

## Resumo

*Philodendron adamantinum* é uma espécie rupícola de distribuição restrita, polinizada pelo besouro *Erioscelis emarginata*. Essa espécie apresenta diversas características que favorecem a cantarofilia, como liberação de odor envolvida na atração do polinizador; termogênese; tecido nutritivo; protoginia e a presença de câmara que abriga os polinizadores. A liberação de resina na inflorescência, característica exclusiva do gênero, também auxilia no processo de polinização. Em busca de maior compreensão da complexa interação entre *P. adamantinum* e seu polinizador específico, a relação entre estrutura e funcionamento dos osmóforos, tecido nutritivo e canais secretores de resina foram explorados neste trabalho. Os osmóforos são formados por células secretoras dispersas na região apical estéril dos estames e no ápice dos estaminódios. Os estaminódios apresentam reserva lipídica que é, em sua maior parte, utilizada nos processos de termogênese e liberação de odor. O restante da reserva, bem como as células com citoplasma denso, ricas em compostos estruturais, são utilizados pelo besouro como recurso nutritivo. Somada à oferta nutritiva, a localização dos estaminódios no interior da câmara, além de manter os besouros na inflorescência até a liberação do pólen, auxilia na proteção das partes férteis, evitando o consumo destas pelos polinizadores. Os canais de resina apresentam características comuns a essas estruturas observadas em outras espécies. Porém, o mecanismo de liberação de resina para o meio externo é descrito pela primeira vez e apresenta forte correlação com a atividade dos polinizadores. O aumento do volume das células do canal, principalmente da camada subjacente ao epitélio secretor, resulta no aumento da pressão exercida sobre a resina no lume. A natureza extremamente péctica da parede das células parenquimáticas próximas ao ápice do canal sugere uma rota de abertura. Assim, aliando a pressão aumentada a um ponto de fragilidade, a epiderme é rompida e a resina extravasa. As estruturas estudadas neste trabalho medeiam a interação entre *P. adamantinum* e seu polinizador exclusivo, participando de uma sequência de eventos sincronizada, controlada por mecanismos precisos, que culmina na polinização dessa espécie.

**Palavras chave:** Araceae; canais resiníferos; osmóforos; *Philodendron*; tecido nutritivo; ultraestrutura celular.

## **Abstract**

*Philodendron adamantinum* is a rupicolous species of restricted distribution, pollinated by beetles *Erioscelis emarginata*. This Araceae species presents several traits that favour cantharophily, such as release of attractive scents; thermogenesis; nutritive tissue; protogyny and the presence of sheltering chamber for pollinators. The release of resin in the inflorescence, which occurs exclusively in *Philodendron*, also assists in the pollination process. Searching for better understand the complex interaction between *P. adamantinum* and its specific pollinator, the relationship between structure and function of osmophores, nutritive tissue and resin secretory ducts were evaluated in this work. The osmophores are composed by scattered secretory cells in infertile apical region of the stamens and in the apex of staminodes. The staminodes present lipid reserves that are, in the most part, used in the thermogenesis and scent release. The beetles use the remaining reserves as well as cells with dense cytoplasm rich in structural compounds as food source. Added to the nutrient supply, the position of staminodes into a chamber favors protection the fertile structures against pollinators' damages and keeps the beetles in the inflorescence until the pollen release. The resiniferous ducts have typical characteristics observed in other species. However, the mechanism of resin release to the external environment is first described in this work and shows strong correlation with pollinators' activity. The increase in volume of the cells of duct, especially the adjacent secretory epithelium layer, results in increased pressure on the resin in the lumen. The very high pectic nature of the wall of parenchyma cells near the apex of the duct suggests a route for duct opening. Thus, combining increased pressure to a weakness point, the epidermis is ruptured and the resin overflows. The structures studied in this work mediate the interaction between *P. adamantinum* and its exclusive pollinator, participating in a synchronized sequence of events controlled by precise mechanisms, culminating in the pollination of this species.

**Key words:** Araceae; cell ultrastructure; nutritive tissue; osmophores; *Philodendron*; resiniferous ducts

## Introdução geral

A maioria das angiospermas é polinizada por animais (Eriksson & Bremmer 1992). Essa interação é tão importante que, segundo alguns autores (Eriksson & Bremmer 1992, Bronstein *et al.* 2006), contribui de forma efetiva para a diversificação desse grupo. A interação animal-planta é usualmente mediada por estruturas secretoras e, considerando a polinização, pode-se citar a atração dos animais por recursos produzidos por tecidos secretores, como néctar, óleos essenciais, odores, dentre outros (Simpson & Neff 1981, Pansarin *et al.* 2009, Dötterl & Vereecken 2010).

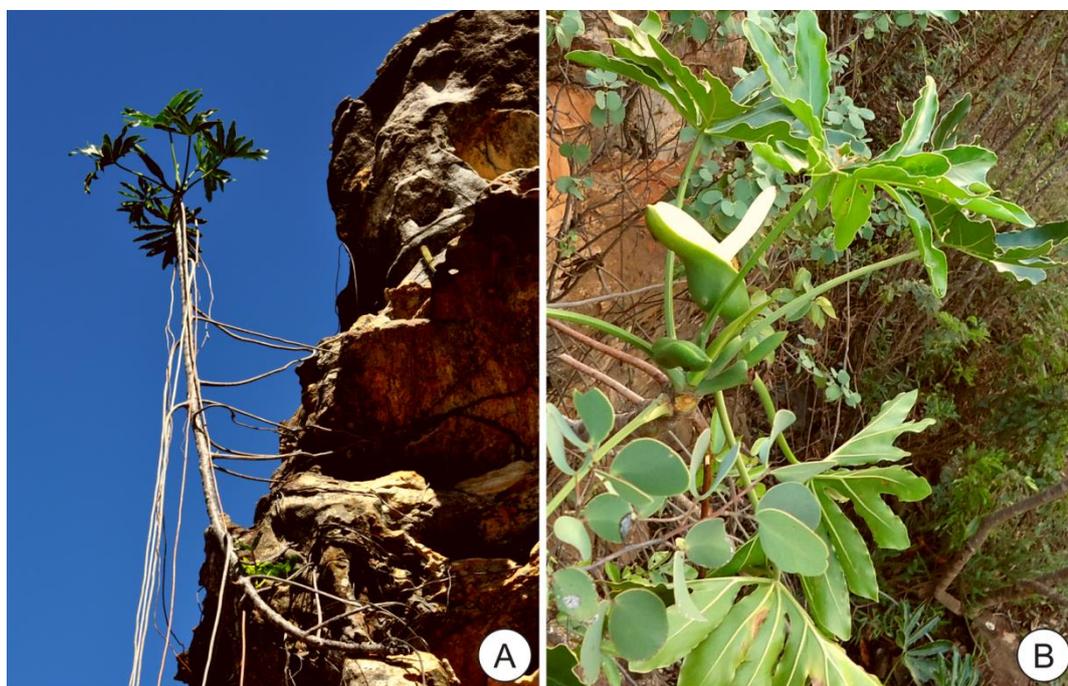
A família Araceae é basicamente polinizada por insetos (Mayo *et al.* 1997) divididos principalmente em três grandes grupos: abelhas, besouros e moscas (Gibernau 2003). Em espécies de diversos gêneros destacam-se as modificações morfológicas e a presença de estruturas secretoras que medeiam essa interação. Em *Arum*, a epiderme da espata impede que as moscas escapem da inflorescência (Dormer 1960). Em outros gêneros, como *Dieffenbachia* (Young 1986), ocorre o acúmulo de reserva em determinadas regiões da inflorescência que funcionam como oferta nutritiva para os polinizadores. Néctar é produzido no estigma de espécies de *Anthurium*, *Arum* e da subfamília Lasioideae e no conectivo em *Spathicarpa* (Mayo *et al.* 1997). A liberação de odor, uma característica marcante para a família, foi relatada em espécies de diversos gêneros (Knudsen *et al.* 1993, Kite & Hettterscheid 1997, Buzgo 1998, Gibernau *et al.* 1999, 2000, Gibernau & Barabé 2002, Miyake & Yafuso 2003).

A família Araceae possui ampla distribuição predominantemente tropical, mas cerca de 10% dos gêneros estendem-se às zonas temperadas do norte (Mayo *et al.* 1997). Compreende aproximadamente 107 gêneros e 2.500 espécies de plantas herbáceas e trepadeiras (Grayum 1990), sendo *Philodendron* o segundo maior, com aproximadamente 700 espécies (Croat 1997). O gênero é restrito ao novo mundo, distribuído do norte do México ao sul do Uruguai (Mayo *et al.* 1997). *Philodendron* é dividido em três subgêneros, *Meconostigma* composto por 20 espécies (Mayo 1991, Croat *et al.* 2002, Gonçalves & Salviani 2002), *Philodendron* pela maior parte das espécies e *Pteromischum* por 87 espécies (Grayum 1996).

*Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott pertencente ao subgênero *Meconostigma*, é uma planta rupícola (Fig. 1A) de ambientes montanhosos da Serra do Espinhaço, restrita à região de Diamantina, Minas Gerais (Mayo 1991). Ainda segundo autor, a espécie apresenta inflorescência com espata verde na superfície abaxial e branco-cremosa na superfície adaxial (Fig. 1B). A espádice contém três zonas distintas: estaminadas fértil e estéril e pistilada, sendo

a segunda ligeiramente maior do que a primeira, característica do subgênero. Segundo Pereira *et al.* (2014), a espécie é protogínica, não permitindo a autopolinização, dado que em um indivíduo não ocorrem duas inflorescências abertas ao mesmo momento.

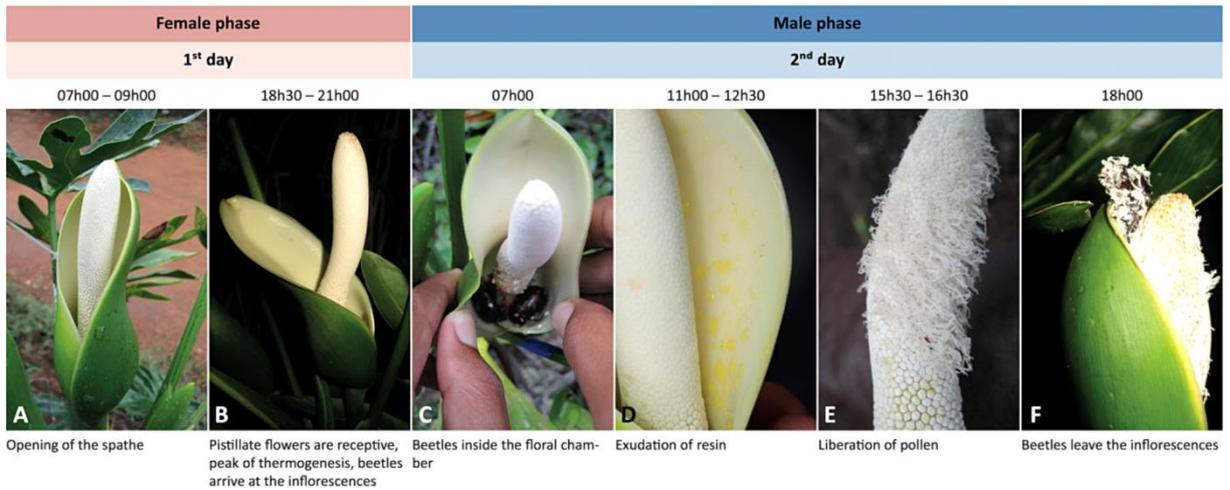
Estudos realizados por Pereira *et al.* (2014) abrangendo a biologia floral de *Philodendron adamantinum* permitiram a escolha dessa espécie como objeto de estudo e facilitaram o direcionamento das coletas. A ocorrência de população relativamente grande na região de coleta também foi determinante nessa escolha, visto que a espécie apresenta poucas inflorescências por indivíduo e em diferentes estádios de desenvolvimento num dado momento (Fig. 1B).



**Figura 1.** Indivíduos de *Philodendron adamantinum*. (A) Hábito rupícola. (B) Inflorescências em diversas fases de desenvolvimento.

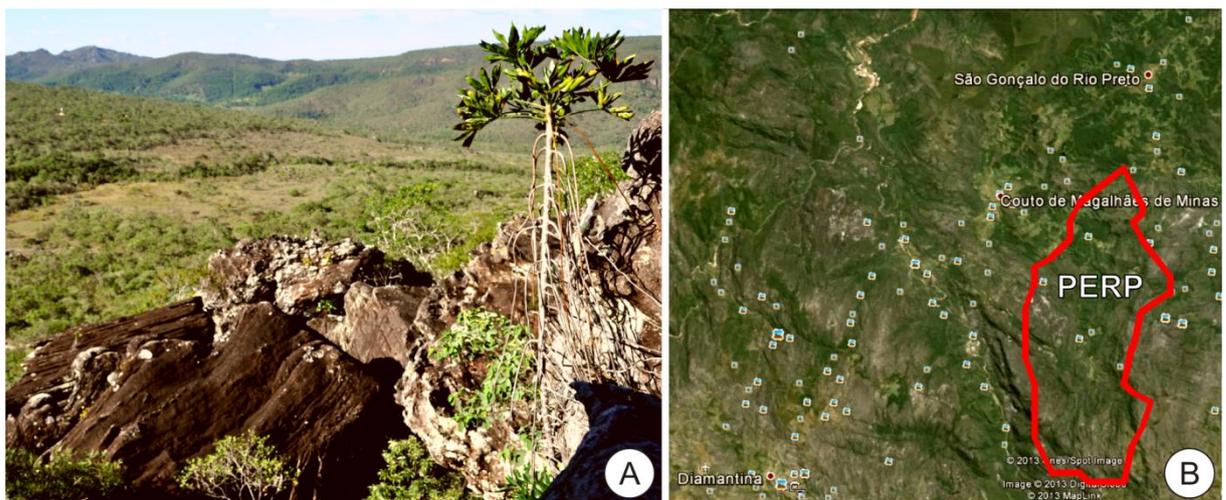
Estudos sobre a polinização em *Philodendron* mostram grande similaridade entre as espécies. Pereira *et al.* (2014), observaram que em *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott o besouro *Erioscelis emarginata*, escarabeídeo da subfamília Dynastinae, é atraído pelo odor liberado pela planta, permanecendo na câmara formada pela espata até o dia posterior, onde se alimentam de estaminódios. Durante o fechamento da espata, os besouros são expulsos da câmara e cobertos por resina concomitantemente liberada na espata. Essa resina adere grãos de pólen ao corpo do animal (Fig. 2), que atraído para inflorescências de outros indivíduos com o estigma receptivo, completa a polinização. Gibernau *et al.* (1999, 2000), Gibernau & Barabé (2002) e Maia *et al.* (2010) verificaram que a polinização ocorre dessa forma em *P.*

*solimoesense*, *P. melinonii*, *P. squamiferum* e *P. acutatatum* respectivamente, mesmo sendo os polinizadores de espécies diferentes.



**Figura 2.** Série de ocorrências durante a fase sexualmente reprodutiva de *Philodendron adamantinum*, imagem extraída de Pereira *et al.* (2014).

O Parque Estadual do Rio Preto – PERP localizado no município de São Gonçalo do Rio Preto – MG (Fig. 3), foi criado em 1994 com o objetivo de proteger a nascente do Rio Preto. Inserida na cadeia do Espinhaço no bioma Cerrado, a reserva apresenta relevo acidentado onde os afloramentos quartzíticos sobressaem e a vegetação é composta por um mosaico de formações campestres, campo limpo e rupestre, formações savânicas, florestas ciliares e áreas com floresta estacional semidecidual (IEF 2004). Nesse parque são encontradas diversas populações de *Philodendron adamantinum*, espécie objeto deste estudo.



**Figura 3.** (A) Vista do Parque Estadual do Rio Preto – PERP. (B) Localização e delimitações do PERP; imagem obtida por meio do *Google Earth*, com modificações.

A interação mutualística entre planta e polinizador, mediada por substâncias voláteis e pela presença de tecido nutritivo, é um interessante objeto a ser estudado devido às implicações

evolutivas e ecológicas que o tema contempla. Para compreender a dinâmica da relação entre *Philodendron adamantinum* e *Erioscelis emarginata*, foi proposto nesta dissertação o estudo das estruturas secretoras relacionadas à atração e os recursos alimentares utilizados pelo polinizador.

O papel ecológico das secreções e sua composição química são amplamente abrangidos em estudos (Schiestl & Dötterl 2012, Vega *et al.* 2014), porém a organização estrutural de tecidos secretores é, muitas vezes, negligenciada. Entender as características morfológicas dessas estruturas é fundamental para a elucidação de seus aspectos funcionais e das interações ecológicas nas quais estão envolvidas.

Estudos estruturais e a importância da relação mutualística entre *Philodendron adamantinum* e potenciais polinizadores podem contribuir para a compreensão das relações entre coleópteros e plantas cantarófilas. Em estudos recentes Pereira *et al.* (2014) identificaram os voláteis produzidos pelas inflorescências de *P. adamantinum* reforçando a necessidade dos estudos estruturais. O conhecimento da composição química da secreção, por outro lado, possibilita a correlação entre aspectos da estrutura celular e síntese dessas substâncias, auxiliando a compreensão das atividades biológicas envolvidas nesse processo.

## Referências Bibliográficas

- Bronstein JL, Alarcón R, Geber M. 2006.** The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist* **172**: 412-428.
- Buzgo M. 1998.** Odor differentiation in *Lagenandra ovata* (Araceae). *Acta Botanica Yunnanica* **X**: 76-88.
- Croat TB. 1997.** A Revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) for Mexico and Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**(3): 311-704.
- Croat TB, Mayo SJ, Boss JO. 2002.** A new species of Brazilian *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Aroideana* **25**: 63-66.
- Dormer KJ. 1960.** The truth about pollination in *Arum*. *New Phytologist* **59**: 298-301.
- Eriksson O, Bremer B. 1992.** Pollination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in Angiosperm families. *Evolution* **46**(1): 258-266.
- Gibernau M. 2003.** Pollinators and visitors of aroid inflorescences. *Aroideana* **26**: 73-91.
- Gibernau M, Barabé D. 2002.** Pollination ecology of *Philodendron squamiferum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany* **80**: 316-320.
- Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A. 1999.** Beetle pollination of *Philodendron solimoense* (Araceae) in French Guiana. *International Journal of Plant Sciences* **160**(6): 1135-1143.
- Gibernau M, Barabé D, Labat D. 2000.** Flowering and pollination of *Philodendron melinonii* (Araceae) in French Guiana. *Plant Biology* **2**: 331-334.
- Gonçalves EG, Salviani ER. 2002.** New species and changing concepts of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Aroideana* **25**: 2-15.
- Grayum MH. 1990.** Evolution and phylogeny of the Araceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**(4): 628-697.
- Grayum MH. 1996.** Revision of *Philodendron* subgenus *Pteromischum* (Araceae) for Pacific and Caribbean Tropical America. *Systematic Botany Monographs* **47**: 1-233.
- IEF 2004.** Instituto Estadual de Florestas - Plano de Manejo do Parque Estadual do Rio Preto.

- Kite GC, Hetterscheid WLA. 1997.** Inflorescence odours of *Amorphophallus* and *Pseudodracontium* (Araceae). *Phytochemistry* **46**(1): 71-75.
- Knudsen JT, Tollsten L, Bergström LG. 1993.** Floral scents- a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* **33**(2): 253-280.
- Maia ACD, Schlindwein C, Navarro DMAF, Gibernau M. 2010.** Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic forest of Northeastern Brazil: a single scarab beetle species guarantees high fruit set. *International Journal of Plant Sciences* **171**(7): 740-748.
- Mayo SJ. 1991.** A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Kew bulletin* **46**(4): 601-681.
- Mayo SJ, Bogner J, Boyce PC. 1997.** *The Genera of Araceae*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Miyake T, Yafuso M. 2003.** Floral scents affect reproductive success in fly-pollinated *Alocasia odora* (Araceae). *American Journal of Botany* **90**(3): 370-376.
- Pansarin LM, Castro MM, 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.
- Pereira J, Schlindwein C, Antonini Y, Maia ACD, Dötterl S, Martins C, Navarro DMAF, Oliveira R. 2014.** *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* **111**(3): 679-691.
- Schiestl FP, Dötterl S. 2012.** The evolution of floral scent and olfactory preferences in pollinators- coevolution or pre-existing bias. *Evolution* **66**(7): 2042-2055.
- Simpson BB, Neff JL. 1981.** Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301-322.
- Vega C, Herrera CM, Dötterl S. 2014.** Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **16**: 32-42.
- Young HJ. 1986.** Beetle pollination of *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *American Journal of Botany* **73**(6): 931-944.

## Capítulo I

### Desvendando os osmóforos em *Philodendron adamantinum* (Araceae) como meio de compreender a interação com polinizadores

#### Resumo

O osmóforo de *Philodendron adamantinum* é de suma importância na reprodução dessa espécie cantarófila, uma vez que o polinizador exclusivo é atraído pelos compostos voláteis emitidos pelas inflorescências. Nessa espécie, como em diversas outras, o osmóforo não apresenta uma identidade morfológica definida, o que dificulta sua localização e, conseqüentemente, desestimula estudos estruturais. Diversas abordagens foram aplicadas para localização e compreensão do funcionamento do tecido secretor. Um teste sensorial foi utilizado, permitindo restringir as demais análises aos estames, férteis e estéreis, locais de produção de odor. As análises estruturais, ultraestruturais e histoquímicas foram realizadas por meio de técnicas usuais. Na porção distal dos estames férteis e estaminódios as células epidérmicas são papilosas e, de modo semelhante às células parenquimáticas dessa região, apresentam características secretoras. Ainda nessa porção, ocorre o acúmulo de reservas lipídicas, consumidas concomitantemente à liberação de odor. Nas células de citoplasma denso, a composição de organelas é compatível com a atividade secretora, destacando-se mitocôndrias e plastídios em maior número, além de retículo endoplasmático liso e alguns dictiossomos. O teste com solução de vermelho neutro se mostrou ineficiente na detecção de osmóforos de *P. adamantinum*, evidenciando a fragilidade dessa técnica. Os osmóforos estão localizados na porção apical estéril dos estames férteis e em região correspondente nos estaminódios. A provável partição da energia acumulada entre os processos de termogênese e liberação de odor sugere que a região estaminada fértil é mais efetiva na síntese e liberação dos compostos voláteis. Os dados obtidos, principalmente a identificação da localização dos osmóforos, podem servir como estímulo a outros estudos em espécies relacionadas, permitir comparações futuras e estabelecer padrões morfofuncionais.

**Palavras chave:** Araceae; interação inseto-planta; osmóforos; polinização; ultraestrutura celular

## Introdução

Os odores emitidos pelos osmóforos atuam na atração de polinizadores, dispersores e predadores de herbívoros (Gang 2005) e na repelência de potenciais herbívoros (Chapman *et al.* 1981). Segundo Vogel (1963) os osmóforos diferem de outras glândulas secretoras pela localização, o produto liberado, duração da atividade e estrutura anatômica.

Diversos estudos químicos e ecológicos foram realizados tendo como objeto os osmóforos e a secreção por eles produzida (Chapman *et al.* 1981, Huber *et al.* 2005, Vega *et al.* 2014). Porém, pouca informação é encontrada na literatura em relação aos aspectos anatômicos, devido principalmente à dificuldade de localização dessa estrutura secretora. Os poucos estudos estruturais são, em sua maioria, restritos à família Orchidaceae (Wiemer *et al.* 2009, Melo *et al.* 2010).

Osmóforos são encontrados em algumas gimnospermas e apresentam distribuição ampla entre as angiospermas (Knudsen *et al.* 1993), dentre as quais ocorrem em maior frequência em monocotiledôneas e, após Orchidaceae, Araceae é o grupo mais importante em relação a essas estruturas (Vogel 1963). Embora a emissão de odores tenha sido relatada para *Philodendron* (Gibernau *et al.* 1999, 2000, Gibernau & Barabé 2002, Maia *et al.* 2010), inexistem estudos morfológicos que permitam sequer localizar com precisão as estruturas produtoras de voláteis nesse gênero.

Diversas espécies cantarófilas possuem osmóforos, constituindo uma marcante característica dessa síndrome (Gottsberger 1977). A polinização por besouros é amplamente encontrada em Araceae (Gibernau 2003) bem como em famílias basais (Pijl 1960). As espécies dessas famílias apresentam características semelhantes que, em conjunto, são responsáveis pela atração e manutenção do polinizador caracterizando a síndrome de cantarofilia. Nas espécies de *Philodendron*, apesar de receberem vários visitantes florais, a polinização é realizada por grandes coleópteros (Croat 1997).

A família Araceae compreende aproximadamente 107 gêneros e 2.500 espécies (Grayum 1990), sendo *Philodendron* o segundo maior gênero, com aproximadamente 700 espécies (Croat 1997). As inflorescências das espécies de *Philodendron* apresentam pedúnculo curto e espatas persistentes que se abrem do ápice para a base, fechando-se logo após a liberação do pólen. A espádice apresenta flores aclamídeas pistiladas na base e estaminadas no ápice, sendo a região estaminada frequentemente dividida em fértil e estéril (Mayo 1991).

Em *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott, espécie rupícola endêmica da Serra do Espinhaço, Minas Gerais (Mayo 1991), diversas características compatíveis com a cantarofilia, tais como liberação de odor para atração do polinizador; termogênese; tecido nutritivo; protoginia e a presença de câmara formada pela espata, utilizada como local de acasalamento são observadas (Pereira *et al.* 2014). Segundo esses autores, a polinização em *P. adamantinum* é realizada exclusivamente pelo besouro *Erioscelis emarginata*, escarabeídeo da subfamília Dinastinae, que é atraído pela liberação de substâncias voláteis durante o primeiro pico de termogênese.

O papel do odor liberado pelos osmóforos na atração do único polinizador observado em *P. adamantinum* é imprescindível para a reprodução dessa espécie de distribuição bastante restrita. Sendo os osmóforos estruturas inconspícuas em *P. adamantinum*, como na maioria dos casos, uma abordagem anatômica se faz necessária para localização e compreensão do funcionamento do tecido secretor. Assim, buscando compreender a interação entre *P. adamantinum* e seu polinizador, este trabalho teve por objetivos determinar a localização e proceder a análise estrutural e ultraestrutural dos osmóforos, de modo a compreender seu funcionamento.

## **Materiais e métodos**

### *Coleta*

As amostras de *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott foram coletadas no Parque Estadual do Rio Preto, localizado no município de São Gonçalo do Rio Preto, MG. Inflorescências em diversos estádios de desenvolvimento, de acordo com a necessidade de cada análise, foram localizadas em diferentes populações distribuídas pelo parque.

As coletas foram realizadas de novembro a janeiro, durante o período reprodutivo de *P. adamantinum*, ao longo dos anos de 2012, 2013 e 2014.

Material testemunho foi depositado no herbário BHCB do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob o número 161786.

### *Teste sensorial*

Duas inflorescências recém-abertas foram dissecadas de modo a permitir a separação das seguintes porções: espata e espádice, sendo que desta foram removidas as flores deixando apenas o eixo floral. Assim foram obtidas amostras contendo espata, eixo da inflorescência, flores estaminadas férteis, flores estaminadas estéreis e flores pistiladas. Cada amostra isolada foi transferida para um recipiente que permaneceu fechado durante duas horas, após esse período o recipiente foi aberto para detecção da fragrância. Imediatamente os recipientes foram fechados e, dessa forma permaneceram por vinte e quatro horas para confirmar a presença de odor.

### *Análise estrutural e natureza da secreção*

Os resultados obtidos no teste sensorial indicaram as fontes de odor, sendo assim, as análises seguintes foram procedidas apenas nas regiões estaminadas férteis e estéreis.

Três inflorescências foram coletadas e, de acordo com a liberação de odor, cinco estádios de desenvolvimento foram definidos: (1) aproximadamente cinco dias antes (início da abertura da espata); (2) oito horas antes (manhã de abertura total da espata); (3) durante a liberação de odor; (4) 24 horas após (deiscência das anteras); (5) 36 horas após (quando a espata se encontra fechada novamente). Amostras de estames férteis e estaminódios, todas contendo tecido do eixo da inflorescência, foram processadas para estudos sob microscopia de luz e testes histoquímicos.

As amostras foram submetidas a vácuo em solução de Karnovsky pH 7,2 em tampão fosfato 0,1M (Karnovsky 1965) e fixadas por 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica (Johansen 1940) e submetido à pré-infiltração e infiltração em resina sintética (2-hidroxi-etil-metacrilato) (Leica®). Secções de 6µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com solução de azul de Toluidina, pH 7,4 (O'Brien *et al.* 1964), contra coradas com solução de vermelho de rutênio, dispostas em lâminas e montadas em Entellan® para fotodocumentação e estudo sob microscopia de luz.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em amostras da região estaminada fértil de inflorescências em aproximadamente dez dias antes e durante a liberação de odor, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, desidratadas em série etílica crescente até o ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido, metalizadas com ouro

(Robards 1978) e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), a 12-20 kV.

Testes histoquímicos foram empregados tanto em amostras fixadas em solução de Karnovsky e seccionadas à mão livre com lâmina inox quanto em material incluído em resina e seccionado em micrótomo rotativo. Os seguintes testes foram realizados: Lugol para identificação de amido (Johansen 1940); NADI para terpenos (David & Carde 1964); solução aquosa de cloreto férrico a 10% para compostos fenólicos (Johansen 1940); solução aquosa de vermelho de rutênio a 0,02% para detecção de compostos pécticos (Jensen 1962); Sudan red B para lipídios em geral (Brundrett *et al.* 1991).

Para localização de tecidos metabolicamente ativos duas inflorescências contendo a espata foram coletadas no estágio correspondente à liberação de odor. Ambas foram totalmente imersas em solução aquosa de vermelho neutro 0,01% por 24 horas (Vogel 1963). Após esse período, as inflorescências foram retiradas e analisadas a olho nu. As espádices foram seccionadas para observação dos tecidos internos.

#### *Análises ultraestruturais*

Considerando os resultados obtidos na análise de odor, as análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram focadas principalmente nos estames férteis, sendo analisadas apenas algumas amostras dos estéreis. Amostras das porções apicais dos estames foram coletadas no início da abertura da espata, estágio correspondente a aproximadamente cinco dias antes da liberação de odor, duas horas antes e durante a liberação. Os fragmentos obtidos foram fixados em solução de Karnovsky pH 7,2 em tampão fosfato 0,1M (Karnovsky 1965) por 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) por duas horas, lavados em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2), desidratados em série etílica e infiltrados em resina Araldite® (Roland 1978). As secções ultrafinas de 50nm obtidas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão a 80 kV.

## Resultados

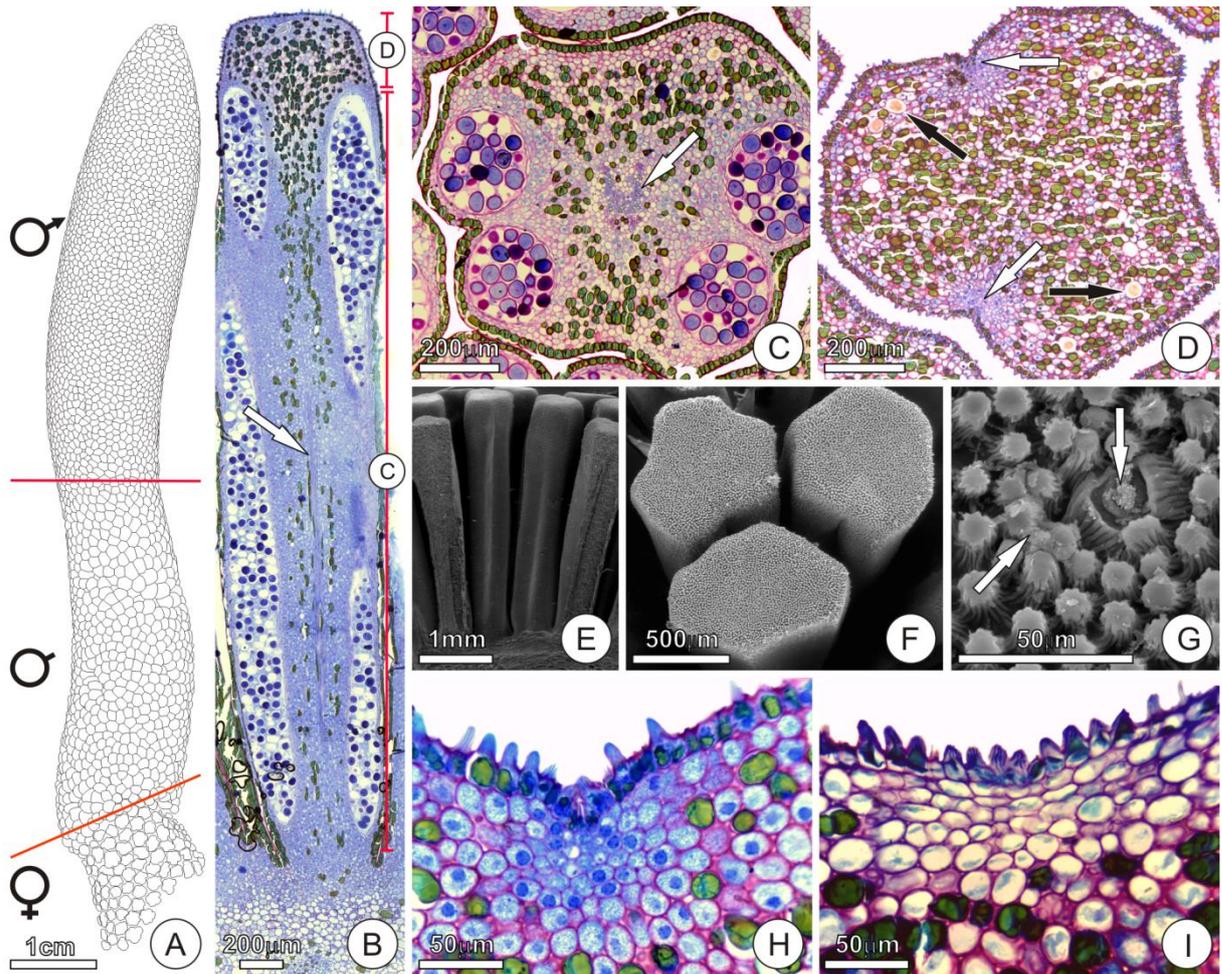
### *Localização, organização estrutural e natureza da secreção*

Forte odor de fruto maduro foi detectado nos fragmentos da região estaminada fértil e, em menor intensidade, na região estaminada estéril no teste sensorial. Nas demais regiões da inflorescência – eixo e flores pistiladas, bem como na espata, o odor não foi percebido. Durante esse teste observou-se, ainda, a condensação de gotículas nos recipientes contendo as porções estaminadas fértil e estéril, evidenciando a ocorrência de termogênese nessas regiões.

A zona estaminada fértil, localizada no ápice da inflorescência (Fig. 1A), possui numerosos estames obpiramidais e justapostos (Figs. 1A-B). Cada estame, revestido por epiderme unisseriada, apresenta uma antera biteca e tetraesporangiada (Figs. 1B-C) que apresenta deiscência longitudinal. Esses estames apresentam apenas um feixe vascular que parte do eixo da inflorescência e sua seção distal coincide com o ápice dos esporângios, destacando uma porção apical estéril (Figs. 1B, D).

Nessa porção as células epidérmicas são papilosas e formam a superfície exposta da espádice (Figs. 1E-F). Os estômatos são encontrados ao longo de toda a superfície do estame. No ápice, por ocasião da emissão de odores, observa-se que os estômatos apresentam poros obstruídos por substância amorfa, que se espalha por entre as papilas (Fig. 1G). Na lateral dos estames, a epiderme apresenta células com face periclinal externa plana, ou seja, as papilas estão ausentes. A epiderme não papilosa apresenta células com vacúolo amplo, no qual se acumulam substâncias de natureza fenólica (Fig. 1C).

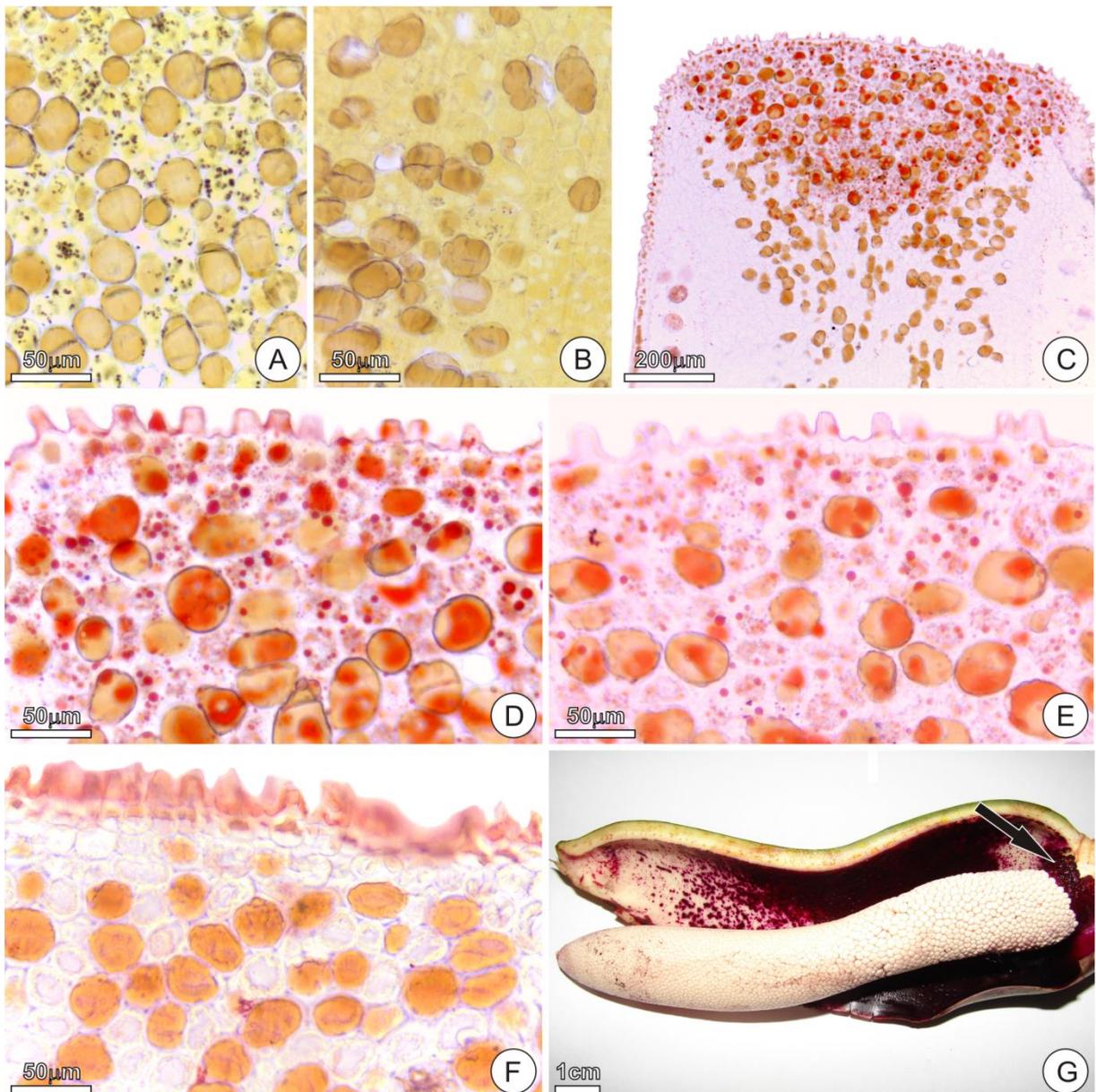
As células parenquimáticas são globosas com paredes delgadas e, algumas, apresentam ráfides ou drusas, principalmente na porção apical dos estames (Fig. 1D). Antes da termogênese os estames apresentam regiões de células com características secretoras, como citoplasma denso, núcleo conspícuo e vacuoma pouco desenvolvido, entremeadas por células vacuoladas que armazenam substâncias fenólicas (Figs. 1D, H). Após a termogênese as primeiras células se tornam vacuoladas, porém desprovidas de substâncias fenólicas (Fig. 1I). Na porção apical estéril do estame, reentrâncias são observadas, acima do estômio. Nessas reentrâncias ocorre concentração das células com características secretoras (Figs. 1D, H).



**Figura 1.** Estames férteis de *Philodendron adamantinum*. (A) Esquema representando a distribuição dos tipos florais na espádice: na região apical flores estaminadas férteis; na região mediana os estaminódios e na basal as flores pistiladas. (B) Secção longitudinal destacando a região da antera, exibida em corte transversal na figura (C) e a porção apical estéril, onde se acumulam substâncias fenólicas em parte das células parenquimáticas, em corte transversal na figura (D), seta aponta único feixe vascular. (C) Secção transversal na região da antera, mostrando os microsporângios e, indicado pela seta, o feixe vascular; perceber a ausência de papilas nas células epidérmicas. (D) Secção transversal da porção apical estéril, notar epiderme papilosa e ausência de vascularização, setas brancas destacam as reentrâncias onde se acumulam células com citoplasma denso, setas pretas indicam idioblastos contendo cristais. (E) Imagem lateral de estames exibindo epiderme papilosa na porção distal e lisa nas laterais. (F) Superfície apical dos estames mostrando epiderme papilosa homogênea. (G) Detalhe de estômato localizado na superfície do estame, setas indicam secreção, notar a ornamentação cuticular. (H-I) Reentrâncias da porção apical estéril. (H) Oito horas antes da liberação de odor, notar as células com características secretoras. (I) 24 horas após a liberação de odor, observar intensa vacuolização nas células.

Nos estames férteis a presença de amido foi observada apenas no período anterior ao primeiro pico de termogênese, no tecido fundamental (Fig. 2A) e em algumas células epidérmicas. Durante o primeiro pico de termogênese esse amido é consumido (Fig. 2B).

Gotas lipídicas dispersas no citoplasma foram observadas nas células da porção apical estéril (Figs. 2C-D). Durante o primeiro pico de termogênese esses lipídios desaparecem (Fig. 2E) de modo a estarem ausentes nos estádios posteriores (Fig. 2F). Essa fração lipídica é composta, pelo menos em parte, por terpenos, evidenciados pelo teste NADI.



**Figura 2.** Testes histoquímicos realizados na porção apical estéril dos estames férteis de *Philodendron adamantinum*. (A-B) Teste de Lugol em seções transversais do parênquima. (A) Oito horas antes da emissão intensa de odor. (B) Durante a liberação de odor. (C-F) Teste Sudan Red. (C) Secção longitudinal do ápice do estame evidenciando o acúmulo de substâncias lipídicas na porção apical estéril. (D-F) Sequência de seções transversais da região próxima à epiderme exibindo o consumo da reserva lipídica. (D) Oito horas antes da liberação de odor, notar as gotículas de reserva lipídica dispersas no citoplasma. (E) Durante a liberação de odor, observar consumo parcial. (F) 24 horas após a liberação de odor evidenciando a exaustão da reserva. (G) Inflorescência submetida à imersão em vermelho neutro, notar resultado positivo apenas na espata e nas flores pistiladas indicadas pela seta preta.

Após 24 horas de imersão das inflorescências em solução de vermelho neutro observou-se que os ápices das flores pistiladas e a face adaxial da espata coraram intensamente. As regiões estaminadas fértil e estéril não apresentaram alteração de cor (Fig. 2G), tampouco o eixo da

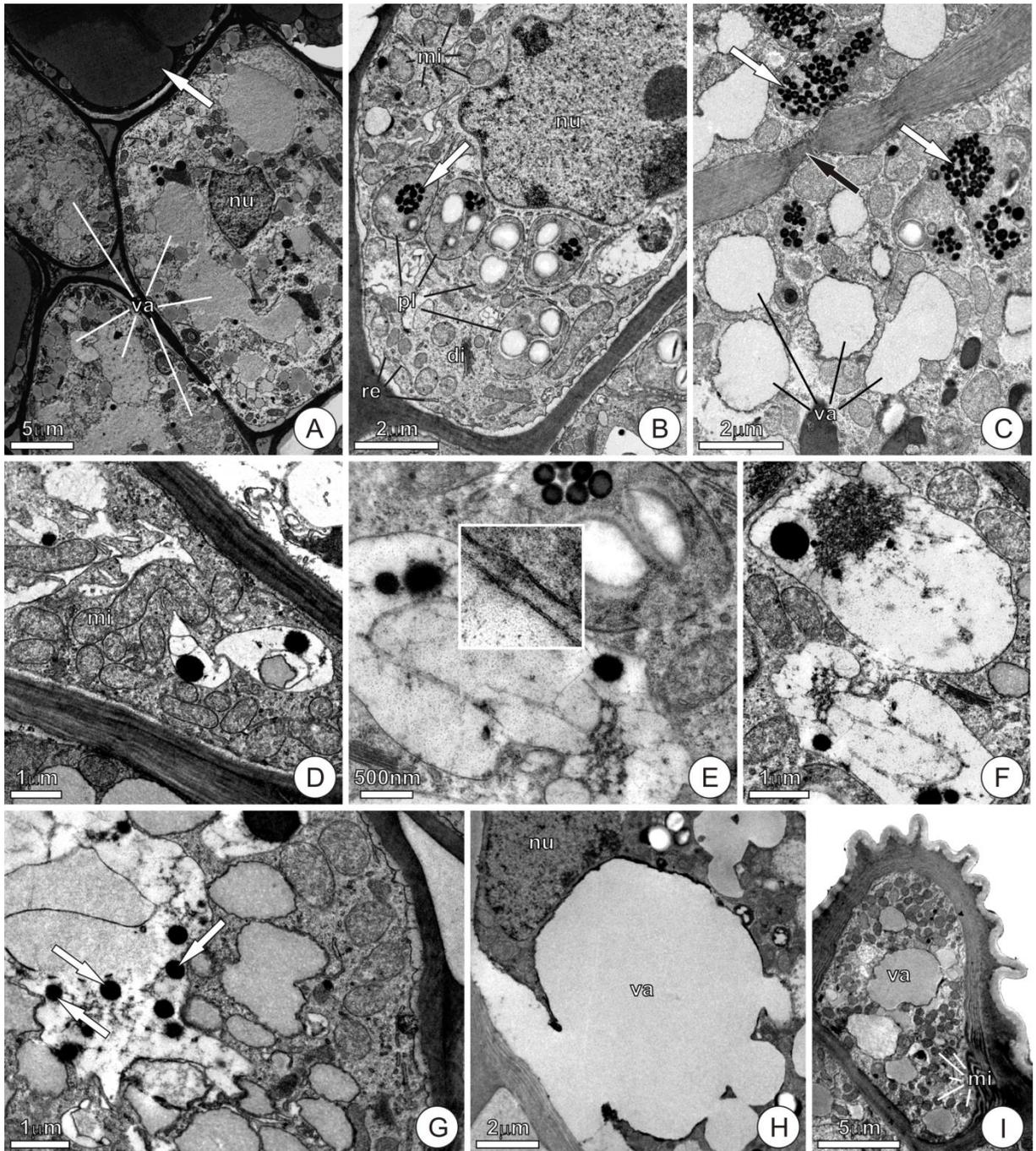
inflorescência. A espádice foi seccionada longitudinalmente para visualização dos tecidos internos que também não foram corados.

Os estaminódios apresentam estrutura anatômica bastante semelhante àquela observada nos estames férteis (ver capítulo 2) Assim, sendo a emissão de voláteis mais intensa na porção estaminada fértil da inflorescência, apenas estames dessa porção foram descritos em detalhe neste capítulo.

### *Organização ultraestrutural*

Na porção apical estéril dos estames férteis, o tecido fundamental apresenta tanto células de citoplasma denso e rico em organelas, quanto células vacuoladas e fenólicas (Fig. 3A). Nas células com substâncias fenólicas o vacúolo ocupa grande proporção do lume celular, ficando o citoplasma, pobre em organelas, limitado a uma estreita faixa comprimida junto à parede celular (Fig. 3A).

As células de citoplasma denso apresentam alta população de organelas e o vacuoma é formado por diversos vacúolos pequenos, no interior dos quais nota-se a presença de substância amorfa (Fig. 3A), provavelmente lipídios. Nessas células o núcleo é evidente, com nucléolo conspícuo (Fig. 3B); a parede é bastante delgada e podem ser observados plasmodesmos comunicando células adjacentes (Fig. 3C). No citoplasma, além dos vacúolos, observam-se plastídios, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e dictiossomos, dentre as organelas mais representativas (Figs. 3B-C). Os plastídios apresentam sistema de membranas pouco desenvolvido, estroma denso e inúmeros plastoglóbulos; grãos de amido podem ser observados em algumas dessas organelas (Figs. 3B-C). Os dictiossomos, pouco numerosos, apresentam poucas cisternas e não há indícios de produção de vesículas. Merece destaque o elevado número de mitocôndrias, dispersas por todo o citoplasma, que apresentam cristas muito desenvolvidas (Fig. 3D).



**Figura 3.** Células secretoras durante a emissão de odor em estames férteis e estaminódios de *Philodendron adamantinum*. (A-G) Estames férteis. (A) Células secretoras mostrando citoplasma denso, seta aponta vacúolo central repleto de conteúdo fenólico, pressionando o citoplasma para a periferia. (B) Célula evidenciando grande população de organelas, principalmente amiloplastos e mitocôndrias, seta destaca plastoglôbulos, notar plastídios com sistema de tilacoides ausente. (C) Conexão entre duas células por campo de pontoação indicado pela seta preta, setas brancas destacam numerosos plastoglôbulos. (D) População de mitocôndrias mostrando cristas bem desenvolvidas. (E-G) Sequência do processo de transformação de plastídios em vacúolos. (E) Plastídio normal no canto superior e, no canto inferior, outro com conteúdo já modificado, em detalhe, membranas duplas de ambas as estruturas. (F) Estádio intermediário da transformação de plastídios em vacúolos (G) Vacúolo formado, sendo possível reconhecer a origem plastidial devido à presença de plastoglôbulos indicados pelas setas. (H-I) Estaminódios. (H) Vesículas fusionadas ao vacúolo incorporado à membrana plasmática, liberando conteúdo para o espaço periplasmático. (I) Célula epidérmica exibindo população de organelas semelhante às demais células secretoras. di - dictiossomo; mi - mitocôndria; nu - núcleo; pl - plastídio; re - retículo endoplasmático; va - vacúolo.

Durante a liberação de odor, observa-se em alguns plastídios sinais da hidrólise de amido e forte redução na densidade do estroma (Fig. 3E). Nesse estágio, essas organelas perdem a dupla membrana, o sistema de membranas internas se desfaz e a organela passa por uma alteração de contorno, expandindo-se de forma ameboide (Figs. 3E-F). Na sequência desses eventos, o plastídio em transformação pode ainda ser reconhecido, sobretudo pela presença dos plastoglóbulos; as membranas internas desaparecem e o estroma torna-se ainda mais rarefeito (Fig. 3F). Notam-se indícios da fusão entre plastídios (Fig. 3F) e, em algumas células, plastoglóbulos no interior dos vacúolos (Fig. 3G). Por todo o citoplasma, fusões entre pequenos vacúolos podem ser observadas e, não raro a fusão de vacúolo com a membrana plasmática, quando ocorre o extravasamento do conteúdo vacuolar para o espaço periplasmático e espaços intercelulares (Fig. 3H).

As células epidérmicas papilosas, dispostas no ápice dos estames, apresentam composição de organelas semelhante à observada nas células do tecido fundamental; elevada população de mitocôndrias, plastídios e pequenos vacúolos (Fig. 3I). Nessas células a parede celular periclinal externa mostra-se ligeiramente espessa e lamelada; a cutícula espessa e íntegra forma, junto com camadas mais externas da parede, ondulações (Fig. 3I).

## Discussão

A liberação de odor detectada no teste sensorial permitiu a constatação de que os osmóforos na espécie *Philodendron adamantinum* estão localizados nos estames, férteis e estaminódios. Diversas características observadas nessas estruturas reforçam essa observação. Em *Lagenandra ovata* os osmóforos também estão localizados nos estames (Buzgo 1998), porém o autor não realizou análises estruturais que permitam a comparação.

A ocorrência de células epidérmicas papilosas na região do tecido secretor de compostos voláteis foi relatada para várias espécies (Endress 1984, Sazima *et al.* 1993, Vogel & Hadacek 2004, Melo *et al.* 2010), sendo uma característica recorrente que pode ser utilizada como indicativo da localização dos osmóforos.

A análise dos compostos voláteis de *P. adamantinum* foi realizada por Pereira *et al.* (2014) que constataram como principal constituinte do *bouquet* o terpenoide diidro- $\beta$ -ionona. Segundo esses autores, o (*E*)-8,9-deidro-4,5-diidrotheaspirona e o eucaliptol também estão entre os compostos mais abundantes na fragrância dessa espécie. A natureza terpênica da

reserva lipídica do ápice dos estames foi evidenciada pelo teste de NADI, corroborando o fato de que essa região atua como osmóforo.

O teste com a solução de vermelho neutro utilizado para a localização de osmóforos já foi recomendado por Vogel (1963) concatenado a outros meios, devido à sua inespecificidade, corando todo tecido com características de metabolismo elevado. Porém, no caso da espádice de *P. adamantinum*, os tecidos secretores de compostos voláteis não foram corados por essa solução. Esse fato pode ser atribuído ao impedimento do contato do corante com o tecido secretor, isolado pela cutícula hidrofóbica dos estames e pela presença de poucos estômatos, principalmente na porção apical dos estames, uma vez que os estômatos funcionariam como meio de entrada do corante até os tecidos mais internos. O resultado obtido nas inflorescências de *P. adamantinum* levaria à conclusão errônea de que o osmóforo estaria localizado na espata e na região correspondente às flores pistiladas. Assim, nossos resultados indicam que este teste deve ser empregado com ressalvas, sobretudo em Araceae.

Mesmo em pequena quantidade, os estômatos do ápice dos estames parecem funcionar como meio de liberação dos compostos voláteis. A presença de secreção no poro estomático e a ausência de poros cuticulares nas demais células epidérmicas são evidências que suportam essa hipótese. Estômatos como meio de liberação da secreção dos osmóforos foram observados em outras espécies (Vogel 1963, Melo *et al.* 2010).

As células do ápice dos estames possuem citoplasma denso, elevada população de organelas, principalmente mitocôndrias e vacuoma pouco desenvolvido no período anterior à liberação de odor. Essas, segundo Fahn (1988), são características de tecido secretor. Assim como em *P. adamantinum*, diversas espécies de Orchidaceae apresentam numerosas mitocôndrias com cristas bastante desenvolvidas no tecido dos osmóforos (Pridgeon & Stern 1983, Curry 1987, Melo *et al.* 2010). Melo *et al.* (2010) atribuíram essa característica ao consumo elevado de energia durante o processo secretor.

Alta densidade de mitocôndrias também está relacionada ao processo de termogênese, oriundo da respiração celular. Segundo Seymour *et al.* (1983), a termogênese em *Philodendron selloum* ocorre nas flores estaminadas, sendo aproximadamente 70% do calor emitido pelas flores estéreis. Walker *et al.* (1983) afirmam que essas flores utilizam lipídios como substrato para a geração de calor. Os resultados obtidos neste capítulo indicam que o mesmo ocorre em *P. adamantinum*. O compartilhamento dessa característica parece resultar da estreita relação filogenética entre essas espécies, circunscritas ao restrito subgênero *Meconostigma* (Mayo

1991). Esse fato corrobora que o maior aporte de compostos voláteis seja proveniente dos estames férteis, já que parte considerável dos recursos energéticos dos estaminódios é consumido na geração de calor.

A presença de plastoglobulos é vista por muitos autores como evidência da produção de compostos terpênicos (Pridgeon & Stern 1983, Curry *et al.* 1987). Apesar de estudos recentes revelarem outras funções para essas estruturas, esses estudos não descartaram o papel no metabolismo e armazenamento de substâncias lipídicas (Austin *et al.* 2006, Bréhélin *et al.* 2007, Bréhélin & Kessler 2008).

Embora o acúmulo de amido nos osmóforos seja relatado em diversos estudos (García *et al.* 2007, Wiemer *et al.* 2009, Melo *et al.* 2010), sendo inclusive uma característica utilizada como indício da localização dessa estrutura, a presença de amido não é universal; Vogel & Martens (2000) relataram que os osmóforos de espécies do gênero *Arisaema* não apresentam reserva de amido e mantêm a emissão de odor, bem como a temperatura, constantes ao longo da antese. A presença de amido nos estames férteis de *P. adamantinum* está restrita a fase imediatamente anterior à termogênese e à liberação de odor. Esse amido coexiste com as substâncias terpênicas que, possivelmente, são parte do *bouquet* liberado. Portanto, pode-se inferir que o amido não participa da síntese dos compostos voláteis, sendo consumido em outros processos metabólicos.

A abundante vascularização na região dos osmóforos de *Ceropegia elegans* foi relacionada por Vogel (1963) com a necessidade de água e assimilados durante a produção e emissão dos voláteis. A ausência de vascularização na região dos osmóforos indica que os recursos utilizados na produção e liberação dos compostos voláteis são providos pela reserva acumulada no tecido secretor durante o seu desenvolvimento.

A transposição do conteúdo dos plastídios para o interior de vacúolos foi relatada em nectários de *Cucumis sativus* (Peng *et al.* 2004) e *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado 2008). Porém, em ambos os casos o plastídio não se converte em vacúolo como observado nas células do osmóforo de *P. adamantinum*. No primeiro o plastídio é englobado pelo vacúolo e no segundo ocorre a dissolução do envelope e posterior formação da membrana do vacúolo. Peng *et al.* (2004) sugerem que o néctar é modificado no interior dos plastídios em associação com os vacúolos. A síntese de pelo menos parte dos compostos voláteis liberados por *P. adamantinum* possivelmente ocorre no interior de plastídios e a transformação dessas organelas em vacúolos pode estar relacionada ao transporte da secreção para o espaço periplasmático. A

conversão de plastídios em vacúolos é claramente demonstrada pela presença dos plastoglóbulos, antes restritos aos plastídios, no interior dos vacúolos na fase de liberação da secreção.

A secreção dos compostos voláteis é, pelo menos em parte, granulócina, visto que são observadas diversas vesículas incorporadas à membrana plasmática liberando o conteúdo para o espaço periplasmático. Esse modo de secreção foi observado nos osmóforos de espécies de Orchidaceae e Passifloraceae (Pridgeon & Stern 1983, García *et al.* 2007). Não há grande acúmulo de substâncias no espaço periplasmático, o que segundo Vogel (1983), é comum em osmóforos, sendo as substâncias voláteis sintetizadas durante a liberação do odor e não armazenadas previamente. A visualização de material no interior dos ostíolos permitiu inferir que a secreção não é liberada na forma gasosa, sendo volatilizada no ambiente externo. Sendo assim, a geração de calor observada na região estaminada da inflorescência seria responsável por aumentar a volatilização desses compostos, aumentando a eficiência da emissão de odores.

Reunindo todas as evidências acima citadas, é possível afirmar que os osmóforos de *P. adamantinum* se localizam no ápice dos estames férteis e estéreis, região onde não ocorre vascularização ou a presença de microsporângios.

Os osmóforos de *Philodendron adamantinum*, apesar da dificuldade de localização devido à ausência de identidade morfológica e à ineficiência do vermelho neutro, possuem algumas características semelhantes ao comumente encontrado para essas estruturas. Não é possível traçar um paralelo mais específico já que inexistem outros estudos anatômicos em grupos próximos. O conhecimento da localização desses osmóforos pode inspirar novos trabalhos em espécies relacionadas.

## Referências Bibliográficas

- Austin II JR, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA. 2006.** Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* **18**: 1693-1703.
- Bréhélin C, Kessler F. 2008.** The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochemistry and Photobiology* **84**: 1388-1394.
- Bréhélin C, Kessler F, Wijk KJ. 2007.** Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science* **12**(6): 260-266.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111-116.
- Buzgo M. 1998.** Odor differentiation in *Lagenandra ovata* (Araceae). *Acta Botanica Yunnanica* **X**: 76-88.
- Chapman RF, Bernays EA, Simpson SJ. 1981.** Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors. *Journal of Chemical Ecology* **7**(5): 881-888.
- Croat TB. 1997.** A Revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) for Mexico and Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**(3): 311-704.
- Curry KJ. 1987.** Initiation of terpenoid synthesis in osmophores of *Stanhopea anfracta* (Orchidaceae): a cytochemical study. *American Journal of Botany* **74** (9): 1332-1338.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du *pin maritime* au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* **258**: 1338-1340.
- Endress PK. 1984.** The role of inner staminodes in the floral display of some relic Magnoliales. *Plant Systematics and Evolution* **146**: 269-282.
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229-257.
- Gang DR. 2005.** Evolution of flavors and scents. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 301-325.
- García MTA, Galati BG, Hoc PS. 2007.** Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora* **202**: 302-315.
- Gibernau M. 2003.** Pollinators and visitors of aroid inflorescences. *Aroideana* **26**: 73-91.

- Gibernau M, Barabé D. 2002.** Pollination ecology of *Philodendron squamiferum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany* **80**: 316-320.
- Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A. 1999.** Beetle pollination of *Philodendron solimoense* (Araceae) in French Guiana. *International Journal of Plant Sciences* **160**(6): 1135-1143.
- Gibernau M, Barabé D, Labat D. 2000.** Flowering and pollination of *Philodendron melinonii* (Araceae) in French Guiana. *Plant Biology* **2**: 331-334.
- Gottsberger G. 1977.** Some aspects of beetle pollination in the evolution of flowering plants. *Plant Systematics and Evolution* **1**: 211-226.
- Grayum MH. 1990.** Evolution and phylogeny of the Araceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**(4): 628-697.
- Huber, F.K. Kaiser, R. Sauter, W. Schiestl, F.P. 2005.** Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia* **142**: 564-575.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: Freeman.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw–Hill.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137-138.
- Knudsen JT, Tollsten L, Bergström LG. 1993.** Floral scents-a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* **33**(2): 253-280.
- Maia ACD, Schlindwein C, Navarro DMAF, Gibernau M. 2010.** Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic forest of Northeastern Brazil: a single scarab beetle species guarantees high fruit set. *International Journal of Plant Sciences* **171**(7): 740-748.
- Mayo SJ. 1991.** A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Kew bulletin* **46**(4): 601-681.
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010.** Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141-151.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**(2):368-373.

- Paiva EAS, Machado SR. 2008.** The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Annals of Botany* **101**: 125–133.
- Peng YB, Li YQ, Hao YJ, Xu ZH, Bai SN. 2004.** Nectar production and transportation in the nectaries of the female *Cucumis sativus* L. flower during anthesis. *Protoplasma* **224**: 71-78.
- Pereira J, Schlindwein C, Antonini Y, Maia ACD, Dötterl S, Martins C, Navarro DMAF, Oliveira R. 2014.** *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* **111**(3): 679-691.
- Pijl L. 1960.** Ecological aspects of flower evolution. I. Phyletic evolution. *Evolution* **14**(4): 403-416.
- Pridgeon AM, Stern WL. 1983.** Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **70**(8): 1233-1243.
- 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*. New York: Elsevier, 343-403.
- Roland AM. 1978.** General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL, ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 1-62.
- 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 RS, Bartholomew GA, Barnhart MC. 1983.** Respiration and heat production by the inflorescence of *Philodendron selloum* Koch. *Planta* **157**: 336-343.
- Vega C, Herrera CM, Dötterl S. 2014.** Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **16**: 32- 42.
- Vogel S. 1963.** *The role of scent glands in pollination. On the structure and function of osmophores* (transl.by Bhatti JS). Washington, DC: Smithsonian Institution Libraries.

- Vogel S. 1983.** Ecophysiology of zoophilic pollination. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds. *Physiological plant ecology III. Responses to the chemical and biological environment*. New York: Springer, 559-624.
- Vogel S, Martens J. 2000.** A survey of the function of the lethal kettle traps of *Arisaema* (Araceae), with records of pollinating fungus gnats from Nepal. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**: 61-100.
- 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.
- Walker DB, Gysi J, Sternberg L, DeNiro MJ. 1983.** Direct respiration of lipids during heat production in the inflorescence of *Philodendron selloum*. *Science* **220**: 419-421.
- Wiemer AP, Moré M, Benitez-Vieyra S, Cocucci AA, Raguso RA, Sérsic AN. 2009.** A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology* **11**: 506-514.

## Capítulo II

### **Tecido nutritivo em *Philodendron adamantinum* (Araceae): estrutura e interação com polinizadores**

#### **Resumo**

Os estaminódios constituem o único recurso nutritivo ofertado pelas inflorescências de *Philodendron adamantinum*. Análises estruturais, histoquímicas e ultraestruturais foram realizadas com o objetivo de descrever esses estaminódios e compreender a seletividade do polinizador por essa estrutura. As zonas estaminada estéril e pistilada estão inseridas na câmara formada pela espata, onde os polinizadores se abrigam. Os estaminódios apresentam face distal plana, revestida por epiderme papilosa provida de estômatos. No tecido fundamental adjacente, células parenquimáticas de citoplasma denso ocorrem em meio às células vacuoladas e fenólicas. As células de citoplasma denso apresentam elevada população de organelas, principalmente mitocôndrias. Nessas células observa-se reserva lipídica no interior de vesículas, as quais se fundem formando vacúolos. Parte da reserva lipídica é consumida durante os processos de termogênese e liberação de odores para atração dos polinizadores; porém há um excedente que, aliado aos componentes estruturais das células, atuam como recurso nutritivo aos polinizadores. Dada a similaridade estrutural e química entre estames funcionais e estaminódios, a localização dos últimos no interior da câmara parece justificar a preferência alimentar dos besouros. A presença dos estaminódios, além de contribuir para a manutenção dos polinizadores na inflorescência até a deiscência das anteras evita a predação das estruturas férteis, contribuindo para o sucesso reprodutivo.

**Palavras chave:** Araceae; câmara floral; cantarofilia; estaminódios; interação inseto-planta; ultraestrutura celular

## Introdução

Os tecidos nutritivos florais são recursos ofertados pelas flores em adição ou substituição ao néctar e pólen (Simpson & Neff 1981). Segundo Pijl (1960) essas estruturas são caracterizadas por massas de tecido consumidas pelos polinizadores localizadas próximas aos esporângios.

Várias são as espécies que apresentam modificações histológicas florais acumulando e/ou secretando nutrientes e servindo de atrativo para polinizadores. Simpson & Neff (1981) citam brácteas, pétalas e sépalas carnosas, estaminódios, tricomas, corpos de alimentação e outros, presentes em diversos grupos vegetais. Em Annonaceae, por exemplo, as pétalas são grandes e carnosas servindo como alimento para os besouros polinizadores (Galastri 2013).

Além da atração, os tecidos nutritivos desempenham outro importante papel na polinização: a manutenção dos animais nas flores pelo tempo necessário à liberação do pólen. Ao remover os estaminódios que constituem recompensa alimentar em *Dieffenbachia longispatha*, Young (1986) observou que os besouros deixaram a planta antes da deiscência das anteras, deixando de atuar como polinizadores.

Poucos estudos foram encontrados na literatura abordando a composição da reserva do tecido nutritivo. A presença de grãos de amido nas células dos tecidos nutritivos é bastante citada (Endress 1984, Armstrong & Irvine 1990, Galastri 2013). Young (1986) analisou o tecido nutritivo presente em estaminódios de *Dieffenbachia longispatha* demonstrando a relevância de proteínas e carboidratos na composição das reservas.

A polinização por besouros é amplamente encontrada na família Araceae (Gibernau 2003) bem como em famílias basais (Pijl 1960). As espécies dessas famílias apresentam características semelhantes que, em conjunto, são responsáveis pela atração e manutenção do polinizador caracterizando a síndrome de cantarofilia.

Em *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott a polinização é realizada exclusivamente pelo besouro *Erioscelis emarginata*, escarabeídeo da subfamília Dinastinae. Esses besouros são atraídos até a inflorescência ao final da tarde, simultaneamente ao primeiro pico de termogênese e liberação intensa dos compostos voláteis. Os besouros adentram a câmara formada pela espata e nela permanecem até o dia posterior, quando a espata inicia o fechamento expulsando os animais. Durante a permanência, os besouros se alimentam dos estaminódios (Pereira *et al.* 2014).

Diversas adaptações à polinização por besouros podem ser observadas em *P. adamantinum*, dentre as quais se destacam a liberação de odor; termogênese; protoginia; presença de câmara formada pela espata e de tecido nutritivo (Pereira *et al.* 2014). Essas características foram selecionadas ao longo da evolução dos pares envolvidos nessa interação inseto-plantas e são imprescindíveis à reprodução sexuada dessa espécie.

A oferta de recompensas florais como os estaminódios, único alimento ingerido pelos besouros durante a fase pistilada (Pereira *et al.* 2014) é um fator decisivo em um sistema específico como *Philodendron adamantinum* – *Erioscelis emarginata*. Dados sobre a composição e a morfologia dos recursos nutritivos são úteis para a compreensão da preferência dos polinizadores por essa porção da inflorescência.

Compreender os elementos que medeiam o processo de polinização em *P. adamantinum* pode ser útil na manutenção e conservação dessa espécie de hábito peculiar e distribuição restrita bem como auxiliar na compreensão das relações entre coleópteros e espécies cantarófilas. Assim, este trabalho teve como objetivos proceder a caracterização anatômica e química do tecido nutritivo presente na região estaminada estéril de *P. adamantinum*, buscando entender a seletividade do polinizador.

## **Materiais e métodos**

### *Coleta*

As amostras de *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott foram coletadas no Parque Estadual do Rio Preto, localizado no município de São Gonçalo do Rio Preto, MG. Inflorescências em diversos estádios de desenvolvimento, de acordo com a necessidade de cada análise, foram localizadas em diferentes populações distribuídas pelo parque.

As coletas foram realizadas de novembro a janeiro, durante o período reprodutivo de *P. adamantinum*, ao longo dos anos de 2012, 2013 e 2014.

Material testemunho foi depositado no herbário BHCB do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob o número 161786.

### *Análise estrutural e composição das reservas nutritivas*

Fragmentos da região estaminada estéril contendo parte do eixo da inflorescência foram coletados de três inflorescências e, de acordo com a liberação de odor, cinco estádios de desenvolvimento foram definidos: (1) aproximadamente cinco dias antes (início da abertura da espata); (2) oito horas antes (manhã de abertura total da espata); (3) durante a liberação de odor; (4) 24 horas após (deiscência das anteras); (5) 36 horas após (quando a espata se encontra fechada novamente). As amostras foram processadas e analisadas em microscopia de luz e submetidas a testes histoquímicos.

As amostras foram submetidas a vácuo em solução de Karnovsky pH 7,2 em tampão fosfato 0,1M (Karnovsky 1965) e fixadas por 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica (Johansen 1940) e submetido à pré-infiltração e infiltração em resina sintética (2-hidroxi-etil-metacrilato) (Leica®). Secções de 6µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com solução de azul de Toluidina, pH 7,4 (O'Brien *et al.* 1964), contra coradas com solução de vermelho de rutênio, dispostas em lâminas e montadas em Entellan® para fotodocumentação e estudo sob microscopia de luz.

Testes histoquímicos foram empregados tanto em amostras fixadas em solução de Karnovsky e seccionadas à mão livre com lâmina inox quanto em material incluído em resina e seccionado em micrótomo rotativo. Foram aplicados os seguintes testes: Lugol para identificação de amido (Johansen 1940); NADI para terpenos (David & Carde 1964); solução aquosa de cloreto férrico a 10% para compostos fenólicos (Johansen 1940); solução aquosa de vermelho de rutênio a 0,02% para detecção de compostos pécticos (Jensen 1962); Sudan red B para lipídios em geral (Brundrett *et al.* 1991).

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em fragmentos da região estaminada estéril de inflorescências em aproximadamente dez dias antes e durante a liberação de odor. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, desidratadas em série etílica crescente até o ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido, metalizadas com ouro (Robards 1978) e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), a 12-20 kV.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), fragmentos do ápice dos estaminódios foram submetidos a vácuo em solução Karnovsky pH 7,2 em tampão fosfato 0,1M (Karnovsky 1965) e fixados por 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) por duas horas, lavados em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2), desidratados

em série etífica e infiltrados em resina Araldite® (Roland 1978). As secções ultrafinas de 50nm obtidas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão a 80 kV.

## **Resultados**

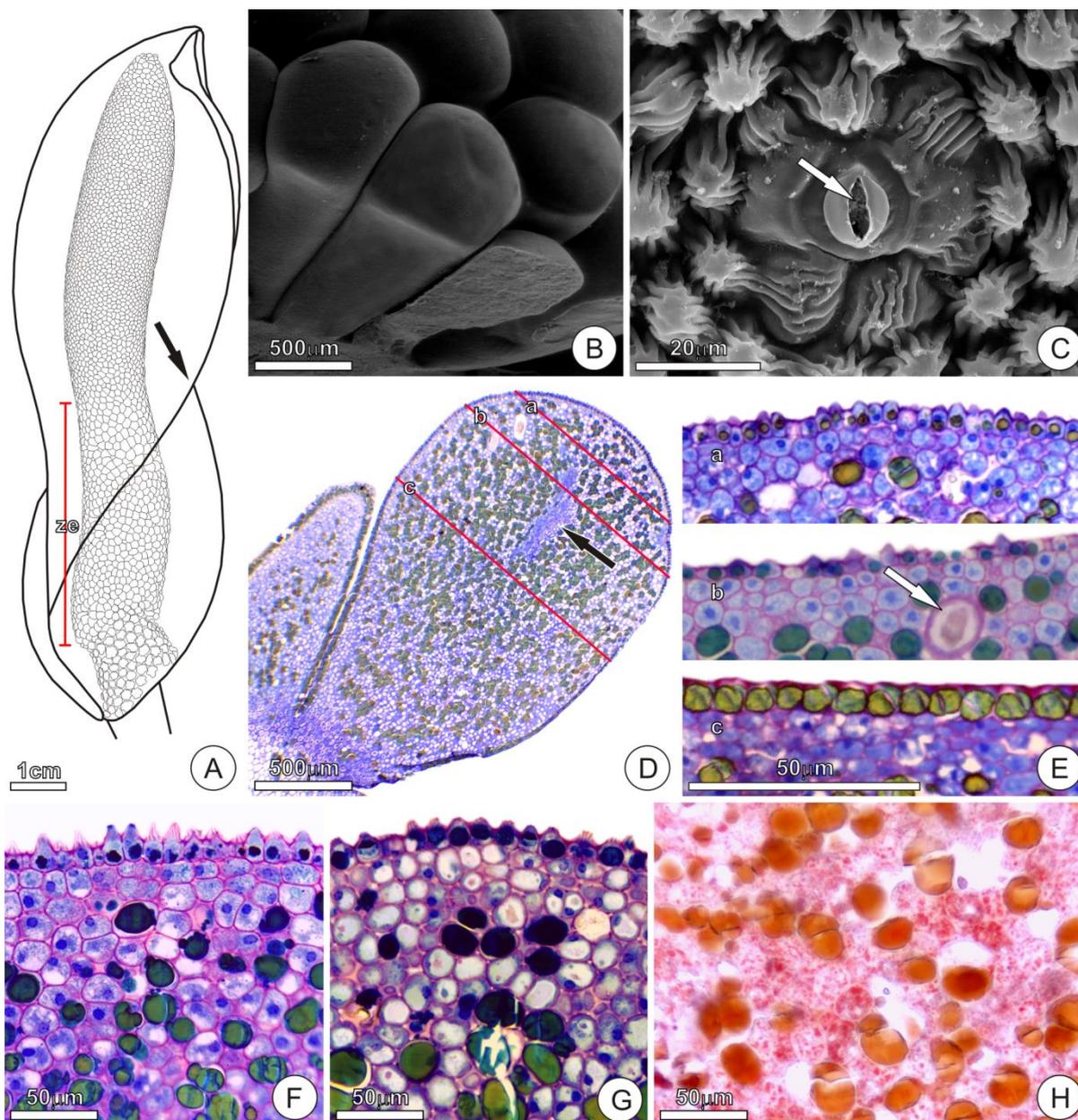
### *Estrutura e composição da reserva nutritiva*

A região estaminada estéril é encontrada na porção mediana da inflorescência e está quase totalmente imersa no interior da câmara formada pela constrição da espata (Fig. 1A). Essa região é composta por estames estéreis, prismáticos e justapostos (Fig. 1B). Esses estames possuem a superfície lisa, exceto pelo ápice, onde papilas são desenvolvidas (Fig. 1C). Poucos estômatos são observados, principalmente na região papilosa. No momento da liberação de odor, secreção amorfa é encontrada no interior dos estômatos da região apical e espalhada entre as papilas próximas (Fig. 1C).

Os estaminódios apresentam três regiões distintas, sendo a distal não vascularizada e a proximal provida de apenas um feixe vascular (Fig. 1D), predominantemente composto por floema. Entre as duas, no ápice do feixe vascular, observa-se uma zona de transição. A diferença marcante entre essas três regiões é a composição das células epidérmicas. Na porção distal, a maior parte das células são papilosas e parte delas acumulam substâncias fenólicas. Na região de transição a quantidade de papilas diminui até que desaparecem por completo na porção proximal. (Figs. 1D-E). Nessa porção todas as células epidérmicas apresentam vacúolo com conteúdo fenólico (Fig. 1E).

As células parenquimáticas da região fundamental são dispostas de modo compacto, com espaços intercelulares pequenos. Essas células são globosas com paredes pecto-celulósicas delgadas e apresentam protoplasto que as distingue em dois grupos: células de citoplasma denso e células vacuoladas, essas repletas de substâncias fenólicas (Fig. 1F). Dentre as células parenquimáticas, observam-se idioblastos cristalíferos, que podem conter drusas ou ráfides e ocorrem em maior número na região distal dos estaminódios (Figs. 1D-E).

Por ocasião da termogênese e liberação de odor, as células de citoplasma denso perdem essas características e se tornam vacuoladas (Figs. 1F-G).



**Figura 1.** Estaminódios de *Philodendron adamantinum*. (A) Esquema representando a localização da região estaminada estéril na espádice, seta aponta constrição formando câmara na porção proximal da espata. (B) Imagem lateral dos estaminódios dez dias antes da liberação de odor, estágio anterior à diferenciação das papilas na porção apical. (C) Papilas do ápice do estaminódio exibindo cutícula ornamentada e, em destaque, estômato contendo secreção no interior do ostíolo (seta). (D) Secção longitudinal mostrando parte do único feixe vascular (seta), três regiões distintas são observadas: a; b; c. (E) Secções transversais próximas à epiderme nas três regiões indicadas na figura (D); a: região distal, sem vascularização, onde a maior parte das células epidérmicas são papilosas e algumas acumulam substâncias fenólicas; b: região de transição na qual encontram-se poucas células epidérmicas papilosa, seta aponta idioblasto cristalífero; c: região proximal contendo apenas células epidérmicas com face periclinal externa lisa e conteúdo fenólico. (F) Células de citoplasma denso durante a liberação intensa de odor. (G) Região correspondente à observada em (F), 24 horas após a emissão dos compostos voláteis. (H) Teste de Sudan Red evidenciando gotículas lipídicas no citoplasma em células parenquimáticas da região distal a. ze – zona estaminada estéril.

Gotículas de natureza lipídica foram observadas dispersas nos vacúolos e citoplasma das células do ápice dos estaminódios em fases anteriores ao início da termogênese e liberação

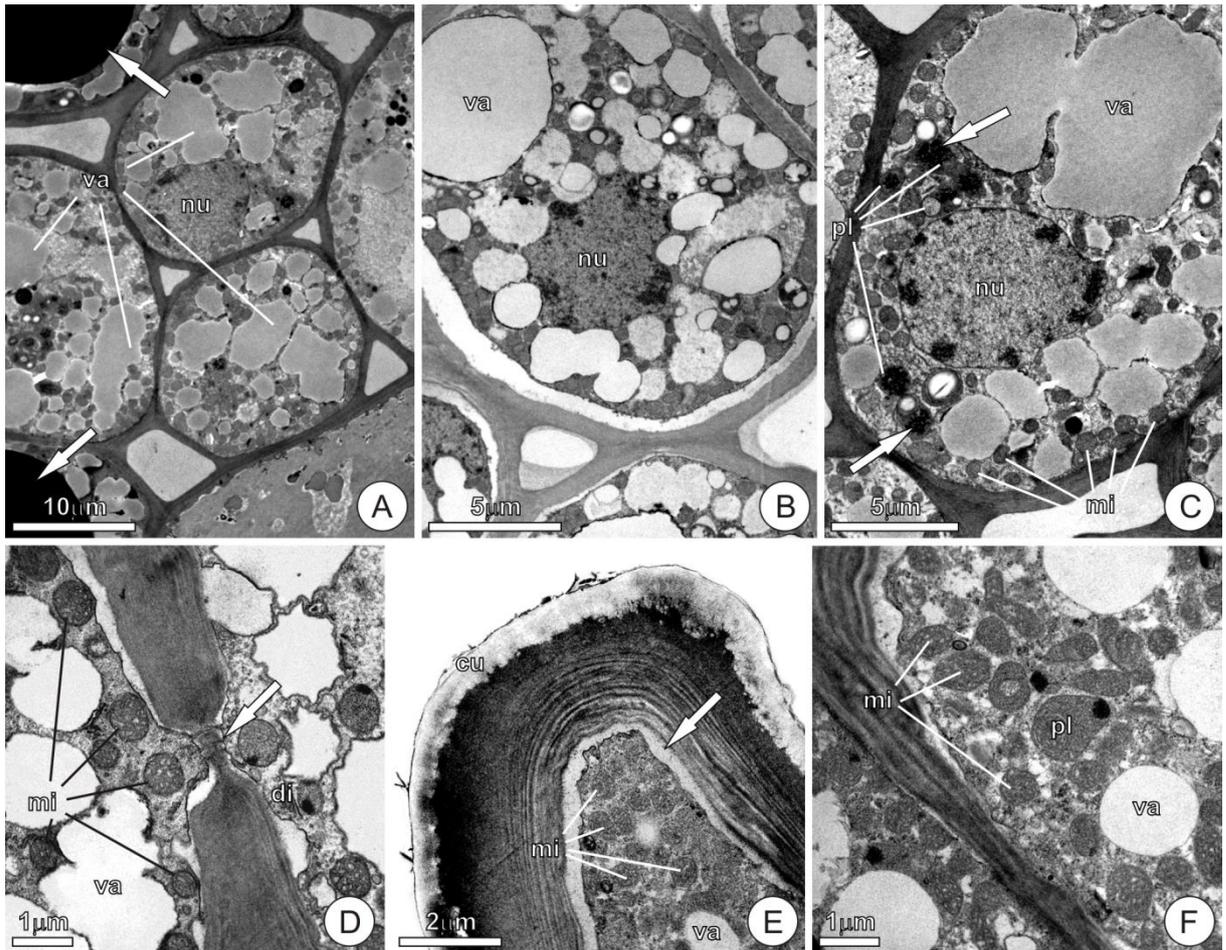
de odor (Fig.1H). Durante a termogênese a reserva, composta principalmente por terpenos evidenciados pelo teste NADI, é parcialmente consumida restando gotículas ainda menores.

### *Organização ultraestrutural*

Na região fundamental as células com citoplasma denso e rico em organelas foram objetos de estudos ao microscópio eletrônico de transmissão. Essas células estão distribuídas ao longo da região apical do estaminódio e entremeadas por outras células contendo vacúolo central repleto de substâncias fenólicas (Fig. 2A).

Durante a fase secretora, as células de citoplasma denso possuem o vacuoma bastante desenvolvido, formado por pequenas vesículas que se unem em vacúolos maiores (Fig. 2B). O núcleo é volumoso, globoso e o nucléolo não é evidente (Fig. 2C). Mitocôndrias de cristas bem desenvolvidas são as organelas preponderantes nessas células, sendo amplamente distribuídas (Figs. 2C-D). O citoplasma exibe ainda plastídios sem sistema de tilacoides e contendo plastoglobulos e grãos de amido; retículo endoplasmático liso e alguns dictiosomos. As células secretoras se comunicam por via simplástica por meio de vários plasmodesmos (Fig. 2D).

As células epidérmicas da região apical apresentam parede celular espessa, lamelada, revestida por cutícula íntegra e bem aderida (Fig. 2E). Nessas células a composição de organelas é bastante semelhante àquela observada na região fundamental. Algumas das células apresentam citoplasma rico em organelas, enquanto outras se destacam pela presença de vacúolo amplo e conteúdo fenólico. Nas células de citoplasma denso, merece destaque a elevada população de mitocôndrias (Figs. 2E-F), retículo endoplasmático liso e plastídios contendo grãos de amido. Mesmo as células de citoplasma denso acumulam substâncias fenólicas e, após a fase secretora, essas substâncias ocupam parte significativa do volume celular.



**Figura 2.** Células da porção apical estéril dos estames de *Philodendron adamantinum*. (A-D) Células parenquimáticas. (A) Células secretoras mostrando citoplasma denso, entremeadas por células de conteúdo fenólico (setas). (B) Células secretoras apresentando inúmeros pequenos vacúolos que se unem formando vacúolo maior. (C) Célula evidenciando grande população de organelas, principalmente mitocôndrias, seta destaca plastoglobulos. (D) Encontro entre duas células secretoras na região de campo de pontoação (seta), notar as cristas desenvolvidas das mitocôndrias. (E-F) Células epidérmicas papilosas. (E) Região apical mostrando inúmeras mitocôndrias, acúmulo de substâncias no espaço periplasmático (destacado pela seta) e parede lamelada com cutícula espessa. (F) Região basal exibindo população de organelas, principalmente mitocôndrias. **cu** - cutícula; **di** - dictiossomo; **mi** - mitocôndria; **nu** - núcleo; **pl** - plastídio; **va** - vacúolo.

## Discussão

Os recursos nutritivos ofertados por *Philodendron adamantinum* são os estaminódios. Em todos os estudos observados que abordam a polinização de espécies do gênero *Philodendron* foi constatado que os polinizadores se alimentam desse recurso (Gibernau *et al.* 1999, 2000, Gibernau & Barabé 2002, Maia *et al.* 2010), sendo raros danos às partes reprodutivas férteis.

Os estaminódios de *P. adamantinum*, assim como os observados em *Eupomatia laurina* (Armstrong & Irvine 1990), desempenham papel diversificado funcionando como osmóforo, recurso nutritivo e, ainda, fonte de calor.

Diferentemente dos estaminódios de *Eupomatia laurina* (Armstrong & Irvine 1990) e das pétalas de espécies de *Annona* (Galastrri 2013), o tecido nutritivo em *P. adamantinum* apresenta poucos grãos de amido, detectados apenas em microscopia eletrônica de transmissão; nessa espécie o principal componente da reserva é de natureza lipídica.

Em *P. selloum*, Walker *et al.* (1983) reportaram que as flores utilizam lipídios como substrato para o processo termogênico e Seymour *et al.* (1983) observaram que aproximadamente 70% do calor gerado nesse processo é emitido pelas flores estéreis. *P. selloum* está intimamente relacionada à *P. adamantinum*, sendo ambas as espécies circunscritas ao subgênero *Meconostigma* (Mayo 1991), composto por apenas 20 espécies. Esse dado nos permite inferir que a reserva lipídica dos estames estéreis de *P. adamantinum* é, em grande parte, consumida no processo termogênico, sendo o restante utilizado pelos besouros como alimento.

Além do restante da reserva lipídica e o pouco amido observado nos estaminódios, parte das células que compõem o tecido nutritivo apresenta protoplasto denso e rico em organelas, o que as torna fonte de lipídios e proteínas estruturais incrementando os recursos utilizados pelos besouros.

As substâncias fenólicas são tidas por diversos autores como deterrentes. Porém, em *P. adamantinum*, a ocorrência dessas substâncias não impede os besouros de se alimentarem dos estaminódios. Galastrri (2013) relata a presença de fenólicos no tecido nutritivo de *Annona*, sendo os mesmos consumidos por besouros do gênero *Cyclocephala* subfamília Dynastinae, a mesma de *Erioscelis emarginata*, polinizador de *P. adamantinum*. De acordo com Barbehenn & Constabel (2011) vários insetos possuem a capacidade de ingerir fenólicos sem sofrerem os prejuízos devidos à toxicidade dessas substâncias.

As flores pistiladas, situadas na câmara da inflorescência próximas aos estaminódios, mesmo quando ocorre superpopulação de besouros em um indivíduo, não sofrem danos. A ausência de reservas energéticas nessas flores parece justificar o desinteresse do polinizador em ingerir esses órgãos, visto que não foram observadas barreiras físicas e os besouros parecem não ser afetados pelas substâncias fenólicas, presentes em grande quantidade no estilete.

Os dados obtidos permitem inferir que em *P. adamantinum* a presença do tecido nutritivo, além de assegurar a manutenção dos besouros na inflorescência até a ocasião da liberação do pólen, auxilia na proteção das partes férteis, sobretudo a pistilada, pois evita seu consumo pelos polinizadores. De modo semelhante, em *Eupomatia laurina*, espécie em que os

estaminódios realizam o papel de osmóforo e tecido nutritivo, mesmo quando ocorre superpopulação de besouros em uma flor, o gineceu permanece intacto (Armstrong & Irvine 1990).

Não foram observadas diferenças significativas na morfologia ou composição da reserva dos estames estéreis em relação aos férteis (ver capítulo 1) que justifiquem a seletividade do polinizador durante a alimentação. É provável que essa preferência se deva apenas à localização da zona estaminada estéril, quase completamente protegida pela câmara formada pela espata, onde os besouros se encontram durante a permanência na inflorescência.

O momento em que os besouros são expulsos da câmara e forçados a escalar a espádice, atingindo assim a zona estaminada fértil, é concomitante à liberação de grãos de pólen, recurso, nessa espécie, rico em amido e lipídios utilizado também por besouros. É possível que a oferta de pólen funcione como um distrator, evitando o consumo das flores estaminadas. Merece destacar que os estames férteis podem ser consumidos em determinadas situações, como nos casos de superpopulação de *Erioscelis emarginata*, polinizador de *P. adamantinum*, na inflorescência. Esses resultados corroboram a hipótese de que a seletividade do besouro em relação à fonte alimentar resulta, sobretudo, da localização desta em uma região que confere abrigo e proteção ao polinizador.

## Referências bibliográficas

- Armstrong JE, Irvine AK. 1990.** Functions of staminodia in the beetle-pollinated flowers of *Eupomatia laurina*. *Biotropica* **22**(4): 429-431.
- Barbehenn RV, Constabel CP. 2011.** Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry* **72**: 1551-1565.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111-116.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du *pin maritime* au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* **258**: 1338-1340.
- Endress PK. 1984.** The role of inner staminodes in the floral display of some relic Magnoliales. *Plant Systematics and Evolution* **146**: 269-282.
- Galastri NA. 2013.** *Morfoanatomia, histoquímica e ultraestrutura floral de espécies de Annonaceae do cerrado*. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Gibernau M. 2003.** Pollinators and visitors of aroid inflorescences. *Aroideana* **26**: 73-91.
- Gibernau M, Barabé D. 2002.** Pollination ecology of *Philodendron squamiferum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany* **80**: 316-320.
- Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A. 1999.** Beetle pollination of *Philodendron solimoesense* (Araceae) in French Guiana. *International Journal of Plant Sciences* **160**(6): 1135-1143.
- Gibernau M, Barabé D, Labat D. 2000.** Flowering and pollination of *Philodendron melinonii* (Araceae) in French Guiana. *Plant Biology* **2**: 331-334.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: Freeman.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw–Hill.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137-138.
- Maia ACD, Schlindwein C, Navarro DMAF, Gibernau M. 2010.** Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic forest of Northeastern Brazil: a single

- scarab beetle species guarantees high fruit set. *International Journal of Plant Sciences* **171**(7): 740-748.
- Mayo SJ. 1991.** A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Kew bulletin* **46**(4): 601-681.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**(2):368-373.
- Pereira J, Schlindwein C, Antonini Y, Maia ACD, Dötterl S, Martins C, Navarro DMAF, Oliveira R. 2014.** *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* **111**(3): 679-691.
- Pijl L. 1960.** Ecological aspects of flower evolution. I. Phyletic evolution. *Evolution* **14**(4): 403-416.
- 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*. New York: Elsevier, 343-403.
- Roland AM. 1978.** General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL, ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 1-62.
- Seymour RS, Bartholomew GA, Barnhart MC. 1983.** Respiration and heat production by the inflorescence of *Philodendron selloum* Koch. *Planta* **157**: 336-343.
- Simpson BB, Neff JL. 1981.** Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301-322.
- Walker DB, Gysi J, Sternberg L, DeNiro MJ. 1983.** Direct respiration of lipids during heat production in the inflorescence of *Philodendron selloum*. *Science* **220**: 419-421.
- Young HJ. 1986.** Beetle pollination of *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *American Journal of Botany* **73**(6): 931-944.

## CAPÍTULO III

### **Produção de resina e polinização em *Philodendron adamantinum* (Araceae): desvendando os mecanismos de controle**

#### **Resumo**

*Philodendron* é o único gênero de Araceae no qual ocorre a liberação de resina na inflorescência. Essa secreção cobre o corpo liso dos besouros polinizadores e atua como aderente para o grão de pólen. A sincronia observada entre a exsudação de resina e a deiscência das anteras em *Philodendron adamantinum* torna o processo de liberação um intrigante tema a ser abordado. Assim, o presente capítulo objetivou a análise estrutural, ultraestrutural e histoquímica dos canais de resina e da secreção produzida buscando compreender o funcionamento desses canais, principalmente quanto ao processo de liberação para o meio externo. Dois tipos de canais secretores são observados na espata de *P. adamantinum*, próximo à face abaxial observa-se canais de calibre pequeno e, na região adaxial os de maior calibre. Apenas os canais do segundo grupo têm o ápice desviado para epiderme e liberam a secreção para o meio externo. Esses canais possuem organização anatômica e composição celular semelhante aos outros canais secretores de resina. Porém, a exsudação de resina é uma característica peculiar, não observada para essa estrutura em nenhum outro modelo. O processo exige algum mecanismo de controle visto que apenas a pressão exercida pelo acúmulo da secreção não seria suficiente para ocorrer a exsudação. Os resultados obtidos demonstram que o aumento do volume das células dos canais, aliado à presença de uma rota de abertura estabelecida pela composição pectínica da parede das células próximas ao ápice do canal resultariam na liberação ativa da resina.

**Palavras chave:** Araceae; canais resiníferos; cantarofilia; exsudação de resina; interação inseto-planta

## Introdução

Resinas vegetais são complexas substâncias sintetizadas, armazenadas e, por vezes, liberadas por plantas. Dell & McComb (1978) atribuem à resina produzida pelas plantas a função de proteção contra agentes abióticos, como insolação e dessecação, e agentes bióticos, como herbívoros e patógenos. Langenheim (1990) ressaltou que a complexa mistura de compostos presentes nas resinas conferem a essa substância o caráter tóxico e deterrente; alta viscosidade que a torna uma barreira física ao acesso à planta e capacidade de rápida polimerização, que auxilia na cicatrização de injúrias e impede a entrada de patógenos.

Usualmente, a produção de resina ocorre em órgãos vegetativos e a secreção é denominada superficial, quando produzida por tricomas glandulares, ou interna, quando produzida em estruturas como ductos e cavidades (Dell & McComb 1978). Raramente a liberação de resina ocorre em estruturas reprodutivas. Armbruster (1984) observou espécies do gênero *Dalechampia* e *Clusia* que produzem resina nas bractéolas e estaminódios, respectivamente. Nessas espécies, a resina é um importante recurso na atração de polinizadores como abelhas da família Apidae, que são observadas coletando resina para a construção de seus ninhos.

A capacidade de síntese de resina foi observada na maioria das coníferas e, em pelo menos 10% das famílias de angiospermas, principalmente lenhosas de distribuição tropical e subtropical (Langenheim, 1990, 2003). Na família Araceae representantes das tribos Culcasieae, Homalomeneae e Philodendreae são reconhecidos como produtores de resina (French 1987, Mayo *et al.* 1997). Segundo French (1987), os gêneros *Cercestis*, *Culcasia*, *Furtadoa*, *Homalomena* e *Philodendron* possuem canais resiníferos nas raízes. Nesses gêneros, exceto *Furtadoa*, há também registros de cavidades secretoras no caule, em *Culcasia* e *Philodendron* canais conspícuos são observados nas folhas e apenas *Philodendron* apresenta secreção de resina nas inflorescências (Mayo *et al.* 1997).

A resina liberada em inflorescências de espécies do gênero *Philodendron* também está associada à polinização, porém não é responsável por suscitar os polinizadores, besouros da família Scarabaeidae. Essa secreção cobre o corpo liso desses animais e atua como aderente para o grão de pólen (Gibernau *et al.* 1999, 2000, Gibernau & Barabé 2002).

Segundo Mayo (1991), a liberação de resina pela inflorescência em Araceae é uma característica exclusiva de *Philodendron*, no qual a localização, a estrutura e o padrão de atividade dos canais variam entre as espécies do gênero. Muitas espécies dos três subgêneros

de *Philodendron* liberam resina na face adaxial da espata, e, mais raramente, nos estames (Mayo 1991, Grayum 1996, Croat 1997). Em *Philodendron adamantinum*, observa-se a liberação de gotas de resina na face adaxial da espata no período anterior à deiscência das anteras (Pereira *et al.* 2014).

A exsudação de resina produzida em ductos e cavidades sem que ocorram injúrias, constitui fato incomum, uma vez que resinas sintetizadas nessas estruturas permanecem no lume. Além disso, observou-se que em *Philodendron adamantinum* há sincronia entre a exsudação de resina e a liberação de pólen, o que torna o processo de liberação um intrigante tema a ser abordado. Soma-se a isso a importância dessa resina na reprodução de uma espécie de distribuição restrita, resultando na motivação do presente estudo.

Ambicionando entender a produção e, principalmente, a liberação de resina pela espata de *Philodendron adamantinum*, este estudo teve como objetivos a caracterização anatômica dos canais de resina presentes na face adaxial da espata, a análise ultraestrutural das células secretoras desses canais e a investigação dos grupos químicos das substâncias que compõem a secreção.

## **Materiais e métodos**

### *Coleta*

As amostras de *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott foram coletadas no Parque Estadual do Rio Preto, localizado no município de São Gonçalo do Rio Preto, MG. Inflorescências em diversos estádios de desenvolvimento, de acordo com a necessidade de cada análise, foram localizadas em diferentes populações distribuídas pelo parque.

As coletas foram realizadas de novembro a janeiro, durante o período reprodutivo de *P. adamantinum*, ao longo dos anos de 2012, 2013 e 2014.

Material testemunho foi depositado no herbário BHCB do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob o número 161786.

### *Análise estrutural e natureza da secreção*

Fragmentos de espata de três inflorescências foram coletados em vários estádios de desenvolvimento: inflorescências medindo 30%, 50% e 70% do tamanho final, que chega a aproximadamente 15cm de comprimento, 15 horas antes e no momento da liberação da resina. As amostras foram retiradas das regiões basal, mediana e apical da espata e processadas para estudos sob microscopia de luz e aplicação de testes histoquímicos.

Todas as amostras foram submetidas a vácuo em solução de Karnovsky pH 7,2 em tampão fosfato 0,1M (Karnovsky 1965) e fixadas por 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica (Johansen 1940) e submetido à pré-infiltração e infiltração em resina sintética (2-hidroxi-etil-metacrilato) (Leica®). Secções de 6µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas com solução de azul de Toluidina, pH 7,4 (O'Brien *et al.* 1964), contracoradas com solução de vermelho de rutênio, dispostas em lâminas e montadas em Entellan® para fotodocumentação e estudo sob microscopia de luz.

Testes histoquímicos foram empregados tanto em material incluído em resina quanto em secções de material fixado em solução Karnovsky, obtidas com auxílio de lâmina inox. Foram aplicados os seguintes testes histoquímicos: Lugol para identificação de amido (Johansen 1940); NADI para detecção de terpenos (David & Carde 1964); solução aquosa de cloreto férrico a 10% para compostos fenólicos (Johansen 1940); solução aquosa de vermelho de rutênio a 0,02% para detecção de compostos pécticos (Jensen 1962); Sudan red B para lipídios em geral (Brundrett *et al.* 1991).

Para localização de tecidos metabolicamente ativos, duas inflorescências contendo a espata foram coletadas no estádio correspondente ao primeiro pico de termogênese, correspondente a 15 horas antes da liberação de resina. Ambas foram totalmente imersas em solução aquosa de vermelho neutro 0,01% por 24 horas (Vogel 1963). Após esse período, as espatas foram retiradas e analisadas a olho nu.

Duas espatas com 30% e 50% do tamanho final foram seccionadas longitudinalmente na porção mediana resultando em tiras de aproximadamente 1cm de largura. O material foi clarificado de acordo com o método de Fuchs (1963) e montado em lâminas de vidro com gelatina glicerinada para visualização de todo o comprimento dos ductos secretores de resina.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em amostras de espatas 15 horas antes e durante a liberação da resina, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, desidratadas em série etílica crescente até o ponto crítico em

CO<sub>2</sub> líquido, metalizadas com ouro (Robards 1978) e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands), a 12-20 kV.

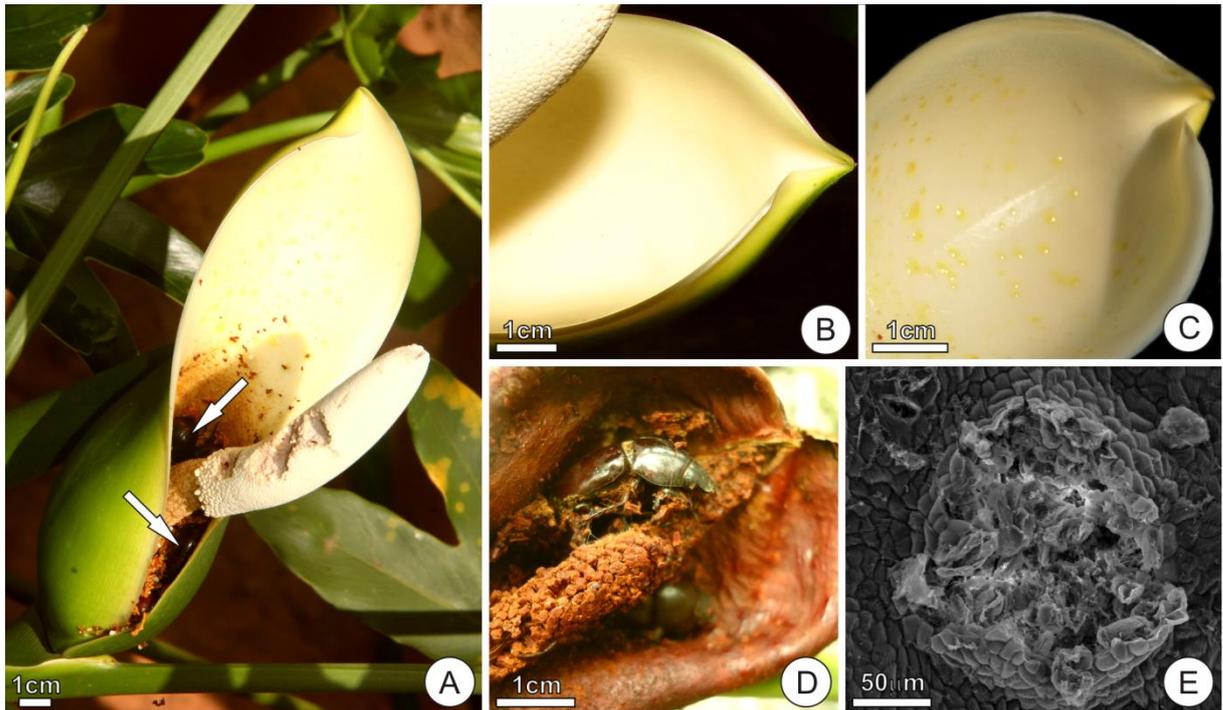
Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), fragmentos transversais da espata de inflorescência jovem - cerca de 30% do tamanho final, e 15 horas antes da liberação de resina foram submetidos a vácuo em solução Karnovsky pH 7,2 em tampão fosfato 0,1M (Karnovsky 1965) e fixados por 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) por duas horas, lavados em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2), desidratados em série etílica e infiltrados em resina Araldite® (Roland 1978). As secções ultrafinas de 50nm obtidas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão a 80 kV.

## Resultados

### *Organização estrutural e natureza da secreção*

A espata em *Philodendron adamantinum* forma uma grande câmara que pode abrigar diversos indivíduos de *Erioscelis emarginata* (Fig. 1A). A face adaxial branco cremosa é homogênea no momento anterior à exsudação de resina e não apresenta indícios de abertura (Fig. 1B). Durante o segundo dia de abertura da espata, ao final da manhã, copiosas gotas de resina amarelo-alaranjadas são liberadas na face adaxial (Figs. 1A,C). O fechamento acrópeto da espata expulsa os besouros da câmara durante o processo, obrigando-os a escalar a espádice, cobrindo o corpo de resina que irá aderir os grãos de pólen produzidos pelas flores estaminadas férteis dispostas na porção distal da espádice. Alguns besouros não conseguem escapar e são enclausurados na câmara, onde morrem (Fig. 1D).

A superfície adaxial da espata jovem é uniforme e apresenta células epidérmicas com cutícula lisa e numerosos estômatos. No momento da liberação de resina, a cutícula se torna sulcada e poros são formados pelo rompimento da epiderme (Fig. 1E).



**Figura 1.** Espatas de *Philodendron adamantinum*. (A) Vista geral da inflorescência no momento de liberação de resina, observar a distribuição das gotas de resina e besouros localizados na câmara formada pela espata (setas). (B) Ápice da espata no momento anterior à liberação de resina, observar textura homogênea. (C) Ápice da espata evidenciando as gotículas de resina. (D) Inflorescência desidratada apresentando dois besouros encerrados no momento do fechamento da espata. (E) Face adaxial da espata destacando poro pelo qual a resina é exsudada, notar ausência de organização dos tecidos.

O mesofilo da espata é formado por três regiões distintas, sendo ambas as regiões próximas à epiderme constituídas por células parenquimáticas globosas, com espaço intercelular limitado. Separando estas duas regiões, encontra-se outra, constituída por várias camadas de células maiores, espaçadas, formando aerênquima. Distribuídas nas três regiões, observam-se células com conteúdo fenólico (Figs. 2A-B).

Canais secretores de resina estão distribuídos ao longo de todo mesofilo. Próximos à face abaxial e em camadas mais profundas da face adaxial, os canais possuem menor calibre (Fig. 2A) e não liberam a resina secretada. Ainda na face adaxial e no aerênquima observam-se também canais de maior calibre (Fig. 2B) que podem sofrer anastomose (Fig. 2C), formando uma rede de ductos secretores. Todos os canais tendem a ser paralelos à epiderme, no entanto os que apresentam maior diâmetro possuem o ápice desviado em direção à superfície adaxial da espata (Fig. 2D). No ápice do canal observa-se alta concentração de substâncias pécicas, inclusive entre as células parenquimáticas do contorno (Fig. 2D).

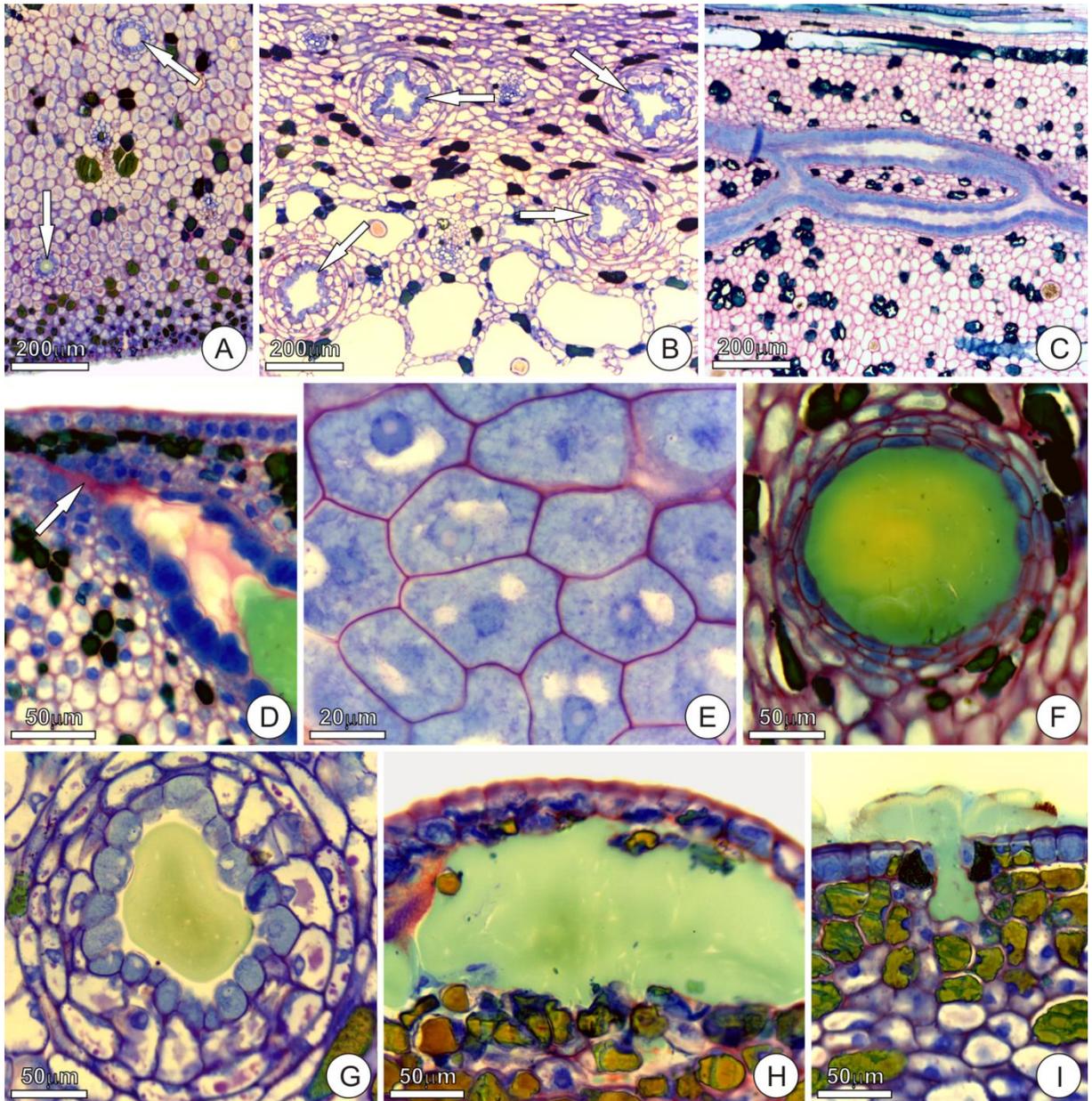
Envolvendo o epitélio secretor observam-se de três a quatro camadas de células parenquimáticas contendo vacúolo que ocupa grande parte do lume celular. Essas células são

achatadas nas fases mais jovens, quando ocorre o acúmulo de resina no lume do canal (Fig. 2F), sendo que as células das camadas mais internas aumentam consideravelmente de volume e se tornam globosas durante o extravasamento de resina para o meio externo (Fig. 2G). A secreção é acumulada em bolsas formadas no espaço intercelular abaixo da epiderme (Fig. 2H), que se rompem liberando resina amarelo-alaranjada, viscosa, na face adaxial da espata, principalmente na região de constrição deste órgão, próximo à zona dos estaminódios. Quando a abertura do ducto coincide com a presença de um estômato a secreção é liberada por ele (Fig. 2I). Os canais de menor calibre (Fig. 2A) são sempre paralelos à superfície, não desviam seu ápice em direção à epiderme e possuem apenas duas camadas de células circundando o tecido secretor

Grãos de amido estão presentes nas células do mesofilo da espata, exceto nas camadas subjacentes à epiderme e nas células dos canais secretores de resina (Fig. 3A). Nos estádios iniciais de desenvolvimento da espata o amido ocorre em baixas concentrações, tanto na proximidade dos canais secretores, quanto no restante do mesofilo. Durante o desenvolvimento da inflorescência, o amido é acumulado e, 15 horas antes da liberação de resina observa-se maior quantidade dessa reserva (Fig. 3B). No momento da liberação de resina pela espata observa-se que parte significativa do amido foi consumida (Fig. 3C).

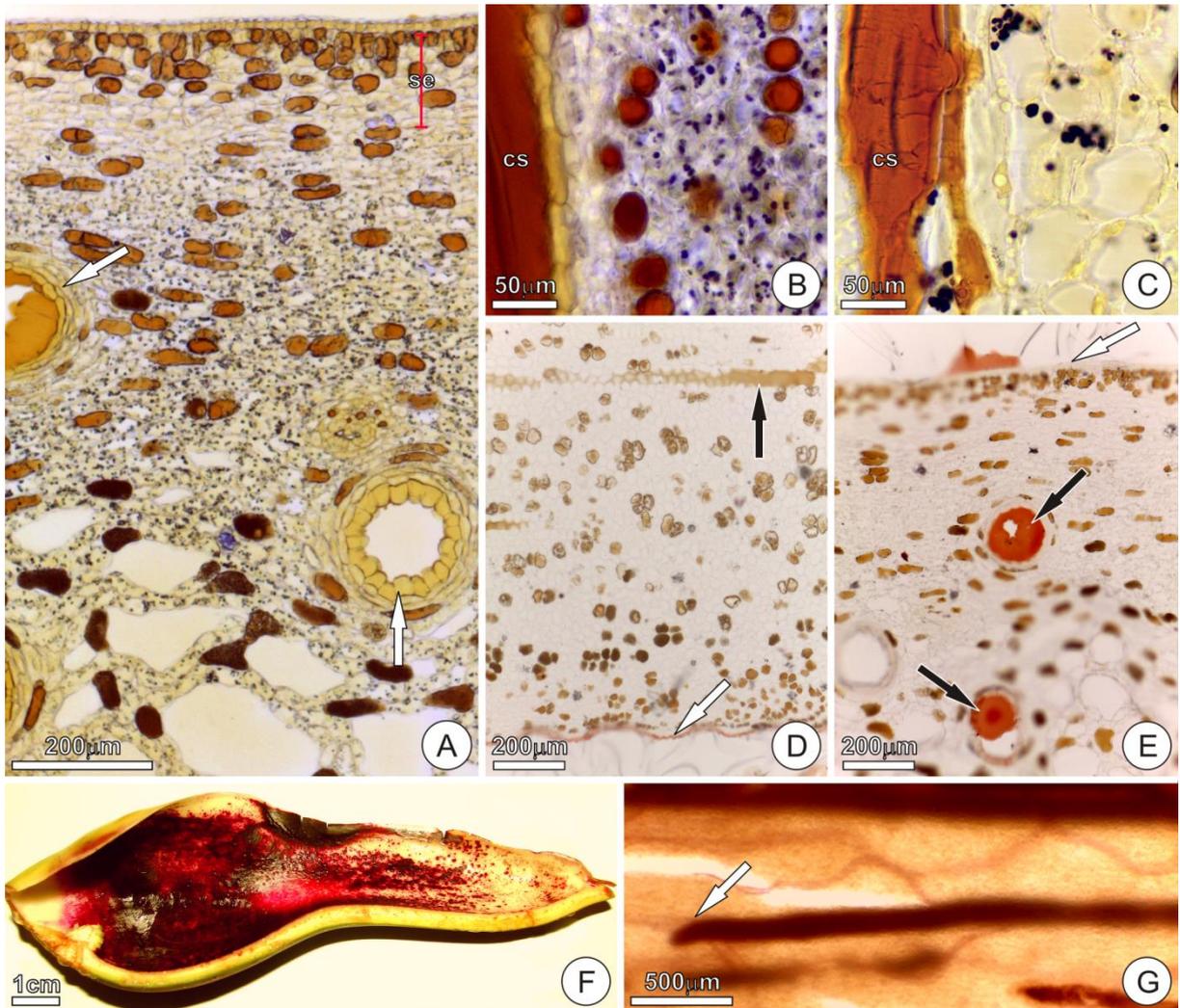
Material de natureza lipídica revelado pelo teste de Sudan está restrito à cutícula das células epidérmicas da face abaxial (Fig. 3D) e à secreção encontrada no lume dos canais de resina de maior calibre (Fig. 3E). A secreção dos canais de menor calibre, bem como o conteúdo das células secretoras, não apresentou resultado positivo para esse teste. O teste de NADI revelou a natureza terpênica da secreção dos canais de maior calibre.

Praticamente toda a face abaxial foi corada pelo vermelho neutro, principalmente na câmara e região de constrição da espata (Fig. 3F). Aparentemente o corante penetrou no tecido através dos estômatos.



**Figura 2.** Secções de espatas de *Philodendron adamantinum*. (A) Corte transversal na região abaxial, setas destacam canais de menor calibre. (B) Corte transversal próximo à face adaxial da epiderme, observar canais de maior calibre (setas). (C-D) Secção longitudinal da região adaxial. (C) Canais secretores de resina em anastomose. (D) Ápice do canal secretor em direção à face adaxial de epiderme, seta aponta região com acúmulo de material péctico. (E) Células do epitélio do canal secretor, notar núcleo volumoso e citoplasma denso. (F) Canal secretor em secção transversal exibindo lume repleto de resina 15 horas antes da exsudação. (G) Canal secretor em secção transversal no momento da liberação da resina para o meio externo. (H) Acúmulo de resina no espaço intercelular subepidérmico, deslocando a epiderme. (I) Resina sendo liberada para o meio externo através de estômato aberto.

O método de clarificação de Fuchs permitiu a visualização do canal secretor, paralelo à epiderme até o seu ápice, bruscamente convergente à face abaxial da espata (Fig. 3G).



**Figura 3.** Testes histoquímicos realizados em secções de espatas de *Philodendron adamantinum*. (A-C) Teste de Lugol. (A) Espata 15 horas antes da liberação de resina, observa-se a distribuição dos grãos de amido ao longo da região do mesofilo próximo à face adaxial da epiderme, notar a ausência de grãos nas camadas subepidérmicas e nas células dos canais secretores (setas). (B) Região próxima ao ducto secretor de resina, 15 horas antes da liberação. (C) Região próxima ao ducto secretor de resina no momento da liberação, evidenciando consumo dos grãos de amido. (D-E) Teste Sudan Red. (D) Região do mesofilo próxima à face abaxial da epiderme, notar resultado positivo apenas para a cutícula (seta branca), a seta preta aponta canal secretor de menor calibre. (E) Região do mesofilo próxima à face adaxial da epiderme, destacando natureza lipídica da secreção dos ductos de maior calibre (setas pretas), não ocorreu reação na epiderme (seta branca). (F) Espata seccionada longitudinalmente apresentando resultado da imersão em vermelho neutro. (G) Vista paradérmica de fragmento da espata após processo de diafanização exibindo ducto secretor de resina, notar desvio do ápice do canal em direção à face adaxial da epiderme (seta branca). cs - canal secretor; se - camadas subepidérmicas.

### Organização ultraestrutural

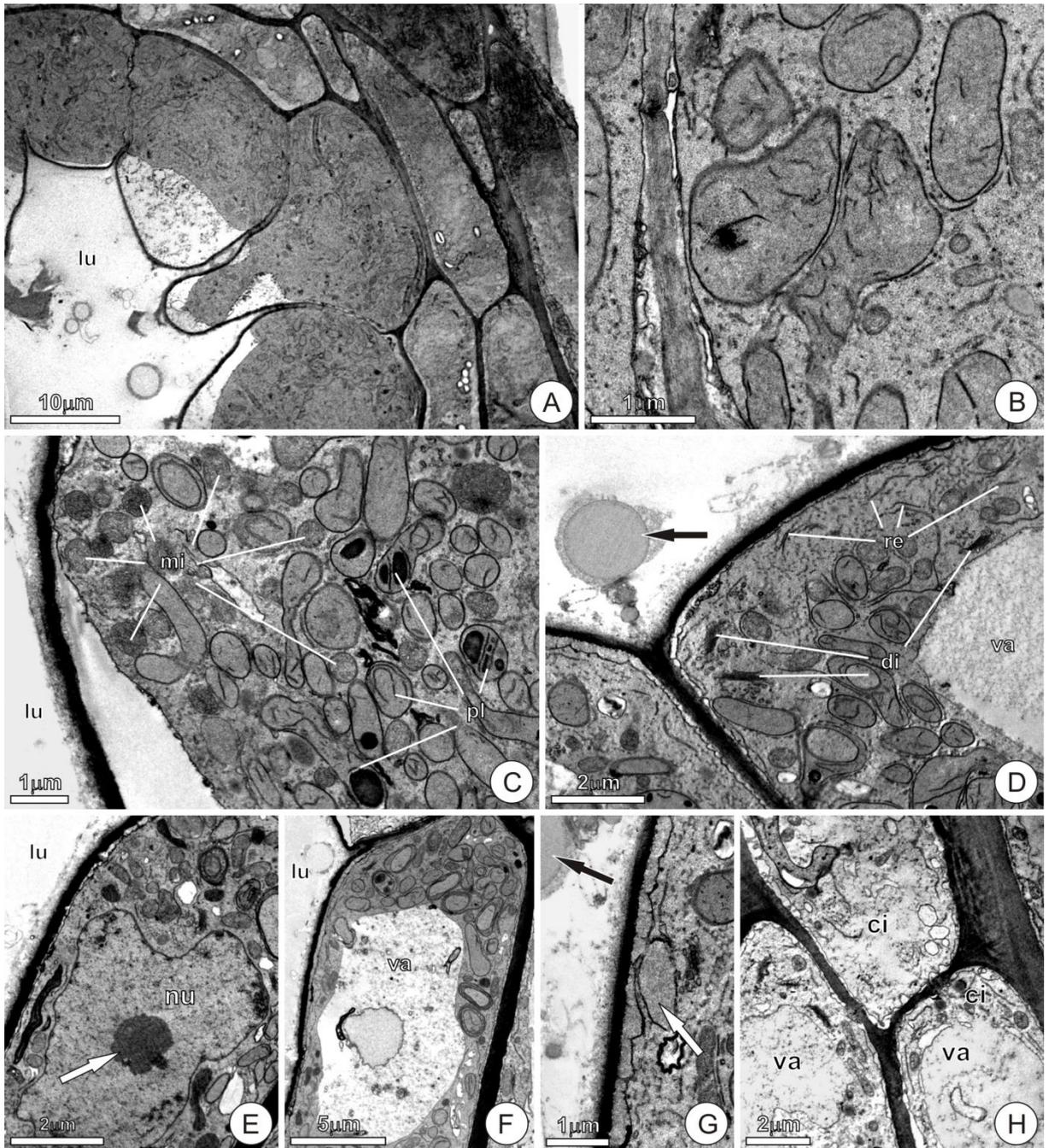
O epitélio secretor composto por uma camada de células globosas possui longa atividade secretora. Nos momentos observados ocorre produção de secreção de aspecto granular e seu acúmulo no espaço periplasmático adjacente à parede periclinal interna das células, próxima ao

lume do canal (Fig. 4A). Não foram observados plasmodesmos conectando as células secretoras entre si ou às demais células do canal.

O conjunto de organelas das células secretoras é formado, sobretudo, por plastídios com sistema de tilacoides ausente (Fig. 4B) e elevado número de mitocôndrias predominantemente globosas (Fig. 4C). Outras organelas são observadas como retículo endoplasmático liso, dictiosomos e ribossomos, porém de forma menos expressiva (Fig. 4D). O núcleo volumoso apresenta nucléolo evidente (Fig. 4E).

As células secretoras não apresentam vacúolos desenvolvidos durante o período secretor (Fig. 4A), exceto ao final desse período, quando podemos observar grandes vacúolos repletos de material de aspecto granular (Fig. 4F). Esse conteúdo se assemelha ao produto acumulado no espaço periplasmático (Fig. 4A). A secreção é, pelo menos em parte, granulócrica, sendo observadas vesículas repletas de substância granular se fusionando à membrana plasmática (Fig. 4G). Gotas de material de natureza lipídica são observadas no lume do canal, porém não foram observadas no interior da célula secretora (Figs. 4D, G).

As demais células do canal apresentam citoplasma rarefeito, com composição de organelas semelhante às células secretoras: mitocôndrias, plastídios, REL e ribossomos, porém em baixa população, destacam-se grandes vacúolos repletos de material granular (Fig. 4H).



**Figura 4.** Secções de canais secretores de resina localizados no mesofilo de espatas de *Philodendron adamantinum*. (A-B) Espata com aproximadamente 30% do tamanho final. (A) Parte do canal secretor em corte transversal exibindo as células epiteliais e tecido adjacente. (B) Célula secretora destacando os plastídios. (C-H) Espata 15 horas antes da liberação de resina. (C) População de organelas de célula secretora. (D) Células secretoras e parte do lume do canal, notar gotícula de material de natureza lipídica (seta) e vacúolo. (E) Detalhe da célula evidenciando núcleo volumoso com nucléolo conspícuo (seta). (F) Célula secretora apresentando vacúolo central repleto de material granular. (G) Vesícula contendo secreção (seta branca) se incorporando à membrana plasmática, seta preta indica gotícula de material de natureza lipídica. (H) Células do canal, adjacentes ao tecido secretor, mostrando citoplasma com baixa densidade de organelas e vacuoma bem desenvolvido. **ci** - citoplasma; **di** - dictiossomo; **lu** - lume do canal; **mi** - mitocôndria; **nu** - núcleo; **pl** - plastídio; **re** - retículo endoplasmático; **va** - vacúolo.

## Discussão

Mesmo existindo alguns trabalhos relatando a presença de canais secretores de resina em espécies da família Araceae (French 1987, Mayo *et al* 1997), Langenheim (2003) trata com cautela essa informação. Diversas substâncias são relatadas na literatura como resina e, segundo Langenheim (2003), apenas o estudo detalhado da composição química dessas substâncias permite reconhecê-las como tal. Apesar da constituição da secreção não ter sido objeto do presente estudo, algumas características nos permitem a denominação de resina para a secreção dos canais da espata de *Philodendron adamantinum*.

A estrutura anatômica desses canais é coerente com a morfologia de outros canais e cavidades secretores de resina: epitélio contendo uma camada de células secretoras e algumas camadas de células parenquimáticas subjacentes (Gilliland *et al.* 1988, Ciccarelli *et al.* 2001, Machado & Carmello-Guerreiro 2001). Essa composição é observada também para os canais resiníferos encontrados no eixo da inflorescência de *P. adamantinum* (observações pessoais) e na raiz de outras espécies do gênero (French, 1987).

A natureza terpênica do conteúdo dos canais de maior diâmetro, evidenciada pelos testes histoquímicos, sugere que se trata de resina a secreção desses canais. Langenheim (2003) separa as resinas em duas categorias de acordo com a composição dessa substância, resinas terpênicas e fenólicas. A resina exsudada pela espata de *P. adamantinum* se enquadra na primeira categoria, conforme revelado pelo teste de NADI.

A composição de organelas das células epiteliais dos canais de *Philodendron adamantinum*, formada preponderantemente de plastídios e com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso presentes em grandes quantidades, condiz com o observado nessas estruturas em outras espécies (Gilliland *et al.* 1988, Langenheim 2003, Rodrigues *et al.* 2011).

Os canais secretores de menor diâmetro presentes na espata de *Philodendron adamantinum*, tanto os localizados próximos à face abaxial quanto adaxial, apresentam comportamento semelhante ao observado nos canais ocorrentes na raiz de espécies do gênero *Philodendron* (French 1987) e no eixo da inflorescência de *Philodendron adamantinum* (observações pessoais): a secreção é acumulada no lume dos ductos e a liberação ocorre apenas em caso de injúria. Esse é o padrão observado para as estruturas internas secretoras de resina – canais e cavidades, usualmente não liberam ativamente a secreção para o meio externo (Dell & McComb 1978).

Entretanto, os canais de maior calibre, também encontrados na espata, exibem ápices direcionados à face adaxial da epiderme e, após acúmulo de secreção no espaço intercelular subepidérmico, a epiderme se rompe e a resina é liberada para o meio externo. Esse comportamento dos canais é compartilhado apenas com outras espécies do gênero *Philodendron* (Gibernau 1999, 2000, Gibernau & Barabé 2002) não sendo observados exemplos de outros gêneros na literatura.

A liberação de resina para o meio externo é extremamente sincronizada, ocorrendo em todas as inflorescências no mesmo momento do dia, exigindo algum mecanismo de controle. Lorio & Hodges (1968) observaram que a pressão de exsudação de oleoresina em *Pinus taeda* chega a 10atm. Mesmo sob tal pressão, há a necessidade de injúria para ocorrer exsudação dessa oleoresina, mostrando que apenas a pressão gerada pelo acúmulo dessa substância não é capaz de romper os tecidos e extravasar o conteúdo do lume para o meio externo. O aumento de volume das células do canal de resina da espata de *P. adamantinum* sugere o aumento da pressão no conteúdo do lume, forçando o trânsito de resina em direção ao ápice do canal e rompendo a epiderme, caracterizando a liberação ativa da resina para o meio externo. No momento do extravasamento da resina, o surgimento de grandes vacúolos nas células epiteliais, ainda ativas, aumentando o volume dessas células, pode contribuir também para maior pressão sobre a secreção.

A presença de grãos de amido na espata não parece estar relacionada à síntese de resina, visto que a fase secretora dos canais inicia-se cedo no desenvolvimento da espata e o acúmulo dessa reserva se dá em estádios mais avançados. Entretanto, é possível que o produto da hidrólise dessa reserva seja transportado para as células do canal, incrementando a concentração, gere um gradiente osmótico e contribua com o aumento do volume dessas células.

A natureza péctica da parede das células próximas ao ápice sugere uma rota de abertura do canal. A separação de células se dá por meio da ação de pectinases, imprescindível para a quebra da lamela mediana e consequente enfraquecimento dessa camada (Roberts *et al.* 2000). Essa ação enzimática é comum, por exemplo, em zonas de deiscência de frutos (Petersen *et al.* 1996).

É possível que a liberação ativa de resina se dê aliando-se o aumento da pressão sobre a resina acumulada no lume ao enfraquecimento da lamela mediana das células parenquimáticas próximas ao ápice do canal e ao rompimento da epiderme. Além disso, não se pode descartar o

papel dos estômatos, que quando coincide com o ápice do canal, torna-se um meio de liberação da secreção.

O papel desempenhado pela resina na adesão do grão de pólen ao corpo do polinizador foi relatado na literatura apenas para outro sistema. Croat (1978) observou que a resina liberada pelo androceu de *Clusia odorata* permitia que abelhas do gênero *Trigona* carregassem grãos de pólen grudados em suas patas. Porém, Armbruster (1984), baseado na natureza extremamente viscosa da resina e na pouca quantidade de pólen reunido nas patas das abelhas, sugere que, desse modo, a polinização seria ineficaz. Entretanto, nas espécies de *Philodendron* já estudadas, incluindo *P. adamantinum*, a resina recobre todo o corpo do polinizador, além do grão de pólen ser liberado em cordões, o que favoreceria a adesão ao estigma. Devido à ausência de estruturas especializadas para carregar grãos de pólen no corpo do polinizador, o papel aderente da resina parece ser crucial à polinização dessa espécie.

A liberação ativa de resina para o meio externo é uma novidade para estruturas internas, não tendo sido abordado na literatura aspectos da funcionalidade de sistema equivalente. Importante atentar para os mecanismos celulares que controlam o processo de liberação da resina, sobretudo pela precisão e ajuste temporal. Esses mecanismos garantem que a resina esteja disponível no momento em que os polinizadores saem da câmara da espata e encontram o pólen recém-liberado, permitindo que esta atue como elemento de fixação do pólen ao corpo dos polinizadores. Tal especificidade nessa relação inseto-planta evidencia a estreita relação entre os pares ao longo da evolução.

Análises mais apuradas, objetivando compreender o funcionamento desse mecanismo, principalmente no que se refere à alteração da forma celular, se tornam necessárias e interessantes para estudos futuros. Aliada ao intrigante funcionamento desses canais está a importância ecológica da resina, aparentemente essencial à polinização de *Philodendron adamantinum*, reforçando o valor do tema como objeto de novos trabalhos.

## Referências bibliográficas

- Armbruster WS. 1984.** The role of resin in angiosperm pollination: ecological and chemical considerations. *American Journal of Botany* **71**(8): 1149- 1160.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111-116.
- Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. 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.
- Croat TB. 1978.** *Flora of Barro Colorado island*. Stanford: Stanford University Press.
- Croat TB. 1997.** A Revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) for Mexico and Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**(3): 311-704.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du *pin maritime* au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l' Academie dès Sciences Paris* **258**: 1338-1340.
- Dell B, McComb AJ. 1978.** Plant resins-their formation, secretion and possible functions. In H.W. Woolhouse (ed.). *Advances in Botanical Research VI*. Academic Press, New York, 277-316.
- French JC. 1987.** Systematic survey of resin canals in roots of Araceae. *Botanical Gazette* **148**(3): 360-371.
- Fuchs CH. 1963.** Fucsina staining with NaOH clearing for lignified elements of whole plants or plant organs. *Stain Technology* **38**(3): 141-144.
- Gibernau M, Barabé D. 2002.** Pollination ecology of *Philodendron squamiferum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany* **80**: 316-320.
- Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A. 1999.** Beetle pollination of *Philodendron solimoense* (Araceae) in French Guiana. *International Journal of Plant Sciences* **160**(6): 1135-1143.
- Gibernau M, Barabé D, Labat D. 2000.** Flowering and pollination of *Philodendron melinonii* (Araceae) in French Guiana. *Plant Biology* **2**: 331-334.

- Gilliland MG, Apletton MR, Staden J. 1988.** Gland cells in resin canal epithelia in guayule (*Parthenium argentatum*) in relation to resin and rubber production. *Annals of Botany* **61**: 55-64.
- Grayum MH. 1996.** Revision of *Philodendron* subgenus *Pteromischum* (Araceae) for Pacific and Caribbean Tropical America. *Systematic Botany Monographs* **47**: 1-233.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: Freeman.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw–Hill.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137-138.
- Langenheim JH. 1990.** Plant resins. *American Scientist* **78**(1): 16-24.
- Langenheim, J.H. 2003.** *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany*. Portland: Timber Press.
- Lorio PL, Hodges JD. 1968.** Microsite effects on oleoresin exudation pressure of large loblolly pines. *Ecological Society of America* **49**(6): 1207-1210.
- Machado SR, Carmello-Guerreiro SM. 2001.** Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica* **15**(2): 189-195.
- Mayo SJ. 1991.** A revision of *Philodendron* subgenus *Meconostigma* (Araceae). *Kew bulletin* **46**(4): 601-681.
- Mayo SJ, Bogner J, Boyce PC. 1997.** *The Genera of Araceae*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**(2):368-373.
- Pereira J, Schlindwein C, Antonini Y, Maia ACD, Dötterl S, Martins C, Navarro DMAF, Oliveira R. 2014.** *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* **111**(3): 679-691.
- Petersen M, Sander L, Child R, Onckelen H, Ulvskov P, Borkhardt B. 1996.** Isolation and characterisation of a pod dehiscence zone-specific polygalacturonase from *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **31**: 517-527.

- 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*. New York: Elsevier, 343-403.
- Roberts JA, Whitelaw CA, Gonzalez-Carranza ZH, McManus MT. 2000.** Cell separation processes in plants - models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany* **86**: 223-235.
- Rodrigues TM, Teixeira SP, Machado SR. 2011.** The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). *Flora* **206**: 585-594.
- Roland AM. 1978.** General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL, ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 1-62.
- Vogel S. 1963.** *The role of scent glands in pollination. On the structure and function of osmophores* (transl.by Bhatti JS). Washington, DC: Smithsonian Institution Libraries.

## Considerações finais

A polinização cruzada é essencial à reprodução sexuada em *Philodendron adamantinum*, já que autopolinização não ocorre nessa espécie protogínica. As estruturas apresentadas nesta dissertação contribuem de forma direta para o sucesso da polinização. Os osmóforos liberam substâncias voláteis que atraem *Erioscelis emarginata*, polinizador exclusivo de *P. adamantinum*; os estaminódios são recursos nutritivos consumidos pelo besouro, mantendo intactas as estruturas férteis; os canais da espata secretam resina que aderem o grão de pólen ao corpo liso do polinizador. Todas as estruturas funcionam de forma sincronizada, geridas por mecanismos refinados que garantem o sucesso da interação entre *P. adamantinum* e o polinizador.

As análises estruturais realizadas durante o presente trabalho permitiram maior compreensão do funcionamento dessas estruturas, ressaltando o valor das mesmas para a reprodução da espécie. Destacam-se a descrição morfológica e a compreensão de aspectos funcionais dos osmóforos, estruturas pouco contempladas principalmente devido à dificuldade de localização, bem como a introdução ao mecanismo de liberação ativa de resina pela espata, intrínseco ao gênero *Philodendron*.

A reprodução de *P. adamantinum*, espécie de distribuição restrita e hábito peculiar, é um interessante tema a ser estudado e o presente trabalho contribui com informações relevantes para novos estudos. Uma perspectiva ecológica em relação ao comportamento do besouro seria significativa, ampliando os dados sobre essa interação específica. Além disso, novos estudos estruturais abrangendo espécies relacionadas podem ser realizados objetivando o estabelecimento de padrões.