aromáticos, tais como flavonoides (Merken & Beecher 2000). Já os perfis dos tricomas da flor e da folha de *B. rufa* foram similares, mas não idênticos. No perfil dos tricomas da flor foram observados sete picos, os quais foram numerados de 1 até 7 (tempos de retenção: 1 – 26,99 min., 2 – 29,48 min., 3 – 32,90 min., 4 – 33,70 min., 5 – 35,82 min., 6 – 36,61 min., 7 – 37,06 min.). No perfil dos tricomas da folha foram também observados sete picos. Os picos 2 a 7 são os mesmos observados no tricoma da flor. Contudo, o pico 1 que aparece no perfil da flor não aparece no perfil da folha. No perfil da folha ocorre um pico adicional com tempo de retenção de 40,07 min. que recebeu o número 8, o qual não aparece no perfil da flor (Fig. 6). Nesta espécie, os picos 3 a 8 apresentam padrão de absorção de substância aromática, provavelmente flavonoide (absorção no UV: 1 – 296 nm, 2 – 297 nm, 3 – 269 e 338 nm, 4 – 255 e 354 nm, 5 – 264 e 349 nm, 6 – 255 e 352 nm, 7 – 255 e 349 nm, 8 – 263 e 342 nm) (Merken & Beecher 2000).

Processo de secreção

Em *Bauhinia curvula* o conteúdo é produzido em fases mais iniciais do desenvolvimento que em *B. rufa*. Em ambas as espécies, os compostos fenólicos começam a ser produzidos nas células secretoras antes dos terpenos. Neste estágio, as células secretoras de tricomas cavitados em início do processo de secreção (Fig. 1F) se caracterizam por apresentar núcleo conspicuo arredondado com cromatina descondensada (Figs. 7A, 11A). Pequenos vacúolos em início de acúmulo de material elétron-denso são observados (Fig. 7B); o citoplasma é elétron-opaco e apresenta dictiossomos sem vesículas e plastídios sem organização interna

(Figs. 7C-D, 11B-C). O retículo endoplasmático rugoso já é detectado (Fig. 7D), assim como plasmodesmas nas paredes anticlinais das células (Fig. 11B). Com o aumento na deposição de conteúdo elétron-denso no vacúolo (Figs. 7E, 11D), inicia-se a síntese dos terpenos, detectados na forma de glóbulos elétron-opacos. Neste estágio, diferenças no processo de secreção são observadas entre as espécies. Em *B. curvula* os glóbulos elétron-opacos encontram-se no citoplasma associados à membrana externa dos plastídios, que se tornam alongados e próximos a mitocôndrias (Fig. 7F-G). Em *B. rufa* os glóbulos aparecem no interior dos plastídios e próximos aos dictiossomos (Fig. 11F-G). A abundância de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias é observada em ambas as espécies (Fig. 11E). Os glóbulos elétron-opacos se fundem ao vacúolo ou formam fileiras no espaço entre a membrana e a parede celular (Fig. 11H-I).

Em *B. curvula* os vacúolos pequenos se fundem (Fig. 8A) formando um grande vacúolo que apresenta conteúdo elétron-denso, o que resulta em aumento do volume da célula. Já não se observam glóbulos associados à membrana externa dos plastídios, que apresentam tilacóides evidentes (Fig. 8B) e o retículo endoplasmático liso começa a se proliferar, tornando-se dilatado e associado a vesículas elétron-densas maiores (Fig. 8C-D). Quando a célula secretora encontra-se completamente repleta de conteúdo, assume um aspecto arredondado e o citoplasma se torna elétron-denso (Fig. 9A). Nesta fase, o retículo endoplasmático rugoso não é mais encontrado, enquanto dictiossomos e retículo endoplasmático liso ainda são observados próximos às vesículas (Fig. 9B-D), além de mitocôndrias. Os plastídios se tornam elétron-densos e mantêm sua organização interna de membranas (Fig. 9E-F). No entanto, em algumas células secretoras foi constatado o clareamento de seu conteúdo (Fig. 10A). Apesar do conteúdo secretor se mostrar elétron-opaco, estas células apresentam citoplasma elétron-denso e plastídios semelhantes aos observados na célula anterior, além de retículo endoplasmático liso abundante (Fig. 10B-C).

Em *B. rufa* o conteúdo depositado no grande vacúolo torna-se mais elétron-opaco até se fragmentar totalmente (Figs. 1G-J, 12A-B, E, 13A). Ao contrário do observado em *B. curvula*, os plastídios apresentam uma desestruturação interna gradativa, que parece estar relacionada à formação de glóbulos em seu interior (Figs. 12C, F, 13D-E). Semelhante

a *B. curvula*, com a formação de um grande e único vacúolo, o citoplasma se torna elétron-denso, o retículo endoplasmático rugoso não é mais observado, ao contrário do retículo endoplasmático liso, dictiossomos (Figs. 12D, 13B-C) e mitocôndrias, que se tornam mais frequentes. Após a fragmentação do conteúdo, a célula pode permanecer com o conteúdo fragmentado ou pode ser preenchida novamente, tornando-se repleta de um conteúdo com aspecto liso (Fig. 14A). Estas células são semelhantes às células em estágio final de secreção encontradas em *B. curvula* (Fig. 9A).

Em ambas as espécies, o vacúolo repleto de conteúdo ocupa quase todo o volume da célula; neste estágio, conteúdo globular é encontrado entre a parede celular e a membrana plasmática (Fig. 10D, F). As substâncias liberadas atravessam a parede e se movimentam até a região de junção entre duas células secretoras, onde são liberadas para o lúmen (Figs. 10E, 14B). Em *B. rufa*, à medida que o material é liberado, pequenos vacúolos sem conteúdo são observados em meio ao conteúdo, até a célula ficar totalmente vazia (Fig. 14C-D). Esta célula, apesar de permanecer somente com uma fina camada de citoplasma, apresenta grande quantidade de retículo endoplasmático liso associado a vesículas (Fig. 14E-F). Em consequência do afastamento das células mais apicais da cabeça e da ruptura da cutícula, o conteúdo passa do lúmen do tricoma secretor cavitado para sua superfície (Fig. 2D-E).

Figura 1: Desenhos esquemáticos (A-D) e fotomicrografias (E-K) dos tricomas secretores cavitados de *Bauhinia rufa* em diferentes fases de desenvolvimento. A: Alongamento vertical da célula protodérmica e divisão do nucléolo. B: Primeira divisão oblíqua. C: Segunda divisão oblíqua. D: Divisão longitudinal da célula apical. E: Início do alongamento da cabeça; note o formato triangular da célula mais apical. F: Tricoma em fase de acúmulo de conteúdo e expansão das células da cabeça. G-I: Formação do lúmen; note a separação de células inicialmente na região apical da cabeça e as mudanças no aspecto e na coloração do conteúdo. J-K: Tricoma completamente formado. Barras: 10 µm.

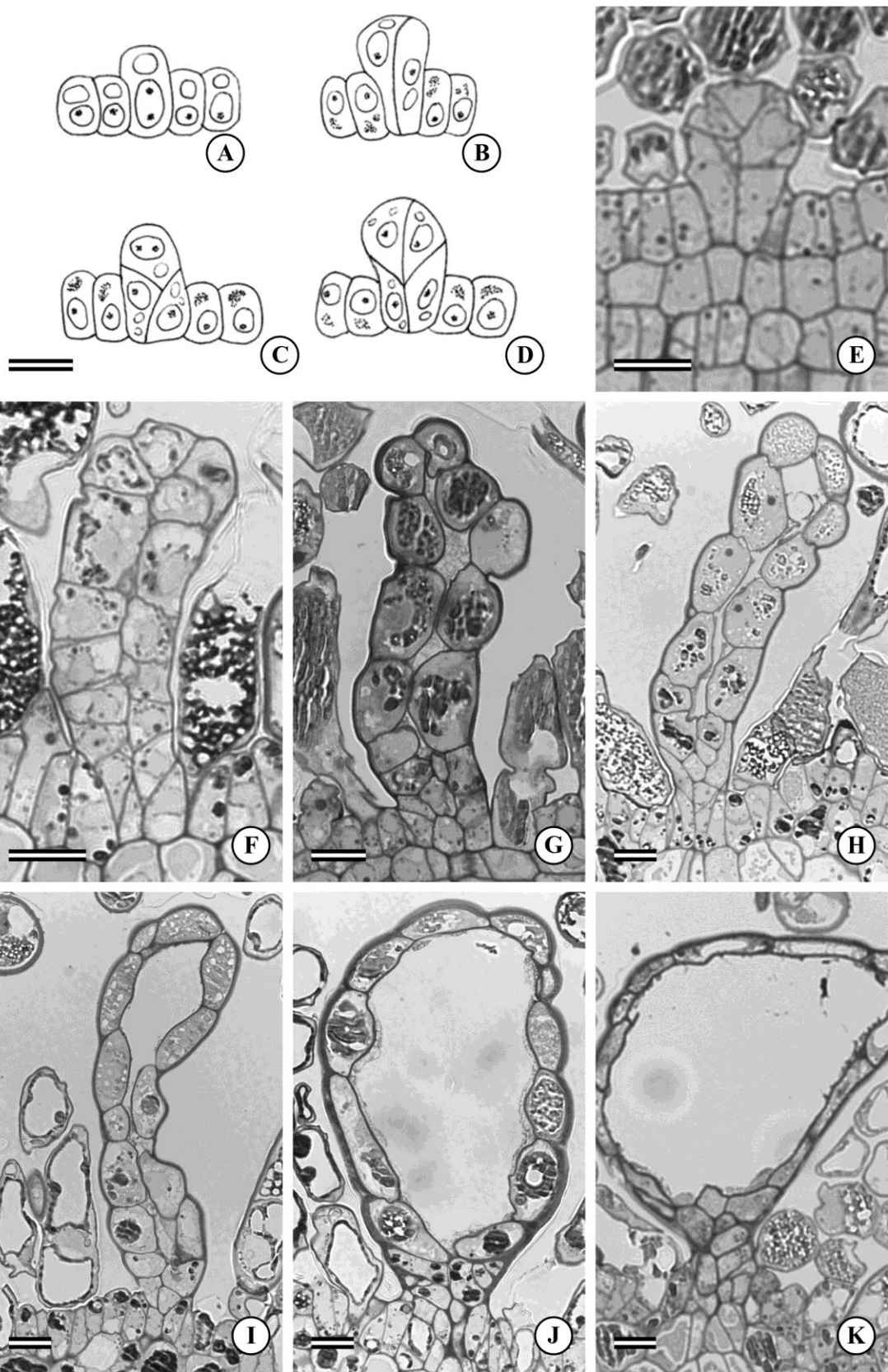


Figura 2: Fotomicrografias (A-C) e eletromicrografias de varredura (D-E) dos tricomas secretores cavitados presentes nas sépalas de *Bauhinia rufa* (A-D) e *B. curvula* (E). A-C: Tricomas secretores cavitados em seção longitudinal evidenciando o conteúdo no interior das células da cabeça e no lúmen (coloração: azul de Toluidina em A, Sudan III em B e reagente de NADI em C). D-E: Observe a superfície dos tricomas secretores mostrando o conteúdo extravasado em D e a separação das células da cabeça em E. Barras = 30 μm (A-B, D-E); 20 μm (C).

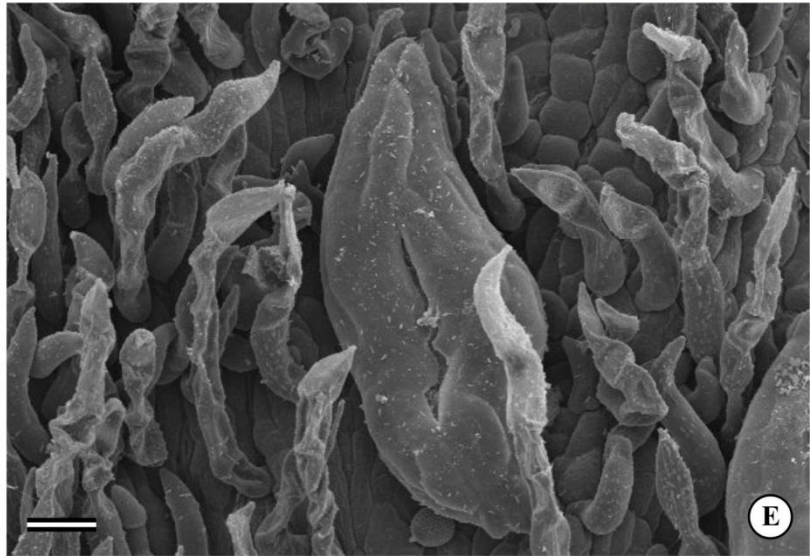
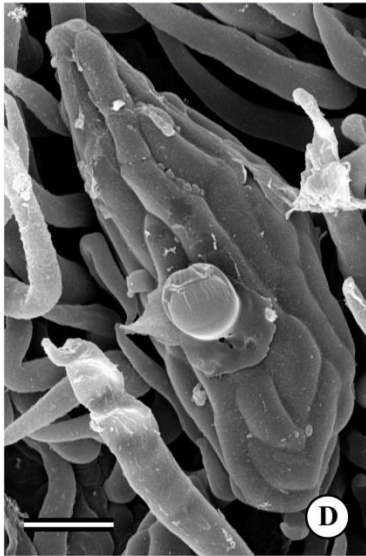
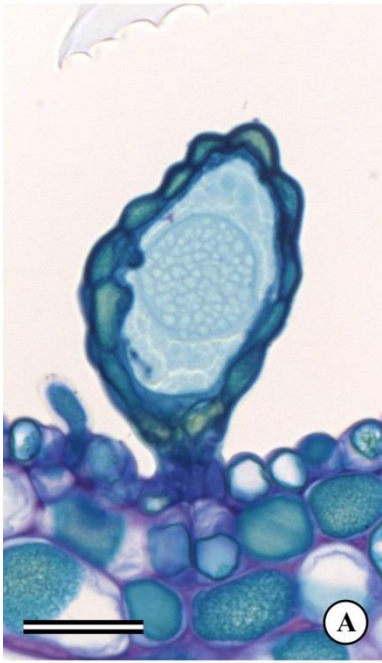


Figura 3: Perfil químico geral obtido em CG dos tricomas secretores cavitados coletados de sépalas (A, C) e folhas (B, D) de *Bauhinia curvula* (A-B) e *B. rufa* (C-D). Observe duas regiões com picos distintos. eixo das abcissas = tempo (min.), eixo das ordenadas = altura (pA), números acima dos picos = tempos de retenção.

Figura 4: Detalhe do perfil químico da região 1 obtido em CG dos tricomas secretores cavitados coletados de sépalas (A, C) e folhas (B, D) de *Bauhinia curvula* (A-B) e *B. rufa* (C-D). eixo das abcissas = tempo (min.), eixo das ordenadas = altura (pA), números acima dos picos = tempos de retenção.

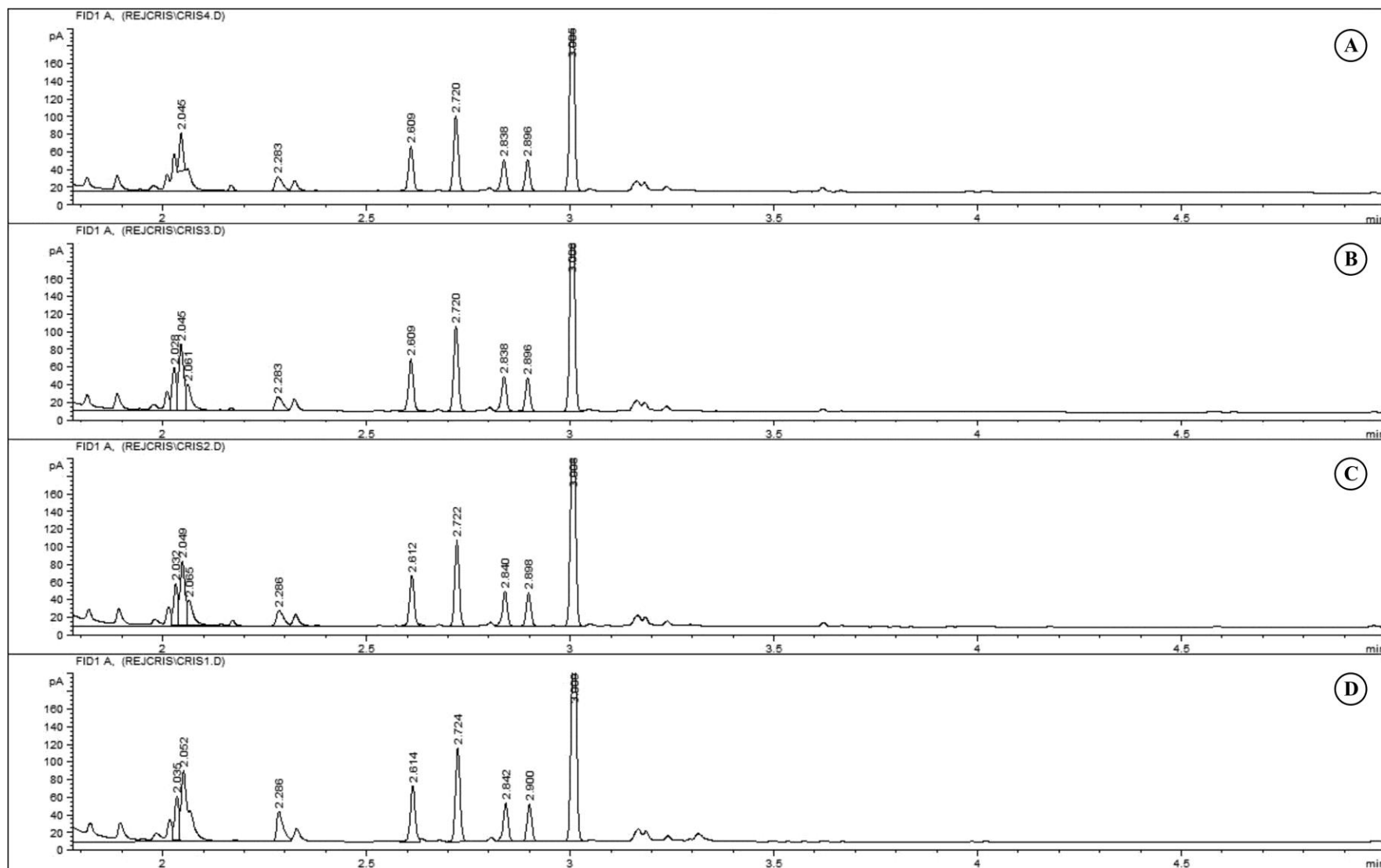


Figura 5: Detalhe do perfil químico da região 2 obtido em CG dos tricomas secretores cavitados coletados de sépalas (A, C) e folhas (B, D) de *Bauhinia curvula* (A-B) e *B. rufa* (C-D). eixo das abcissas = tempo (min.), eixo das ordenadas = altura (pA), números acima dos picos = tempos de retenção.

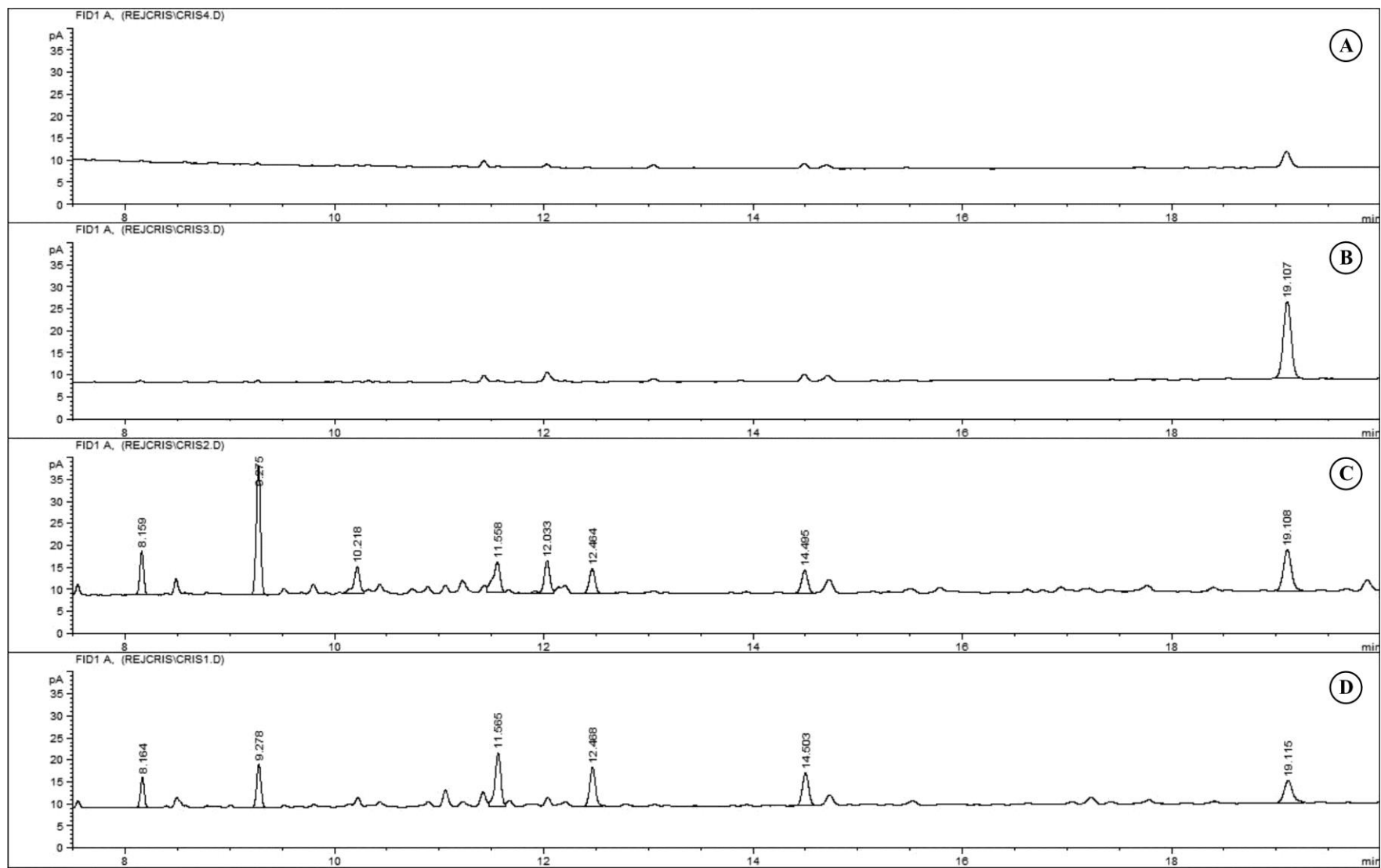


Figura 6: Perfil químico obtido em CLAE/UV/DAD dos tricomas secretores cavitados coletados de sépalas (A, C) e folhas (B, D) de *Bauhinia curvula* (A-B) e *B. rufa* (C-D). eixo das abcissas = tempo (min.), eixo das ordenadas = área (%).

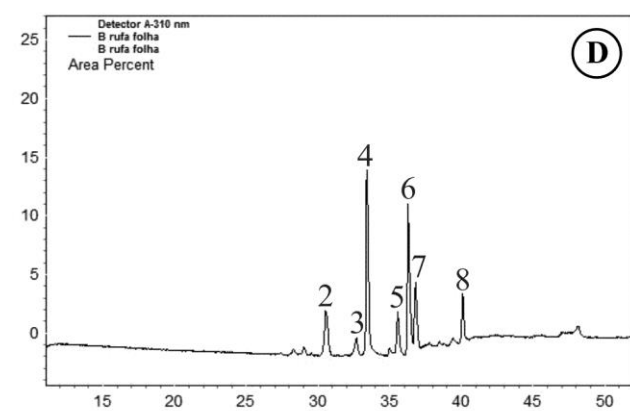
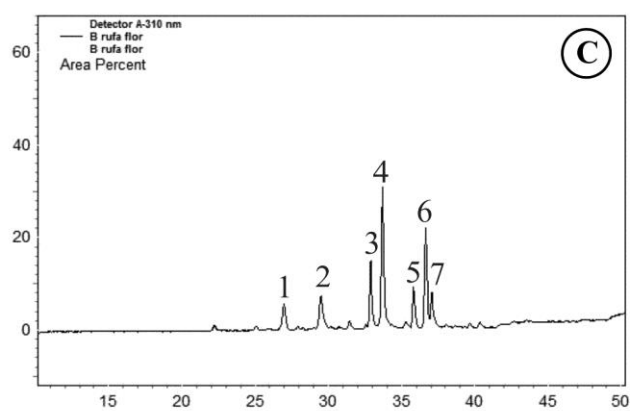
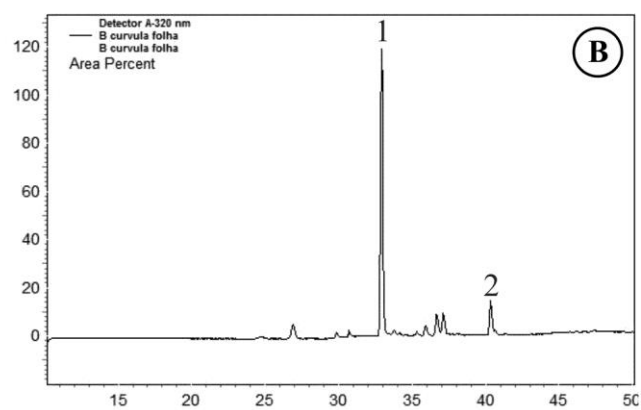
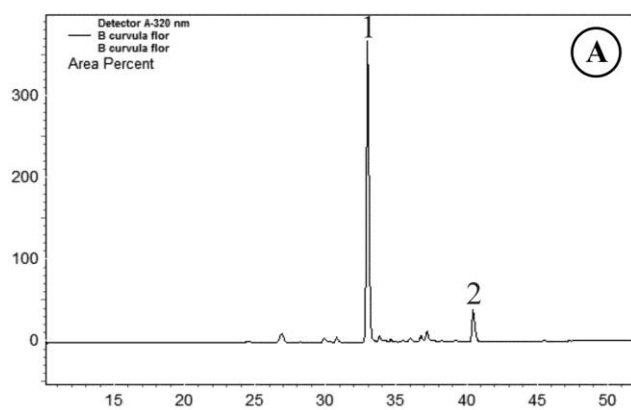


Figura 7: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia curvula*. A-D: Célula secretora em fase inicial de secreção evidenciando pequenos vacúolos com início de acúmulo de conteúdo (B, seta), dictiossomo sem vesículas (C), retículo endoplasmático rugoso e glóbulos elétron-opacos no citoplasma (D, seta). E-G: Célula secretora com aumento do vacúolo mostrando plastídios próximos aos glóbulos elétron-opacos (F-G, setas). mi = mitocôndria, nu = núcleo, pl = plastídio, pm = plasmodesma, rer = retículo endoplasmático rugoso, se = conteúdo elétron-denso, va = vacúolo. Barras: 2 μm (A, E); 1 μm (B, D, F-G); 0,5 μm (C).

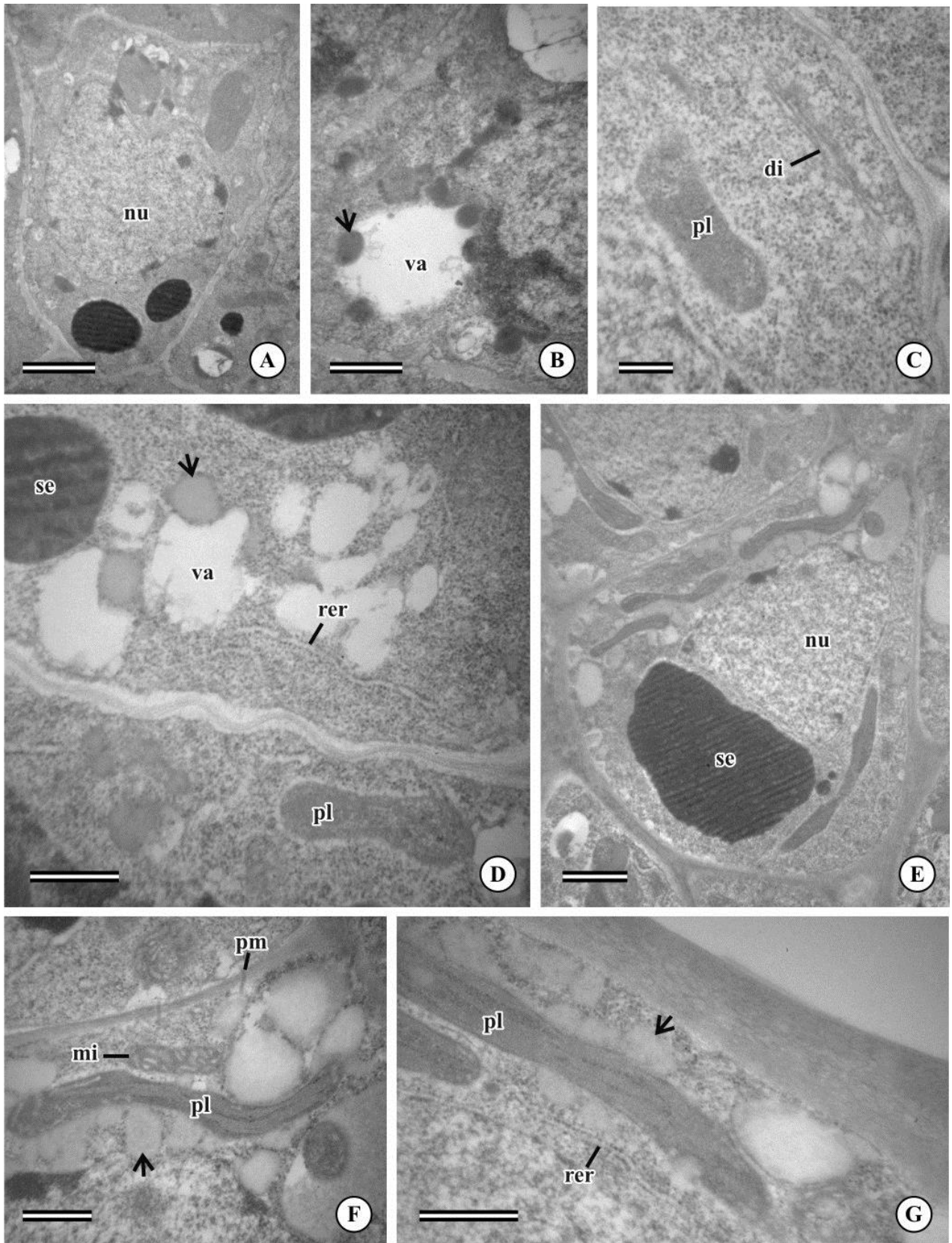


Figura 8: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia curvula*. A-D: Célula secretora com vacúolos expansão e fusão de conteúdo elétron-denso. Observe o plastídio sem glóbulos próximo à membrana externa (B) e os retículos lisos associados a vesículas (C-D, setas). nu = núcleo, pl = plastídio, rer = retículo endoplasmático rugoso, rel = retículo endoplasmático liso, se = conteúdo elétron-denso. Barras: 3 μm (A); 1 μm (B-D).

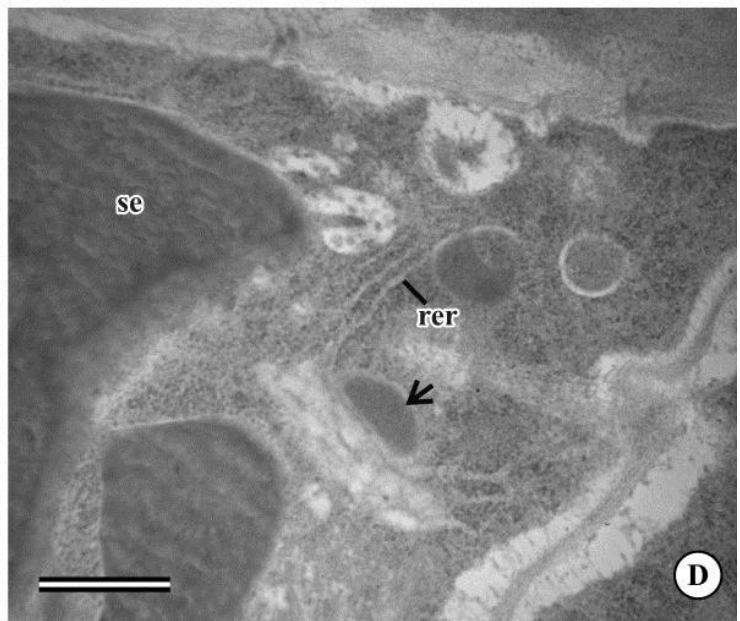
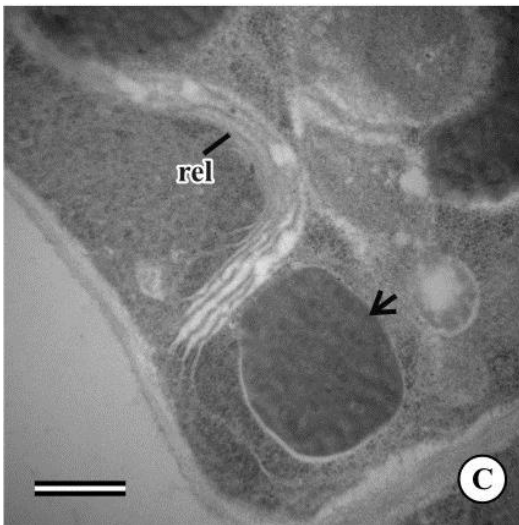
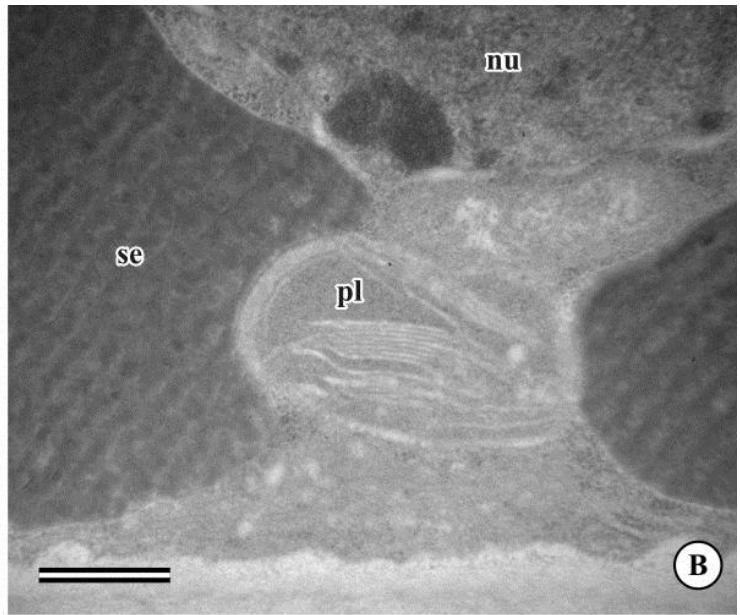
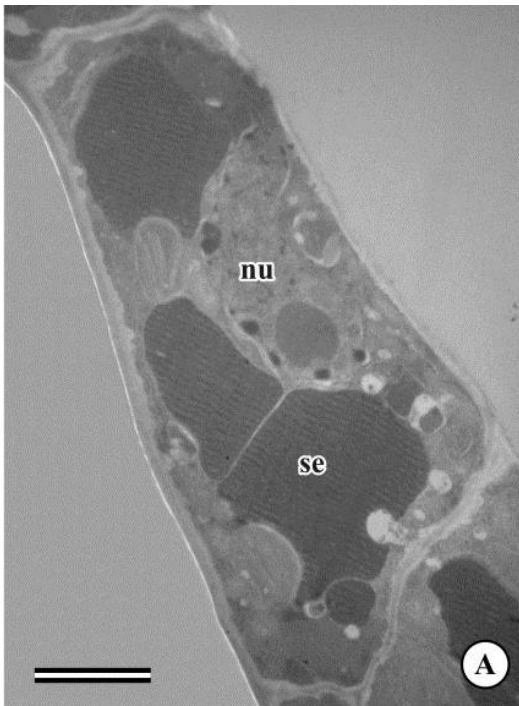


Figura 9: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia curvula*. A-F: Célula secretora de conteúdo elétron-denso com aspecto liso. Em B, observe o citoplasma elétron-denso e o dictiossomo, em C e D, os retículos endoplasmáticos lisos associados a vesículas elétron-densas (setas) e em E e F, os plastídios com sistema de membranas interno evidente. di = dictiossomo, pl = plastídio, rel = retículo endoplasmático liso, se = conteúdo. Barras: 3 μm (A); 0,5 μm (B); 1 μm (C-F).

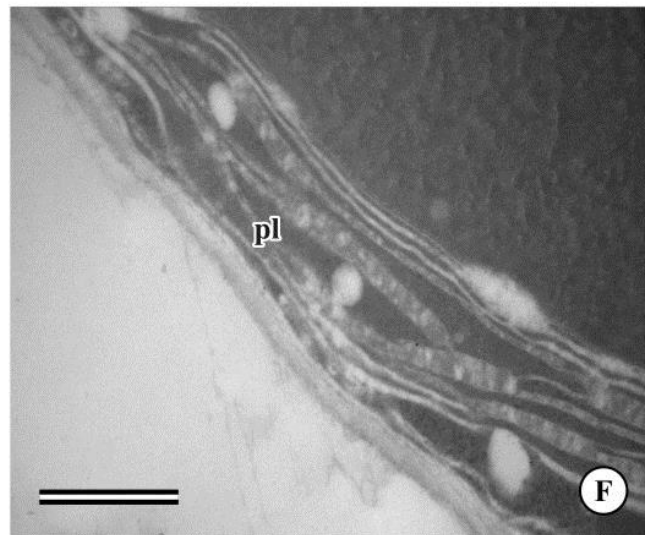
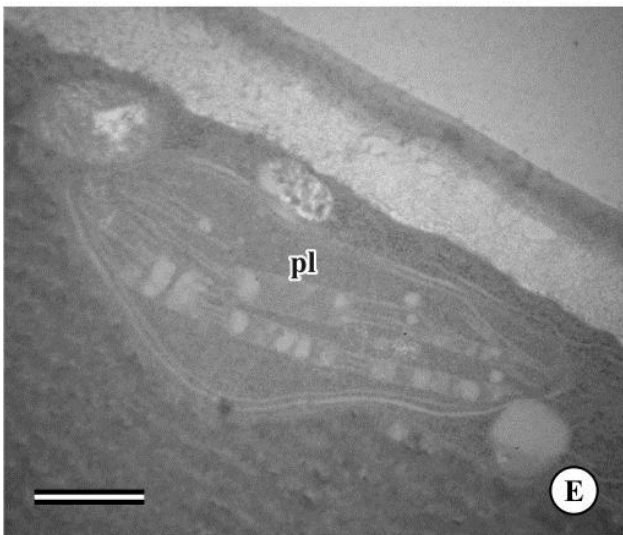
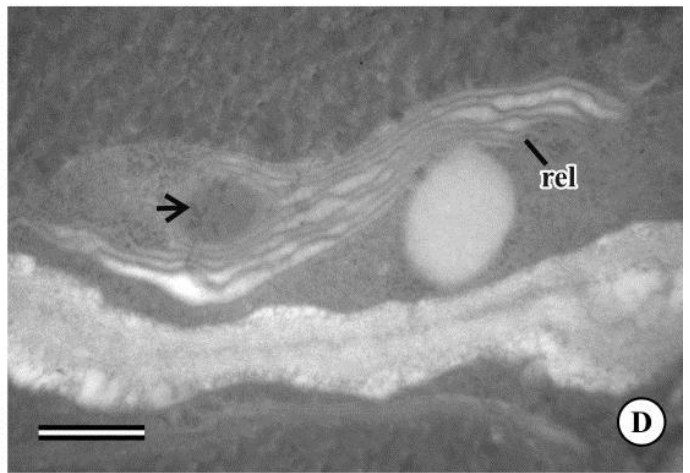
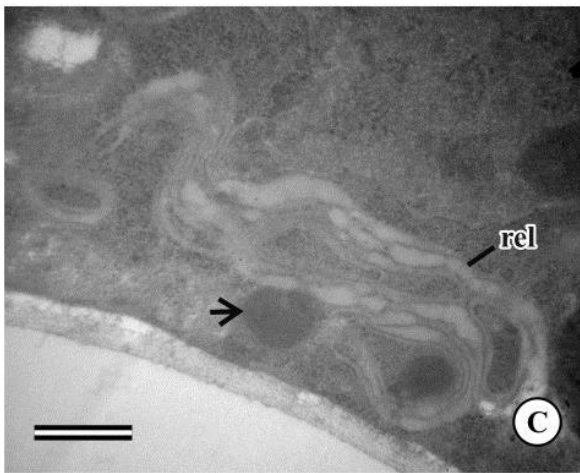
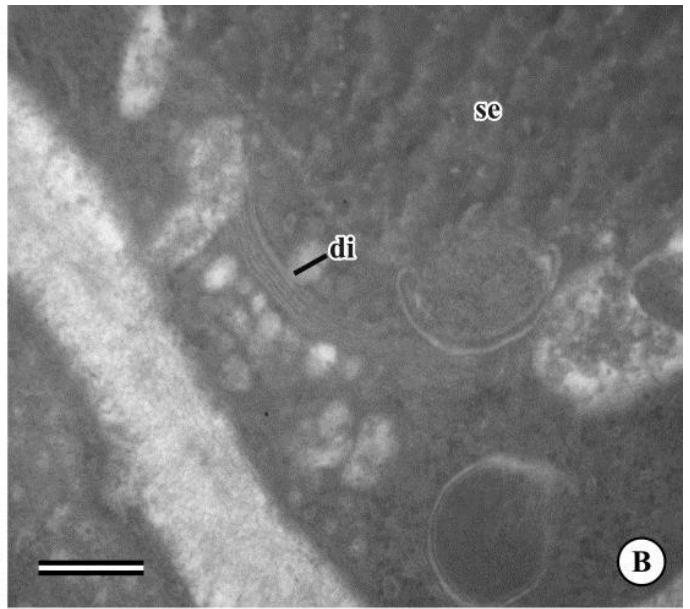
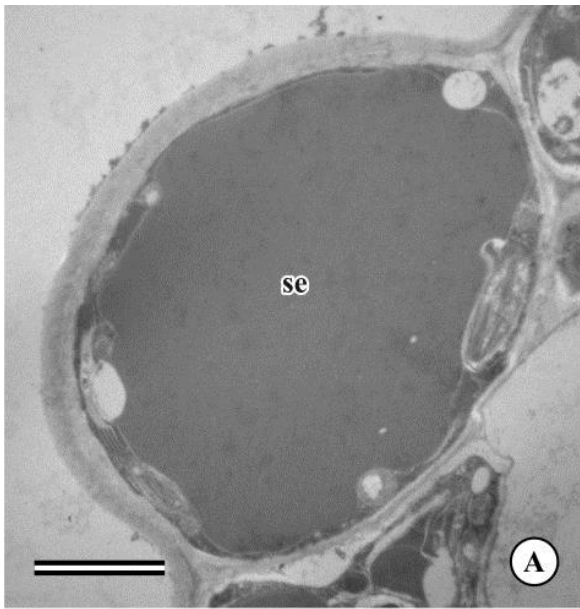


Figura 10: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia curvula*. A-C: Célula secretora de conteúdo elétron-opaco evidenciando o citoplasma e as organelas elétron-densas. D-F: Célula secretora em fase de liberação do conteúdo no lúmen. Note o conteúdo secretado entre a membrana plasmática e a parede celular e no lúmen (E-F, setas). mi = mitocôndria, mp = membrana plasmática, pl = plastídio, rel = retículo endoplasmático liso, se = conteúdo. Barras: 3 μm (A, D); 0,5 μm (B-C, F); 1 μm (E).

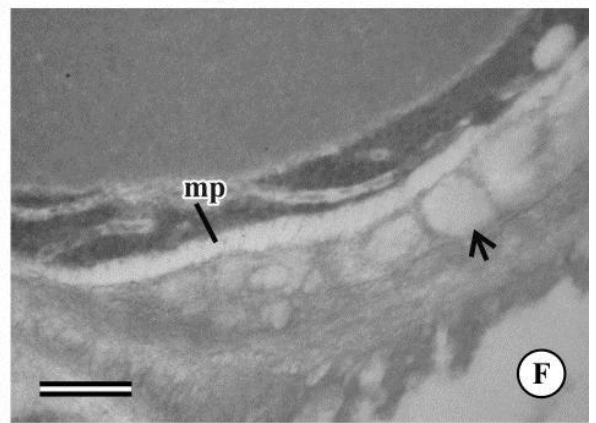
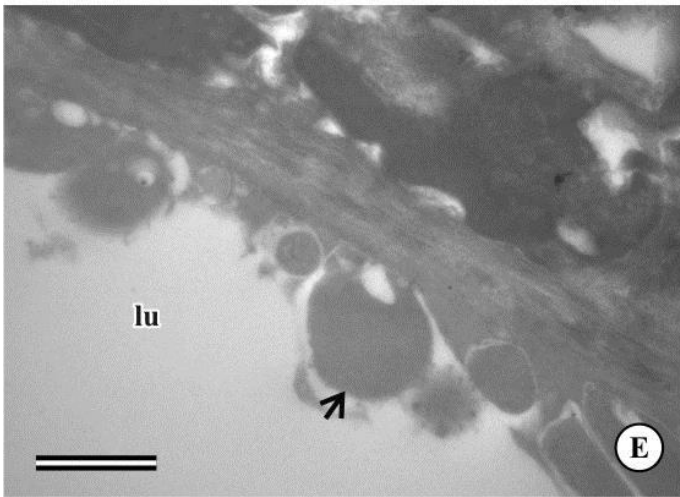
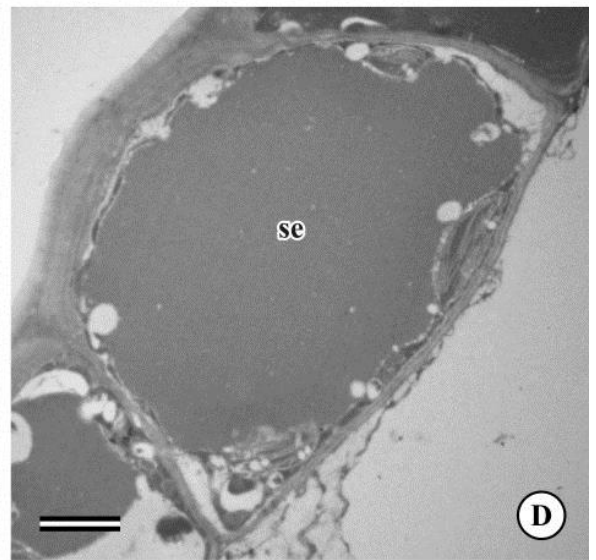
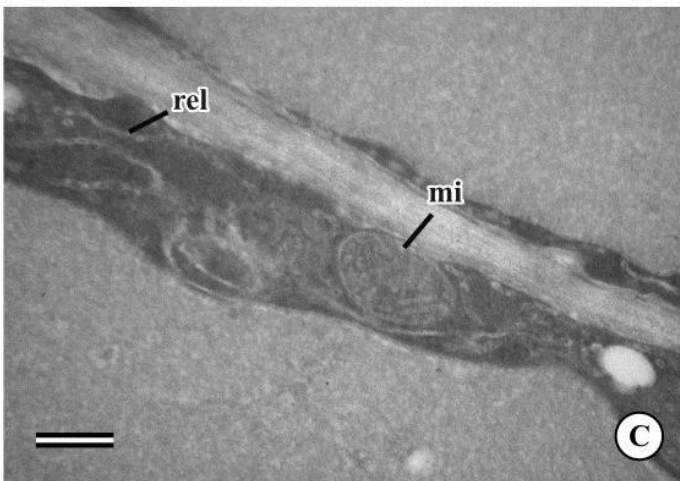
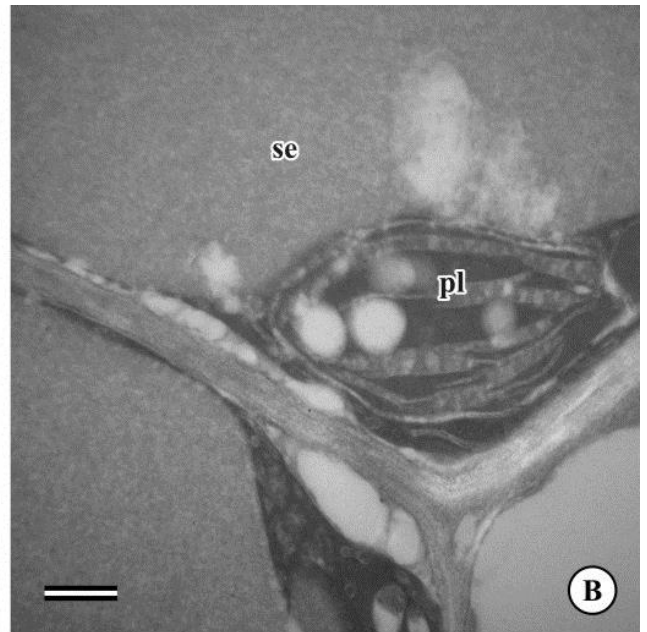
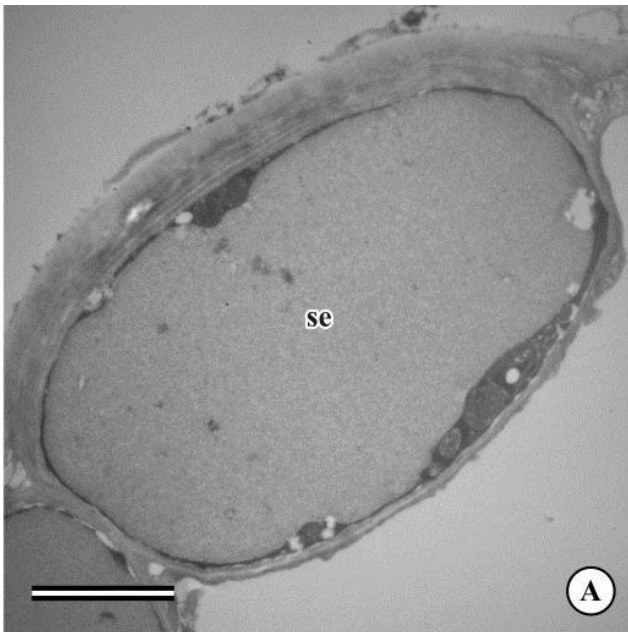


Figura 11: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia rufa*. A-C: Fase inicial de secreção evidenciando a formação de pequenos vacúolos com início de acúmulo de substâncias. D-I: Célula com aumento de conteúdo elétron-denso liberado no vacúolo (D). Observe os retículos endoplasmáticos rugosos (E) e os plastídios (F) e dictiossomos (G) associados a glóbulos elétron-opacos (setas). Estes glóbulos são depositados no vacúolo ou permanecem próximos à parede celular (seta, H-I). di = dictiossomo, mi = mitocôndria, nu – núcleo, pl = plastídio, pm = plasmodesma, rer = retículo endoplasmático rugoso, se = conteúdo elétron-denso, va = vacúolo. Barras: 2 μm (A); 0,5 μm (B, G); 1 μm (C, E-F, H-I); 4 μm (D).

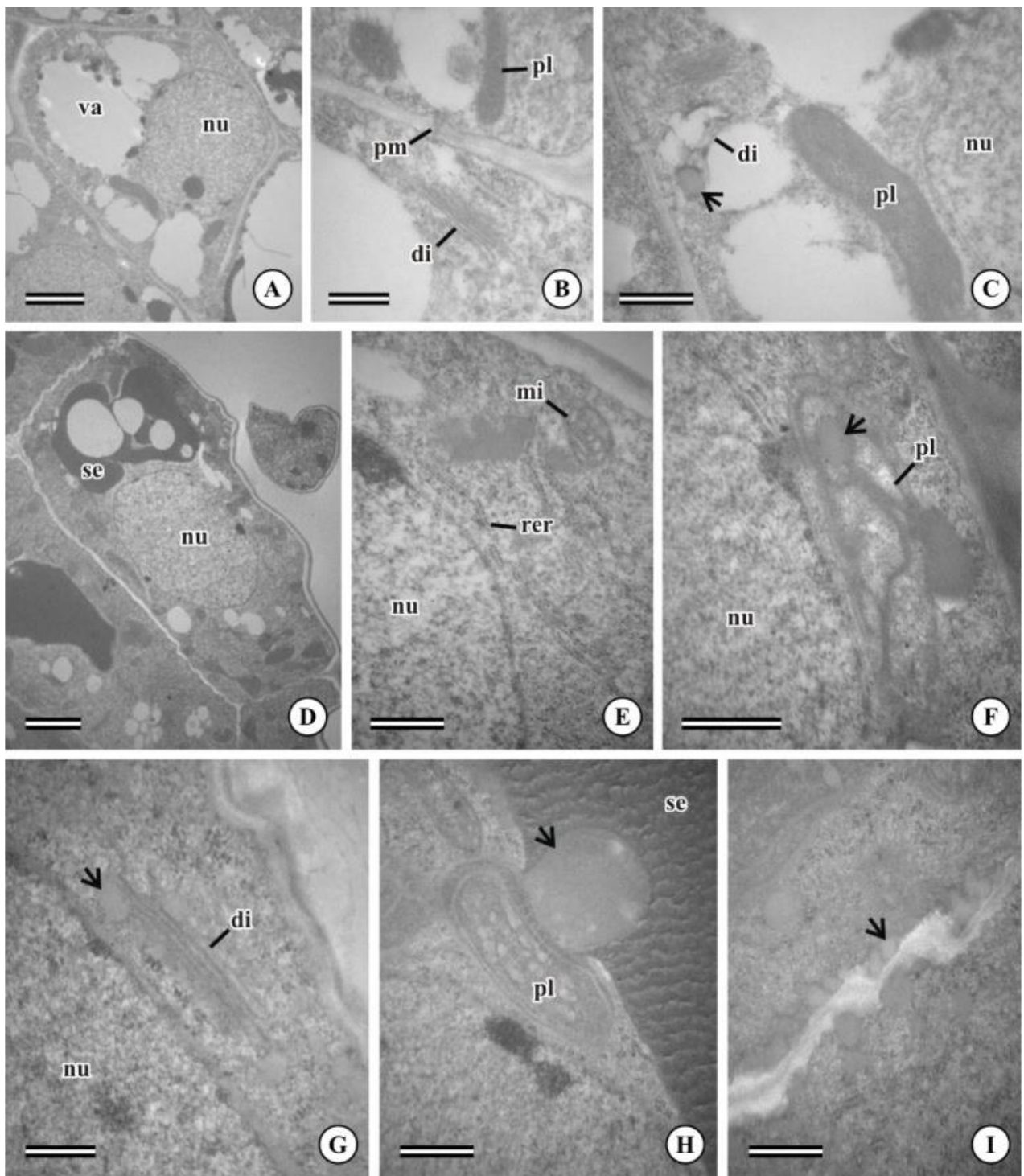


Figura 12: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia rufa*. A: Célula secretora mostrando vacúolos em expansão e fusão com conteúdo. B-D: Célula secretora de conteúdo elétron-opaco. E-F: Início da fragmentação do conteúdo acumulado no vacúolo. Observe o aumento na elétron-densidade em seu interior (C, F). mi = mitocôndria, pl = plastídio, nu = núcleo, rer = retículo endoplasmático rugoso, se = conteúdo. Barras: 4 μm (A-B, E); 1 μm (C-D); 0,5 μm (F).

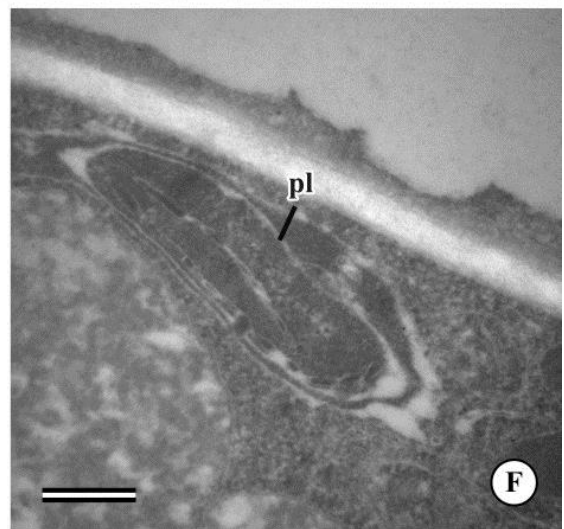
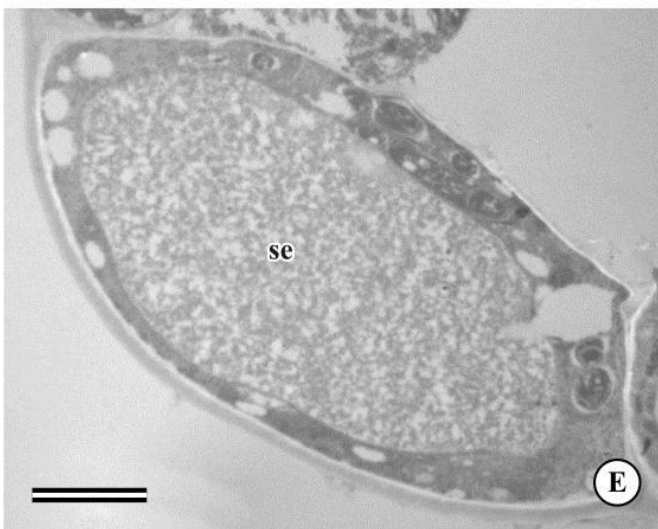
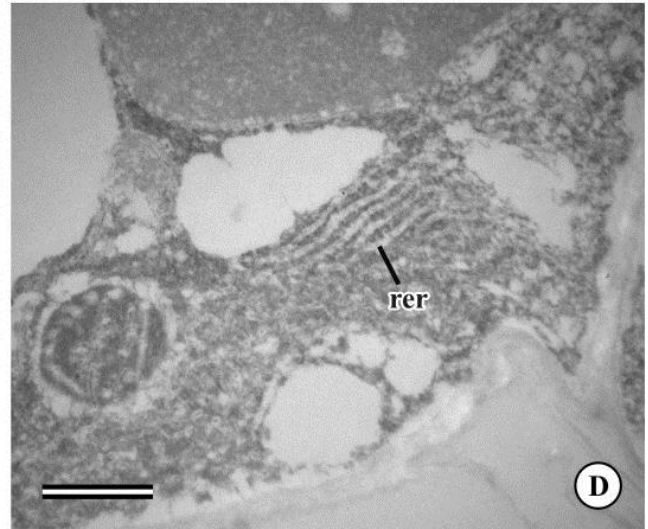
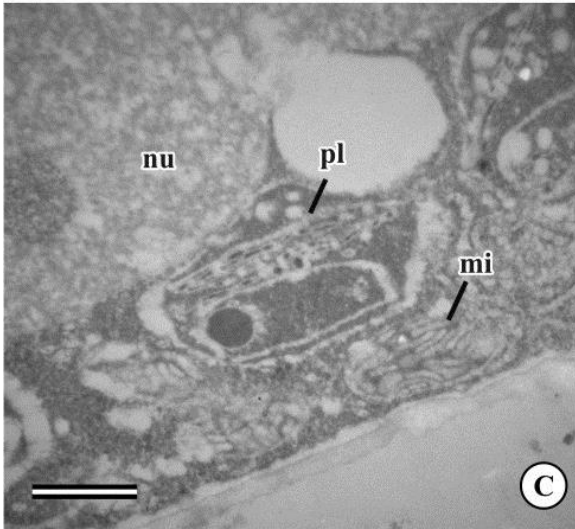
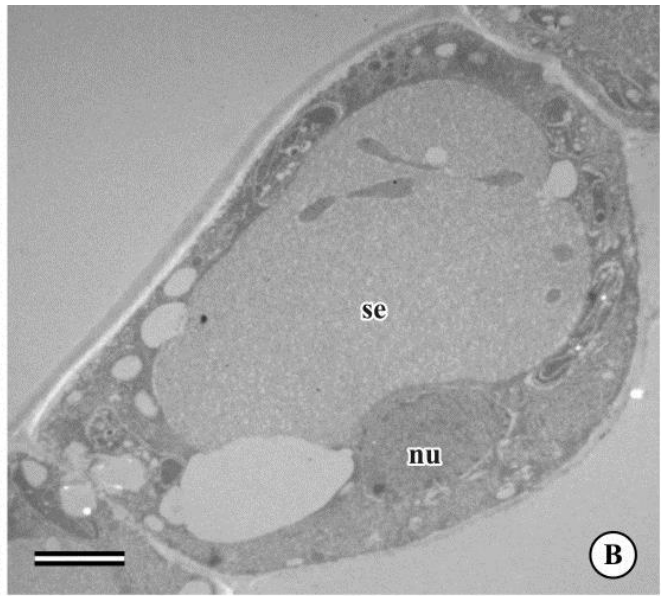
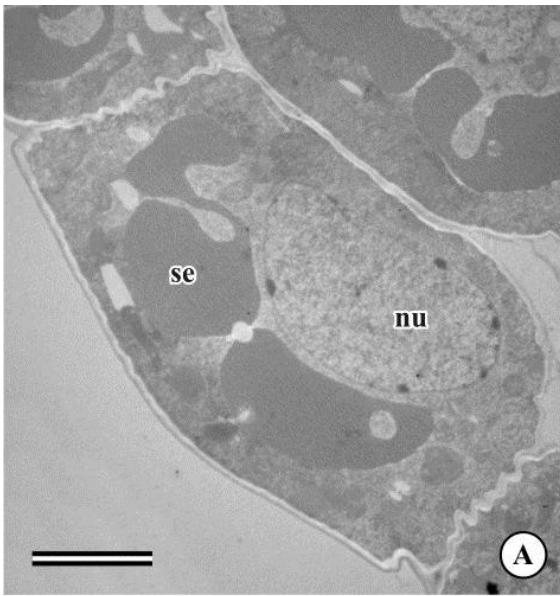


Figura 13: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia rufa*. A-E: Célula secretora de conteúdo fragmentado no vacúolo. Observe o dictiossomo (B), o retículo endoplasmático liso associado a vesículas elétron-densas (C, seta) e o conteúdo depositado no vacúolo (C, cabeça de seta). Os plastídios se tornam elétron-densos (D-E). nu = núcleo, pl = plastídio, rel = retículo endoplasmático liso, se = conteúdo, va = vacúolo. Barras: 4 μm (A); 0,5 μm (B-C, E); 1 μm (D).

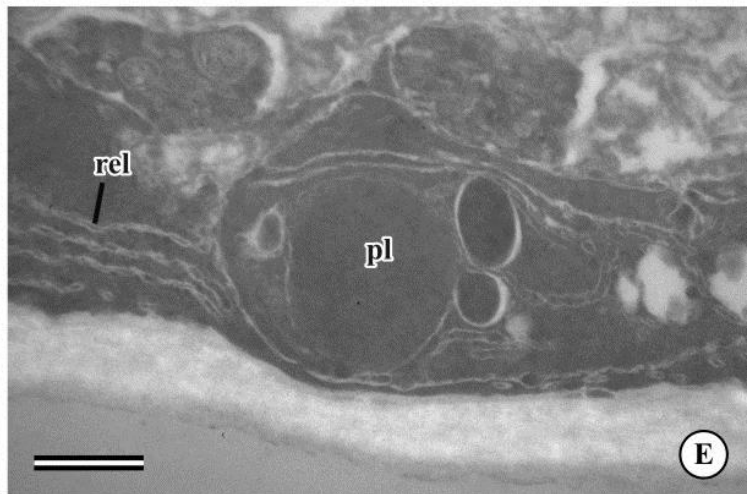
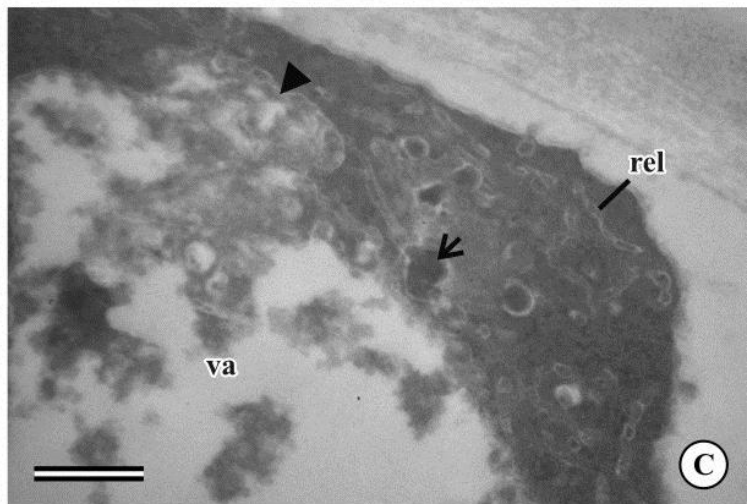
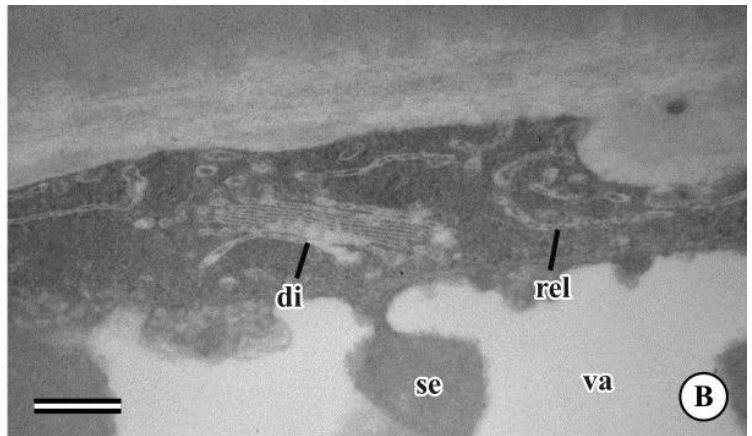
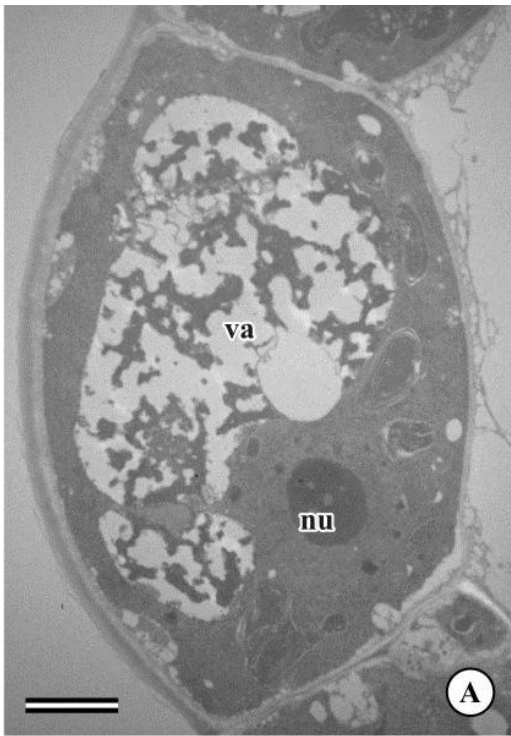


Figura 14: Ultraestrutura das células secretoras (MET) dos tricomas cavitados em sépalas de *Bauhinia rufa*. A-B: Célula secretora de conteúdo com aspecto liso. Note o conteúdo secretado entre a membrana plasmática e a parede celular e no interior do lúmen (B, setas). C: Célula secretora mostrando vacúolos vazios em meio ao conteúdo secretor. D-F: Célula secretora vazia, com retículo endoplasmático liso dilatado e associado a vesículas elétricas opacas (E, seta). lu = lúmen, rel = retículo endoplasmático liso, se = conteúdo, va = vacúolo. Barras: 3 μm (A); 0,5 μm (B, E); 6 μm (C-D); 1 μm (F).

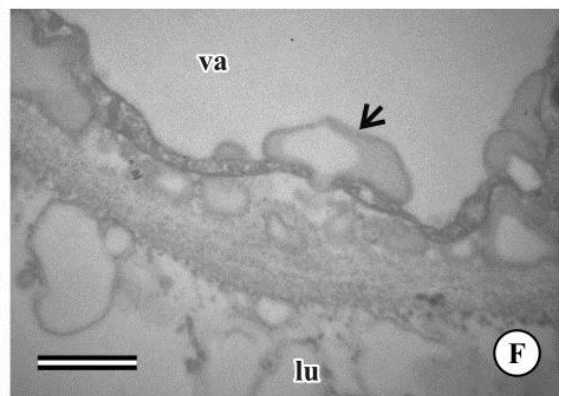
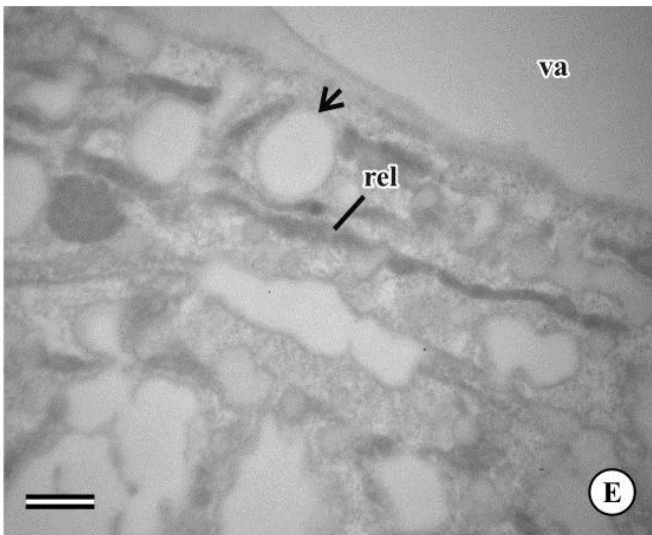
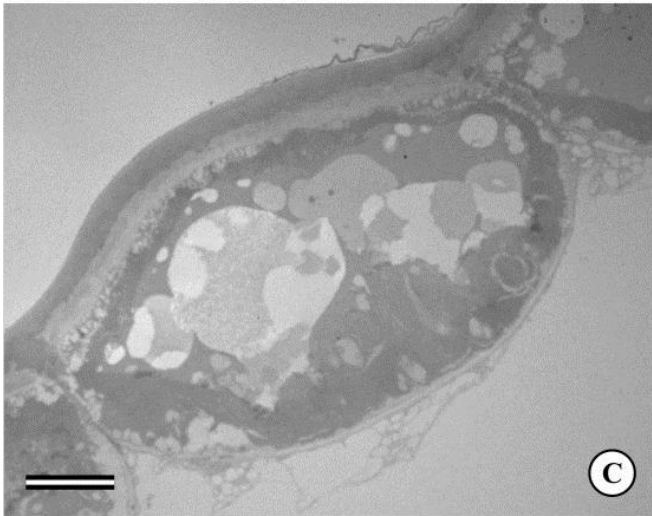
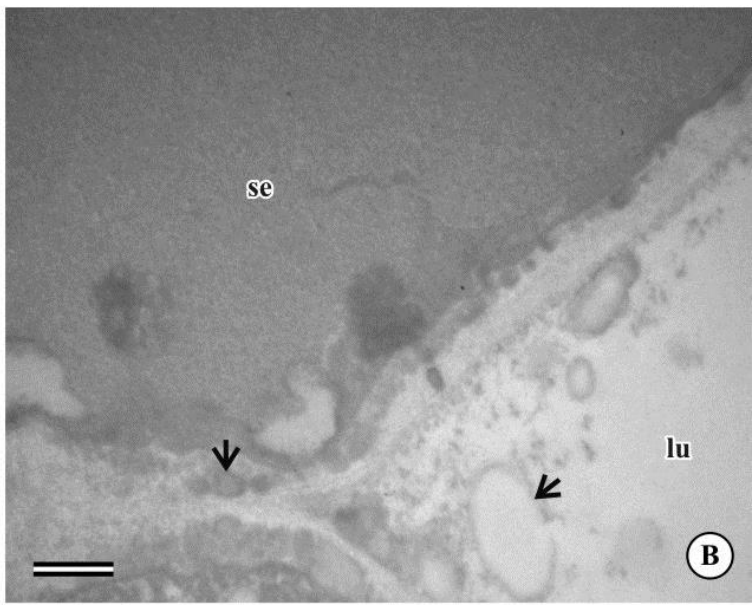
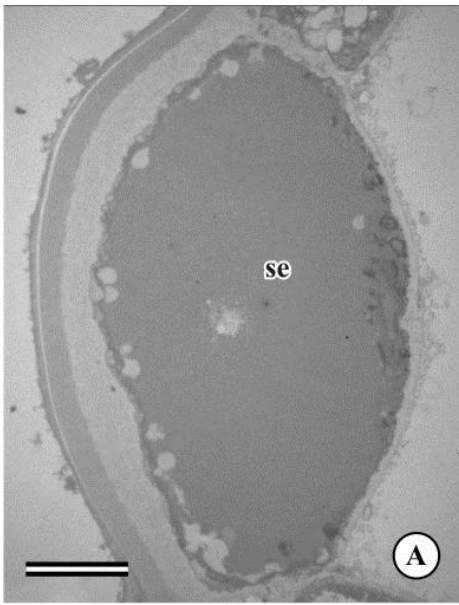


Tabela 1: Características dos tricomas secretores cavitados florais comparados aos foliares em *Bauhinia curvula* e *B. rufa*.

Características		<i>Bauhinia curvula</i>	<i>Bauhinia rufa</i>
Distribuição		Pecíolo, limbo foliar, sépala, pétala, ovário, estilete.	Pecíolo, limbo foliar, sépala, ovário, estilete.
Desenvolvimento		Origem: protoderme. Alongamento: divisões oblíquas, longitudinais e transversais das células do pedúnculo e da cabeça. Formação do lúmen: separação das células da cabeça a partir da porção apical.	
Anatomia		Pedúnculo curto, bisseriado e cabeça navicular constituída por uma camada de células lenticulares secretoras que se dispõem ao redor de um lúmen ovalado com conteúdo.	
Conteúdo	Histoquímica	Terpenos e compostos fenólicos	
	Perfil químico	CG: um pico na região 2	CG: oito picos na região 2
		CLAE: dois picos	CLAE: sete picos
Processo de secreção	Fase de síntese inicial	As células secretoras exibem núcleo conspícuo com cromatina descondensada e citoplasma elétron-opaco com dictiossomos sem vesículas, plastídios sem organização interna e rer. Os compostos fenólicos começam a ser produzidos antes dos terpenos e são armazenados em pequenos vacúolos. Os terpenos são sintetizados em células que exibem abundância de rer e mitocôndrias e vacúolos com maior deposição de conteúdo fenólico.	
		Os terpenos ocorrem no citoplasma associados à membrana externa dos plastídios.	Os terpenos ocorrem no interior dos plastídios e próximos aos dictiossomos.
	Fase de síntese intermediária	Os plastídios não exibem glóbulos associados à membrana externa, apresentam tilacóides.	Os plastídios apresentam uma desestruturação interna gradativa relacionada à formação de glóbulos em seu interior.
		O rel se prolifera e mostra associação com vesículas elétron-densas. Os vacúolos se fundem e a célula se dilata, apresentando um grande vacúolo com conteúdo elétron-denso de aspecto liso, referente aos fenólicos e terpenos depositados.	
	Fase de liberação	O conteúdo secretado atravessa a parede e se movimenta até a região de junção entre duas células secretoras, onde é liberado para o lúmen. O conteúdo passa do lúmen do tricoma secretor cavitado para sua superfície pelo afastamento das células apicais da cabeça e ruptura da cutícula.	

Discussão

Bauhinia curvula e *B. rufa* apresentam tricomas secretores cavitados florais e foliares com morfologia e padrão de desenvolvimento semelhantes. As diferenças encontradas na distribuição, na composição subcelular, no processo de secreção e na composição química do conteúdo são interespecíficas e pouco relacionadas às possíveis diferenças de funções destes tricomas em órgãos vegetativos ou reprodutivos da planta. Os perfis químicos obtidos tanto em CG quanto em CLAE indicam que os tricomas cavitados de *B. curvula* e *B. rufa* produzem classes diversas de terpenos e flavonoides, o que pode estar relacionado a pressões seletivas exercidas por herbívoros distintos do Cerrado a espécies arbustivas, como é o caso de *B. curvula*, e espécies arbóreas, como *B. rufa*.

É provável, portanto, que os terpenos e flavonoides produzidos pelos tricomas cavitados nas flores e folhas de *B. curvula* e *B. rufa* atuem somente na defesa à planta no decorrer do desenvolvimento, considerando que a produção de exsudato inicia-se em estádios muito anteriores à antese floral. Flavonoides são bastante conhecidos por suas propriedades na proteção contra herbívoros e patógenos, além da proteção contra raios UV (Pourcel *et al.* 2006). Terpenos também podem agir como repelentes e na proteção contra fungos e microrganismos, além de atuarem na atração de polinizadores e dispersores de sementes (Dudareva *et al.* 2006, Maffei 2010).

Tal inferência exclui a possibilidade das diferenças no processo de secreção dos tricomas estarem associadas ao fato de *B. curvula* ser esfingófila e *B. rufa* quiropterófila, visto que as glândulas de odor de espécies polinizadas por mariposas e morcegos produzem diferentes classes de compostos (Dobson 2006). Assim, os compostos voláteis responsáveis pela atração dos polinizadores são produzidos em outro tecido, como a epiderme e o mesofilo das sépalas e pétalas, que constituem tecidos de odor de produção difusa (C.R. Marinho *pers. obs.* para *B. curvula*, ver Capítulo 2 para *B. rufa*). Tricomas secretores florais não são frequentemente associados à produção de fragrância emitida pelas flores, sendo relatados somente em *Phragmopedilum grande* (Orchidaceae) e *Jacaranda oxyphylla* (Bignoniaceae) (Vogel 1990, Guimarães *et al.* 2008).

A produção de fenólicos e terpenos na mesma célula do tricoma secretor cavitado de *B. curvula* e *B. rufa* associada às alterações observadas nas populações de organelas constituem um excelente modelo para elucidar o papel das organelas em cada processo. A detecção de flavonoides concomitante à presença de uma população grande de retículo endoplasmático rugoso confirma estudos anteriores que sugerem o envolvimento desta organela na produção de compostos fenólicos (ver Parham & Kaustinen 1977, Barros 2011). A produção de flavonoides cessa enquanto os terpenos ainda estão sendo sintetizados. Este evento é marcado pela conversão do retículo endoplasmático rugoso em retículo endoplasmático liso, pelo aumento em abundância de plastídios e mitocôndrias e pela maior elétrion-densidade do citosol. O envolvimento desses compartimentos subcelulares na produção de terpenos em tricomas é amplamente conhecido na literatura (Ascensão *et al.* 1997, Turner *et al.* 2000, Turner & Croteau 2004, Huang *et al.* 2008, Nagegowda 2010). É importante ressaltar que a abundância de retículo endoplasmático liso nas células secretoras dos tricomas cavitados também deve estar associada ao transporte de conteúdo do vacúolo para o lúmen. Tal conteúdo atravessa a membrana plasmática e as microfibrilas da parede celular, que se tornam mais frouxas, até serem liberadas para o exterior celular, semelhante ao observado em tricomas secretores de espécies de Lamiaceae (Ascensão *et al.* 1997, Turner *et al.* 2000). Provavelmente a maior espessura da parede periclinal externa das células da cabeça dos tricomas cavitados de *B. curvula* e *B. rufa* garante o transporte das vesículas para o interior do lúmen e não para a superfície do tricoma.

É bastante interessante a semelhança morfológica entre os tricomas secretores cavitados e as cavidades secretoras (Paiva & Machado 2004, Paiva & Oliveira 2004, Milani *et al.* 2011, Rodrigues *et al.* 2011). As cavidades secretoras que se originam da protoderme e apresentam uma camada de epitélio secretor formada por processos esquizógenos (ex. *Hymenaea stigonocarpa*, Leguminosae – Paiva & Machado 2004) são as que apresentam aspectos do desenvolvimento mais semelhantes ao dos tricomas secretores cavitados de *B. curvula* e *B. rufa*. No entanto, enquanto a formação do epitélio secretor ocorre por divisões radiais nas cavidades, nos tricomas cavitados de *Bauhinia* a formação do epitélio se dá por divisões periclinais e longitudinais, que são comuns em tricomas secretores em

desenvolvimento, (Ascensão & Pais 1987, Turner *et al.* 2000, Healy *et al.* 2009, ver Capítulo 4), além de divisões oblíquas. Tal plano de divisão celular resulta na forma cuneiforme da célula apical do tricoma desde a primeira divisão celular. No entanto, Tucker *et al.* (1984), ao estudarem a distribuição e ontogenia dos tricomas cavitados de *Bauhinia malabarica*, *B. tomentosa* e *B. divaricata* (Leguminosae, Caesalpinioideae), constataram que a primeira divisão da inicial do tricoma é periclinal; enquanto que em *Indigofera* (Leguminosae, Papilionoideae) e *Holocarpha* (Asteraceae) a origem deste tipo de tricoma ocorre por uma primeira divisão anticlinal de uma célula protodérmica (Carlquist 1959, Kumar *et al.* 1986).

Semelhanças e diferenças também ocorrem no processo de liberação do conteúdo entre os tricomas secretores cavitados e os tricomas secretores comuns e as cavidades secretoras. Ao contrário do observado nos tricomas secretores, o conteúdo dos tricomas cavitados de *B. curvula* e *B. rufa* não é liberado para um espaço subcuticular, mas sim para o lúmen formado pela separação esquizógena das células da cabeça. No entanto, o conteúdo transportado para o lúmen dos tricomas cavitados não permanece confinado neste local, assim como observado nas cavidades secretoras (Fahn 1979, Ciccarelli *et al.* 2001, Teixeira & Rocha 2009, Rodrigues *et al.* 2011). Foi constatada a liberação deste conteúdo para o meio externo por meio da separação esquizógena das células mais apicais da cabeça destes tricomas.

A forma como se dá a formação do lúmen do tricoma secretor cavitado pode ter significado sistemático em Leguminosae. A separação das células sem que ocorra lise celular é condição comum em *Indigofera* e *Bauhinia* (Tucker *et al.* 1984, Kumar *et al.* 1986), mas a direção em que se inicia esta separação é variável e parece ser típica de cada gênero - separação centrífuga em *Indigofera* (Kumar *et al.* 1986) e no sentido apical-basal em *Bauhinia* (presente trabalho).

Este trabalho contribui para o avanço no estudo dos tricomas secretores, principalmente no que diz respeito às funções ecológicas destas estruturas nos diferentes órgãos. Além disso, os resultados obtidos trazem informações sobre a biologia da secreção e a natureza química do conteúdo produzido pelos tricomas cavitados, as quais são inexistentes na literatura.

Agradecimentos

Agradecemos aos técnicos Edimárcio da Silva Campos (FCFRP/ USP), José Augusto Maulin e Maria Dolores Seabra Ferreira (FMRP/ USP) pela assistência técnica; à Dra. Rejane Barbosa de Oliveira (FCFRP/ USP) pelo auxílio no procedimento das análises químicas; e à Fapesp (processos n°s 2008/55434-7 e 2009/01057-0) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Ascensão L., Pais M.S. 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *Maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette* **148**: 221–227.
- Ascensão L., Marques N., Pais M.S. 1997. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Sciences* **158**: 249–258.
- Baitello J.B. 1981/82. Desenvolvimento morfo-anatômico da folha de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. *Silvicultura de São Paulo* **15/16**: 61–89.
- Baker H.G. 1961. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quarterly Review of Biology* **36**: 64–73.
- Barros T.C. 2011. *Estruturas secretoras em órgãos vegetativos de espécies de barbatimão (Dimorphandra mollis Benth. e Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville - Leguminosae)*. Dissertação. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.
- Carlquist S. 1959. Glandular structures of *Holocarpha* and their ontogeny. *American Journal of Botany* **46**: 300–308.
- Ciccarelli D., Andreucci A.C., Pagni A.M. 2001. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* **88**: 637–644.
- Curtis J.D., Lersten N.R., Lewis G.P. 1996. Leaf Anatomy, emphasizing unusual ‘concertina’ mesophyll cells, of two east African legumes (Caesalpinieae, Caesalpinioideae, Leguminosae). *Annals of Botany* **78**: 55–59.
- David R., Carde J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l’ Academie des Sciences Paris* **D258**: 1338–1340.
- Dobson H.E.M. 2006. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: Dudareva N., Pichersky E. (Eds), *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: Taylor & Francis Group. Pp. 147–198.
- Duarte-Almeida J.M., Negri G., Salatino A. 2004. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochemical Systematics and Ecology* **32**: 747–753.

- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 417–440.
- Endress P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. New York: Cambridge University Press.
- Faegri K., van der Pijl L. 1979. *The principles of pollination ecology*, 3rd ed. Oxford/ New York/ Toronto/ Sydney/ Paris/ Braunschweig: Pergamon Press.
- Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Feder N., O'Brien T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123–142.
- Gibbs P.E., Oliveira P.E., Bianchi M.B. 1999. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian cerrados. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 72–78.
- Guimarães E., Di Stasi L.C., Maimoni-Rodella R.C.S. 2008. Pollination biology of *Jacaranda oxyphylla* with an emphasis on staminode function. *Annals of Botany* **102**: 699–711.
- Healy R.A., Palmer R.G., Horner H.T. 2009. Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecea. *International Journal of Plant Science* **170**: 444–456.
- Huang S., Kirchoff B.K., Liao J. 2008. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): histochemistry, ultrastructure, and secretion. *Journal of the Torrey Botanical Society* **135**: 155–167.
- Johansen D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137–138.
- Kumar B.K.V., Prabhakar M., Ramayya N., Leelavathi P. 1986. Structure, distribution and development of cavitated trichomes in *Indigofera* L. (Fabaceae). *Geophytology* **16**: 227–231.
- Leelavathi P., Ramayya N. 1983a. Structure, distribution and classification of plant trichomes in relation to taxonomy II. Caesalpinioideae. *Indian Journal of Forestry* **6**: 43–56.
- Leelavathi P., Ramayya N. 1983b. Structure, distribution and classification of plant trichomes in relation to taxonomy III. Papilionoideae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Science)* **92**: 421–441.
- Lersten N.R., Curtis J.D. 1994. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. *Plant Systematics and Evolution* **192**: 231–255.
- Lersten N.R., Curtis J.D. 1996. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of tribe Caesalpinieae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **200**: 21–39.
- Levin D.A. 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* **48**: 3–15.
- Lillie R.D. 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 3rd ed. New York/ Toronto/ Sydney/ London: McGraw-Hill Book Company.

- Lopes A.V., Vogel S., Machado I.C. 2002. Secretory trichomes, a substitutive floral nectar source in *Lundia* A. DC. (Bignoniaceae), a genus lacking a functional disk. *Annals of Botany* **90**: 169–174.
- Łotocka B., Osińska E. 2010. Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **163**: 70–86.
- Lusa M.G., Bona C. 2009. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Acta Botânica Brasilica* **23**: 196–211.
- Maffei M.E. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* **76**: 612–631.
- Marquiafável F.S., Ferreira M.D.S., Teixeira S.P. 2009. Novel reports of glands in Neotropical species of *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae). *Flora* **204**: 189–197.
- Merken H.M., Beecher G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 577–599.
- Metcalf C.R., Chalk L., 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*, v.2. Oxford: Clarendon Press.
- Milani J.F., Rocha J.F., Teixeira S.P. 2012. Oleoresin glands in copaiba (*Copaifera trapezifolia* Hayne: Leguminosae), a Brazilian rainforest tree. *Trees* **26**: 769–775.
- Munin R.L., Teixeira R.C., Sigrist M.R. 2008. Esfingofilia e sistema de reprodução de *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae: Caesalpinioideae) em cerrado no Centro-Oeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* **31**: 15–25.
- Nagegowda D.A. 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* **584**: 2965–2973.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- Paiva E.A.S., Machado S.R. 2004. Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) leaves. *Nordic Journal of Botany* **24**: 423–431.
- Paiva E.A.S., Oliveira D.M.T. 2004. Ontogenesis of the fruit pulp layer of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Australian Journal of Botany* **52**: 677–683.
- Parham R.A., Kaustinen H.M. 1977. On the site of tannin synthesis in plant cells. *Botanical Gazette* **138**: 465–467.
- Pearse A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*, v.2, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Pourcel L., Routaboul J., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. 2006. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**: 29–36.
- Rezende M.H., Cardoso L.A., Vannucci A.L. 1994. Morfologia e anatomia foliar da *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Acta Botânica Brasilica* **8**: 19–34.
- Rodrigues T.M., Teixeira S.P., Machado S.R. 2011. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora* **206**: 585–594.

- Sá C.E.M., Silveira F.A.O., Santos J.C., Isaias R.M.S., Fernandes G.W. 2009. Anatomical and developmental aspects of leaf galls induced by *Schizomyia macrocapillata* Maia (Diptera: Cecidomyiidae) on *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **32**: 319–327.
- Sass J.E. (1951) *Botanical microtechnique*, 2nd ed. The Iowa State College Press: Ames.
- Teixeira S.P., Rocha J.F. 2009. Oil glands in the neotropical genus *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Revista Brasileira de Botânica* **32**: 57–64.
- Tucker S.C., Rugenstein S.R., Derstine K. 1984. Inflated trichomes in flowers of *Bauhinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **88**: 291–301.
- Turner G.W., Gershenzon J., Croteau R.B. 2000. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology* **124**: 665–679.
- Turner G.W., Croteau R. 2004. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiology* **136**: 4215–4227.
- Uphof J.C.T. 1962. Plant Hairs. In: Linsbauer K. (Ed.), *Encyclopedia of Plant Anatomy*, v.4. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Vidal B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology* **22**: 45–64.
- Vogel S. 1990. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington: Smithsonian Institution Libraries. (Translated by S.S. Renner).
- Vogel S., Machado I.C. 1991. Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in NE Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **178**: 153–178.

CONCLUSÕES

As flores das leguminosas abordadas no presente estudo sempre exibiram algum tipo de estrutura secretora, seja relacionada à defesa ou à atração de polinizadores. Tal fato era esperado, visto que espécies vegetais polinizadas por animais geralmente apresentam dispositivos florais que atuam na atração destes, e, ao mesmo tempo, estruturas secretoras que repelem fitófagos também apresentam vantagens para as flores.

Nectários e osmóforos foram as estruturas secretoras florais relacionadas à atração encontradas. A anatomia dos nectários revelou correlações entre seu tamanho, a quantidade de néctar produzido e o tipo de polinizador (morcego *versus* mariposa), demonstrando sua grande importância na relação flor-polinizador. Já a anatomia dos osmóforos mostrou que não existem relações entre o tipo de osmóforo (típico ou difuso) e o hábito do polinizador (diurno ou noturno). Os osmóforos difusos predominaram nas espécies estudadas, o que levanta a hipótese deste estado de caráter ser convergente ou plesiomórfico nas espécies zoófilas de Leguminosae. Estudos ultraestruturais de osmóforos produtores de terpenos e compostos fenólicos revelaram características subcelulares inéditas para este tipo de glândula.

As flores apresentaram uma diversidade de tipos de estruturas secretoras relacionadas à defesa, sendo observados tricomas, cavidades, idioblastos e tecidos (epiderme e/ ou mesofilo) secretores de compostos fenólicos. Tais estruturas apresentam significado biológico e/ou taxonômico, mas ocorrem de maneira generalizada nas espécies polinizadas por diferentes grupos de animais, não podendo, portanto, serem associadas à determinada síndrome. Estudos de anatomia e de desenvolvimento mostraram que as estruturas secretoras superficiais robustas detectadas nas flores de *Poincianella pluviosa* e *Erythrostemon gilliesii* se tratam de tricomas secretores multicelulares, e que os tricomas secretores cavitados observados nas flores e folhas de *Bauhinia curvula* e *B. rufa* apresentam morfologia externa e desenvolvimento semelhantes, independente do órgão e da espécie analisados. Análises ultraestruturais e químicas realizadas nos tricomas cavitados revelaram que seu conteúdo é idêntico comparando-se os órgãos e, portanto, apresentam função semelhante, ou seja, atuam na defesa da planta. Além disso, como os

tricomas secretores de voláteis de *B. curvula*, *B. rufa*, *P. pluviosa* e *E. gilliesii* apresentam atividade não só na antese, mas em todas as fases do desenvolvimento floral, estas estruturas possivelmente atuam na defesa das flores ao longo do seu desenvolvimento.

Como já relatado para representantes de Leguminosae, tecidos secretores de compostos fenólicos podem ocorrer em todos os órgãos florais das espécies estudadas, estando presentes inclusive nos nectários e osmóforos de algumas espécies. Estes tecidos atuam na defesa da flor; porém, nos osmóforos eles também podem compor o odor, atuando na atração dos polinizadores.