



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal



BRUNO FERNANDES FALCÃO

**POLINIZAÇÃO E ESTRUTURA DO ANDROCEU EM *Solanum*
luridifuscescens BITTER (CLADO CYPHOMANDRA –
SOLANACEAE): A MORFOLOGIA DA ANTERA PREDIZ A
ESTRATÉGIA DE POLINIZAÇÃO?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

BELO HORIZONTE – MG

2015



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal



BRUNO FERNANDES FALCÃO

**POLINIZAÇÃO E ESTRUTURA DO ANDROCEU EM *Solanum*
luridifuscescens BITTER (CLADO CYPHOMANDRA –
SOLANACEAE): A MORFOLOGIA DA ANTERA PREDIZ A
ESTRATÉGIA DE POLINIZAÇÃO?**

Orientador: Prof. Dr. João Renato Stehmann
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Coorientador: Prof. Dr. Clemens Peter Schlindwein
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2015

Agradecimentos

Agradeço à minha família por fazer parte de toda minha trajetória de vida, em especial aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram na minha força de vontade para iniciar a vida acadêmica, mesmo após anos longe das salas de aula.

Aos meus orientadores João Renato e Clemens Schlindwein pelo acompanhamento e participação, pela paciência e bom humor no trabalho.

A todos que me acompanharam nas expedições de campo: Suzana Moreira, Yuri Gouvêa, Patrick Luan, Izabella Rodrigues, João Stehmann, Fernanda Freitas, Juliana Souza, Talita Mota, pela companhia, sugestões, palpites, paciência e resistência!

Aos membros da banca pela participação, críticas e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao professor Alexandre Salino pela oportunidade de estágio no herbário BHCB durante a graduação.

Ao professor João Renato e a amiga Izabella Rodrigues pela oportunidade de iniciação científica e primeiros contatos com a pesquisa científica.

Aos membros do Laboratório de Sistemática Vegetal pelo coleguismo, discussões, ajudas e momentos de descontração.

Ao professor Élder Paiva por todo o apoio instrumental e valiosas contribuições dadas ao segundo capítulo deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Anatomia Vegetal pela solicitude com a qual sempre me receberam.

À Carolina Oliveira e Patrícia Gonçalves pelo auxílio na montagem das lâminas e processamento do material para microscopia eletrônica.

Aos membros do Grupo Plebéia pela experiência compartilhada em biologia da polinização.

À professora Queila Garcia, Daniela Duarte, Leilane Barreto e demais alunos do Laboratório de Fisiologia Vegetal pelo auxílio na germinação de sementes.

Ao professor João Batista, Karina Proite, Aline Vale e alunos do Laboratório de Biosistemática e Sistemática Molecular pela colaboração nos experimentos de citogenética.

À professora Marta Svartman e Naiara Araújo do Laboratório de Citogenômica Evolutiva pelo incentivo e contribuições nos estudos de citogenética.

Ao professor Stefan Dötterl e Irmi Schäffler da Universidade de Salzburg, Áustria, pelas análises de odores florais.

Ao casal que zela pela Mata do Sossego, seu Jairo e dona Aparecida, pelo trabalho dedicado, exemplo de companheirismo, humildade e hospitalidade, pelos jantares, piadas e saberes.

Ao Alexandre Enout, gerente da RPPN Mata do Sossego, pela autonomia dada à prática dos trabalhos de campo.

Aos membros do Projeto Muriquis do Sossego, principalmente Anderson Ferreira, pelas conversas e experiência compartilhada.

Ao Sandro pela boa vontade em fornecer transporte nos caminhos tortuosos entre Simonésia e a Mata do Sossego.

À minha companheira Suzana por todo o apoio nos momentos mais difíceis deste aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMG.

A todos os membros do Departamento de Botânica da UFMG, professores, alunos, técnicos e prestadores de serviço.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Fundação Biodiversitas por permitir a execução dos estudos na RPPN Mata do Sossego.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG.

A todos que, de alguma forma, participaram na realização deste trabalho.

Obrigado.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

SUMÁRIO

1. Resumo	7
2. Introdução	9
3. Capítulo 1: Mecanismos de liberação polínica e estrutura do androceu em <i>Solanum luridifuscescens</i> Bitter (Clado Cyphomandra – Solanaceae): a morfologia da antera prediz a estratégia de polinização?	12
3.1: Introdução	13
3.2: Metodologia	15
3.3: Resultados	18
3.4: Discussão	28
3.5: Referências	32
4. Capítulo 2: Aspectos microestruturais de papilas florais apontam a presença de osmóforos em <i>Solanum luridifuscescens</i> Bitter (Clado Cyphomandra – Solanaceae)	36
4.1: Introdução	37
4.2: Metodologia	39
4.3: Resultados	40
4.4: Discussão	47
4.5: Referências	51
5. Considerações Finais	55

Resumo

As flores do gênero *Solanum*, em geral, possuem anteras rígidas e amarelas, que contrastam com a cor do perianto, não produzem néctar, e oferecem o pólen seco como único recurso, caracterizando a síndrome de pólen. Os principais polinizadores são abelhas fêmeas que transmitem vibrações às anteras, provocando a liberação de pólen através dos pequenos poros apicais. Neste trabalho, estudamos uma população de *Solanum luridifuscescens* Bitter que foge a esse padrão, suas flores apresentam anteras flexíveis, cobertas por papilas roxas, que não contrastam com a cor da corola. Essas características lembram algumas espécies proximamente relacionadas que exibem o mecanismo pneumático de polinização, por meio do qual machos de abelhas da tribo Euglossini, causam a compressão das paredes delgadas das anteras e, inadvertidamente, provocam a liberação de pólen sem aplicar vibrações às flores. Nesse tipo de interação, os perfumes florais, além de atuarem como os principais atrativos, também são o principal recurso floral, o que caracteriza a síndrome de perfume. No capítulo 1 investigamos a biologia reprodutiva e a polinização da população em questão, sendo o principal objetivo determinar a ocorrência desse mecanismo. As flores possuem antese diurna, são hermafroditas, pentâmeras, de corola roxa estrelada. Duram em média cinco dias, se fecham todas as noites e o estile cresce durante a antese. Fêmeas de seis espécies de abelhas visitaram as flores e vibraram as anteras para coletar pólen. Machos de Euglossini podem visitar as flores, mas sem provocar liberação de pólen, dessa forma nossos estudos mostraram o mecanismo pneumático operando somente em resposta a estímulos artificiais. Em *Solanum luridifuscescens*, uma espécie polinizada por abelhas fêmeas que coletam pólen por vibração, a conquista do princípio pneumático pode representar um estágio evolutivo intermediário entre um *Solanum* típico e aqueles polinizados por machos de Euglossini. No capítulo 2 analisamos o caráter glandular das anteras da espécie, com o objetivo de elucidar sua morfologia intracelular, buscando evidenciar se as papilas que revestem as anteras constituem osmóforos. Rápido consumo de amido, característica marcante em tecidos secretores de perfume, foi observado no material analisado. As papilas epidérmicas do conectivo que cobrem a face abaxial das anteras possuem características comumente encontradas em tecidos osmogênicos: citoplasma denso e rico em organelas, núcleo conspícuo, numerosas mitocôndrias, e gotas lipídicas no citoplasma durante a antese. Pequenas vesículas se fundem no interior dos numerosos plastídeos até formar uma grande estrutura globular. Diversas cisternas de retículo endoplasmático liso são encontradas junto aos plastídeos e à membrana plasmática. Uma substância amorfa, de elétron-densidade moderada e textura heterogênea foi encontrada junto à cutícula. A liberação parece ocorrer por processos écrinos, mas o sítio exato de transporte para o exterior não foi localizado. Embora os testes com Sudan tenham sido positivos e as evidências ultraestruturais indiquem que as células secretam substâncias de natureza lipídica, possivelmente terpenos, futuras análises ainda são necessárias para se confirmar a natureza química dos compostos produzidos. A aquisição do princípio pneumático de polinização e a evolução do conectivo secretor podem ter ocorrido mais de uma vez no clado Cyphomandra, tendo em vista o não monofiletismo das seções que o compõem.

Palavras-Chave: Mata Atlântica, Cyphomandropsis, vibração, pneumático, secreção.

Abstract

The flowers of the genus *Solanum*, in general, have rigid and yellow anthers, which contrast with the perianth color, do not produce nectar, and offer the dry pollen as the only resource, featuring the pollen syndrome. The main pollinators are female's bees that transmit vibrations to anther, causing the release of pollen through the small apical pores. In this paper we studied a population of *Solanum luridifuscescens* Bitter that flees from this pattern, whose flowers have flexible anthers covered by purple papillae that do not contrast with the corolla's color. These features resemble some closely related species which exhibit the pneumatic pollination mechanism, whereby Euglossini males cause compression in the thin anther walls and initiate pollen release without applying vibration to the flowers. In this kind of interaction, the floral scents, act as the main attractives, besides they are the main floral resource, featuring the perfume syndrome. In the Chapter 1 we investigate the reproductive biology and pollination of the population in question, with the main objective of determine the occurrence of this mechanism. The flowers have diurnal anthesis, are hermaphrodites, pentamerous, of purple starry corolla. Last an average of five days, close every night and the style grows during anthesis. Females of six specie's bees visited the flowers and vibrated the anthers to collect pollen. Euglossini males can visit the flowers, but without causing pollen release so, our studies showed the pneumatic mechanism operating only in response to artificial stimuli. In *Solanum*, a species pollinated by female bees that collect pollen by vibration, the conquest of pneumatic principle can represent an intermediate evolutionary stage between a typical *Solanum* and those pollinated by Euglossini males. In Chapter 2 we analyze the glandular character of the anthers, in order to elucidate their cellular morphology, seeking evidence of whether the papillae covering the anthers are osmophores. Quick starch consumption, a typical feature in perfume secreting tissues, was observed in the analyzed material. The epidermal connective papillae covering the abaxial surface of the anthers have characteristics commonly found in osmogenic tissue: dense cytoplasm rich in organelles, conspicuous nucleus, numerous mitochondria and lipid droplets in the cytoplasm during anthesis. Small vesicles fuse inside the numerous plastids to form a large globular structure. Several smooth endoplasmic reticulum cisterns are found next to the plastids and the plasma membrane. An amorphous substance of moderate electron density and heterogeneous texture was found in the cuticle. The liberation appears to occur by eccrine processes, but the exact site of transport to the exterior was not found. Although the tests were positive with Sudan and ultrastructural evidence indicates that cells secrete substances of lipidic nature, possibly terpenes, further analysis is still required to confirm the nature of the chemical compounds produced. The acquisition of pneumatic principle of pollination and the development of secretory connective may have occurred more than once in *Cyphomandra* clade, in view of the non-monophyly of the sections that compose it.

Keywords: Atlantic Forest, *Cyphomandropsis*, vibration, pneumatic, secretion.

Introdução

Solanum (Solanaceae), um dos maiores gêneros de plantas com sementes, conta com 1250 a 1700 espécies (Frodin, 2004), ocorre em todos os continentes temperados e tropicais, e exibe notável diversidade morfológica e ecológica, sendo o gênero de maior importância econômica por conter espécies cultivadas como a batata (*S. tuberosum* L.), o tomate (*S. lycopersicum* L.) e a berinjela (*S. melongena* L.) (Weese & Bohs, 2007). Um dos grupos bem definidos no gênero é o clado Cyphomandra, formado por cerca de 50 espécies de arbustos ou pequenas árvores, exclusivamente neotropicais, cuja sinapomorfia morfológica mais consistente é a presença de grandes cromossomos e grande quantidade de DNA nuclear (Bohs, 1994, 2001, 2007; Weese & Bohs, 2007).

O gênero *Solanum* é conhecido por possuir flores caracterizadas pela síndrome de pólen, ou seja, não produzem néctar, possuem anteras rígidas, geralmente amarelas brilhantes, que contrastam com a cor do perianto, e oferecem o pólen como única recompensa (Vogel, 1978). O pólen é retirado pelos poros apicais das anteras através de vibrações aplicadas por abelhas fêmeas a essas estruturas (Buchmann, 1983). Entretanto, em um dos subgrupos do clado Cyphomandra, seção Pachyphylla, que inclui o tomate de árvore (*S. betaceum* Cav.), evoluiu um mecanismo diferente, denominado pneumático (ou mecanismo do fole), por meio do qual machos de abelhas da tribo Euglossini provocam a liberação de pólen sem aplicar vibrações às anteras. Nesse caso, as abelhas coletam perfumes florais produzidos pelo conectivo das anteras, que é desenvolvido e diferenciado em osmóforo (Soares et al., 1989; Gracie, 1993; Sazima et al., 1993). As flores das espécies que exibem esse mecanismo possuem anteras flexíveis, papilosas, roxas, verdes ou esbranquiçadas, que não contrastam com a cor da corola.

Solanum luridifuscescens Bitter, que ocorre na RPPN Mata do Sossego, Simonésia, Minas Gerais, pertence à outra seção do clado Cyphomandra, Cyphomandropsis, e possui características equivalentes aquelas das espécies nas quais o mecanismo pneumático atua, como anteras papilosas roxas cujas paredes se flexionam após uma leve pressão mecânica. Até o momento, somente fêmeas de abelhas foram registradas em espécies da seção (Passarelli & Bruzzone, 2004) e, sendo assim, o mecanismo pneumático, não foi visto atuando em espécies de Cyphomandropsis na natureza.

Essa dissertação foi construída com o intuito de determinar a ocorrência do mecanismo pneumático nas flores de *S. luridifuscescens*, bem como de investigar o caráter glandular das anteras da população em estudo. O primeiro capítulo aborda a biologia floral e a polinização, tendo em vista

as interações entre *S. luridifuscescens* e seus visitantes florais, buscando elucidar se a morfologia da flor prediz seu mecanismo de polinização. O segundo capítulo versa sobre a estrutura da antera nitidamente papilosa, com destaque na ultraestrutura das células possivelmente envolvidas em processos de secreção. Osmóforos foram relatados em espécies da seção *Cyphomandropsis* (Passarelli & Bruzzone, 2004), mas sua estrutura não foi elucidada.

Espera-se que as informações aqui apresentadas contribuam para a compreensão da evolução dos mecanismos de polinização no clado *Cyphomandra*. Este trabalho também teve o propósito de fornecer uma base de comparação entre estruturas secretoras no gênero *Solanum*, assim como na família Solanaceae.

Referências

- Bohs, L. 1994. *Cyphomandra* (Solanaceae). Flora Neotropica Monograph 63. New York Botanical Garden, New York.
- Bohs, L. 1995. Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*, 44:583-587.
- Bohs, L. 2001. A revision of *Solanum* section *Cyphomandropsis* (Solanaceae). *Syst. Bot. Monogr.*, 61: 1-85.
- Bohs, L. 2007. Phylogeny of the *Cyphomandra* clade of the genus *Solanum* (Solanaceae) based on ITS sequence data. *Taxon*, 56: 1012-1026.
- Buchmann, S.L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*, Van Nostrand & Reinhold, New York: 73-114.
- Frodin, D.G. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53: 753-776.
- Gracie, C. 1993. Pollination of *Cyphomandra endopogon* var. *endopogon* (Solanaceae) by *Eufriesea* spp. (Euglossini) in French Guiana. *Brittonia*, 45(1): 39-46.
- Passarelli, L.; Bruzzone, L. 2004. Significance of floral colour and scent in three *Solanum* sect. *Cyphomandropsis* species (Solanaceae) with different floral rewards. *Aust. J. Bot.*, 52: 659-667.
- Sazima, M.; Vogel, S.; Cocucci, A.; Hausner, G. 1993. The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae): pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Pl. Syst. Evol.*, 187: 51-88.

- Soares, A.A.; Campos, O. de; Vieira, M.F.; Melo, G.R. de. 1989. Relações entre *Euglossa* (Euglossella) *mandibularis* Friese 1899 (Hymen. Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). Ciênc. Cult., 41: 903-905.
- Vogel, S. 1978. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: The Pollination of Flowers by Insects. Linnean Soc. Symp. Series, 6: 89-96.
- Weese, T. & Bohs, L. 2007. A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). Syst. Bot., 32(2): 445-463.

Mecanismos de liberação polínica e estrutura do androceu em *Solanum luridifuscescens* Bitter (Clado Cyphomandra – Solanaceae): a morfologia da antera prediz a estratégia de polinização?

Bruno Fernandes Falcão¹, Clemens Peter Schlindwein¹, João Renato Stehmann¹

1 – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Caixa Postal 486 – Belo Horizonte, MG, Brasil.

Resumo: *Solanum luridifuscescens* Bitter seção Cyphomandropsis, espécie que ocorre no sudeste e sul do Brasil, Argentina e Paraguai, difere da grande maioria dos *Solanum* por apresentar flores inconspícuas, com anteras de paredes flexíveis e face abaxial coberta por papilas roxas. Essas características lembram algumas espécies proximalmente relacionadas que exibem o mecanismo pneumático de polinização, por meio do qual machos de abelhas da tribo Euglossini, causam a compressão das paredes delgadas das anteras e, inadvertidamente, provocam a liberação de pólen sem aplicar vibrações às flores. No intuito de verificar a ocorrência desse mecanismo, investigamos a biologia reprodutiva e a polinização de uma população de *Solanum luridifuscescens*. As plantas crescem em uma clareira natural na floresta, numa área de difícil acesso, em terreno íngreme, a cerca de 1540 metros de altitude. A espécie possui hábito arbustivo e inflorescências do tipo monocásio escorpioide, com flores de antese diurna, hermafroditas, pentâmeras, de corola roxa estrelada. As flores duram em média cinco dias, se fecham todas as noites e o estile cresce durante a antese. Fêmeas de seis espécies de abelhas visitaram as flores e vibraram as anteras para coletar pólen. Machos de Euglossini podem visitar as flores, mas sem provocar liberação de pólen, dessa forma nossos estudos mostraram o mecanismo pneumático operando somente através de estímulos artificiais. A conquista do princípio pneumático de polinização em *Solanum luridifuscescens*, uma espécie polinizada por abelhas fêmeas que coletam pólen por vibração, pode representar um estágio evolutivo intermediário entre um *Solanum* típico e aqueles polinizados por machos de Euglossini. A evolução do mecanismo pneumático pode ter ocorrido mais de uma vez no clado Cyphomandra, tendo em vista o não monofiletismo das seções que o compõem.

Palavras-chave: Mata Atlântica, Cyphomandropsis, vibração, pneumático, fole.

Abstract: *Solanum luridifuscescens* Bitter section Cyphomandropsis, species found in southeastern and southern of Brazil, Argentina and Paraguay, differs from the vast majority of *Solanum* to present inconspicuous flowers with anthers of flexible walls and abaxial face covered with purple papillae. These features resemble some closely related species that exhibit the pollination pneumatic mechanism whereby male bees of the Euglossini tribe, cause compression of the anther's thin walls and, inadvertently, trigger the pollen release without applying vibration in the flowers. In order to verify the occurrence of this mechanism, we investigated the reproductive biology and pollination of a population of *Solanum luridifuscescens*. The plants grow in a natural glade in the forest, in an area of difficult access, in steep terrain, to about 1540 meters. The species has the shrub habit and inflorescences of the monocasial scorpioides type, with flowers of diurnal anthesis, hermaphrodites, pentamerous, of starry purple corolla. The flowers last an average of five days, close every night and the style grows during anthesis. Females of six species of bees visited the flowers and vibrated the anthers to collect pollen. Euglossini males can visit the flowers but without causing pollen release, so, our studies showed the pneumatic mechanism operating only through artificial stimuli. The conquest of the pollination pneumatic principle in *Solanum luridifuscescens*, a species

pollinated by female bees that collect pollen by vibration, may represent an intermediate evolutive stage between a typical *Solanum* and those pollinated by Euglossini males. The evolution of the pneumatic mechanism may have occurred more than once in Cyphomandra clade, with a view of not monophyletic sections that compose it.

Keywords: Atlantic Forest, Cyphomandropsis, vibration, pneumatic, bellows.

Introdução

Radiação adaptativa para diferentes polinizadores tem sido um dos processos mais importantes de especiação, diversificação e evolução ocorrido nas angiospermas (Friis et al., 1987; Proctor et al., 1996). Em Solanaceae, ele foi um processo chave, especialmente na região neotropical (Cocucci, 1999). Nos gêneros *Calibrachoa*, *Iochroma*, *Nicotiana* e *Petunia*, por exemplo, ocorrem espécies polinizadas por abelhas, esfingídeos e beija-flores (Cocucci, 1999; Stehmann et al., 2009; Gübitz, 2009; Knapp, 2010). Num contexto evolutivo, adaptações morfológicas associadas a diferentes polinizadores têm sido consideradas homoplásicas em Solanaceae (Knapp, 2010), embora membros da subfamília Solanoideae, que inclui o especioso gênero *Solanum*, tenha se especializado na polinização por abelhas.

Caracterizadas pela falta de nectários, as flores de *Solanum* oferecem somente o pólen seco, armazenado em anteras poricidas, geralmente de coloração amarela brilhante, contrastando com a cor do perianto. Esses atributos constituem a síndrome de pólen, de acordo com Vogel (1978). O pólen é somente acessível a abelhas fêmeas de determinadas espécies (Augochlorini, Bombini, Euglossini, Xylocopini, entre outras) que vibram as anteras para coletá-lo. Nesse tipo de remoção de pólen, as abelhas se curvam sob o ápice do cone de anteras, agarrando-o firmemente, e vibram as flores através de contração e relaxamento de músculos alares, a uma frequência de 2-2000 Hz. Um som audível é emitido, enquanto uma nuvem de pólen é liberada através dos poros apicais das anteras. A polinização advinda desse processo foi denominada “buzz-pollination” (Buchmann, 1983), sendo as anteras rígidas e espessas.

As seções *Cyphomandropsis* e *Pachyphylla* compõem o clado *Cyphomandra*, formado por cerca de 50 espécies de arbustos ou pequenas árvores, exclusivamente neotropicais, sendo sua sinapomorfia morfológica mais consistente a presença de cromossomos grandes, e grandes quantidades de DNA nuclear (Bohs, 1994, 2001, 2007; Weese & Bohs, 2007). Porém, quando consideradas separadamente, as duas seções não formam grupos monofiléticos (Bohs, 2007), e se diferem morfológicamente por caracteres do conectivo das anteras.

Na seção *Pachyphylla*, que compreende o antigo gênero *Cyphomandra* L., agora incluso em *Solanum* (Bohs, 1995), evoluiu um mecanismo alternativo de liberação de pólen: as abelhas exercem pressão mecânica nas paredes das anteras que, através de um princípio físico pneumático (parte do ar contido dentro das anteras é expelido enquanto o pólen é liberado pelo fluxo de ar), liberam os grãos de pólen (Sazima et al., 1993). As flores que exibem esse mecanismo possuem anteras flexíveis e inconspícuas, não contrastantes com o perianto. O conectivo é alargado (Sendtner, 1845), possui superfície papilosa e funciona como osmóforo floral, uma vez que produz substâncias voláteis que atraem machos de abelhas da tribo Euglossini (Apidae) (Soares et al., 1989; Gracie, 1993; Sazima et al., 1993). Enquanto raspam a superfície glandular para coletar os perfumes, essas abelhas provocam a compressão das anteras e a expulsão do pólen. O pólen aderido ao corpo do animal fica então disponível para a polinização. Embora machos coletores de perfumes sejam os principais polinizadores, fêmeas coletoras de pólen por vibração também podem ser encontradas esporadicamente nas flores (Sazima et al., 1993). Nessas flores, os perfumes florais, além de atuarem como os atrativos preponderantes, também são o principal recurso coletado pelas abelhas, o que caracteriza a síndrome de perfume.

Diferente da seção *Pachyphylla*, as espécies da seção *Cyphomandropsis* não possuem conectivos tão desenvolvidos, no entanto, algumas delas exibem características semelhantes aos membros de *Pachyphylla*. Passarelli & Cocucci (2006b) estudaram a ontogenia de três espécies de *Cyphomandropsis*, duas delas com paredes finas e flexíveis (*S. confusum* e *S. stuckertii*) e uma com paredes espessas e rígidas (*S. glaucophyllum*). *S. confusum* e *S. stuckertii* possuem conectivos desenvolvidos, com caracteres glandulares, mas sem células papilosas (Passarelli & Bruzzone, 2004; Passarelli & Cocucci, 2006b). Contudo, as três espécies possuem dupla expansão do tecido placentóide na maturidade, semelhante às espécies de *Pachyphylla* que exibem o mecanismo pneumático (Passarelli & Cocucci, 2006b). Passarelli & Cocucci (2006a) sugeriram que o mecanismo pneumático pode ter exercido um papel simultâneo ao mecanismo vibratório, como um serviço de desobstrução dos poros das anteras que possibilitaria a divisão do pólen entre diferentes polinizadores. Apesar dessas semelhanças, o mecanismo pneumático de polinização ainda não foi registrado operando naturalmente nas espécies da seção *Cyphomandropsis*. Até o momento, visitantes florais só foram registrados em duas espécies desta seção que ocorrem na Argentina, *Solanum stuckertii* e *S. glaucophyllum*, ambas polinizadas por abelhas que vibraram as flores para coletar pólen (Passarelli & Bruzzone, 2004).

Neste trabalho, investigamos a polinização de *Solanum luridifuscescens*, um membro da seção Cyphomandropsis que possui flores com a face abaxial das anteras cobertas por papilas roxas, que não contrastam com a cor da corola. As paredes das anteras são delgadas e flexíveis, e expelem pólen quando mecanicamente pressionadas, características compartilhadas com aquelas espécies de Pachyphylla que exibem o mecanismo de polinização por fole (Sazima et al., 1993). Tais características florais predizem a ocorrência natural do mecanismo pneumático, hipótese aqui testada para a espécie.

Metodologia

ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Mata do Sossego, localizada na Zona da Mata mineira, entre os municípios de Simonésia e Manhuaçu (MG), a 324 km de Belo Horizonte. A vegetação é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual Montana (Veloso et al., 1991) e o clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwb, típico das montanhas do sudeste do Brasil (Alvares et al., 2013). A temperatura e pluviosidade oscilam de 13 a 17°C, e 10 a 17mm, nos dias mais frios e secos (abril a setembro). Nos dias mais quentes e úmidos (outubro a março) esses valores variam de 22 a 26°C, e 103 a 283mm, respectivamente (Fundação Biodiversitas, 2013). O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de acordo com a portaria nº 20, de 16 de fevereiro de 1998, reconhece a reserva como representativa de ecossistemas da Mata Atlântica, fauna típica da região, com espécies ameaçadas de extinção, várias nascentes e relevante beleza cênica.

As plantas de *Solanum luridifuscescens* crescem em uma clareira natural na floresta, numa área de difícil acesso, em terreno íngreme. A população fica próxima ao mirante da reserva, dispersada ao redor da Trilha das Hortências, consiste em 12 indivíduos de hábito arbustivo, com até 2,5m de altura, numa altitude de aproximadamente 1540 metros (S 20° 04' 05.2'' / W 42° 05' 18.6''). As plantas foram acompanhadas entre novembro de 2013 e dezembro de 2014, ao longo de duas estações de floração.

BIOLOGIA FLORAL, SISTEMA REPRODUTIVO E MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE PÓLEN

O horário de início da antese foi inferido a partir da média dos horários, em intervalos de uma hora, observados em 40 botões florais marcados, e a longevidade floral foi determinada através do acompanhamento desses mesmos botões, até a queda da corola.

O sistema reprodutivo foi determinado a partir de experimentos de polinização controlada, onde cinco tratamentos foram empregados (1 – polinização cruzada manual, 2 – autopolinização manual, 3 – geitonogamia, 4 – autopolinização espontânea e 5 – controle) em 12 indivíduos (5 x 12 = 60 flores). Para os testes de polinização cruzada manual, autopolinização manual e geitonogamia os botões florais foram ensacados até o dia da abertura, quando então os sacos foram retirados, as flores polinizadas entre 15 e 17h, e ensacadas novamente. Para as autopolinizações espontâneas um botão foi simplesmente ensacado em cada indivíduo. Um botão por indivíduo foi marcado, mas não ensacado, permanecendo acessível aos insetos (controle).

Para as polinizações manuais o pólen foi extraído para uma lâmina, em seguida foi transferido para o estigma, até que toda a região estigmática ficasse coberta de grãos. Foram utilizadas 34 flores para as extrações, sendo que metade dessas flores tiveram o pólen extraído através de compressões das anteras com auxílio de uma pinça (mecanismo pneumático), e a outra metade utilizando uma escova de dente elétrica (Dontodent, mod. 4695, 2.4-3v, fabricada na Suíça, frequência: 50-60 Hz) com um alfinete acoplado à extremidade que vibra, simulando a visita de uma abelha vibratória. Nas polinizações cruzadas manuais, foram utilizados cinco indivíduos doadores de pólen para cada indivíduo receptor. A quantidade de frutos produzidos em condições naturais (flores controle) foi comparada com aquela de flores ensacadas.

Para verificar se traços do perfume floral, sem as pistas visuais (flores), seriam capazes de atrair as abelhas, flores de cada dia da antese (1º ao 4º), ligadas à planta, foram encerradas em sacos de poliacetato inodoro (um saco por flor, com uma repetição cada, somando oito flores). Após quatro horas os sacos foram abertos e as flores foram retiradas. Metade dos sacos foi amarrada à planta, e a outra metade (repetições) foi deixada a alguns metros de distância, em áreas por onde os insetos costumavam passar em suas rotas até a planta (adaptado de Kullenberg, 1956).

A receptividade estigmática foi testada em flores do 1º ao 4º dia (10 flores de cada dia, total de 40 flores) de antese através da reação com solução de permanganato de potássio 0,25% (Robinson, 1924). As flores foram submersas na solução por 10 minutos, lavadas em água

destilada, secadas em papel filtro e o estigma observado com auxílio de uma lupa. Foram considerados receptivos os estigmas que se apresentaram intensamente corados.

VISITANTES FLORAIS: FREQUÊNCIA E COMPORTAMENTO

Cinco períodos, cada um com quatro dias (25, 26, 28, 29/11/2013 – 10 a 13/01/2014 – 18 a 21/09/2014 – 9, 11, 12, 13/11/2014 – 12, 13, 15, 16/12/2014), de 7 às 15h, foram utilizados para observações e coletas de abelhas (total de 160h).

Foi determinada a frequência relativa das espécies de abelhas nas plantas (N = 1090 visitas às plantas). Para isso, foi contabilizada cada vez que uma abelha chegou à planta e executou pelo menos uma vibração. O percentual de cada espécie foi calculado a partir do total de visitas de abelhas às plantas em cada um dos cinco períodos. O mesmo foi feito para a soma da quantidade de visitas às plantas nos cinco períodos, e as abelhas divididas em classes de frequência de acordo com o percentual obtido: raras (de 0 a 5%), comuns (de 6 a 20%) e muito comuns (de 21 a 60%).

Foi avaliada a atratividade das flores ao longo da antese. Nesse sentido, foi determinada a frequência da espécie mais frequente (*Melipona bicolor*), em intervalos de uma hora, em flores do 1º ao 4º dia de antese. Para isso, duas flores em cada um destes estágios foram marcadas e acompanhadas ao longo de um dia (2 x 4 = 8). A contagem foi repetida, utilizando flores diferentes por mais quatro dias, totalizando 40 flores (8 x 5 = 40). Foi contabilizada uma visita quando a abelha pousou na flor e executou pelo menos uma vibração. As flores não marcadas, não foram retiradas para não interferir na atratividade da planta como um todo. As frequências médias de visitas foram comparadas com o intuito de verificar se há diferença entre a atratividade das flores nos diferentes dias de antese (Software PAST para Windows, versão 3.04).

O comportamento dos animais durante as visitas florais foi analisado a partir de observações diretas, filmagens e fotografias feitas com câmera digital. As plantas foram observadas durante três noites a fim de verificar a presença de abelhas noturnas. As abelhas coletadas foram depositadas na Coleção Entomológica da UFMG. Espécimes-testemunho de *Solanum luridifuscescens* foram depositados no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB 175529 e 175534).

Durante um dos períodos foram utilizadas armadilhas aromáticas, segundo metodologia adaptada de Campos et al. (1989), a fim de confirmar a presença de machos de Euglossini na área. A armadilha foi confeccionada a partir de garrafas PET de dois litros, com duas aberturas laterais em forma de funil. A isca de cheiro, um chumaço de algodão com a essência, foi colocada no

interior da garrafa e pendurada por um barbante na altura das aberturas. Foram utilizadas quatro tipos de essência: eucaliptol, eugenol, linalol e vanilina, cada uma em uma garrafa. As garrafas foram dependuradas próximo às plantas.

Resultados

BIOLOGIA FLORAL, SISTEMA REPRODUTIVO E MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE PÓLEN

As inflorescências de *Solanum luridifuscescens* são do tipo monocásio escorpioide (Figura 1 A, B) e produzem em média $15 \pm 4,4$ (média \pm desvio padrão) flores hermafroditas (N = 36 inflorescências, três por indivíduo). Até quatro flores podem estar abertas simultaneamente e, após a abertura da primeira, houve um intervalo de até três dias entre uma abertura e outra. As flores são actinomorfas e pentâmeras, as pétalas possuem ápice agudo e uma pequena projeção subapical (Figura 1C). A corola é estrelada, subcoriácea, purpúrea, as pétalas possuem a nervura central prateada e o bordo esbranquiçado (Figura 1C). As cinco anteras têm deiscência poricida, são coniventes, lanceoladas e o conectivo é desenvolvido e pode ser visto cobrindo toda a porção dorsal das tecas. A epiderme do conectivo é formada por papilas roxas, dando à superfície abaxial das anteras uma aparência verrucosa (Figura 1D). As flores não possuem cheiro característico perceptível por humanos.

A floração ocorreu entre setembro e fevereiro, a maior parte das flores (29 flores: 72,5% do total) iniciou a antese entre 6 e 8h, com os outros botões abrindo ao longo do dia. As flores fecharam-se todas as noites (Figura 2) e duraram em média $5 \pm 0,5$ dias. O fechamento e reabertura duraram de duas a três horas: entre 16 e 19h, e entre 4 e 7h, respectivamente. No início da antese as pétalas possuem lobos curtos e reflexos, que se alongam e tornam-se menos arqueados no decorrer do processo. Os poros das anteras se abriram durante as primeiras horas da antese, porém levaram mais tempo em dias frios, com a deiscência ocorrendo ao longo do dia.

Flores em todas as posições na inflorescência apresentam crescimento do estilete ao longo da antese (Figura 3), que se mantém retilíneo durante o processo. Entre o 5º e 6º dia as pétalas murcham e caem juntamente com o androceu, o estilete ainda permanece ligado ao ovário por um ou dois dias antes de secar e cair. No decorrer da antese a corola, que no início possui a cor roxa escura, vai tornando-se esbranquiçada.



Figura 1: *Solanum luridifuscens* Bitter na RPPN Mata do Sossego, Simonésia, MG. A – Ramo fértil; B – Inflorescência com botões florais; C – Flor. D – Detalhe das papilas roxas na superfície abaxial das anteras.

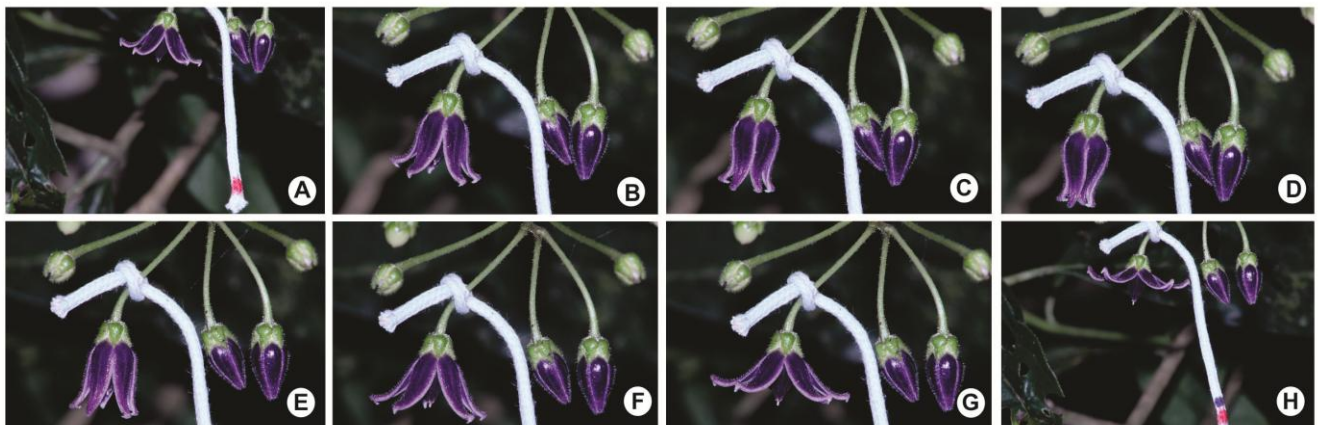


Figura 2: Fechamento e abertura de uma flor de *Solanum luridifuscescens*. A a D – Fechamento na noite do 1º dia de antese. Horário das fotos: 16:49, 17:23, 17:57 e 18:30, respectivamente. E a H – Abertura na manhã do 2º dia de antese. Horário das fotos: 5:01, 5:50, 6:30 e 7:00, respectivamente.

Os experimentos de polinização indicaram que a espécie é autoincompatível, produzindo frutos somente após polinização cruzada e visitas de abelhas (Tabela 1). Tanto o mecanismo do fole quanto o mecanismo vibratório funcionaram artificialmente em todas as extrações de pólen utilizadas nas polinizações manuais. As compressões manuais, assim como as vibrações aplicadas às anteras provocaram a liberação do pólen.

As compressões foram efetuadas de modo que a pinça comprimiu a região mediana de todo o cone de anteras, causando a saída de pólen das cinco anteras. As vibrações provocaram a liberação de pólen através dos poros de apenas uma antera por vez, aquela em contato com a ponta do alfinete. As compressões causaram a liberação explosiva do pólen, enquanto que nas vibrações os grãos de pólen saíram de maneira contínua, sendo expelidos a uma distância menor em relação às compressões. Para efetuar a coleta com maior eficiência, nos dois métodos o cone de anteras foi sendo girado em torno do próprio eixo durante o processo de extração.

Tanto os sacos de poliacetato amarrados à planta quanto aqueles mantidos nas rotas das abelhas não atraíram nenhum inseto. Em relação à receptividade estigmática, somente os estigmas de flores abertas há poucas horas (3 flores: 7,5% do total) não se apresentaram intensamente corados. Sendo assim, constatou-se que ao longo do 1º dia de antese a superfície estigmática torna-se receptiva, mantendo-se deste modo pelo menos até o 4º dia.

Tabela 1: Experimentos de polinização realizados em *Solanum luridifuscescens* entre janeiro e dezembro de 2014.

Tratamentos	Nº de flores	Nº de frutos	%
Autopolinização espontânea	12	0	0
Autopolinização manual	12	0	0
Flores acessíveis a polinizadores (controle)	12	1	8
Polinização cruzada manual	12	4	33
Geitonogamia	12	0	0

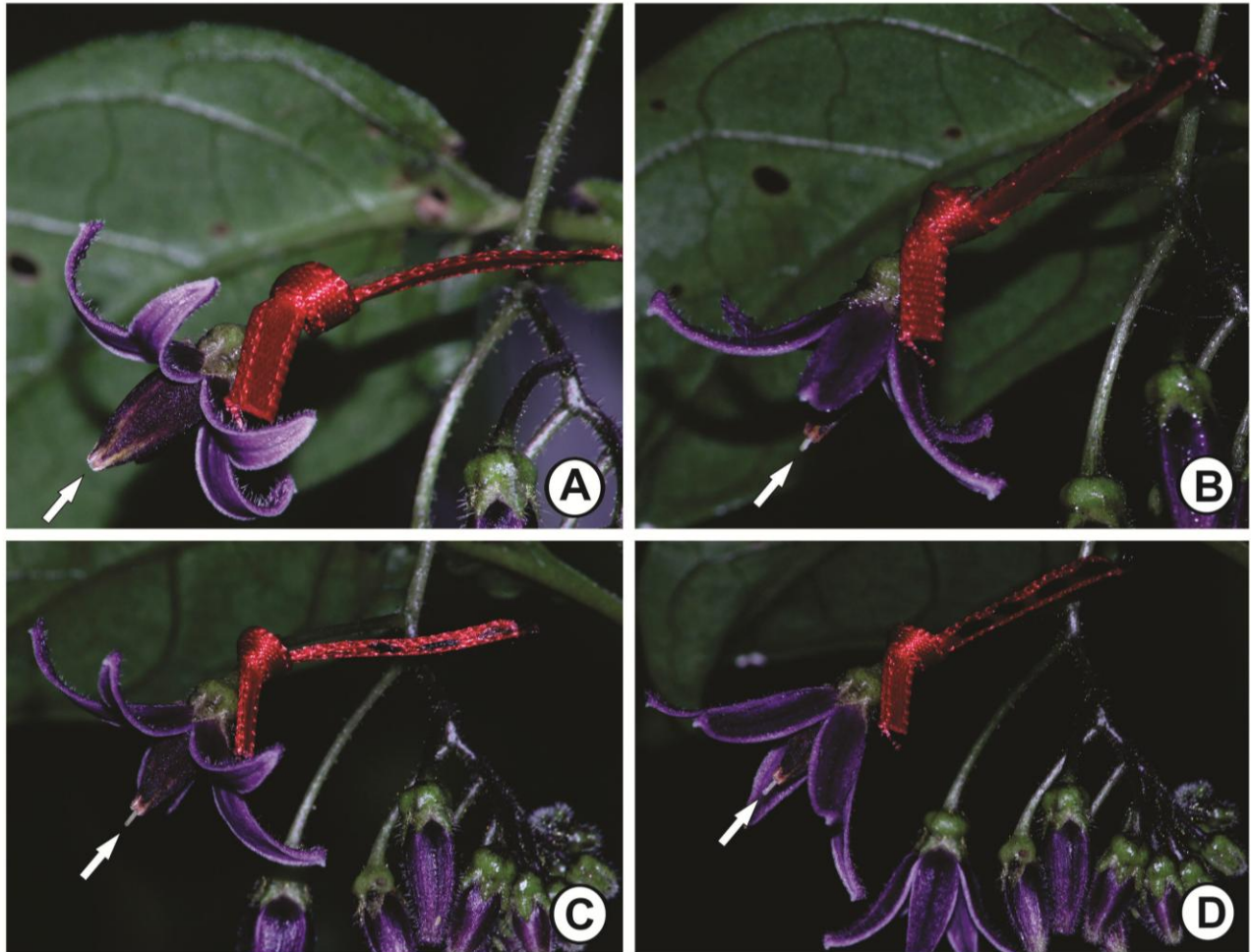


Figura 3: Crescimento do estilete em *Solanum luridifuscescens*. Flor no 1° (A), 2° (B), 3°(C) e 4° (D) dia de antese. As setas brancas apontam para o estigma.

VISITANTES FLORAIS: FREQUÊNCIA E COMPORTAMENTO

Fêmeas de seis espécies de abelhas visitaram as flores e vibraram as anteras para remoção de pólen (Figura 4 A, B, C): *Augochlora* sp., *Augochloropsis* sp. (Halictidae, Augochlorini), *Bombus brasiliensis* (Apidae, Bombini), *Eucerini* sp., *Melipona bicolor* e *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini). As visitas florais tiveram início a partir das 7h, coincidindo com o horário do início da antese e de reabertura das flores que se fecharam na noite anterior.

Alguns Meliponini esporádicos introduziram a probóscide nos poros das anteras para retirar pólen (Figura 4D). Em uma única ocasião essa mesma espécie foi vista arrancando pedaços das

anteras com as mandíbulas para acessar o pólen no interior dos lóculos (Figura 4E). Pequenos coleópteros foram encontrados se alimentando das pétalas (Figura 4F).

A arquitetura das pequenas flores roxas, com o estilete no centro do cone de anteras, resulta numa curta distância entre o estigma e os poros das anteras, favorecendo o contato do visitante floral com a superfície estigmática. A conação das anteras mantém a região apical dessas estruturas intimamente unida, e o comprimento máximo do estilete é cerca da metade dessa medida em abelhas como *Augochloropsis*. Dessa forma, mesmo forrageiras pequenas conseguem se agarrar às cinco anteras com seus pares de pernas e, portanto, vibrar todas elas simultaneamente.

Todas as abelhas que coletaram pólen por vibração pousaram de ponta-cabeça, perpendicular ao eixo floral, e curvaram seu corpo sobre o ápice do cone, conseqüentemente sobre o estigma. Os insetos agarraram-se ao ápice do cone utilizando os três pares de pernas, encolhendo-se sobre a superfície estigmática, e vibraram as flores, nesse momento a parte ventral do corpo das fêmeas toca o estigma. Entre as vibrações foi comum as abelhas girarem o corpo sobre o cone de anteras. Em flores mais maduras o estilete longo toca o corpo das forrageiras com maior frequência, servindo de suporte tanto aos movimentos de vibração, como aos de organização e armazenamento de pólen executados por elas, que apoiam partes do ventre e das pernas, ou mesmo se agarram à estrutura.

Durante esses movimentos o estigma toca a parte ventral das forrageiras, assim como as partes internas de suas pernas, onde o pólen aderiu após as vibrações. O comportamento descrito acima foi comum às cinco espécies de polinizadores, exceto três delas: *Augochlora* sp., que teve uma frequência muito baixa e não pôde ter seu comportamento descrito, *Bombus brasiliensis* e *Eucerini* sp., conforme descrito abaixo.

Para acumular os grãos de pólen aderidos ao corpo, *Augochloropsis* sp. segurou o ápice do cone de anteras apenas com o par de pernas posterior. Com o auxílio das pernas medianas e anteriores a abelha acumulou o pólen em direção ao abdômen, continuando em posição perpendicular ao eixo floral. Em seguida, o animal segurou-se apenas com as pernas anteriores, dependurando-se, assumindo uma posição quase que paralela ao eixo floral (Figura 4A). Nessa posição, utilizando as pernas medianas e posteriores, a abelha finalizou a limpeza do pólen, transferindo-o para as escopas, na parte interna das tíbias posteriores. Algumas vezes *Augochloropsis* sp. deixou a flor e pousou numa folha, onde terminou a limpeza e o armazenamento dos grãos de pólen.

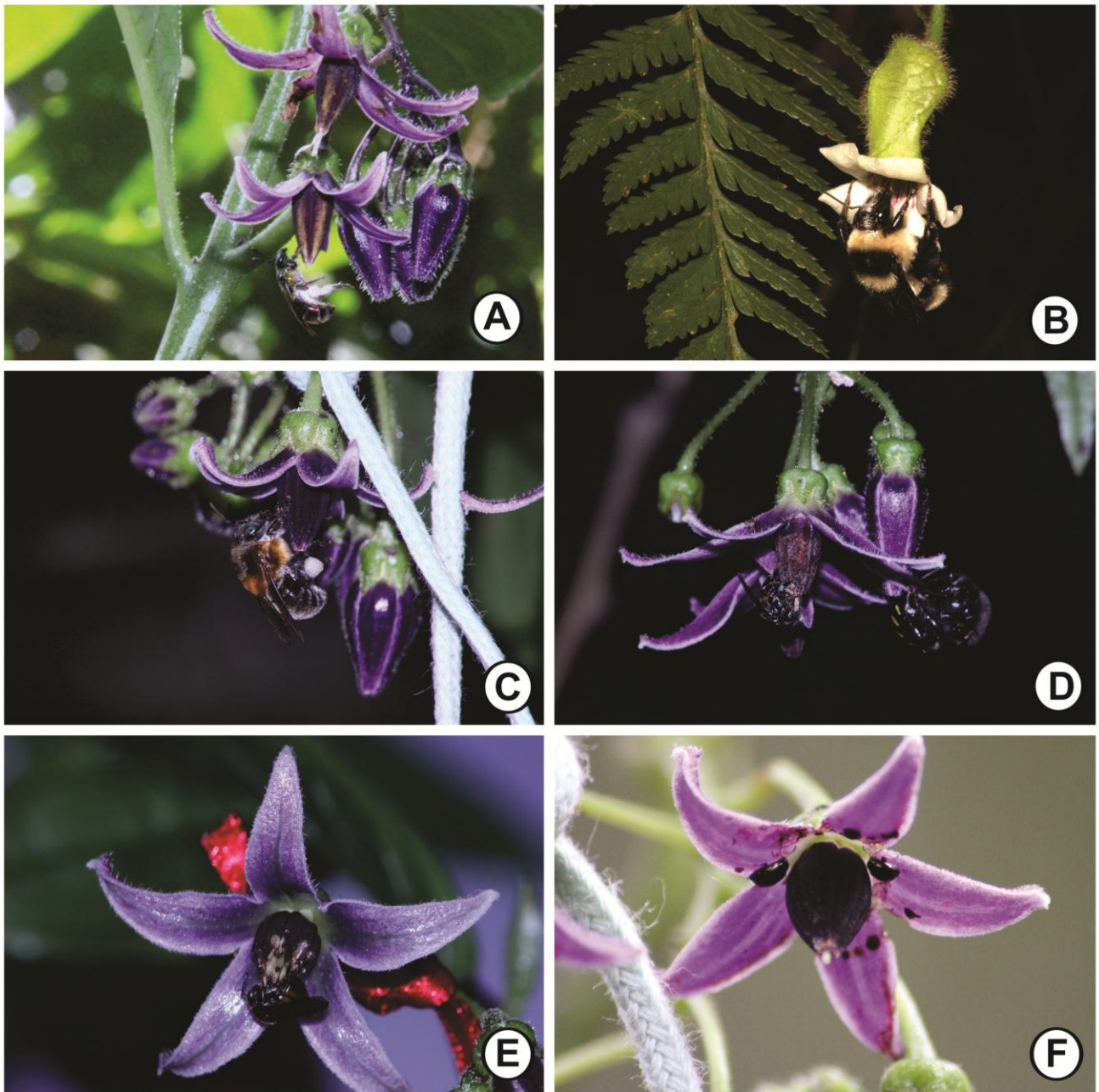


Figura 4: Visitantes florais em *Solanum luridifuscescens*. A – *Augochloropsis* sp. B – *Bombus brasiliensis*. C – *Melipona bicolor*. D – “Meliponini ordenhador” à esquerda, e *Melipona quadrifasciata* à direita. E – “Meliponini cortador” destruindo as anteras. F – Coleópteros se alimentando das pétalas. Abelhas ordenhadoras e cortadoras segundo Thorp (2000) e Wille (1963).

Operárias das duas espécies de *Melipona* comportaram-se de maneira semelhante, dependurando-se no ápice do cone de anteras com as pernas anteriores, enquanto recolhiam e guardavam pólen com os outros pares de pernas (Figura 4C). Contudo, foi comum *Melipona bicolor* pairar em frente à flor de onde coletou pólen, ficando com os três pares de pernas livres para os movimentos de limpeza e armazenamento.

Bombus brasiliensis e fêmeas de *Eucerini* sp. exibiram conduta distinta das outras espécies, mas semelhante entre si. As duas espécies se dependuraram às flores com as duas, ou com apenas uma das pernas anteriores, neste caso deixando as outras cinco pernas livres para reunir os grãos de pólen e armazená-los. A quantidade média de flores visitadas em cada vôo de forrageamento, em um indivíduo da planta, ao longo de um dia de observação foi (N = 10 vôos / sp.): *Melipona bicolor*: $16 \pm 8,4$; *Melipona quadrifasciata*: $16 \pm 8,3$; *Eucerini* sp.: $12 \pm 6,7$ e *Augochloropsis* sp.: $3 \pm 1,3$. *Augochlora* sp. e *Bombus brasiliensis* tiveram baixa frequência, não atingiram a marca de 10 vôos de forrageamento em um indivíduo da planta durante um dia.

Após o 1º dia de antese as flores apresentaram marcas necróticas na porção apical das anteras (Figura 5). Essas marcas são causadas pelas abelhas, que danificaram as papilas da epiderme das anteras enquanto se agarram a essas estruturas. Os insetos (exceto o Meliponini cortador) não foram vistos mordendo as anteras.

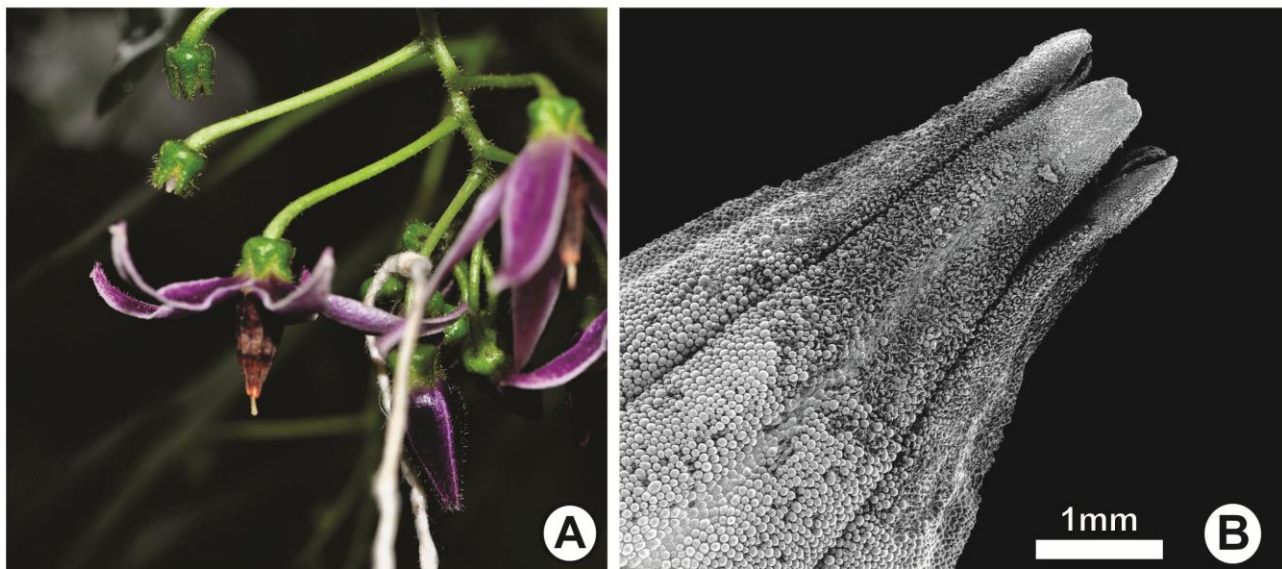


Figura 5: Injúrias causadas pelas abelhas em *Solanum luridifuscescens*. A – Necrose das anteras. B – Papilas danificadas na porção apical das anteras (Microscopia Eletrônica de Varredura).

A análise da frequência de abelhas revelou períodos de ausência de algumas espécies e presença de outras (Figura 6). Durante o mês de dezembro de 2014 verificou-se a maior riqueza de espécies, sendo o único com a presença de abelhas de todas as espécies amostradas nas flores de *S. luridifuscescens*. Em setembro de 2014 somente abelhas de *Melipona quadrifasciata* foram amostradas. Ao total (Figura 7), as operárias de *Melipona bicolor* estiveram em 58,7% das visitas às plantas, seguidas de *Melipona quadrifasciata* em 20,1% das observações. Abelhas de *Augochloropsis* sp. estiveram presente em 14,0% das observações, ao passo que *Augochlora* sp. só apareceu em 0,2% das vezes. A espécie *Eucerini* sp. ocorreu em 4,3% das estadas nas plantas, e *Bombus brasiliensis* fez-se presente em 2,7% das visitas às plantas. *Melipona bicolor* foi considerada muito comum, *Augochloropsis* sp. e *Melipona quadrifasciata* espécies comuns, e *Augochlora* sp., *Bombus brasiliensis* e *Eucerini* sp. foram classificadas como abelhas raras (Figura 7).

Flores mais jovens, no 1º e 2º dia de antese, receberam uma maior quantidade de visitas pelas operárias de *Melipona bicolor* quando comparadas com aquelas mais antigas, no 3º e 4º dia de antese (Figura 8). No entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas, tanto quando se comparou os quatro grupos (1º, 2º, 3º, 4º dia – One-way ANOVA: $p = 0,60$), quanto para a comparação entre os dois grupos (1º, 2º e 3º, 4º dia – One-way ANOVA: $p = 0,30$). Antes de executar as análises os dados foram transformados através da raiz quadrada, resultando em uma distribuição normal (Shapiro-Wilk: $p = 0,83$).

As abelhas tiveram dois picos de visitas ao longo do dia, o primeiro entre 9 e 11h, e o segundo entre 13 e 15h (Figura 9), diminuindo gradativamente até o fim da tarde. Em linhas gerais, esses dados se aplicam às outras espécies.

Machos de três espécies de Euglossini foram capturados nas armadilhas com voláteis florais puros (eucaliptol, eugenol e vanilina): *Eufriesea violacea* (3), *Eulaema nigrita* (6) e *Eulaema singulata* (2). Um macho de *Eulaema nigrita* visitou as flores de *Solanum luridifuscescens*. A abelha pousou em algumas flores e inseriu a cabeça no curto tubo floral, alguns indivíduos de *Apis mellifera* exibiram comportamento semelhante. Não foi observada liberação de pólen durante essas visitas, e nenhum visitante noturno foi visto nas plantas.

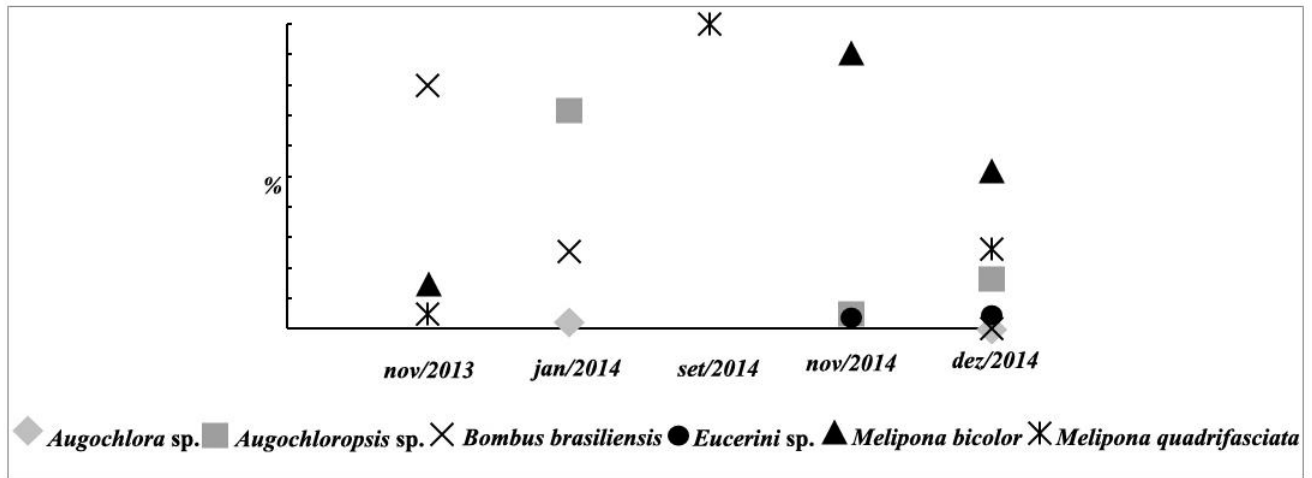


Figura 6: Frequência relativa dos polinizadores em *Solanum luridifuscescens* por período (N = 1090 visitas às plantas).

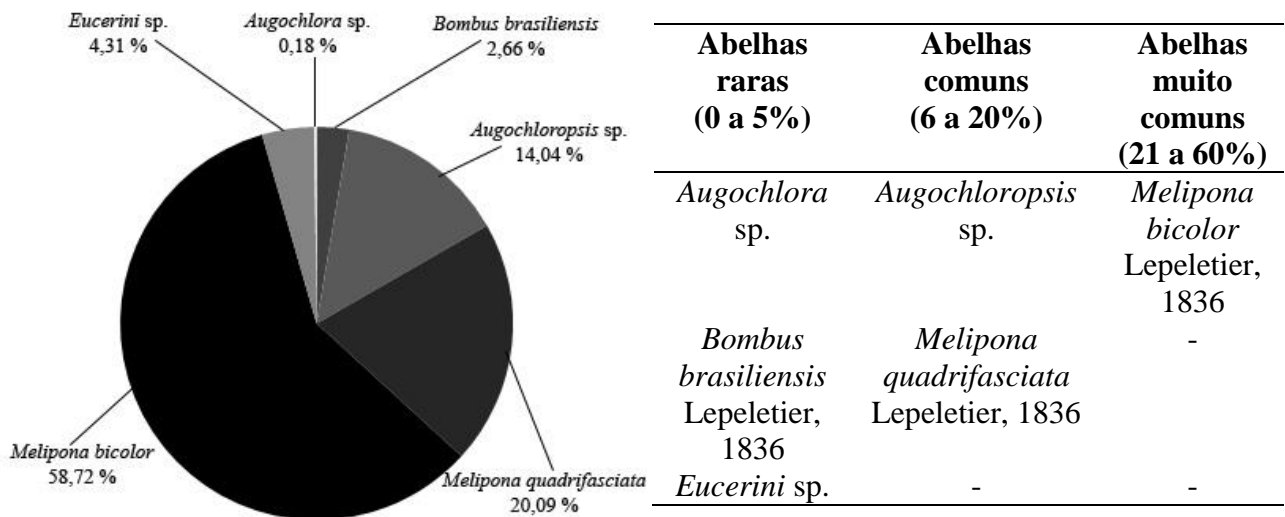


Figura 7: Frequência relativa total e classes de frequência dos polinizadores em *Solanum luridifuscescens* (N = 1090 visitas às plantas).

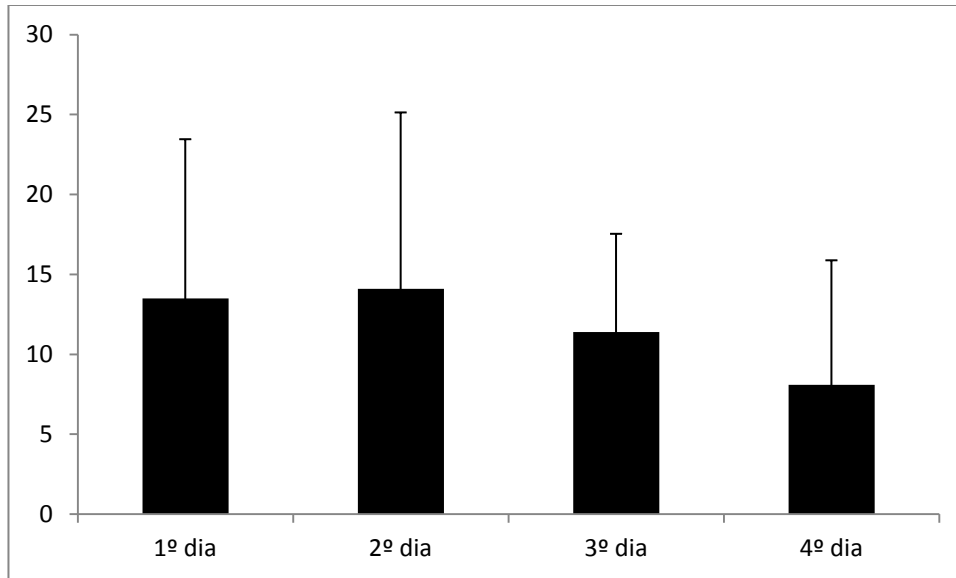


Figura 8: Atratividade de flores de *Solanum luridifuscescens* do 1º ao 4º dia de antese. As barras representam as médias de frequência (com desvio padrão) de *Melipona bicolor* em um dia de visitas. Duas flores em cada dia da antese (1º ao 4º), durante cinco dias: 40 flores.

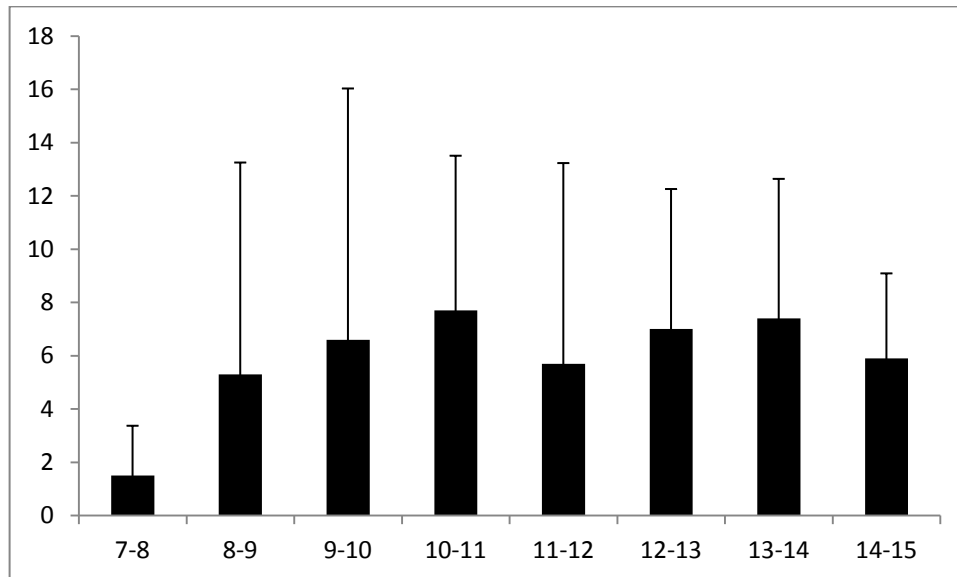


Figura 9: Frequência (com desvio padrão) de visitas florais de operárias de *Melipona bicolor* em flores de *Solanum luridifuscescens* por hora ao longo de um dia (N = 5 dias; 40 flores; 10 de cada dia - 1º ao 4º - de antese).

Discussão

Nas flores de *Solanum luridifuscescens* uma nuvem de pólen é liberada após leve pressão mecânica do cone das anteras, semelhante ao descrito em outras duas espécies da seção *Cyphomandropsis*, *Solanum glaucophyllum* e *S. stuckertii* (Passareli & Cocucci, 2006a), e nas espécies da seção *Pachyphylla* polinizadas por machos de Euglossini (Soares, et al., 1989; Gracie, 1993; Sazima et al., 1993). Embora as flores da espécie investigada possuam morfologia diferenciada e o mecanismo do fole ter funcionado artificialmente, na natureza registramos exclusivamente expulsão de pólen através de vibração das flores por abelhas fêmeas, como usual em flores de *Solanum* (Buchmann, 1983). Além de fêmeas, observamos apenas visitas de um macho de *Eulaema nigrita* (Euglossini) nas flores de *S. luridifuscescens* que, no entanto, não liberaram pólen, uma vez que o animal não comprimiu ou vibrou as anteras durante as visitas florais. Dessa forma não verificamos, no local de estudo, polinização das flores por machos de Euglossini em busca de voláteis florais, como reportado para espécies aparentadas e, portanto, a polinização por fole continua restrita a seção *Pachyphylla*.

No local de estudo, operárias de *Melipona bicolor* e *Melipona quadrifasciata* (Meliponini) foram os visitantes mais frequentes, enquanto *Bombus brasiliensis* (Bombini) apareceu em apenas uma pequena parte das observações, diferente do que têm sido observado em espécies de *Solanum*, nas quais abelhas grandes (Bombini e Xylocopini), capazes de vibrar flores, são geralmente os visitantes naturais mais frequentes (Buchmann, 1983; Buchmann & Cane, 1989; Bezerra & Machado, 2003; Dupont & Olensen, 2006; Quesada-Aguilar et al., 2008; Sekara & Bieniasz, 2008; Burkart et al., 2014).

Fêmeas de *Bombus atratus* foram os visitantes mais comuns em *S. glaucophyllum* e *S. stuckertii*, embora indivíduos de *Augochloropsis* (Halictidae) também tenham vibrado as flores para coletar pólen (Passarelli & Bruzzone, 2004). Em *S. luridifuscescens*, a longa estação de floração possibilitou a atuação de diferentes polinizadores, dependendo da época do ano, uma vez que a composição de espécies de abelhas não foi a mesma ao longo dos períodos de observação, havendo períodos onde determinadas espécies ocorreram e outras não, semelhante ao observado por Bezerra & Machado (2003) em *Solanum stramonifolium*.

As operárias de *Melipona bicolor* visitaram mais flores jovens, embora as diferenças na frequência de visitas não tenham sido significativas em relação às flores mais antigas. Segundo Gori (1983), polinizadores são claramente capazes de reconhecer mudanças florais e visitar apenas flores

viáveis ou não polinizadas. Espécies de *Bombus* se valem de diferenças morfológicas relacionadas à idade para selecionar flores com recompensa polínica antes de pousar (Pellmyr, 1988). Abelhas conseguem avaliar a disponibilidade de pólen enquanto vibram flores de *Solanum* (Buchmann & Cane, 1989; Burkart et al., 2014). Nesse sentido, alterações morfológicas como corola esbranquiçada com lobos longos, estilete longo e anteras necrosadas são indícios de que as flores de *S. luridifuscescens* são mais antigas, e supostamente já receberam muitas visitas, tendo conseqüentemente menor disponibilidade polínica. Essas alterações podem ser percebidas pelas abelhas, o que justificaria a tendência das visitas em relação às flores jovens. Considerando que fêmeas de *M. bicolor* também só consigam estimar a disponibilidade polínica de fato, após vibrarem as flores, seria esperado que elas continuassem a visitar flores antigas, explicando assim o fato de as diferenças não serem significativas. Entretanto, não avaliamos se essas alterações na morfologia floral são realmente percebidas pelas forrageiras, ou se elas são capazes de mensurar a disponibilidade de pólen nas flores, hipóteses que podem ser testadas juntamente com a quantificação polínica nas flores de diferentes idades.

Os resultados mostraram que *S. luridifuscescens* é uma espécie auto-incompatível e, portanto, depende dos polinizadores para assegurar a ocorrência da polinização cruzada. Outras cinco espécies de *Cyphomandropsis* foram incluídas em estudos de sistemas reprodutivos, sendo que três delas apresentam auto-incompatibilidade do tipo gametofítica e as outras duas são auto-compatíveis (Bohs, 2001). A maior produção de frutos e sementes resultante de polinizações manuais do que em condições naturais revela limitação de polinização. Fatores ecológicos contemporâneos como introdução de plantas exóticas altamente atrativas, fragmentação de habitat, redução no tamanho da população, perda dos polinizadores nativos e alterações climáticas podem causar esse tipo de perturbação (Ashman et al., 2004). Como a população em estudo está situada quase no topo da montanha, em área de altitude elevada, é recorrente o fenômeno de chuva orográfica, ocorrendo neblina e pancadas de chuva durante a estação chuvosa, que coincide com o período de floração. Nessas condições verificou-se uma frequência muito baixa de polinizadores, chegando a ter apenas três visitas a um indivíduo da planta durante o dia. Dessa forma, acreditamos que condições desse tipo durante os períodos de experimentação podem ter contribuído para a baixa taxa de formação de frutos nas flores controle, acessíveis aos polinizadores. Abordagens empíricas permanecem problemáticas devido a muitas razões estatísticas e biológicas. Ashmann et al. (2004) apontam alguns destes problemas, salientamos somente um deles: a qualidade do pólen difere entre

a polinização cruzada manual e a natural, já que polinizações cruzadas manuais utilizam puramente o pólen de outros indivíduos, ao passo que vetores naturais deixam uma mistura de pólen da própria planta (e/ou flor) com o pólen de outra(s) planta(s), o que pode ter contribuído para uma menor taxa de frutificação encontrada nas flores controle em *Solanum luridifuscescens*, uma vez que os polinizadores mais frequentes (*Melipona bicolor* e *M. quadrifasciata*) visitaram muitas flores antes de deixar a planta, o que aumenta a quantidade de pólen geitonogâmico para a polinização, que não produz frutos. Não foi possível acompanhar vôos entre plantas co-específicas devido à distância entre os indivíduos e declividade do terreno.

As iscas de cheiro atraíram machos de Euglossini independentemente da presença de flores. Considerando que um perfume específico ou uma mistura de odores atrai machos de Euglossini independentemente da fonte de emissão (ex. papel filtro, espécies de plantas não aparentadas), sendo não apenas a recompensa, mas também o principal atrativo (Simpson & Neff, 1983), acreditamos que o perfume não é o atrativo preponderante para os polinizadores de *S. luridifuscescens*, uma vez que os sacos de poliacetato contendo traços do perfume floral não atraíram nenhuma abelha. Sendo assim, os atributos visuais seriam o principal chamariz nas flores da espécie. Passarelli & Bruzzone (2004) consideraram sinais visuais, como cores contrastantes e regiões de absorção de luz ultra-violeta (UV), como os principais atrativos em flores de *S. glaucophyllum* e *S. stuckertii*. Como as flores de *S. luridifuscescens* não possuem cores contrastantes, é possível que um padrão de absorção de luz UV esteja presente.

Assim como as demais espécies de Cyphomandropsis, *S. luridifuscescens* é hermafrodita e monomórfica na forma floral (Bohs, 2001). Contudo, devido ao alongamento do estilete, verifica-se uma heteromorfia temporal nas flores da espécie, sendo que estiletos maiores favorecem o contato do estigma com os locais de deposição de pólen nas abelhas. Em flores andromonóicas de *Solanum carolinense*, Quesada-Aguilar et al. (2008) observaram que estiletos longos reduzem a remoção de pólen das flores, pois dificultam que as anteras sejam firmemente agarradas por *Bombus impatiens*, mas otimizam a polinização cruzada por permitir o contato do estigma com o pólen no corpo do animal, por outro lado, estiletos curtos não retiram pólen desses polinizadores, mas não interferem na remoção de pólen das anteras pelas abelhas. Em contraste, Nunes-Silva (2011) demonstrou que forrageiras de *Melipona fasciculata* retiram uma maior quantidade de pólen das flores de *Solanum melongena* (berinjela) com estilete longo, em relação aquelas com estilete curto, embora Sekada & Bieniasz (2008) observaram que polinização cruzada por *Bombus terrestris* é favorecida nas flores

de estilete longo. Dessa forma, o crescimento estilar pode representar uma estratégia de *S. luridifuscescens* para diminuir a taxa de geitonogamia, com as flores mais jovens, de estilete curto, atuando principalmente como doadoras de pólen, e as flores mais antigas, de estilete longo, atuando preferencialmente como receptoras de pólen. Essa hipótese é apoiada pelo fato de que nas primeiras horas da antese a superfície estigmática ainda não está pronta para receber os grãos de pólen, tornando-se receptiva ao longo do primeiro dia.

Solanum luridifuscescens exibe características de um *Solanum* típico como flores sem néctar e anteras poricidas que liberam pólen seco através de vibrações, assim como condições semelhantes às de espécies com a síndrome de perfume encontradas na seção *Pachyphylla*: anteras flexíveis, cobertas por papilas roxas, que não contrastam com a cor da corola. Considerando que foram encontradas evidências de atividade secretora nas anteras da população em estudo (capítulo 2), é possível que a espécie esteja numa condição intermediária entre um *Solanum* típico e as espécies de *Pachyphylla* com a síndrome de perfume. Nesse sentido, o oferecimento da secreção como recompensa não seria evolutivamente vantajoso para a planta, a menos que estivesse vinculado a algum mecanismo que maximizasse seu sucesso reprodutivo. Assim, a aquisição do princípio pneumático poderia ser o primeiro passo, abrindo a possibilidade para a deposição de pólen em visitantes que não vibram flores (Passarelli & Cocucci, 2006a). Considerando que as flores de *S. luridifuscescens* são, ao menos, esporadicamente visitadas por machos de Euglossini, e que abelhas desse grupo já foram vistas raspando partes de flores sem perfume (Ackerman, 1983), a secreção produzida nas anteras poderia evoluir para uma recompensa floral, conquistando mais uma guilda de abelhas como polinizadores ou provocando a mudança do mecanismo de polinização por vibração (Buchmann, 1983) para o mecanismo de polinização por fole (Sazima et al., 1993). A conquista do mecanismo pneumático pode ter ocorrido mais de uma vez no clado *Cyphomandra*, tendo em vista o não monofiletismo das seções que o compõem (Bohs, 2007).

Este trabalho mostrou alguns dos principais aspectos envolvidos na biologia floral e polinização em *S. luridifuscescens*, espécie que ocorre no sudeste e sul do Brasil e, sendo assim, constitui o primeiro registro de biologia da polinização para espécies da seção *Cyphomandropsis* ocorrentes no Brasil. É importante documentar de forma mais detalhada a estrutura da antera, os perfumes florais, a ocorrência do mecanismo pneumático e os visitantes florais em outras populações de *S. luridifuscescens*, assim como nas outras espécies de *Cyphomandropsis*, entre elas destacamos *Solanum confusum*, uma espécie que possui características da síndrome de perfume

(Passarelli & Bruzzone, 2004), e *Solanum fusiforme*, que aparece na filogenia como possível grupo irmão de todas as outras espécies do clado *Cyphomandra* (Bohs, 2007). Conhecer essas espécies nesses quesitos é fundamental para compreender a evolução do mecanismo de polinização que, proporcionou ao clado neotropical, *Cyphomandra*, a deriva do mecanismo de polinização por abelhas fêmeas que vibram flores para coletar pólen, para o pneumático, onde machos de *Euglossini* coletam perfumes florais.

Referências

- Ackerman, J. 1983. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. *Biol. J. Linn. Soc.*, 20: 301-314.
- Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L.M. 2013. Modeling monthly mean air temperature for Brazil. *Theor. Appl. Climatol.*, 113: 407-427.
- Ashman, T.-L.; Knight, T.M.; Steets, J.A.; Amarasekare, P.; Burd, M.; Campbell, D.R.; Dudash, M.R.; Johnston, M.O.; Mazer, S.J.; Mitchell, R.J.; Morgan, M.T.; Wilson, W.G. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85(9): 2408-2421.
- Bezerra, E.L.S.; Machado, I.C. 2003. Biologia floral e sistema de polinização em *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanaceae) em remanescente de mata atlântica, Pernambuco. *Acta bot. bras.*, 17(2): 247-257.
- Bohs, L. 1995. Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*, 44: 583-587.
- Bohs, L. 2001. A revision of *Solanum* section *Cyphomandropsis* (Solanaceae). *Syst. Bot. Monogr.*, 61: 1-85.
- Bohs, L. 2007. Phylogeny of the *Cyphomandra* clade of the genus *Solanum* (Solanaceae) based on ITS sequence data. *Taxon*, 56: 1012-1026.
- Buchmann, S.L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*: 73-114.
- Buchmann, S.L. & Cane, J.H. 1989. Bees assess pollen returns while sonicating *Solanum* flowers. *Oecologia*, 81: 289-294.

- Burkart, A.; Schlindwein, C.; Lunau, K. 2014. Assessment of pollen reward and pollen availability in *Solanum stramonifolium* and *Solanum paniculatum* for buzz-pollinating carpenter bees. *Plant Biology*, 16: 503-507.
- Campos, L.A.O.; Silveira, F.A.; Oliveira, M.O.; Abrantes, C.V.M; Morato, E.F.; Melo, G.A.R. 1989. Utilização de armadilhas para a captura de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apoidea). *Rev. Bras. Zool.*, 6(4): 621-626.
- Cocucci, A.A. 1996. El osmóforo de *Cyphomandra* (Solanaceae): estudio con microscopio electrónico de barrido. *Darwiniana*, 34(1-4): 145-150.
- Cocucci, A.A. 1999. Evolutionary radiation in neotropical Solanaceae. In: Nee, M. et al. (ed.) *Solanaceae IV*. Royal Botanical Garden, Kew, London: 9-22.
- Dupont, Y.L. & Olensen, J.M. 2006. Andromonoecy and buzz pollination in *Solanum* species (Solanaceae) endemic to the Canary Islands. *An. Jard. Bot. Madr.*, 63(1): 63-66.
- Friis, E.M., Chaloner, W.G.; Crane, P.R. 1987. The origins of angiosperms and their biological consequences. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fundação Biodiversitas. 2013. RPPN Mata do Sossego, MG. Disponível em <http://www.biodiversitas.org.br/sossego/>. Acesso em: 2 mai. 2013.
- Gori, D.F. 1983. Post-pollination phenomena and adaptive floral changes. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*: 31-45.
- Gracie, C. 1993. Pollination of *Cyphomandra endopogon* var. *endopogon* (Solanaceae) by *Eufriesea* spp. (Euglossini) in French Guiana. *Brittonia*, 45(1): 39-46.
- Gübitz, T.; Hoballah, M.E.; Dell'Olivo, A.; Kuhlemeier, C. 2009. *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In: Gerats, T. & Strommer, J. (eds.) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Springer, Business Media, Nijmegen: 29-49.
- Knapp, S. 2010. On "various contrivances": pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365: 449-460.
- Kullenberg, B. 1956. On the scents and colours of *Ophrys* flowers and their specific pollinators among the Aculeate Hymenoptera. *Sven. Bot. Tidskr.*, 50: 25-46.

- Nunes-Silva, P. 2011. Capacidade vibratória e polinização nas abelhas do gênero *Melipona* (Apidae, Meliponini) e *Bombus* (Apidae, Bombini). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo: 56-85.
- Passarelli, L.; Bruzzone, L. 2004. Significance of floral colour and scent in three *Solanum* sect. *Cyphomandropsis* species (Solanaceae) with different floral rewards. *Aust. J. Bot.*, 52: 659–667.
- Passarelli, L.; Cocucci, A.A. 2006a. Dynamics of pollen release in relation to anther-wall structure among species of *Solanum* (Solanaceae). *Aust. J. Bot.*, 54: 1-7.
- Passarelli, L.; Cocucci, A.A. 2006b. Morphological and functional aspects of anthers from species of *Solanum* sect. *Cyphomandropsis*. *Phytomorphology*, 56(1-2): 47-54.
- Pellmyr, O. 1988. Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae) Assess pollen availability in *Anemonopsis macrophylla* (Ranunculaceae) through floral shape. *Ann. Ent. Soc. Am.*, 81(5): 792-797.
- Proctor, M.; Yeo, P.; Lack, A. 1996. The natural history of pollination. Harper Collins, London.
- Quesada-Aguilar, A.; Kalisz, S.; Ashman, T.-L. 2008. Flower morphology and pollinator dynamics in *Solanum carolinense* (Solanaceae): implications for the evolution of andromonoecy. *Am. J. Bot.*, 95(8): 974-984.
- Robinson, I. 1924. Die farbungsreaktion der narbe, stigmatochromie, als morphobiologische Blütenuntersuchungsmethode. *Sitzungsberichten Akademischer Wissenschaft Wien, Mathematics, Abteilung*, 133: 180-213.
- Sazima, M.; Vogel, S.; Cocucci, A.; Hauser, G. 1993. The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae): pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Plant. Syst. Evol.*, 187: 51–88.
- Sekara, A. & Bieniasz, M. 2008. Pollination, fertilization and fruit formation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Agrobot.*, 61(1): 107-113.
- Sendtner, O. 1845. De *Cyphomandra*, novo Solanacearum genere tropicae Americae. *Flora*, 28: 161–176.
- Simpson, B.B. & Neff, J.L. 1983. Evolution and diversity of floral rewards. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*: 142-159.

- Soares, A.A.; Campos, O. de; Vieira, M.F.; Melo, G.R. de. 1989. Relações entre *Euglossa* (*Euglossella*) *mandibularis* Friese 1899 (Hymen. Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). *Ciênc. Cult.*, 41: 903-905.
- Stehmann, J.R.; Freitas, L.B.; Lorenz-Lemke, A.P.; Semir, J. 2009. *Petunia*. In: Gerats, T. & Strommer, J. (eds) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. Springer, Business Media, Nijmegen: 1-28.
- Thorp, R.W. 2000. The collection of pollen by bees. *Plant Syst. Evol.* 222: 211-223.
- Veloso, H.P.; Rangel-Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro.
- Vogel, S. 1978. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: The pollination of flowers by insects. *Linnean Soc. Symp.*, 6: 89-96.
- Weese, T. & Bohs, L. 2007. A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Syst. Bot.*, 32(2): 445-463.
- Wille, A. 1963. Behavioural adaptations of bees for pollen collecting from *Cassia* flowers. *Rev. Biol. Trop.*, 11: 205-210.

Aspectos microestruturais de papilas florais apontam a presença de osmóforos em *Solanum luridifuscescens* Bitter (Clado Cyphomandra – Solanaceae)

Bruno Fernandes Falcão¹, Clemens Peter Schlindwein¹, João Renato Stehmann¹

1 – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Caixa Postal 486 – Belo Horizonte, MG, Brasil.

Resumo: Osmóforos são estruturas epidérmicas secretoras de perfumes florais envolvidos na atração de polinizadores, mas não são comuns no androceu de Solanaceae. Poucos trabalhos exploraram a estrutura dessas glândulas na família, encontradas em plantas cujos principais polinizadores são machos de abelhas da tribo Euglossini que coletam as essências florais sem aplicar vibrações às flores, diferente da grande maioria das espécies do gênero *Solanum*. As espécies onde o pólen é o principal recurso geralmente possuem anteras rígidas, amarelas e brilhantes, que contrastam com a cor da corola, ao passo que naquelas onde o perfume é oferecido as anteras são estruturas flexíveis e inconspícuas, com cores não contrastantes com o perianto. *Solanum luridifuscescens* é uma espécie filogeneticamente relacionada aquelas com a síndrome de perfume e, embora seja polinizada por abelhas fêmeas que coletam pólen por vibração, possui anteras flexíveis, com a face abaxial coberta por papilas roxas não contrastantes com a cor da corola, semelhante aos osmóforos das espécies aparentadas. Desta forma, realizamos um estudo micromorfológico nas anteras de uma população da espécie com o propósito de determinar a ocorrência de osmóforo. O tecido parenquimático possui células vacuoladas com amplos espaços intercelulares. Rápido consumo de amido, característica marcante em tecidos secretores de perfume, foi observado no material analisado. As papilas epidérmicas do conectivo cobrem a face abaxial das anteras, e possuem características comumente encontradas em tecidos osmogênicos: citoplasma denso e rico em organelas, núcleo conspícuo, numerosas mitocôndrias, e gotas lipídicas no citoplasma durante a antese. Pequenas vesículas se fundem no interior dos numerosos plastídeos até formar uma grande estrutura globular. Diversas cisternas de retículo endoplasmático liso são encontradas junto aos plastídeos e à membrana plasmática. A liberação parece ocorrer por processos écrinos, mas o sítio exato de transporte para o exterior não foi localizado. Uma substância amorfa, de elétrons-densidade moderada e textura heterogênea foi encontrada junto à cutícula. Embora os testes com Sudan tenham sido positivos e as evidências ultraestruturais indiquem que as células secretam substâncias de natureza lipídica, possivelmente terpenos, futuras análises ainda são necessárias para se confirmar a natureza química dos compostos produzidos. A evolução do conectivo em um tecido secretor pode ter ocorrido mais de uma vez no clado Cyphomandra, tendo em vista o não monofiletismo das seções que o compõem.

Palavras-chave: Cyphomandropsis, Mata-Atlântica, polinização, secreção, microestrutura.

Abstract: Osmophores are epidermal structures secreting floral perfumes involved in attracting pollinators, but are not common in the androecium of the Solanaceae. Few studies have explored the structure of these glands in the family, found in plants whose the main pollinators are males of bees belonging to Euglossini tribe which collect the floral essence without applying vibration in the flowers, unlike most species of the genus *Solanum*. Species where the pollen is the main resource usually have rigid, bright and yellow anthers, contrasting with the corolla's color, whereas those where the perfume is offered are flexible and inconspicuous structures, with colors that don't

contrasts with the perianth. *Solanum luridifuscescens* is a species phylogenetically related to those with the perfume syndrome and although it's pollinated by female of bees that collect pollen by vibration, it has flexible anthers, with the abaxial face covered with purple papillae that don't contrast with the corolla's color, similarly to osmophores of related species. Thus, we conducted a micromorphologic study in the anthers of a population of this species in order to determine the occurrence of osmophores. The parenchymatic tissue has vacuolated cells with ample intercellular spaces. Quick starch consumption, a typical feature in perfume secreting tissues, was observed in the analyzed material. The epidermal papillae of the connective covering the anther's abaxial surface have characteristics commonly found in osmogenic tissues: dense cytoplasm rich in organelles, conspicuous nucleus, numerous mitochondria and lipid droplets in the cytoplasm during anthesis. Small vesicles fuse inside the numerous plastids to form a large globular structure. Several smooth endoplasmic reticulum cisternae are located next to plastids and the plasma membrane. Mitochondria are abundant and dictyosomes appear frequently. Lipid droplets are seen in the cytoplasm during anthesis. The release appears to occur by eccrine processes, but the exact site of transport to the exterior was not found. An amorphous substance with moderate electron density and heterogeneous texture was found in the cuticle. Although the tests with Sudan have been positive, and ultrastructural evidence indicates that the cells secrete substances of lipidic nature, possibly terpenes, further analysis is still required to confirm the nature of the chemical compounds produced. The evolution of connective in a secretory tissue may have occurred more than once in *Cyphomandra* clade, in view of the non monophyletic sections that compose it. **Keywords:** *Cyphomandropsis*, Atlantic Forest, pollination, secretion, microstructure.

Introdução

Osmóforos são estruturas epidérmicas glandulares formadas por células estruturalmente distintas, cuja função é secretar compostos voláteis envolvidos na atração de polinizadores (Vogel, 1963). Essas estruturas secretoras não são comuns no androceu das Solanaceae, mas, quando presentes, estão associadas à produção de perfumes florais (Soares et al., 1989; Gracie, 1993; Sazima et al., 1993). A presença de conectivos espessados foi o caráter morfológico utilizado por Sendtner (1845) para definir a seção *Pachyphylla*, que antes compreendia o gênero *Cyphomandra* L., agora incluso em *Solanum* por Bohs (1995). Regiões glandulares funcionando como osmóforos florais, caracterizados pela superfície papilosa, de formato abaulado, foram documentadas no conectivo de algumas espécies da seção. Os perfumes liberados atraem machos de abelhas da tribo Euglossini (Apidae) que efetuam a polinização enquanto raspam a superfície da glândula para coletar as essências (Soares et al., 1989; Gracie, 1993; Sazima et al., 1993). Ao contrário das flores de um “*Solanum* típico” (sensu Vogel, 1978), que possuem anteras rígidas amarelas brilhantes, contrastando com a cor da corola (síndrome de pólen), as flores envolvidas nesse tipo de interação possuem anteras flexíveis roxas, verdes ou esbranquiçadas, que não contrastam com a cor da corola.

Dessa forma, os perfumes florais atuam não só como principal atrativo, mas também como um recurso coletado pelas abelhas, constituindo a síndrome de perfume.

Trabalhos que abordam a estrutura de osmóforos em Solanaceae são escassos, considerando que a família compreende cerca de 100 gêneros e 2500 espécies (D'Arcy et al., 1991; Hunziker, 2001). Contudo, esses estudos levaram a descobertas importantes e continuam sendo referência nas pesquisas em osmóforos, perfumes florais e biologia da polinização. Somente três espécies de *Solanum* seção *Pachyphylla* tiveram os osmóforos investigados do ponto de vista estrutural (Sazima et al., 1993; Cocucci, 1996). Embora esses trabalhos tenham mostrado alguns aspectos anatômicos dos osmóforos por meio da microscopia de luz, e observações a respeito do armazenamento e possíveis modos de liberação da secreção tenham sido feitas por meio da microscopia eletrônica de varredura, a estrutura intracelular dessas glândulas permanece desconhecida.

Em termos filogenéticos, a seção *Pachyphylla* tem sido considerada morfológica e citogeneticamente relacionada à seção *Cyphomandropsis* (Bohs, 2001, 2004). Estudos baseados em dados moleculares, contudo, reconheceram que as seções não são monofiléticas, mas que formam um clado, bem suportado denominado *Cyphomandra* (Bohs, 2007). As espécies da seção *Cyphomandropsis* estudadas até o momento, diferentemente daquelas da seção *Pachyphylla*, possuem flores que oferecem pólen como recompensa, e são polinizadas por abelhas fêmeas que vibram flores para coletar pólen (Buchmann, 1983; Passarelli & Bruzzone, 2004). Contudo, algumas espécies desse grupo, como *S. fallax* (Bohs, 2001) e *S. luridifuscescens*, possuem anteras morfológicamente semelhantes aquelas de *Pachyphylla*, contendo conectivos papilosos, o que sugere tratar-se de estruturas secretoras. Em outras espécies, como *S. confusum* e *S. stuckertii*, apesar de não possuírem epiderme papilosa, as anteras são delgadas e flexíveis, que expelem pólen quando comprimidas (Passarelli & Cocucci, 2006a,b), semelhante ao que ocorre nos membros de *Pachyphylla*.

Neste trabalho, investigamos detalhes da morfologia e ultraestrutura do androceu em *S. luridifuscescens*, pertencente à seção *Cyphomandropsis*, que ocorre no sudeste e sul do Brasil, Argentina e Paraguai. Embora as flores da espécie não possuam perfume característico perceptível por humanos, realizamos um estudo micromorfológico com o objetivo de evidenciar se as papilas que revestem as anteras constituem osmóforos ou não. Conectivos com caracteres glandulares foram apontados em duas espécies da seção, *S. confusum* e *S. stuckertii* (Cocucci, 1996), contudo a

estrutura intracelular não foi elucidada. Amostras florais foram obtidas de uma população na RPPN Mata do Sossego, Simonésia, MG, Brasil.

Metodologia

MATERIAL VEGETAL

As amostras obtidas são provenientes de indivíduos de *Solanum luridifuscescens* que crescem em uma clareira natural na floresta. A vegetação é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual Montana (Veloso et al., 1991) e o clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwb, típico das montanhas do sudeste do Brasil (Alvares et al., 2013). A temperatura e pluviosidade oscilam de 13 a 17°C, e 10 a 17mm, nos dias mais frios e secos (abril a setembro). Nos dias mais quentes e úmidos (outubro a março) esses valores variam de 22 a 26°C, e 103 a 283mm, respectivamente (Fundação Biodiversitas, 2013). O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de acordo com a portaria nº 20, de 16 de fevereiro de 1998, reconhece a reserva como representativa de ecossistemas da Mata Atlântica, fauna típica da região, com espécies ameaçadas de extinção, várias nascentes e relevante beleza cênica. A população fica próxima ao mirante da reserva, dispersada ao redor da Trilha das Hortências, consiste em 12 indivíduos de hábito arbustivo, com até 2,5m de altura, numa altitude de aproximadamente 1540 metros (S 20° 04' 05.2'' / W 42° 05' 18.6''). Espécime-testemunho foi depositado no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB 175529).

MICROSCOPIA DE LUZ

Para estudar as características anatômicas das anteras em microscopia de luz, amostras coletadas em três estágios (botão floral pré-antese, flor no 1º dia de antese e flor no 2º dia de antese) foram coletadas e processadas para estudos ao microscópio de luz. As amostras foram fixadas em mistura de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica, e incluídas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Leica). Seções transversais e longitudinais (5µm) foram obtidas em micrótomo e coradas com Azul de Toluidina 0.05%, pH 4.3 (O'Brien et al., 1964). Os cortes obtidos foram submetidos a testes histoquímicos convencionais utilizando solução de Lugol para detectar amido (Johansen, 1940) e Sudan Red B para lipídios (Brundett et al., 1991).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para observação ao microscópio eletrônico de varredura, três amostras (botão com 50% do tamanho final, botão pré-antese, flor de 2º dia de antese) foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) por 24h, desidratadas em série etílica, submetidas à secagem ao ponto crítico e metalizadas com ca. de 10nm de ouro (Robards, 1978). As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) a 12-20 kV, com captura digital de imagens.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para microscopia eletrônica de transmissão amostras de tecidos das anteras obtidas de três estágios (botão com 50% do tamanho final, botão pré-antese e flor do 2º dia de antese) foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24h, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2), e processadas utilizando metodologia padronizada (Roland, 1978) para observação em microscópio eletrônico de transmissão. Seções ultra-finas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit (Philips / FEI Company, Eindhoven, Netherlands) a 60 kV.

Resultados

O conectivo é desenvolvido na porção dorsal das tecas, cobrindo toda a face abaxial das anteras, que possui epiderme unisseriada, formada por células unidas lateralmente na base e livres na porção apical, conferindo uma aparência papilosa (Figura 1A). Essas células apresentam protoplasto mais denso que o observado nas células do tecido parenquimático subjacente, e paredes pecto-celulósicas (Figura 1B). As anteras são unidas por cinco a dez células da epiderme de anteras adjacentes (Figura 1C). As porções laterais e adaxiais das tecas são delgadas e formadas por epiderme unisseriada, constituída por células menores, justapostas e pavimentosas (Figura 1C). O tecido parenquimático é homogêneo, formado por células com pouco conteúdo citoplasmático, grandes vacúolos e grandes espaços intercelulares (Figura 1C). Há apenas um feixe vascular anficrival no centro, sem ramificações e com floema desenvolvido (Figura 1D). Não há acúmulo considerável de amido, somente em algumas células ao redor do feixe vascular, nos botões pré-antese (Figura 1E) e nas flores do 1º dia de antese (Figura 1F). Em flores do 2º dia de antese o amido é praticamente ausente (Figura 1G). Os testes com Sudan tiveram resultado positivo, evidenciando inclusões lipídicas nas células parenquimáticas e epidérmicas.

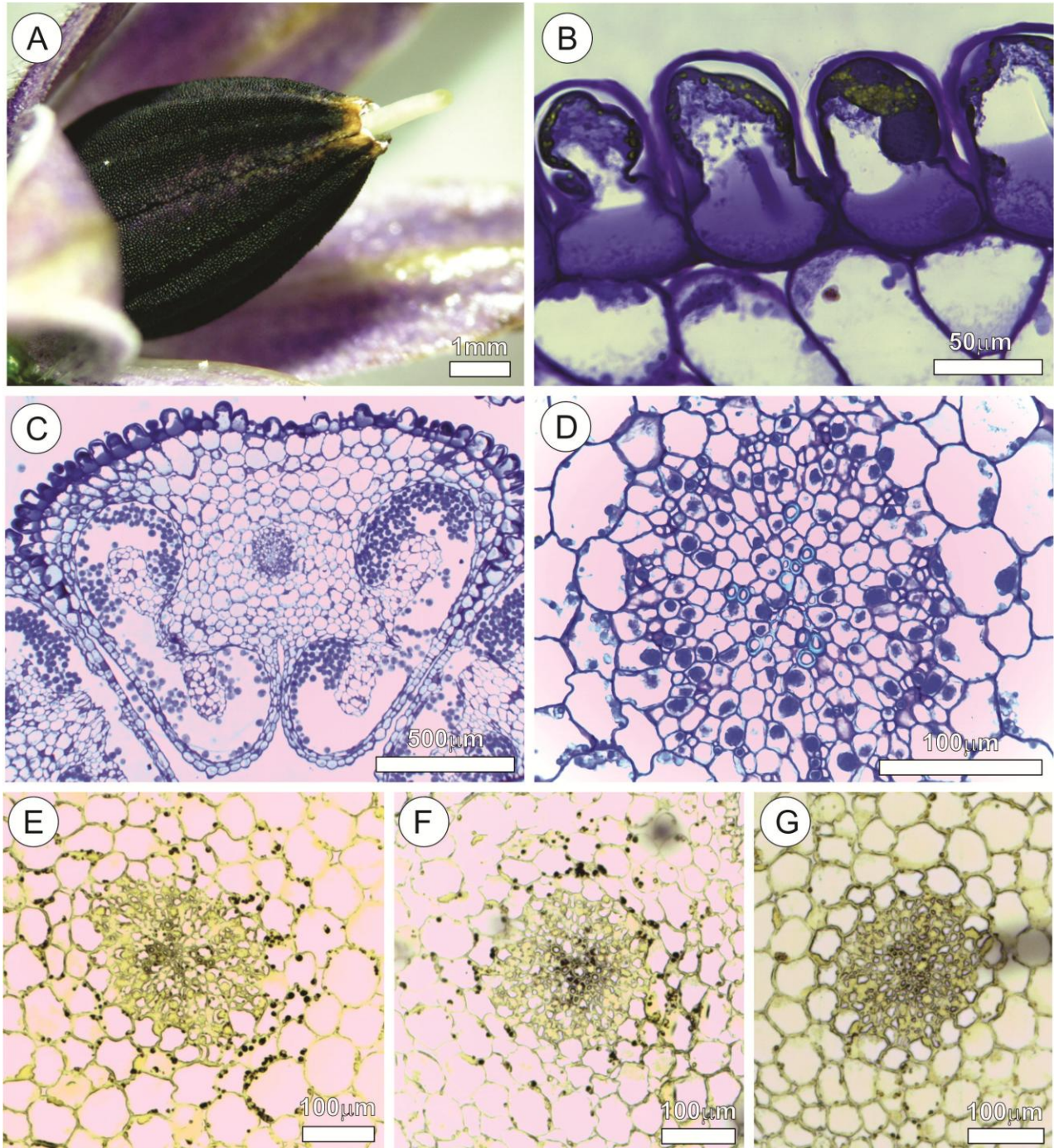


Figura 1: Anteras de *Solanum luridifuscens* (microscopia de luz). A – Detalhe da superfície papilosa na face abaxial das anteras. B – Célula epidérmica papilosa com citoplasma denso, núcleo conspícuo e conteúdo concentrado na porção apical. C – Corte transversal da antera mostrando a epiderme, parênquima com amplos espaços e faces laterais e adaxiais delgadas. D – Detalhe do feixe vascular. E, F, G – Teste com Lugol mostrando grânulos de amido corados de preto no botão floral pré-antese, flor no 1º dia de antese e flor no 2º dia de antese, respectivamente.

De forma geral, a superfície abaxial das anteras é uniforme, as células epidérmicas são papilosas, com ápice convexo, cobertas por cutícula estriada, sem poros ou qualquer sinal de ruptura, estômatos são ausentes (Figura 2A, B, C). Como apresentado no capítulo 1, as papilas da porção apical das anteras são danificadas pelas abelhas durante as visitas florais, quando os insetos se agarram a essa região para executar as vibrações e os movimentos de organização e armazenamento de pólen (Figura 2D). Na face abaxial das anteras as células epidérmicas possuem características micromorfológicas que sugerem seu envolvimento em atividade secretora e, portanto, as descrições que se seguem serão centradas nesse tipo celular, já que nas outras regiões as células são vacuoladas, indicando baixa atividade metabólica.

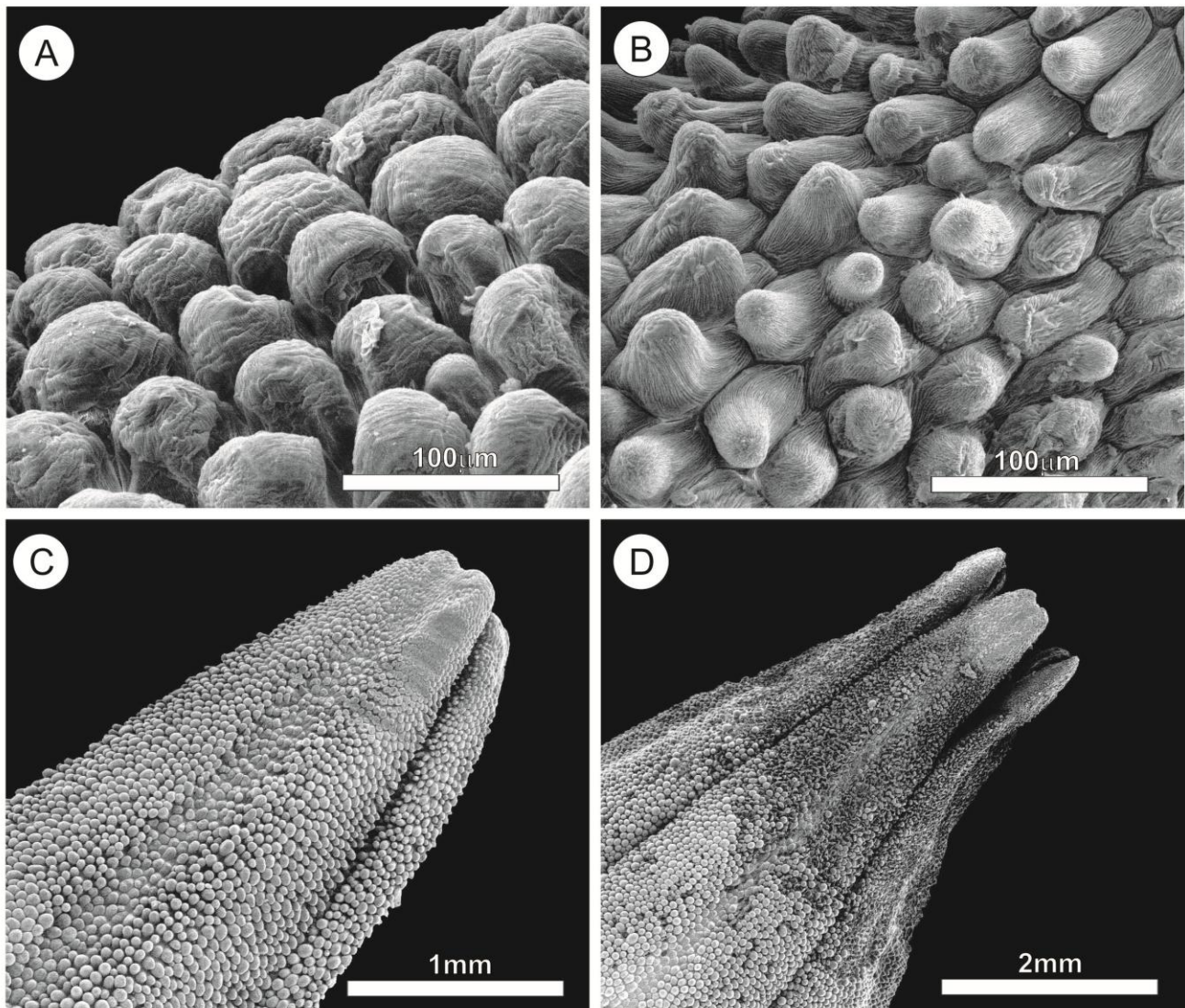


Figura 2: Superfície abaxial das anteras de *Solanum luridifuscescens* em diferentes estágios (microscopia eletrônica de varredura). A e B – Botão floral com 50% do tamanho final mostrando a cutícula estriada, sem poros ou estômatos. C – Porção apical no botão pré-antese com papilas íntegras. D – Flor no 2º dia de antese com papilas da porção apical do cone danificadas pelas abelhas.

Na região secretora as células epidérmicas possuem cutícula firmemente aderida na face periclinal externa (Figura 3A), o citoplasma é denso, rico em organelas (Figura 3). Vesículas de elétrons de densidade moderada se fundem no estroma dos plastídeos (Figura 3B, C). Os plastídeos, possuem forma alongada na fase pré-antese, contêm plastoglóbulos elétrons densos e sistema de membrana pouco desenvolvido e não possuem amido (Figura 3D, E). Cisternas de retículo endoplasmático liso aparecem junto aos plastídeos (Figura 3B, C) e à membrana plasmática (Figura 3D, E). Estruturas desconhecidas, de formato incomum, são vistas na matriz citoplasmática do botão pré-antese (Figura 3B). Mitocôndrias com cristas desenvolvidas, variando de esféricas a tubulares são abundantes (Figura 3D). As células se conectam entre si e com o tecido parenquimático através de plasmodesmos (Figura 3F).

O núcleo é maior do que o das células parenquimáticas, sendo uma estrutura conspícua e globular, com manchas de heterocromatina elétrons densas evidentes, vacúolos de várias formas e tamanhos também estão presentes (Figura 4A). Durante a antese os plastídeos assumem contorno circular após a formação de uma grande vesícula com aspecto rugoso (Figura 4B). Alguns ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso são encontrados em menor quantidade (Figura 4C), dictiossomas são vistos com frequência (Figuras 4D). Pequenas gotas lipídicas também são vistas durante a antese (Figura 4D).

Material particulado é visto no espaço periplasmático (Figura 3E) e uma substância amorfa de textura heterogênea aparece junto à cutícula (Figura 4E, F). Processos semelhantes ocorrem nas paredes e cutículas de outras células, sugerindo liberação para o meio externo (Figura 4G, H). Partículas osmiofílicas, estão associadas aos estágios mais avançados do processo e são vistas na parede celular subjacente (Figura 4G, H).

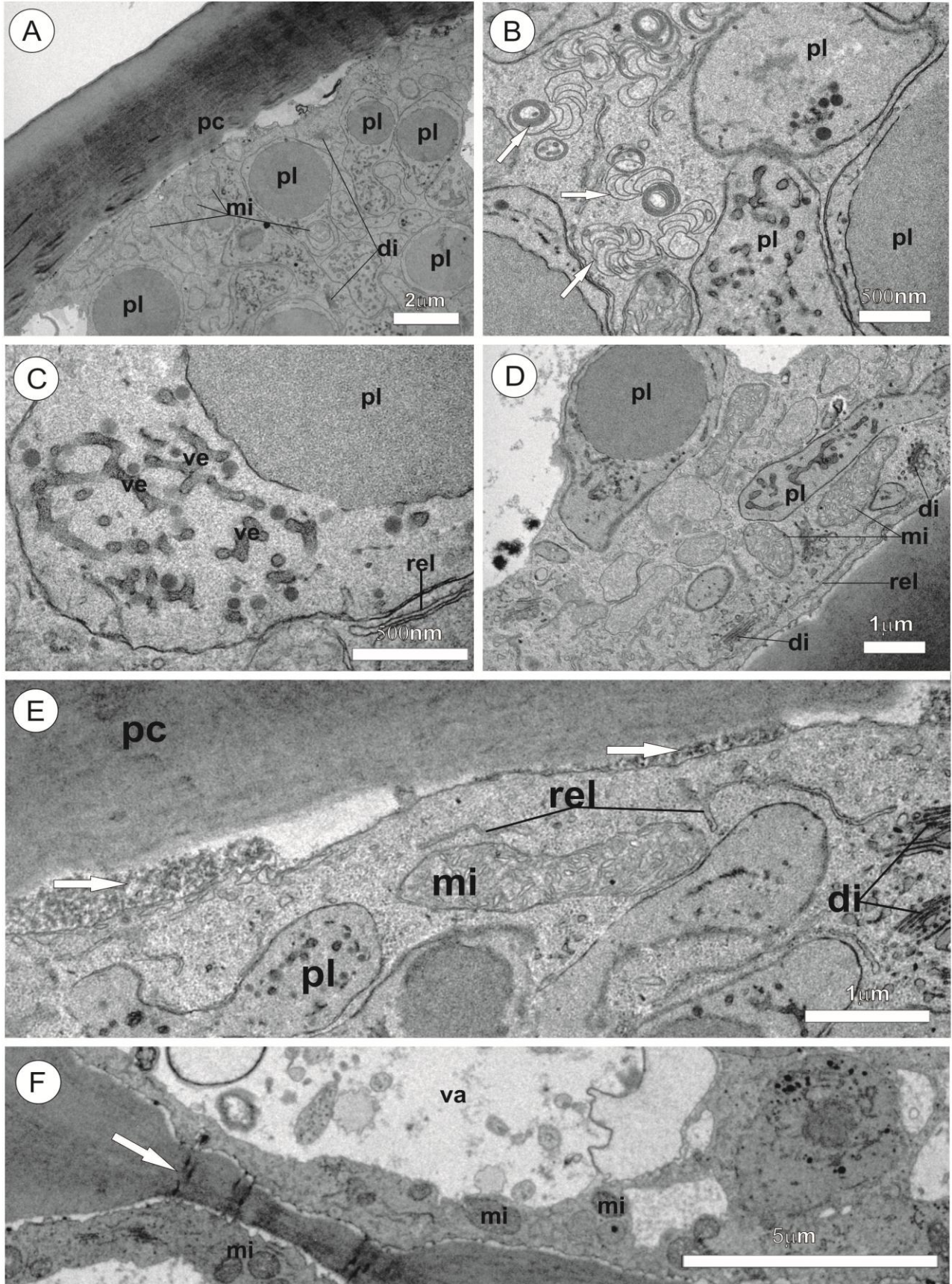


Figura 3: Células epidérmicas da superfície abaxial das anteras de *Solanum luridifuscescens*. Botão floral pré-antese (microscopia eletrônica de transmissão). A – Visão geral mostrando parede, cutícula e numerosos plastídeos secretores. B – Vesículas se fundindo no interior dos plastídeos. Estruturas desconhecidas, de formato incomum, são vistas na matriz citoplasmática (setas). C – Detalhe da fusão de vesículas. Uma cisterna de retículo endoplasmático liso aparece junto ao plastídeo. D – Plastídeo alongado em estágio inicial e outro globoso em estágio avançado. Mitocôndrias e dictiossomos também são vistos. Cisternas de retículo endoplasmático liso aparecem junto à membrana plasmática. E – Material particulado é visto no espaço periplasmático (setas) e pode representar resquícios de secreção. F – Plasmodesmos conectando uma célula epidérmica a uma célula parenquimática (seta). As células parenquimáticas são altamente vacuoladas. (*di* dictiossomo, *mi* mitocôndria, *pc* parede celular, *pl* plastídeo, *rel* retículo endoplasmático liso, *va* vacúolo, *ve* vesícula)

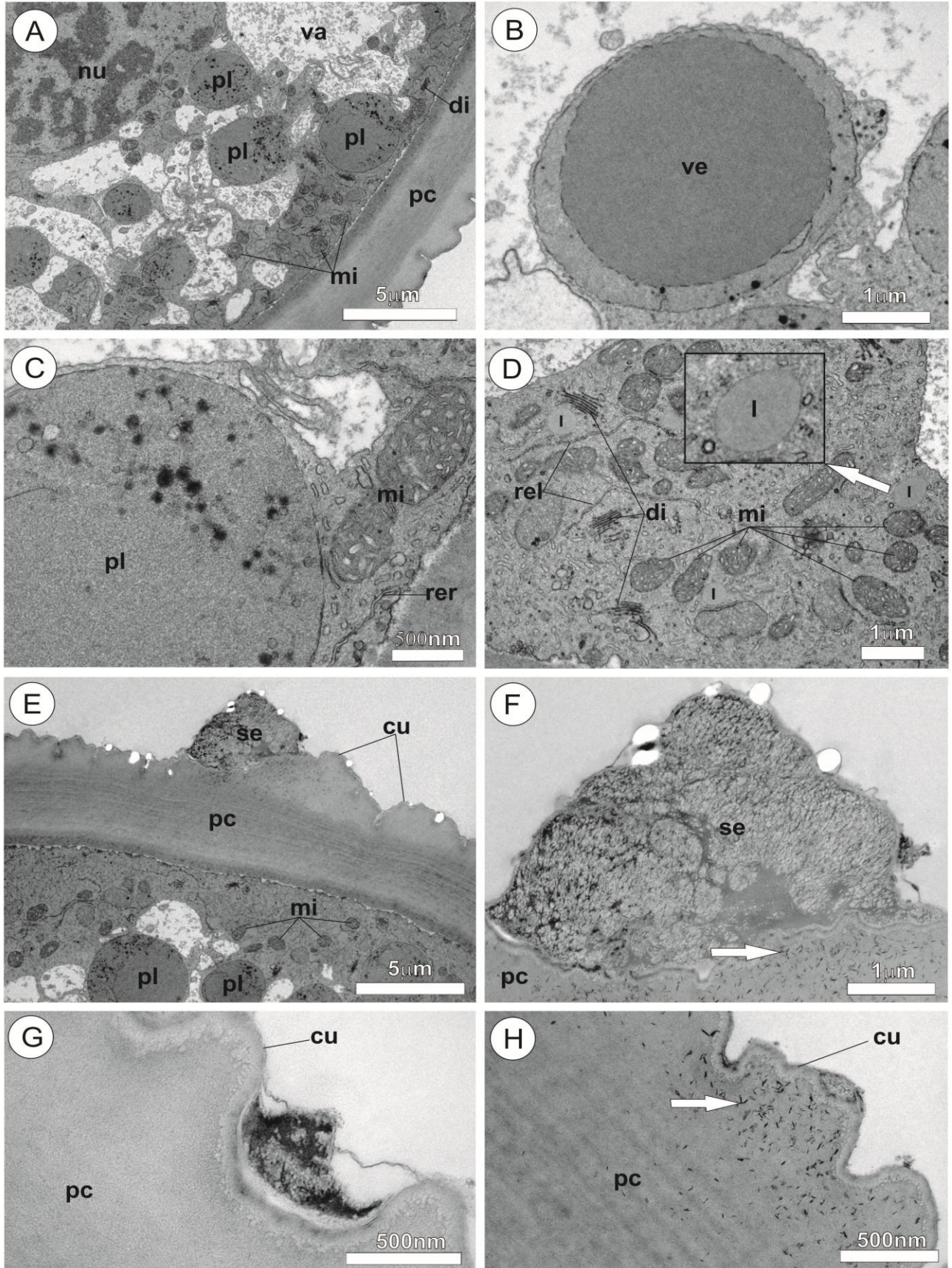


Figura 4: Células epidérmicas da superfície abaxial das anteras de *Solanum luridifuscescens*. Flor no 2º dia de antese (microscopia eletrônica de transmissão). A – Visão geral mostrando o núcleo globóide conspícuo com manchas elétron-densas de heterocromatina e citoplasma rico em organelas. B – Plastídeo globóide após acumular secreção numa grande vesícula. C – Plastídeo com plastoglóbulos evidentes, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. D – Porção do citoplasma contendo uma variedade de organelas e algumas gotas lipídicas. E, F – Substância amorfa de textura heterogênea aparece junto à cutícula, e partículas osmiofílicas (seta) são vistas logo abaixo. G, H – Processos semelhantes na parede celular e cutícula podem ser estágios diferentes da liberação. Partículas osmiofílicas (setas) são vistas na parede celular em H. (*cu* cutícula, *di* dictiossomo, *l* gota lipídica, *mi* mitocôndria, *nu* núcleo, *pc* parede celular, *pl* plastídeo, *rel* retículo endoplasmático liso, *rer* retículo endoplasmático rugoso, *se* secreção, *va* vacúolo, *ve* vesícula)

Discussão

A análise ultraestrutural das anteras de *S. luridifuscescens* indica que as células epidérmicas da face abaxial são secretoras. Além de ser evidente a grande quantidade de secreção acumulada nos plastídeos, essas células possuem citoplasma denso, rico em organelas e muitas mitocôndrias, características típicas de células glandulares (Fahn, 1988). As numerosas mitocôndrias são comuns em estruturas secretoras, sendo necessárias às altas demandas energéticas decorrentes dos processos secretores, e já foram apontadas em osmóforos de Orchidaceae (Pridgeon & Stern, 1983). Tecidos osmogênicos são caracterizados por um núcleo grande (supostamente poliploide), presença de plasmodesmos, floema desenvolvido (Vogel, 1966a, 1990) e parênquima com grandes espaços intercelulares, aspectos vistos em *S. luridifuscescens*. Entretanto, faltam estômatos conectando os espaços intercelulares ao meio externo, e não há acúmulo pronunciado de amido, assim como nos osmóforos das espécies aparentadas de *Solanum* investigadas previamente (Sazima et al., 1993).

O tecido de osmóforos geralmente é estratificado em camadas especializadas em produção, estocagem e liberação (Vogel, 1966a). Essa organização não foi encontrada no material analisado, pois somente as células epidérmicas apresentam conteúdo citoplasmático denso, estando diretamente envolvidas nos processos secretores. Embora as células parenquimáticas pareçam não estar diretamente envolvidas em processos de secreção, o rápido consumo de amido e a presença de plasmodesmos, indicam transporte de assimilados e/ou precursores de secreção às células epidérmicas. Rápido consumo de reservas é característica marcante de tecidos envolvidos na

emissão de odor (Vogel, 1990). Nas espécies de *Solanum*, seção *Pachyphylla*, o tecido parenquimático provavelmente participa diretamente dos processos secretores, uma vez que apresenta conteúdo citoplasmático denso em cerca de oito células de espessura em seção transversal (Sazima et al., 1993). Cocucci (1996) relatou em duas dessas espécies o armazenamento do material secretado em câmaras subcuticulares, e sugeriu que a liberação para o exterior ocorreria por ruptura da cutícula, seja ela espontânea ou pela ação das abelhas enquanto raspam a superfície glandular para coletar os compostos.

A abundância de plastídeos e retículo endoplasmático liso indica o envolvimento dessas organelas nos processos secretores. Os plastídeos estão envolvidos na síntese de várias substâncias lipofílicas secretadas, incluindo óleos essenciais e flavonoides (Kirk & Tilney-Bassett, 1978; Fahn, 1979), mas também podem produzir substâncias precursoras de outras que serão sintetizadas e transportadas dentro do sistema de endomembranas (Whatley & Whatley, 1987). Carotenóides, compostos derivados de terpenos de 40 carbonos, são depositados em grandes quantidades em plastídeos (Whatley & Whatley, 1987), e foram encontrados com frequência em osmóforos (Vogel, 1990), podendo ser subprodutos de fragrâncias. Curry (1987) verificou que o retículo endoplasmático liso é o lugar de transporte e/ou síntese de terpenóides e, uma vez que os plastídeos também estão envolvidos na síntese de enzimas para a via do mevalonato (que produz terpenos e esteroides), a compartimentalização dessa via poderia ser necessária para a síntese de uma variedade de terpenóides como produtos finais. Goodwin (1977) e Grumbach & Forn (1980) mostraram que vias metabólicas de terpenóides podem ser reguladas por meio da divisão entre sítios de precursores plastidiais e extraplastidiais. Portanto, não só os plastídeos, mas também outras organelas, como o retículo endoplasmático liso, podem estar envolvidas na síntese de terpenos. Dictiossomos geralmente estão associados com secreção de proteínas, carboidratos e glicoproteínas (Mollenhauer & Morré, 1980).

Como as reservas de amido são limitadas em *S. luridifuscescens* outras fontes de energia são necessárias para a continuidade dos processos secretores. Amido é a reserva de energia geralmente encontrada em osmóforos (Pridgeon et al., 1983; Stern et al., 1987; Melo et al., 2010), mas lipídeos também podem ocorrer (Vogel, 1990). Plastídeos sem amido em todos os estágios do desenvolvimento já foram observados nos osmóforos de *Gymnadenia conopsea* (Stpiczynska, 2001). O floema desenvolvido também poderia atuar diretamente no suprimento energético das células secretoras devido às dimensões reduzidas da antera em *S. luridifuscescens*. Segundo Stern et

al. (1987), as flores de orquídeas podem ser constantemente supridas por assimilados do floema, sendo esse suprimento externo de carbono/energia utilizado para a síntese de fragrâncias.

Gotas lipídicas livres no citoplasma são comuns durante a fase secretora em osmóforos, e foram interpretadas como resultado da produção de fragrâncias (Pridgeon & Stern, 1983; Stern et al., 1987; Stpiczynska, 2001). Devido à ausência de vesículas se fundindo à membrana plasmática e/ou no espaço periplasmático, a eliminação da secreção parece ocorrer por processos écrinos em *S. luridifuscescens*, assim como observado em osmóforos de espécies de Orchidaceae (Pridgeon & Stern, 1983, 1985; Stern et al., 1987; Melo, et al., 2010). Encontramos evidências de que produtos da secreção se acumulam no espaço periplasmático e são liberados para o exterior.

Na ausência de estômatos ou poros cuticulares, os produtos da secreção teriam outras possíveis rotas. Terpenos de baixo peso molecular podem passar através de paredes celulares e cutícula (Vogel, 1990). Algumas cutículas cobertas por cera permitem a passagem de voláteis (Goodwin et al., 2003), enquanto outras possuem canais polares com a função de absorver e liberar substâncias (Schönherr & Bukovac, 1970). Já foram encontrados microcanais em paredes celulares externas, responsáveis pela distribuição de constituintes da parede e precursores de cera (Lyshede, 1978). Precursores de cera podem ser transportados através da parede por domínios lipofílicos de proteínas constitutivas ou por proteínas carreadoras de lipídeos (Kunst & Samuels, 2003). Lipídeos podem passar através da parede como pequenas metades, sendo remontados na superfície externa da cutícula (Davies et al., 2003). O sítio exato de transporte da secreção para o exterior não foi encontrado, mas rotas como essas poderiam estar presentes em *S. luridifuscescens*, sendo determinadas pela composição das substâncias liberadas. Contudo, as abelhas também provocam a liberação da secreção para o meio externo, semelhante ao proposto por Cocucci (1996), uma vez que as células epidérmicas da porção apical das anteras são rompidas e liberam o conteúdo celular quando os insetos se agarram a elas para executar as vibrações.

Nenhum exsudado foi visto junto à cutícula durante as observações do tecido vivo, provavelmente devido à sua rápida volatilização. Imagens da secreção na superfície cuticular de osmóforos foram feitas apenas por Pridgeon & Stern (1983) como um “acúmulo maciço de resíduos de secreção”, Stern et al. (1987) como “um material amorfo elétron-denso” e García et al. (2007) que as descreveu como “gotas osmiofílicas” e “depósitos em forma de prato de alta elétron-densidade”. O material encontrado na cutícula de *S. luridifuscescens* possui elétron-densidade moderada, e é heterogêneo, sugerindo que não se trata de uma substância pura, mas de uma mistura

de compostos. Uma mistura de voláteis revestidos por cera é comum em certos osmóforos (Vogel, 1990). As partículas osmiofílicas vistas na parede podem representar um processo de reabsorção, semelhante ao observado em *Passiflora* (García et al., 2007). Apesar das flores de *S. luridifuscescens* não possuírem cheiro característico, as evidências estruturais indicam que a estrutura secretora encontrada trata-se de um osmóforo. O olfato humano é insuficiente para abordar a produção e relevância ecológica dos voláteis florais (Vogel, 1963). Osmóforos estão presentes em flores sem odor (García et al., 2007), e substâncias voláteis foram identificadas em flores sem cheiro detectável por humanos (Knudsen et al., 2004). Contudo, embora o teste com Sudan tenha sido positivo, e as evidências ultraestruturais sugiram uma secreção de natureza lipídica, possivelmente terpenos, é necessário que se confirme a composição da secreção, e assim suas propriedades voláteis, o que pode ser inferido por meio de uma análise quali-quantitativa dos perfumes florais.

Diversas espécies de Orchidaceae, algumas Araceae, Euphorbiaceae, Gesneriaceae e Solanaceae possuem osmóforos florais responsáveis pela produção de perfumes que são coletados por machos de Euglossini (Dodson, 1962, 1966; Vogel, 1963, 1966b; Dressler, 1968, 1982; Soares et al., 1989; Gracie, 1993; Sazima et al., 1993). A secreção liberada em *S. luridifuscescens* não constitui um recurso, já que não é coletada pelas abelhas (capítulo 1) e, portanto, a despeito da morfologia diferenciada, as flores da espécie oferecem o pólen como único recurso coletado por abelhas fêmeas através do mecanismo vibratório (Buchmann, 1983) padrão em *Solanum*. Ainda no primeiro capítulo, nossos resultados apontaram que as pistas olfativas não são os principais atrativos para os polinizadores nas flores de *S. luridifuscescens*, deste modo, as substâncias liberadas provavelmente estão envolvidas na atração secundária, assim como sugerido por Cocucci (1996) para *S. stuckertii* e *S. confusum*, embora Passarelli & Bruzzone (2004) tenham concluído que o odor é o principal atrativo nesta última espécie.

O reconhecimento da presença de osmóforos nas anteras de espécies da seção *Cyphomandropsis* abre novas perspectivas para a evolução do mecanismo de polinização no clado *Cyphomandra*. Embora tenha sido sugerido por Sazima et al. (1993), que a produção de voláteis derivou de partes férteis das anteras para o conetivo, nossos resultados, assim como os de Passarelli & Bruzzone (2004), mostram que os osmóforos estão concentrados exclusivamente nos tecidos do conetivo, que se especializaram ainda mais nas espécies polinizadas por Euglossini. A evolução do conetivo em um tecido secretor pode ter ocorrido mais de uma vez no clado *Cyphomandra*, tendo em vista o não monofiletismo das seções *Cyphomandropsis* e *Pachyphylla* (Bohs, 2007).

Apresentamos neste trabalho os aspectos micromorfológicos do tecido secretor encontrado nas anteras de *S. luridifuscescens*. Esperamos que essas informações constituam uma base de comparação que subsidie futuros estudos de estruturas secretoras no clado *Cyphomandra*, assim como em toda a família *Solanaceae*. São necessários estudos anatômicos mais aprofundados nas demais espécies de *Cyphomandropsis* que possuem papilas na superfície abaxial das anteras, *S. cylindricum*, *S. fallax*, *S. fusiforme* e *S. matadori* (Bohs, 2001), para se confirmar a presença de osmóforos e a extensão do papel ecológico desempenhado por essas glândulas. Também se faz necessária uma análise detalhada das relações filogenéticas internas no clado. Essas informações, juntamente com a análise química da secreção, são chaves para a interpretação da radiação adaptativa exibida pelo gênero *Solanum* na região neotropical, onde o mecanismo de polinização vibrátil, tendo como recurso o pólen, derivou para o pneumático, que oferece essências florais.

Referências

- Bohs, L. 1995. Transfer of *Cyphomandra* (*Solanaceae*) and its species to *Solanum*. *Taxon*, 44: 583-587.
- Bohs, L. 2001. A revision of *Solanum* section *Cyphomandropsis* (*Solanaceae*). *Syst. Bot. Monogr.*, 61: 1-85.
- Bohs, L. 2007. Phylogeny of the *Cyphomandra* clade of the genus *Solanum* (*Solanaceae*) based on ITS sequence data. *Taxon*, 56: 1012-1026.
- Brundett, M.C.; Kendrick, B.; Peterson, C.A. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech. & Histochem.*, 66: 111-116.
- Buchmann, S.L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*, Van Nostrand & Reinhold, New York: 73-114.
- Coccuci, A.A. 1996. El osmóforo de *Cyphomandra* (*Solanaceae*): estudio con microscopio electrónico de barrido. *Darwiniana*, 34(1-4): 145-150.
- Curry, K.J. 1987. Initiation of terpenoid synthesis in osmophores of *Stanhopea anfracta* (*Orchidaceae*): a cytochemical study. *Am. J. Bot.*, 74:1332-1338.

- Davies, K.L.; Turner, M.P.; Gregg, A. 2003. Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Ann. Bot.*, 91: 439-446.
- D'Arcy, W.G.; Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Nee, M.; Estrada, N. 1991. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanical Garden, Kew, London: 75-138.
- Dodson, C.H. 1962. Pollination and variation in the subtribe Catasetinae (Orchidaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 49: 35-56.
- Dodson, C.H. 1966. Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 39: 607-629.
- Dressler, R.L. 1968. Pollination by euglossine bees. *Evolution*, 22: 202-212.
- Dressler, R.L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13: 373-394.
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108: 229-257.
- García, M.T.A.; Galati, B.G.; Hoc, P.S. 2007. Ultrastructure of the corona of scented and scentless flowers of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Flora*, 202: 302-315.
- Goodwin, T.W. 1977. The prenyl lipids of membranes of higher plants. In: *Tevini, M. & Lichtenthaler, H. K. (eds.) Lipids and lipid polymers in higher plants*, Springer-Verlag, Berlin: 29-47.
- Goodwin, S.M.; Kolosova, N.; Kish, C.M.; Wood, K.V.; Dudareva, N.; Jenks, M.A. 2003. Cuticle characteristics and volatile emissions of petals in *Antirrhinum majus*. *Physiol. Plant.*, 117: 435-443.
- Gracie, C. 1993. Pollination of *Cyphomandra endopogon* var. *endopogon* (Solanaceae) by *Eufriesea* spp. (Euglossini) in French Guiana. *Brittonia*, 45(1): 39-46.
- Grumbach, K.H. & Forn, B. 1980. Chloroplast autonomy in acetylcoenzyme-A-formation and terpenoid biosynthesis. *Z. Naturforsch. C.*, 35: 645-648.
- Hunziker, A.T. 2001. *The Genera of Solanaceae*, A.R.G. Gantner Verlag. Royal Botanical Garden, Kew, London.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw, New York.

- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A-138A.
- Kirk, J.T.O. & Tilney-Bassett. 1978. *The Plastids*. Elsevier. North Holland.
- Knudsen, J.T.; Tollsten, L.; Groth, Y.; Bergström, G.; Raguso, R.A. 2004. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. *Bot. J. Linn. Soc.* 146: 191-199.
- Kunst, L. & Samuels, A.L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant wax. *Prog. Lipid Res.* 42: 51-80.
- Lyshede, O.B. 1978. Studies on outer epidermal cell walls with microchannels in a xerophytic species. *New Phytol.*, 80: 421-426.
- Melo, M.C. de; Borba, E.L.; Paiva, E.A.S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Syst. Evol.*, 286:141-151.
- Mollenhauer, H.H. & Morre, D.J. 1980. The golgi apparatus. In: Tolbert, N.E. (ed.) *The biochemistry of plants*. Vol 1. The plant cell. Academic Press, New York: 438-489.
- O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59: 368-373.
- Passarelli, L.; Bruzzone, L. 2004. Significance of floral colour and scent in three *Solanum* sect. *Cyphomandropis* species (Solanaceae) with different floral rewards. *Aust. J. Bot.*, 52: 659-667.
- Pridgeon, A.M. & Stern, W.L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 70: 1233-1243.
- Roland, A.M. 1978. General preparations and staining of thin sections In: Hall, J.L. (ed.) *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Elsevier, New York: 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. *Pl. Syst. Evol.*, 187: 51-88.
- Schönherr, J. & Bukovac, M.J. 1970. Preferential polar pathways in the cuticle and their relationship to ectodesmata. *Planta*, 92: 189-201.

- Sendtner, O. 1845. Monographia Cyphomandrae, novi Solanacearum generis. Flora, 28: 161-176.
- Soares, A.A.; Campos, O. de; Vieira, M.F.; Melo, G.R. de. 1989. Relações entre *Euglossa* (Euglossella) *mandibularis* Friese 1899 (Hymen. Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). Ciênc. Cult., 41: 903-905.
- Stern, W.L., Curry, K.J., Pridgeon, A.M., 1987. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). Am. J. Bot., 74: 1323-1331.
- Stpiczynska, M. 1993. Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). Acta Soc. Bot. Pol., 62: 5-9.
- Stpiczynska, M. 2001. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnademnia conopsea* L. (Orchidaceae). Acta Soc. Bot. Pol., 70: 91-96.
- Vogel, S. 1978. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: The Pollination of Flowers by Insects. Linnean Soc. Symp. Series, 6: 89-96.
- Vogel, S. 1963. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. Österreichische Botanische Zeitschrift 110: 308-337.
- Vogel, S. 1966a. Scent organs of orchid flowers and their relation to insect pollination. In: Proceedings of the Fifth World Orchid Conference, Long Beach, California: 253-259.
- Vogel, S. 1966b. Pafümsammelnde Bienen als Bestäuber von Orchidaceen und *Gloxina*. Österreichische Botanische Zeitschrift, 113: 302-361.
- Vogel, S. 1990. The Role of Scent Glands in Pollination. On the Structure and Function of Osmophores. Smithsonian Institution Libraries and The National Science Foundation, Washington.
- Weese, T. & Bohs, L. 2007. A three-gene phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). Syst. Bot., 32(2): 445-463.
- Whatley, J.M. & Whatley, F.R. 1987. When is a chromoplast? New Phytol., 106: 667-678.

Considerações Finais

Apesar da morfologia distinta, as flores de *S. luridifuscescens* se comportaram como flores de pólen, ou seja, forneceram pólen para abelhas que o coletaram de três formas: através mecanismo vibratório característico em *Solanum*, esporadicamente recolhendo restos de pólen aderidos às anteras ou acessando o pólen no interior dos lóculos por meio de buracos abertos nas anteras. Embora abelhas que não vibram flores possam visitar *S. luridifuscescens*, elas não provocaram a liberação de pólen através dos poros das anteras e, dessa forma, mostramos neste trabalho, o funcionamento do princípio pneumático de polinização em resposta a estímulos artificiais.

A presença de osmóforos deve ser investigada nas demais espécies do clado Cyphomandra, entre elas destacamos aquelas da seção Cyphomandropsis que, semelhante a *S. luridifuscescens*, possuem anteras papilosas: *S. cylindricum*, *S. fallax*, *S. fusiforme* e *S. matadori*. As evidências estruturais apontam para a produção de terpenos, contudo ainda resta confirmar a composição química da secreção e a extensão de seu papel nas interações inseto-planta, o que poderá ser inferido através da identificação do buquê floral e experimentos que utilizem os visitantes florais e os compostos encontrados.

Além dos osmóforos, a estrutura do androceu e a ocorrência do princípio pneumático de polinização também devem ser documentados com maior abrangência e de forma comparada no clado Cyphomandra, especialmente em *S. fusiforme* e *S. cylindricum*, que aparecem nos estudos filogenéticos como taxa relativamente basais. Por fim, os visitantes florais e seu comportamento durante as visitas devem ser registrados nas espécies do clado. Juntamente com uma melhor resolução das relações filogenéticas internas em Cyphomandra, essas informações são essenciais para a compreensão da radiação adaptativa exibida pelo gênero *Solanum* na região neotropical.