

## EL NECTARIO Y LA COMPOSICION QUIMICA DEL NECTAR EN *PLUMBAGO AURICULATA* Y *P. CAERULEA* (PLUMBAGINACEAE)

Por LEONARDO GALETTO\*

**Summary** *Nectary and nectar chemical composition in Plumbago auriculata and P. caerulea* (Plumbaginaceae). Nectary structure and nectar chemical composition were studied in the cultivated *Plumbago auriculata* Lam. and in the native *P. caerulea* Kunth. Both species show staminal nectaries on the broaden base of the filaments which, by fusion, form a tube. Stomata are found on the inner tube surface. Mean stomata number is distinctive for each species —53,4 and 36,3 for *P. auriculata* and *P. caerulea*, respectively—, while stomata size is not. Amino acids in a low concentration were detected in all samples of both species whereas reducing acids and alkaloids were not. Lipids and phenols were observed in two samples of *P. caerulea*. The range of sugar concentration according to the sample was 17-21% for *P. auriculata* and 48-54% for *P. caerulea*. Nectar sugar composition is different: *P. auriculata* shows a sucrose rich nectar and *P. caerulea* an hexose rich one.

### INTRODUCCION

*Plumbago* L. es un género con unas 10 especies que habitan en regiones tropicales y cálidas de todo el mundo (Mabberley, 1987). Se trata de hierbas frondosas o subarbutos que, en general, se encuentran sobre suelos alterados (Channell and Wood, 1959).

Son escasos los antecedentes referidos a la histología de las glándulas nectaríferas en *Plumbaginaceae*. Sólo se puede mencionar a Smets (1986), quien en un trabajo sobre la localización e importancia sistemática de los nectarios florales en *Magnoliatae*, señala —como generalidad para toda la familia— que el tejido secretor se encuentra en la base de los filamentos de los estambres.

No se hallaron datos sobre las características del néctar de *Plumbago*; dentro de la familia únicamente se puede citar un trabajo sobre los aminoácidos del néctar en especies de *Armeria* (Baker and Baker, 1976).

Sobre los visitantes florales en especies de *Plumbago* tampoco se conoce demasiado. Vogel (1954) caracteriza a *P. auriculata* como esfingófila (bajo *P. capensis* Thunb.) y menciona que la psicofilia se manifestaría en especies asiáticas del género.

Este trabajo tiene por objetivos el estudio comparativo de la composición química del néctar, así como el análisis de aspectos cualitativos y cuantitativos del nectario en dos especies de *Plumbago*: *P.*

*caerulea* Kunth y *P. auriculata* Lam., la primera nativa de nuestro país y la segunda oriunda de Africa y ampliamente cultivada en todo el mundo (Bailey, 1949; Parodi, 1980).

### MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares de herbario correspondientes a las muestras utilizadas fueron identificadas por el Prof. Ing. Armando T. Hunziker, a quien agradezco especialmente.

#### *Plumbago auriculata* Lam.

ARGENTINA. Prov. Córdoba. Dpto. Capital: Plaza San Martín, cultivada, 26-IV-1989, Galetto 58. Ciudad Universitaria, cultivada, 6-VI-1989, Galetto 59 (CORD).

#### *Plumbago caerulea* Kunth

ARGENTINA. Prov. Córdoba. Dpto. Colón: El Diquecito, 9-V-1989, Galetto y Bernardello 55. La Quebrada, 26-X-1989, Bernardello y Galetto 713 (CORD). Dpto. Santa María: La Serranita, 9-V-1989, Galetto y Bernardello 57 (CORD).

Para visualizar los estomas se diafanizaron flores con solución acuosa de NaOH al 10%, luego fueron lavadas con alcohol: ácido acético (3:1). Posteriormente se separaron los filamentos de los estambres del resto de la flor y, finalmente, éstos fueron teñidos con solución de Lugol. Se contabilizaron los estomas presentes en un mínimo de 5 flores de cada especie. Además, se determinó el diámetro promedio de aproximadamente 60

\*Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), C. C. 495, 5000 Córdoba, Argentina. Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

estomas por especie, midiendo al azar con un ocular graduado.

Las fotomicrografías se tomaron con película Kodak Panatomic-X en un fotomicroscopio Zeiss.

Se fijaron flores en FAA para el análisis histológico. El material fue deshidratado por medio de una serie de alcohol etílico-xilol y luego incluido en parafina. Los cortes longitudinales y transversales seriados de 9-12  $\mu\text{m}$  de espesor se tiñeron con la triple coloración de hematoxilina, safranina y verde permanente (Conn *et al.*, 1960). Para evaluar el tamaño de los núcleos de las células nectaríferas se procedió con el mismo criterio de cálculo explicado para estomas.

El néctar se extrajo mediante capilares de vidrio evitando la contaminación con polen. En el momento de la recolección se midió la concentración de azúcares (% p/p) con un refractómetro de bolsillo American Optical T/C. Las muestras de néctar floral fueron depositadas sobre papel Whatman N° 1 o en frasquitos de vidrio a  $-18^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior análisis.

La metodología de Sweeley *et al.* (1963) fue usada para la identificación y cuantificación de carbohidratos por cromatografía gaseosa. Las muestras fueron tratadas con trimetilclorosilano + hexametildisilano en piridina, y los derivados así obtenidos se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso Konik 3000-HRGS equipado con un integrador Spectra-Physics SP4290 y un detector de ionización de llama. Se utilizó una columna de acero inoxidable de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro, con fase OV 101 3% sobre Chromosorb G/AW-DMCS (malla 100-120), gas portador:  $\text{N}_2$  (30 ml/min.) y el siguiente programa de temperatura: T inicial  $200^{\circ}\text{C}/2$  min., luego  $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$  hasta los  $215^{\circ}\text{C}$  en que se mantiene por 2 min., por último  $15^{\circ}\text{C}/\text{min.}$  hasta los  $310^{\circ}\text{C}$  en donde se estabiliza durante 5 min.

La detección de aminoácidos, lípidos, fenoles, alcaloides y ácidos reductores se realizó según los métodos de Baker y Baker (1975). Los aminoácidos presentes en las muestras de néctar se cuantificaron por medio de la escala de histidina (Baker and Baker, 1973). Se estimó también la relación disacáridos / monosacáridos según la siguiente fórmula:  $r = \text{sacarosa} / \text{fructuosa} + \text{glucosa}$  (Baker and Baker, 1983). Cada análisis químico se repitió entre dos y cuatro veces.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Morfología floral y nectarios

Las especies estudiadas de *Plumbago* presentan flores perfectas, pentámeras, actinomorfas y

casimógamas. La corola gamopétala forma un tubo de longitud variable, presentando en la parte distal 5 lóbulos. Los estambres tienen anteras dorsifijas y filamentos filiformes con sus extremos basales dilatados y soldados, formando un tubo. El ovario es súpero, unilocular y uniovuado.

*Plumbago auriculata* posee flores celestes de  $32,5 \pm 1,24$  mm de longitud. Desde hace tiempo se conoce la heterostilia en esta especie (Dahlgren, 1918). En las muestras estudiadas se constató tal característica (Fig. 1 A-B). Baker (1966) en estudios sobre este aspecto en la familia cita a *Plumbago* como portador de esta particularidad, sin especificar las especies estudiadas. Vuilleumier (1967) y Ganders (1979), en amplias revisiones de la heterostilia, mencionan la ausencia de dimorfismo en el polen y en la superficie estigmática dentro del género, características que suelen acompañar el polimorfismo estilar y estaminal.

*Plumbago caerulea* tiene flores más cortas ( $12,7 \pm 0,47$  mm de longitud), con cáliz de color púrpura y, corola azul claro. En esta especie no se encontró heterostilia, aunque se observó dimorfismo estilar (Fig. 1 I-J). Serán necesarios estudios más profundos y extendidos a otras poblaciones para aclarar este aspecto en la especie.

El tejido nectarífero en ambas especies se encuentra en la base ensanchada de los filamentos estaminales (Fig. 1 A, B, I y J). De acuerdo a la clasificación de Fahn (1979, 1982), la estructura presentada por estas especies correspondería al tipo 3a: nectarios estaminales sobre filamentos. Al realizar cortes histológicos en las dos especies en consideración, se constató una gran similitud estructural, por la cual sólo se esquematizó a *P. caerulea* (Fig. 1 C-H). La base dilatada de cada uno de los filamentos, que se encuentran fusionadas entre sí, constituyen un anillo separado de la corola y del ovario (Fig. 1 E); recién más arriba los filamentos adquieren su individualidad disminuyendo su sección paulatinamente (Fig. 1 F-H). El tejido secretor se ubica, casi totalmente, en la cara interna de las bases fusionadas (Fig. 1 E y F). Parte del tejido glandular se continúa hacia arriba, siempre sobre la cara interna de los filamentos, hasta una altura donde las bases dilatadas son libres (Fig. 1 G). En un detalle se puede observar la estructura común que forman las células por debajo de este nivel, constituyendo un verdadero tubo nectarífero separado del ovario (Fig. 1 K). Alcántara y Segadas-Vianna (1971) al estudiar el hábito ecológico de *Plumbago scandens* L., señalan que dicha especie posee 5 estambres exertos de base dilatada donde se sueldan formando un disco. Sin embargo, estos autores en ningún momento aluden a la naturaleza nectarífera del mismo.

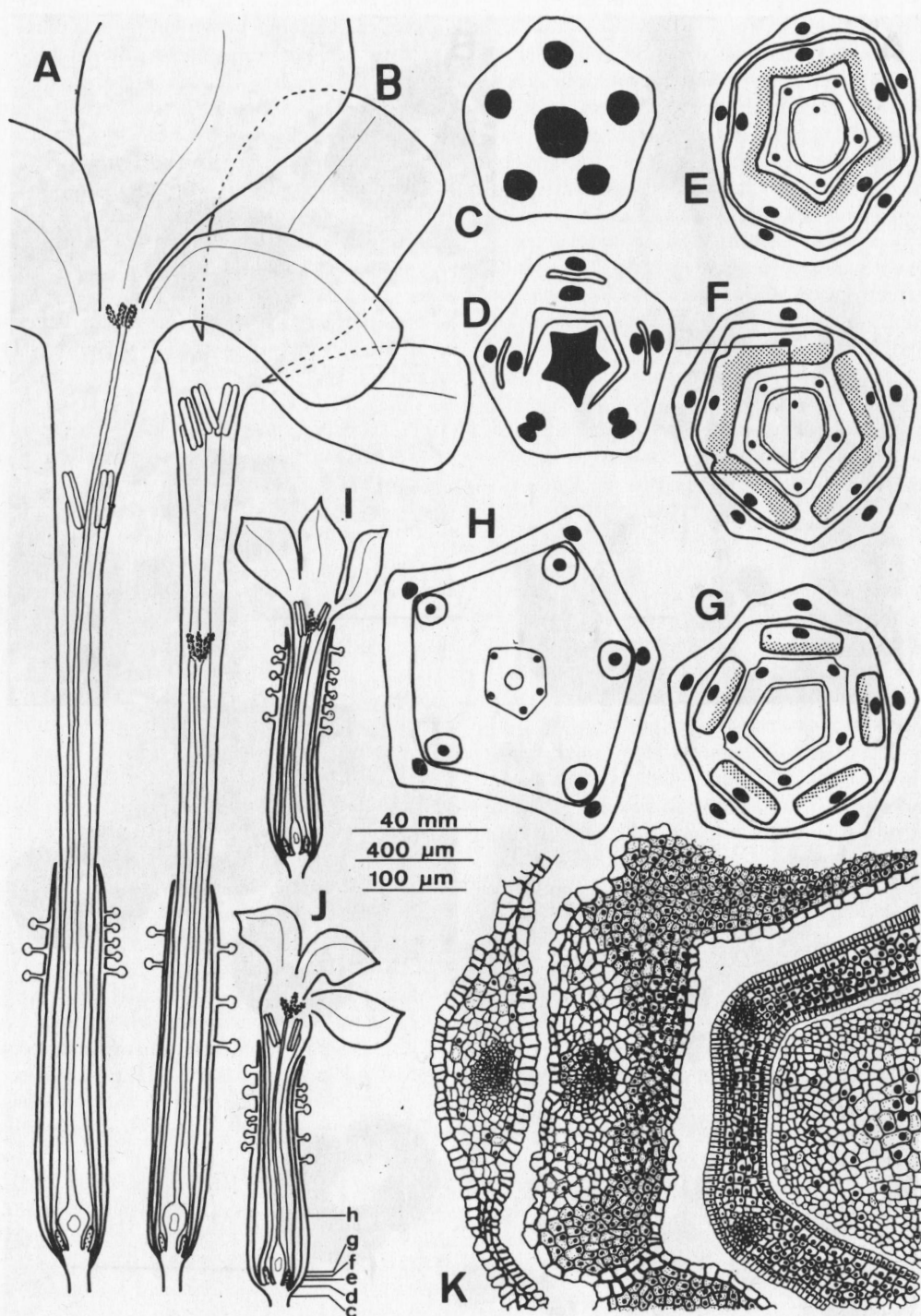


Fig. 1.— Nectarios florales en *Plumbago*. A-B *Plumbago auriculata*: esquemas de corte longitudinal por flor; C-H *Plumbago caerulea*: cortes transversales por flor indicados en J con letras minúsculas en los que se omitió el cáliz; I-J: esquema de corte longitudinal por flor; K: detalle de la zona nectarífera indicado en F con un recuadro. El grisado indica tejido nectarífero. La escala de 40 mm vale para A, B, I y J; la de 400 μm para C.- H y la de 100 μm para K.

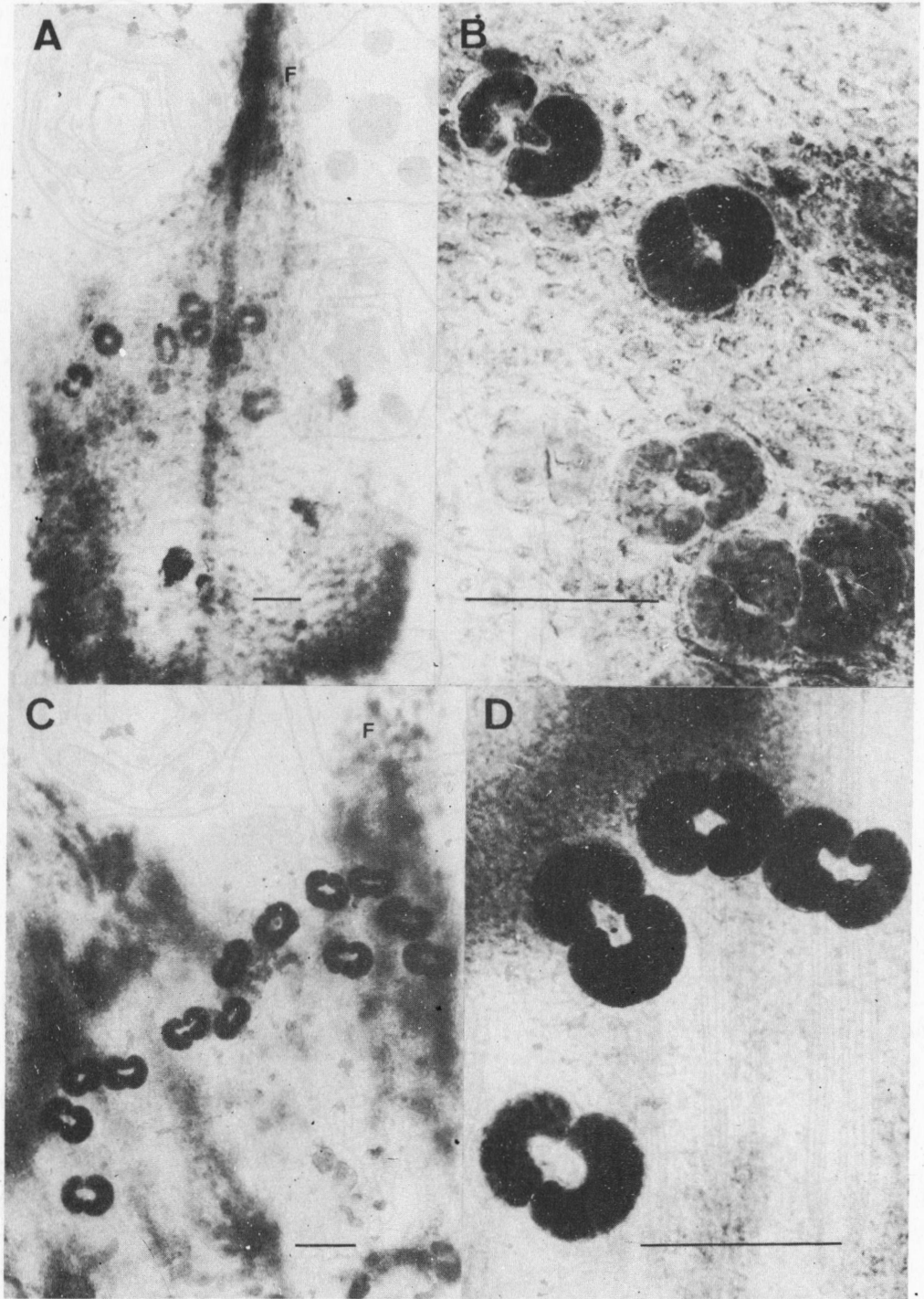


Fig. 2.— Fotomicrografías de estomas del nectario en *Plumbago*. A-B: *P. caerulea*; C-D: *P. auriculata*. La F indica el filamento del estambre. Las escalas equivalen a 30  $\mu$ m.

Sobre la cara interna de este tubo estaminal nectarífero se ubican estomas por los que se llevaría a cabo la secreción del néctar (Fig. 2 A - D). Los mismos se distribuyen, en general, uno al lado del otro de forma uniforme y se ubican en la parte media superior de la estructura (Fig. 2 A y C). Se encontró cierta variabilidad en el número de estomas por flor, aunque con valores medios característicos para cada especie:  $53,4 \pm 1,3$  y  $36,3 \pm 4,4$  para *P. auriculata* y *P. caerulea*, respectivamente. Su tamaño fue aproximadamente el mismo:  $22,1 \mu\text{m} \pm 2,76$  en *P. auriculata* y  $23,6 \mu\text{m} \pm 3,15$  en *P. caerulea*.

#### Néctar

Se observó la presencia de aminoácidos en todas las muestras de néctar analizadas. El reactivo usado para su detección fue ninhidrina al 0,2%, considerándose positiva la reacción por la aparición de color violeta. Su cuantificación a través de la escala de histidina resultó en concentraciones que oscilan entre 0,15-0,30 mg/ml (Tabla 1).

En ninguna de las muestras de *P. auriculata* se reconoció la existencia de lípidos ni compuestos fenólicos. En cambio, en dos de las tres muestras de *P. caerulea* se detectaron estos compuestos (Tabla 1). Se utilizó tetróxido de osmio al 1% como reactivo para lípidos, considerándose positivas aquellas muestras en las que se observaba color marrón. P-nitroanilina fue usada como indicador de fenoles cuando se observaba una mancha marrón rojiza

sobre el papel. Según Baker y Baker (1983), la presencia de compuestos fenólicos y lípidos en el néctar es un hecho bastante frecuente en Angiospermas. No se encontraron alcaloides ni ácidos reductores en ninguna de las muestras analizadas.

Si consideramos las categorías creadas por Baker y Baker (1983) a partir de las proporciones de los carbohidratos presentes en el néctar, podemos diferenciar las dos especies estudiadas (Tabla 1). Cabe aclarar que dichas categorías no poseen una base biológica, limitándose a clasificar los néctares en 4 grupos arbitrarios a partir de la relación de los azúcares más frecuentes. *Plumbago auriculata* presenta néctar rico en sacarosa ( $r > 0,5$ ), mientras *P. caerulea* un exudado rico en hexosas ( $r < 0,5$ ). Al observar los monosacáridos separadamente, resulta que para ambas especies siempre fue mayor el porcentaje relativo de glucosa, en una relación glucosa / fructuosa de aproximadamente 2:1 (Tabla 1). Baker y Baker (1983, cf. table 5-10) ubican a los distintos grupos de visitantes florales dentro de estas categorías, considerando la relación de azúcares. De acuerdo a los datos obtenidos en *P. auriculata* y tomando los polinizadores citados para esta especie (Vogel, 1954), su relación de azúcares resulta relativamente frecuente en flores esfingófilas.

Mariposas diurnas o moscas de trompa larga probablemente visiten las flores de *P. caerulea*. Tomando nuevamente en cuenta la mencionada tabla de Baker y Baker (1983), observamos que las flores

Tabla 1.— Composición química del néctar en *Plumbago*

| Muestra                    | n       | Hora            | Conc. % | Azúcares (media $\pm$ 1 d. e.) |                 |                 | r     | EH | F | L |
|----------------------------|---------|-----------------|---------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------|----|---|---|
|                            |         |                 |         | Sacarosa                       | Fructosa        | Glucosa         |       |    |   |   |
| <i>Plumbago auriculata</i> |         |                 |         |                                |                 |                 |       |    |   |   |
| Galetto 58                 | 1 (9)   | 09:00           | 17      | 48,8 $\pm$ 8,91                | 15,5 $\pm$ 4,11 | 35,7 $\pm$ 4,81 | 0,953 | 2  | - | - |
| Galetto 59                 | 1 (12)  | 17:00           | 21      | 43,8 $\pm$ 4,47                | 16,9 $\pm$ 0,09 | 39,2 $\pm$ 4,39 | 0,780 | 2  | - | - |
|                            |         | Media Ponderada | 19      | 46,3 $\pm$ 7,48                | 16,2 $\pm$ 2,99 | 37,5 $\pm$ 4,93 | 0,863 |    |   |   |
| <i>Plumbago caerulea</i>   |         |                 |         |                                |                 |                 |       |    |   |   |
| Galetto y Bernardello 55   | 5 (24)  | 09:30           | 48      | 17,4 $\pm$ 1,34                | 27,1 $\pm$ 2,83 | 55,5 $\pm$ 1,49 | 0,210 | 1  | + | + |
| Galetto y Bernardello 57   | 14 (49) | 16:00           | 54      | 28,9 $\pm$ 1,48                | 18,7 $\pm$ 2,46 | 52,4 $\pm$ 0,97 | 0,406 | 2  | + | + |
| Bernardello y Galetto 713  | 2 (5)   | 16:30           | 49      | 24,3 $\pm$ 1,65                | 22,6 $\pm$ 2,15 | 53,1 $\pm$ 2,78 | 0,387 | 1  | - | - |
|                            |         | Media Ponderada | 50,3    | 20,2 $\pm$ 1,52                | 22,8 $\pm$ 2,69 | 53,3 $\pm$ 1,76 | 0,347 |    |   |   |

Abreviaturas: n = número de plantas analizadas (número de flores); r = relación disacáridos/monosacáridos; EH = valor obtenido en la escala de histidina; F y L = presencia de compuestos fenólicos y de lípidos, respectivamente.

que son visitadas por cualquiera de estos dos grupos es común que posean néctares ricos o dominantes en hexosas, tal como se encontrara en *P. caerulea*. Observaciones de campo serán necesarias para dilucidar estas especulaciones y caracterizar a los polinizadores de la especie.

La concentración del néctar es característica de cada especie (Tabla 1) y estaría de acuerdo para los polinizadores sugeridos en cada caso. Los valores encontrados en el néctar de *P. caerulea* indicarían polinizadores que explotan flores que producen el recurso concentrado, tal el caso de abejas, moscas y mariposas diurnas (Baker and Baker, 1983). Asimismo, el néctar más diluido de *P. auriculata* es característico de flores esfingófilas (Baker and Baker, 1983; Cruden *et al.*, 1983).

#### AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Luis M. Bernardello por su constante apoyo en este trabajo. Al Dr. Héctor R. Juliani (Cátedra de Farmacognosia de la Fac. de Ciencias Químicas, UNC) por el asesoramiento y facilidades otorgadas en los aspectos químicos. Al Dr. Andrea A. Cocucci por la lectura crítica del manuscrito y por el aporte de datos bibliográficos y sobre la biología floral de *P. caerulea*. Finalmente, al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su financiamiento.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALCANTARA, J. e F. SEGADAS-VIANNA. 1971. Flora ecológica de Restingas do sudeste do Brasil. XVIII — *Plumbaginaceae*. Museo Nacional — Rio de Janeiro, pp. 1-14.
- BAILEY, L.H. 1949. *Manual of cultivated plants*. pp. 1-1116, the Macmillan Company, New York.
- BAKER, H.G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The *Plumbaginaceae*. *Evolution* 20: 349-368.
- and I. BAKER. 1973. Some anthecological aspects of the evolution of nectar-producing flowers, particularly amino acid production in nectar. En Heywood, V.H. (ed.), *Taxonomy and Ecology*, pp. 243-264. Academic Press, London and New York.
- 1975. Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. En Gilbert, L.E. and P.H. Raven (eds.), *Coevolution of animals and plants*, pp. 100-140. Univ. of Texas Press, Austin.
- 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. En Bentley, B. and T. S. Elias (eds.), *The biology of nectaries*, pp. 126-152. Columbia Univ. Press, New York.
- BAKER, I. and H.G. BAKER, 1976. Analyses of amino acids in flower nectars of hybrids and their parents, with phylogenetic implications. *New Phytol.* 76: 87-98.
- CHANNELL, R.B. and C.E. WOOD. 1959. The genera of *Plumbaginaceae* of the southeastern United States. *J. Arn. Arboretum* 15: 391-397.
- CONN, H.J., DARROW, M.A. and V.M. EMMEL. 1960. *Staining procedures*. I-XII, 1-289. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- CRUDEN, R.W., HERMANN, S.M. and S. PETERSON. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. En Bentley, B. and T.S. Elias (eds.), *The biology of nectaries*, pp. 80-125. Columbia Univ. Press, New York.
- DAHLGREN, K.V.O. 1918. Heterostylie innerhalb der Gattung *Plumbago*. *Sv. Bot. Tidskr.* 12: 362-372.
- FAHN, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. I-X, 1-302. Academic Press, London.
- 1982. *Plant anatomy*. I-XI, 1-544, 3rd ed. Pergamon Press, Oxford.
- GANDERS, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand J. Bot.* 17: 607-635.
- MABBERLEY, D.J. 1987. *The Plant-Book*. pp. I-XII, 1-706. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- PARODI, L.R. 1980. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería I* (3ra. edición ampliada y actualizada por M.J. Dimitri). pp. 657-1161. Editorial Acme, Buenos Aires.
- SMETS, E.C. 1986. Localization and systematic importance of the floral nectaries in the *Magnoliatae* (Dicotyledons). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 56: 51-76.
- SWEELEY, E.C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and W.W. WELLS. 1963. Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2497-2507.
- VOGEL, S. 1954. Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippengliederung. *Bot. Stud.* 1: I-X; 1-338.
- VUILLEUMIER, B.S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21: 210-226.