



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**ESTRUTURA, ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DE
LATICÍFEROS E COLÉTERES EM PLANTAS DE
TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS A.DC.
(RAUVOLFIOIDEAE, APOCYNACEAE) EM DIFERENTES FASES
DO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO**

YVE CANAVEZE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade de Plantas.

BOTUCATU-SP

2012



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTRUTURA, ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DE LATICÍFEROS E
COLÉTERES EM PLANTAS DE *TABERNAEMONTANA*
CATHARINENSIS A.DC. (RAUVOLFIOIDEAE, APOCYNACEAE) EM
DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO**

YVE CANAVEZE

PROF^A DR^A SILVIA RODRIGUES MACHADO

ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade de Plantas.

BOTUCATU-SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Canaveze, Yve.

Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos e coléteres em plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae) em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo / Yve Canaveze. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Silvia Rodrigues Machado

Capes: 20302037

1. *Tabernaemontana*. 2. Látex. 3. Produtos florestais.

Palavras-chave: Apocynaceae; Coléteres; Látex; Laticíferos; Mucilagem; Ontogênese; *Tabernaemontana catharinensis*.

Dedicatória

À minha mãe Vera Lúcia e ao meu pai Raul

- por todo o amor e porque me permitiram ser quem sou

Aos meus avós Maria de Lourdes e Venício

- pelo amor e dedicação

Aos meus tios Marina e Antônio

- pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Agradecimentos

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Fapesp) pelo suporte financeiro (TEM-Biota proc. 2008/55434-7; Coordenado pela Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado).

À **Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado**, pela orientação, pelos muitos ensinamentos e pelo comprometimento e entusiasmo com a Ciência, características que me ajudaram a crescer pessoal e cientificamente.

A **todos os alunos e funcionários do Departamento de Botânica**, pela agradável convivência e pela pronta ajuda. Agradeço em especial à Inara Regiane Moreira Coneglian, José Eduardo Costa, Kleber Alexandre Campos e Maria Helena Godoy pelas ajudas nos diversos momentos.

A **todos os professores do Departamento de Botânica** muito obrigada pela boa convivência e auxílio nas diferentes etapas deste trabalho. Agradeço em especial aos docentes **Profa. Elza Guimarães, Profa. Dra. Marina Aparecida de Moraes Dallaqua, Profa. Dra. Rita de Cássia Sindronia Maiomoni-Rodella e Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella** pelas inúmeras e essenciais ajudadas e pela amizade e carinho.

À **Profa. Tatiane Maria Rodrigues** pela disponibilidade e prontidão, pelas sugestões, pelo incentivo e pela amizade.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação**, que sempre foram dedicados a atender minhas solicitações.

Aos **funcionários da Biblioteca Central da UNESP**, câmpus de Botucatu, pela edição da ficha catalográfica.

À **Profa. Dra. Ingrid Koch** pela identificação das plantas.

À **Dra. Suzana Bissacot Barbosa**, pela amizade e ajuda no herbário.

Ao **Sr. Clemente José Campos**, pelo auxílio nas coletas.

Aos queridos amigos **Clívia Carolina Fiorilo Possobom, Sérgio Akira Adachi, Natália Totti, Juliana Marin Stahl e Shelly Favorito de Carvalho** que estiveram sempre dispostos a ajudar e que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos queridos **PIBICs Jr.**, meus jovens amigos que tanto me inspiram, em especial Amanda Eloá Pachani, Marília Crozatti, Tatiane Mionii, Diego Graciano e Tulio Garpelli.

Ao Danilo Rosa de Lima, que tem me ensinado a ser uma pessoa melhor.

Enfim, **a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho**, meus sinceros agradecimentos!

Sumário

RESUMO e ABSTRACT.....	1
INTRODUÇÃO.....	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	20
CAPÍTULO I – Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos em embriões, plântulas e plantas de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae).....	22
Resumo e Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos.....	26
Resultados.....	28
Discussão.....	31
Agradecimentos.....	34
Referências bibliográficas.....	34
Tabelas e Figuras.....	41
CAPÍTULO II – Coléteres foliares em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae): estrutura, origem e desenvolvimento.....	51
Resumo e Abstract.....	52
Introdução.....	53
Material e métodos.....	54
Resultados.....	56
Discussão.....	61
Agradecimentos.....	64
Referências bibliográficas.....	64
Figuras.....	69
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

Resumo e Abstract

Canaveze, Y. **Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos e coléteres em plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae) em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo.** 2012. 89p. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, CAMPUS DE BOTUCATU.

RESUMO - Laticíferos e coléteres são estruturas secretoras comuns em Apocynaceae e tendo sido registrados em órgãos vegetativos e reprodutivos em diferentes gêneros. *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. é uma espécie de Apocynaceae, conhecida como leiteira ou casca-de-cobra, amplamente usada na medicina popular e com atividade medicinal comprovada. É planta heliófita, comum em áreas degradadas, pastagens e como invasora de cultivos, sendo amplamente distribuída no Brasil. Este trabalho teve como objetivo estudar a estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos e coléteres em plantas de *T. catharinensis* em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo. Para este estudo foram analisados embriões maduros, plântulas aos 20 dias e plantas aos 80 dias após a germinação. Laticíferos dos tipos articulados anastomosados e não-anastomosados com crescimento intrusivo e, possivelmente, laticíferos não-articulados ramificados ocorrem em todos os estágios analisados. A fase meristemática dos laticíferos é breve e sua função secretora em regiões próximas ao promeristema foi confirmada histoquimicamente. Grãos protéicos, gotas de lipídeos e terpenos foram detectados nos laticíferos em todas as regiões analisadas. Laticíferos se caracterizam por apresentar crescimento axial, lamela média espessa, protoplasto granuloso e número variável de núcleos. Laticíferos do sistema primário se originam do meristema fundamental e procâmbio. Nas regiões diferenciadas da raiz e sistema caulinar, os laticíferos ocorrem imersos no parênquima fundamental e associados ao floema primário; células parenquimáticas na região cortical do caule, nervura principal e mesofilo podem ser adicionadas aos laticíferos. Laticíferos de origem secundária se originam do câmbio vascular em direção ao floema secundário. Coléteres ocorrem na região nodal de cotilédones, eofilos e metafílos em posição intrapeciolar e interpeciolar (estipulares), sendo ausentes no embrião maduro. Diferenciam-se nas fases iniciais do desenvolvimento foliar e são secretores a partir do segundo nó do ápice caulinar. São emergências não vascularizadas e persistentes, sendo observados coléteres do tipo padrão (mais comuns), tipos bifurcado e trifurcado (raros) e tipo sésstil (nas adjacências da gema axilar). Na fase secretora, possuem coloração verde-claro, são intumescidos e liberam um fluido abundante de natureza polissacarídica que recobre as regiões nodais e o ápice caulinar. A secreção extracelular acumula-se inicialmente em fendas esquizógenas por entre as paredes anticlinais das células epiteliais adjacentes e espaços

subcuticulares, sendo liberada para a superfície sem que ocorra rompimento da cutícula. Na fase pós-secretora, os coléteres tornam-se marrons, acumulam grânulos densos nos vacúolo e lignificam-se, sendo este processo de senescência basípeto. Uma periderme se instala em regiões subjacentes a inserção dos coléteres senescentes. Considerando as características ecológicas de *T. catharinensis*, a presença de laticíferos e coléteres ativos em secreção desde as fases iniciais do desenvolvimento vegetativo certamente constitui um sistema de proteção nos estágios mais críticos do ciclo de vida dessas plantas.

Palavras-chave: Apocynaceae, coléteres, látex, laticíferos, mucilagem, ontogênese

Canaveze, Y. **Structure, origin and development of laticifers and colleters in plants of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae) at different stages of the vegetative development.** 2012. 89p. M.SC. THESIS – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, CAMPUS DE BOTUCATU.

ABSTRACT – Laticifers and colleters are secretory structures common in Apocynaceae and they have been reported in vegetative and reproductive organs to different genera. *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. is a species of Apocynaceae known as leiteira or casca-de-cobra broadly used in the folk medicine and presents therapeutic activity confirmed. It is a heliophytic plant, common in degraded area and pasture areas and as invasive crops, being broadly distributed in Brazil. This work aimed to study the structure, origin and development of laticifers and colleters in *T. catharinensis* plants at different stages of vegetative development. For this study we analyzed mature embryos, 20-day seedlings and 80-day plants after the germination. Articulated anastomosing and nonanastomosing laticifers, and, possibly, nonarticulated branched types occur at all analyzed stages. The meristematic phase of laticifers is brief and your secretory function was histochemically confirmed in regions close to the promeristem. Protein grains, lipid droplets and terpenes were detected in the laticifers in all then analyzed regions. The laticifers were structurally differentiated from the surrounding cells by their axial growth, thick middle lamella, granular protoplast and variable number of nuclei. The primary laticiferous system arises from the ground meristem and the procambium. In the differentiated regions of the root and shoot system, the laticifers occur immersed in the fundamental parenchyma and associated to the phloem; parenchyma cells in the cortical region of the stem, midrib and mesophyll can be added to the laticifers. Laticifers of secondary origin were also produced from the vascular cambium toward the secondary phloem. Colleters occur in nodal region of cotyledons, eophylls and metaphylls at intrapetiolar and interpetiolar (stipulates) positions, being absent in the mature embryo. They become differentiated in the early stages of leaf development and become secretory from the second node of the stem apex. They are emergences nonvascularized and persistent, being seen colleters of standard type (the most common), bifurcate or trifurcate types (rare) and sessile type (adjacent to the axillary bud). At the secretory phase, they show a light-green color, are swollen and release a copious fluid of nature polysaccharides covering the nodals regions and the stem apex. The extracellular secretion accumulates early in schizogenous gaps through the anticlinal walls of epithelial cells adjacent, being released from the surface

without breaking of the cuticle. At the post-secretory stage, the colleter become brown, dense granules are accumulated in the vacuoles and become lignified, being this a basipetal process of senescence. Periderm installs in the regions subjacent to the insertion of the senescent colleters. Concerning the ecological characteristics of *T. catharinensis*, the presence of laticifers and colleters active in secretion from the early phases of the vegetative development certainly constitutes a defensive system against biotic and abiotic factors during this most critical stage in of the life span of these plants.

Key words: Apocynaceae, colleters, latex, laticifers, mucilage, ontogeny

Introdução

Introdução

Apocynaceae *sensu lato* encontra-se entre as maiores famílias de Angiospermas e compreende 424 gêneros e cerca de 3700 espécies distribuídas em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (Endress & Bruyns 2000; Souza & Lorenzi 2005). No Brasil, ocorrem cerca de 90 gêneros e 850 espécies, incluindo espécies de valor econômico agregado, como espécies ornamentais, árvores fornecedoras de madeira de boa qualidade, espécies produtoras de látex e compostos bioativos (Souza & Lorenzi 2005).

Os representantes de Apocynaceae apresentam diversidade de hábito e compõem a flora de diversas formações vegetais englobando desde florestas tropicais úmidas até regiões semi-áridas (Rapini 2004). Nessa família são encontradas diversas estruturas secretoras incluindo tricomas, idioblastos taníferos, cavidades mucilaginosas, laticíferos, coléteres, cabeça dos estiletos, nectários e osmóforos, presentes tanto em órgãos vegetativos quanto em órgãos reprodutivos e que estão envolvidas na produção de metabólitos secundários com diferentes funções incluindo mecanismos de defesa, de atração de polinizadores e dispersores, entre outros (Solereider 1908; Metcalfe & Chalk 1950). Laticíferos e coléteres são amplamente distribuídos na família e os relatos demonstram que são estruturas secretoras de grande importância taxonômica, ecológica e econômica.

Laticíferos são estruturas secretoras internas que contém um fluido denominado látex (Ever 2006) que, geralmente, é mantido sob pressão em células vegetais vivas (Agrawal & Konno 2009). O látex pode conter hidrocarbonetos poliisoprenicos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, amins, fitoesteróis e alcalóides, entre outros compostos (Matile 1987; Mauseth 1978).

A presença de laticíferos confere às plantas um maior sucesso adaptativo em diferentes ambientes, uma vez que o látex tem função relevante na defesa contra microorganismos, redução de herbivoria, como selante de ferimentos (Fahn 1979; Farrell *et al.* 1991; Evert 2006) e no seqüestro das defesas químicas (Farrell *et al.* 1991).

Estruturalmente, os laticíferos são classificados em dois tipos: articulados e não-articulados (De Bary 1884; Esau 1953; Fahn 1979). Laticíferos articulados são formados por fileiras de células alongadas, que se dispõem em série, podendo suas paredes terminais permanecer íntegras (articulados não-anastomosados) ou serem parcial ou totalmente removidas (articulados anastomosados) (Fahn 1979; Evert 2006). Laticíferos não-articulados são formados por uma única célula isolada com crescimento indeterminado, diferenciando-se em estruturas tubulares que apresentam crescimento intrusivo, podendo ser ramificados ou

desenvolverem-se em tubos mais ou menos em linha reta, sendo classificados como não-ramificados (Fahn 1979; Evert 2006). Apesar dessa classificação estrutural dos laticíferos, não se observa relação com o grupo taxonômico; portanto, diferentes tipos de laticíferos podem ocorrer em diferentes espécies dentro de uma mesma família (Fahn 1979; Evert 2006; Castro & Machado 2006; Hagel *et al.* 2008).

Em Apocynaceae, a ocorrência de laticíferos é uma característica universal (Metcalf & Chalk 1950; Demarco *et al.* 2006) e foram registrados em órgãos vegetativos e reprodutivos de cerca de 90 gêneros (Solereider 1908; Blaser 1945; Metcalfe & Chalk 1950; Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Mahlberg 1961; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murungan & Inamdar 1987 a, b; Wilson & Maxam 1987; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Serpe *et al.* 2001; Demarco *et al.* 2006; Demarco & Castro 2008; Lopes *et al.* 2009).

Na maioria das espécies de Apocynaceae estudadas, são descritos laticíferos do tipo não-articulado (Rao & Malaviya 1966; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murugan & Inamdar 1987a, b; Wilson & Malhberg 1978, 1980; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Mahlberg 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Entretanto, com o aumento no número de espécies estudadas sob essa perspectiva, tem sido registrada a presença de laticíferos articulados na família (Milanez 1960/1961, 1966, 1977; Sacchetti *et al.* 1999; Gimenez 2004; Demarco *et al.* 2006; Demarco & Castro 2008; Lopes *et al.* 2009).

Para algumas espécies dessa família existem divergências quanto à classificação dos laticíferos, como por exemplo, em *Cryptostegia grandiflora* os laticíferos são do tipo não-articulados segundo Blaser (1945) e “contínuos” (articulados) segundo Milanez (1960/1961, 1966); em *Nerium oleander* os laticíferos foram descritos como sendo não-articulados por Mahlberg (1961) e “contínuos” (articulados) por Milanez (1977); em *Asclepias curassavica* os laticíferos foram considerados não-articulados por Giordani (1978) e articulados por Demarco & Castro (2008). Tais divergências podem estar relacionadas à rapidez com que ocorrem as fusões das paredes celulares, com total dissolução, não deixando vestígios (Hanstein 1864 *apud* Milanez 1977).

Os coléteres são estruturas externas que secretam uma substância pegajosa constituída por uma mistura de mucilagens e terpenos, que lubrifica e protege meristemas e estruturas em início de desenvolvimento (Fahn 1979, 1990). Estruturalmente, os coléteres podem ser tricomas ou emergências, sendo estas vascularizadas ou não (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991).

Coléteres ocorrem amplamente em Apocynaceae e sua presença é mencionada nas cinco subfamílias (Endress & Bruyns 2000). Apesar de terem sido registrados em 67 gêneros (Simões *et al.* 2006), essas estruturas podem estar ausentes em alguns gêneros (Endress & Bruyns 2000), como registrado em duas espécies de *Aspidosperma* (Demarco 2005). A distribuição e número dessa estrutura são usados como uma característica taxonômica importante para essa família (Woodson & Moore 1938; Ezcurra *et al.* 1992; Apezato-da-Glória & Estelita 2000; Simões & Kinoshita 2002).

Em Apocynaceae, os coléteres são emergências (Thomas 1991). Nas estruturas vegetativas são observados na base da lâmina foliar e na face adaxial do pecíolo (Thomas 1991), podendo ocupar posição inter ou intrapeciolar (Sennblad *et al.* 1998). Para a família, os coléteres descritos, geralmente, são do tipo padrão (Thomas 1991; Rio *et al.* 2002); contudo, tipos inéditos descritos como bifurcados, também chamados de partidos, ramificados e fimbriados, e sésseis foram descritos para espécies de Apocynoideae (Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006; Martins *et al.* 2010) e Asclepiadoideae (Demarco 2005, 2008).

Considerando a riqueza de espécies brasileiras e a relevância taxonômica, ecológica e evolutiva de laticíferos e coléteres, poucos são estudos com espécies de Apocynaceae que tratam da ontogênese, organização estrutural e características histoquímicas dessas estruturas. Neste sentido, merecem destaque os estudos de Milanez (1960/1961), Milanez (1977), Apezato-da-Glória & Estelita (1997), Demarco *et al.* (2006), Demarco & Castro (2008) e Lopes *et al.* (2009) para laticíferos e os estudos de Silva *et al.* (1975), Apezato-da-Glória & Estelita (2000), Rio *et al.* (2002), Rio *et al.* (2005), Schwarz & Furlan (2002), Demarco (2005, 2008), Simões *et al.* (2006) e Martins *et al.* (2010) para coléteres. Além disso, tornam-se ainda mais escassos os trabalhos dedicados ao estudo de coléteres e laticíferos em estágios iniciais do desenvolvimento vegetativo, podendo ser citados os estudos de Milanez (1959, 1977) e Apezato-da-Glória & Estelita (1977, 2000).

Tabernaemontana catharinensis A.DC. (Apocynaceae, Rauvolfioideae), popularmente conhecida como leiteira e casca-de-cobra, é uma espécie nativa, mas não endêmica, do Brasil e apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, em diferentes domínios fitogeográficos (Koch e Rapini 2011). Na região de estudo, as plantas desta espécie são heliófitas, semidecíduas e abundantes em fragmentos de cerrado com forte alteração antrópica, ocorrendo também como invasoras de pastagens e cultivos.

Na medicina popular, é usada como um antídoto para picadas de cobra, para aliviar a dor de dente, e como vermífugo para eliminar verrugas (Spitzer *et al.* 2006), sendo

confirmadas as atividades tripanocida (Pereira *et al.* 1999), leishmanicida (Soares *et al.* 2007), antiofídica (Batina *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2004; Veronese *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2010) e antitumoral (Almeida *et al.* 2004) de extratos de *T. catharinensis*.

Com base na literatura disponível, embora laticíferos e coléteres em Apocynaceae tenham sido revisados e investigados por meio de diversos estudos de grande relevância científica, de modo geral, as investigações se concentram em um órgão e em uma única fase do desenvolvimento vegetal. Informações sobre a ocorrência, distribuição e características estruturais e histoquímicas de coléteres e laticíferos abrangendo desde a fase embrionária até planta adulta permitem aprofundar o conhecimento sobre a biologia dessas estruturas secretoras e inferir sobre o papel das secreções nas interações planta-ambiente.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos e coléteres em plantas de *T. catharinensis* em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo.

Revisão bibliográfica

Revisão bibliográfica

Estruturas secretoras em plantas são definidas como células ou estruturas multicelulares especializadas na síntese, acúmulo e/ou eliminação de substâncias específicas (Fahn 1979; Castro & Machado 2006). Segundo Evert (2006) o conceito de secreção em plantas refere-se aos fenômenos complexos de separação de substâncias do protoplasto ou de seu isolamento em partes do protoplasto, abrangendo processos relacionados tanto à remoção de material da célula (para a superfície da planta ou para espaços internos) quanto ao acúmulo de materiais secretados em algum compartimento celular.

As substâncias secretadas por estruturas secretoras específicas podem ser compostas por íons excedentes (sais); assimilados excedentes (açúcares); metabólitos secundários não utilizados ou parcialmente utilizados nos processos fisiológicos (alcalóides, taninos, óleos essenciais, resinas, cristais); substâncias que têm funções fisiológicas especiais depois que são secretadas (enzimas, hormônios) ou, ainda, metabólitos secundários não utilizáveis e metabólitos primários que podem ser reutilizados (Evert 2006).

Ao associar simplicidade estrutural e atividade secretora intensa, muitas estruturas secretoras em vegetais têm se mostrado como um excelente modelo para o estudo de questões fundamentais da biologia celular, incluindo a diferenciação celular, a dinâmica da secreção e mudanças estruturais durante o ciclo secretor, rotas metabólicas e processos fisiológicos relacionados com a compartimentalização e eliminação das secreções, enfim, eventos que englobam desde a ontogênese até a senescência de estruturas secretoras.

Atualmente, a classificação mais utilizada de estruturas secretoras se baseia na morfologia e/ou no conteúdo do exsudato por elas liberado. A esse respeito, deve-se citar o estudo realizado por Fahn (1988), no qual listou os diferentes tipos de estruturas secretoras as quais são classificadas principalmente quanto à sua morfologia e quanto à composição química da secreção, sendo estas características complementares.

As secreções vegetais, que são classificadas de acordo com sua composição química, têm uma ampla distribuição entre as famílias de angiospermas chamando a atenção de muitos pesquisadores não só pela sua função na planta, como também nas interações planta-ambiente e pelo seu aproveitamento econômico associada à produção de fármacos, cosméticos, borrachas, resinas, fungicidas, associadas à medicina popular entre muitas outras funções (Fahn 1979; Evert 2006).

Apocynaceae *sensu lato* encontra-se entre as maiores famílias de Angiospermas e compreende 424 gêneros distribuídos em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae,

Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (Endress & Bruyns 2000). Seus representantes apresentam diversidade de hábito e compõem a flora de diversas formações vegetais englobando desde florestas tropicais úmidas até regiões semi-áridas (Rapini 2004), sendo a presença de látex uma característica universal nesta família. De forma geral, as espécies de Apocynaceae apresentam grande importância econômica, por serem produtoras de látex e de madeira de boa qualidade; possuem também um grande potencial ornamental e são excelentes fornecedoras de recursos alimentares a animais de diferentes grupos por conta de seus frutos carnosos e sementes ariladas (Souza & Lorenzi 2005).

Nesta família são encontradas diversas estruturas secretoras incluindo tricomas, idioblastos taníferos, cavidades mucilaginosas, laticíferos, coléteres, cabeça dos estiletos, nectários e osmóforos, presentes tanto em órgãos vegetativos quanto em órgãos reprodutivos e que estão envolvidas na produção de metabólitos secundários com diferentes funções incluindo mecanismos de defesa, de atração de polinizadores e dispersores, entre outros (Solender 1908; Metcalfe & Chalk 1950). Laticíferos e coléteres são amplamente distribuídos na família e os relatos demonstram que são estruturas secretoras de grande importância taxonômica, ecológica e econômica, como apresentado a seguir.

Laticíferos

Laticíferos são estruturas secretoras que consistem de células isoladas ou fileiras de células especializadas e que contêm um fluido denominado látex, formando um sistema que permeia vários tecidos e órgãos no corpo da planta (Evert 2006).

A palavra látex é derivada do latim *lac, lactis*, que significa leite (Rizzini 1955); essa palavra também era usada como um adjetivo para caracterizar o sangue e, como o sangue, acreditava-se que o látex estava contido em um vaso e que coagulava quando retirado do corpo da planta (Mahlberg 1993). Vale destacar que no século XVIII grande parte dos estudos anatômicos sobre plantas era realizada por investigadores com algum conhecimento médico, dessa forma era comum essa transposição de termos (Mahlberg 1993).

Atualmente, em termos botânicos, o látex é definido como uma suspensão leitosa ou emulsão de muitas pequenas partículas dispersas em um líquido de composição inespecífica, normalmente, de índice de refração diferente dos índices das partículas (Fahn 1979; Mahlberg 1993; Castro & Machado 2006; Pickard 2008), geralmente mantido sob pressão em células vegetais vivas (Agrawal & Konno 2009).

Como é sabido, o látex também ocorre em outras células que não laticíferos como em células parenquimáticas comuns (pericarpo de *Decaisnea insignis*, nas folhas de *Solidago* e

em células da raiz e do caule de *Parthenium argentatum*), em idioblastos laticíferos (*Jatropha*) e no epitélio de ductos resiníferos (*Parthenium argentatum*) (Fahn 1979; Evert 2006).

Nos laticíferos, o látex preenche tais células desde suas porções mais jovens, sendo composto pelo próprio protoplasto (Matile 1987); geralmente é leitoso, mas pode também ser avermelhado ou amarelado (Endress & Bruyns 2000; Pickard 2008) e conter hidrocarbonetos poliisoprenicos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, aminas, fitoesteróis e alcalóides (Mauseth 1978; Matile 1987). Esses compostos químicos podem oferecer resistência a herbívoros através de toxicidade ou de efeitos antinutritivos ou, ainda, podem estar envolvidos na viscosidade que dificulta a locomoção de insetos herbívoros (Agrawal & Konno 2009; Konno 2011). Alguns autores atribuem o grande sucesso das plantas portadoras de laticíferos nos diversos ambientes às funções protetoras do látex contra predadores tais como insetos e microorganismos e como selante de ferimentos (Fahn 1979; 1990; Farrell *et al.* 1991; Konno 2011).

Cerca de 10% das espécies de angiospermas liberam látex quando seus tecidos são danificados e este látex não apresenta nenhuma função conhecida no metabolismo primário, em termos de aquisição e atribuição de recursos vegetais (Metcalfé 1967; Farrell *et al.* 1991). Ao longo das últimas décadas, esse tema vem sendo pesquisado com maior atenção, considerando a bioquímica, ecologia e conseqüências evolutivas do látex (Agrawal & Konno 2009; Konno 2011). Evidências circunstanciais e experimentais têm comprovado o papel do látex como um potente sistema de defesa contra herbívoros mandibulados, além de atuar como selante de ferimentos ao coagular quando exposto ao ar (Agrawal & Konno 2009; Konno 2011). Pesquisas têm demonstrado que folhas com laticíferos articulados são melhor protegidas contra herbívoros mandibulados em relação às que possuem laticíferos não-articulados, pois um único corte no laticífero não-articulado da nervura principal interrompe todo o fluxo do látex acima do local predado; no caso do laticífero articulado anastomosado, mesmo que o inseto corte várias nervuras, existem outras rotas para a continuidade do fluxo (Agrawal & Konno 2009 e literatura citada). Segundo Agrawal & Konno (2009) diversas linhas de evidência demonstram que a produção de látex é afetada pelos níveis de luz, déficite de água, umidade e fertilidade do solo e pressão de herbivoria; além disso, estudos têm demonstrado que espécies vegetais relacionadas variam até dez vezes em sua produção de látex dependendo das condições bióticas e abióticas.

Além da importância ecológica, alguns componentes do látex também apresentam importância econômica, por exemplo, por suas propriedades adesivas que têm sido utilizadas

para produção de borracha (*Hevea brasiliensis*, entre outras), gomas de mascar (*Manilkara* spp.) e goma-laca de fenóis (espécies de Anacardiaceae) ou por conter vários compostos bioativos, incluindo alcalóides como a morfina (*Papaver* spp.), glicosídeos cardíacos (*Asclepias* spp.), lactonas sesquiterpênicas (*Lactuca* spp.) e proteinases digestivas (*Carica papaya* e *Ficus* spp.) (Agrawal & Konno 2009).

Os laticíferos variam amplamente quanto a sua estrutura e origem. Tais estruturas secretoras podem se originar a partir do meristema fundamental e/ou procâmbio (Fahn 1979; Matile 1987), do câmbio, felogênio ou de células parenquimáticas (Milanez 1959, 1977; Lopes *et al.* 2009). Os relatos apontam que a fase meristemática é muito breve e, enquanto a maioria dos tecidos ainda é meristemática, os laticíferos já estão diferenciados e em fase secretora (Fahn 1979; Matile 1987; Demarco *et al.* 2006).

Estruturalmente, os laticíferos são classificados em dois tipos: articulados e não-articulados (De Bary 1884; Esau 1953; Nessler & Mahlberg 1977; Fahn 1979; Mahlberg 1993; Evert 2006; Hagel *et al.* 2008). Laticíferos articulados são formados por fileiras de células alongadas, que se dispõem em série, podendo suas paredes terminais permanecer íntegras (articulados não-anastomosados) ou serem parcial ou totalmente destruídas (articulados anastomosados) (Fahn 1979; Evert 2006). Laticíferos não-articulados são formados por uma única célula isolada com crescimento indeterminado, diferenciando-se em estruturas tubulares que apresentam crescimento intrusivo, podendo ser ramificados ou desenvolverem-se em tubos mais ou menos em linha reta, sendo classificados como não-ramificados (Fahn 1979; Evert 2006). Apesar dessa classificação estrutural dos laticíferos, não se observa relação com o grupo taxonômico; portanto, diferentes tipos de laticíferos podem ocorrer em diferentes espécies dentro de uma mesma família (Fahn 1979; Evert 2006; Castro & Machado 2006; Hagel *et al.* 2008).

A ocorrência de laticíferos é uma característica universal em Apocynaceae (Metcalf & Chalk 1950; Demarco *et al.* 2006) e foram registrados em órgãos vegetativos e reprodutivos de cerca de 90 gêneros (Solereeder 1908; Blaser 1945; Metcalf & Chalk 1950; Milanez 1960/1961; 1966; 1977; Mahlberg 1961; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murungan & Inamdar 1987a; 1987b, Wilson & Maxam 1987; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Serpe *et al.* 2001).

Em Apocynaceae, há controvérsias quanto ao tipo de laticífero, sendo o tipo não-articulado predominante nas espécies estudadas (Solereeder 1908; Metcalf 1967; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murungan & Inamdar 1987a; 1987b; Inamdar *et al.*

1988; Roy & De 1992; Mahlberg 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Contudo, existem divergências quanto à classificação dos laticíferos para algumas espécies de Apocynaceae, como por exemplo, em *Cryptostegia grandiflora* os laticíferos são do tipo não-articulados segundo Blaser (1945) e “contínuos” (articulados) segundo Milanez (1960/1961; 1966); em *Nerium oleander* os laticíferos foram descritos como sendo não-articulados por Mahlberg (1961) e “contínuos” (articulados) por Milanez (1977); em *Asclepias curassavica* os laticíferos foram considerados não-articulados por Giordani (1978) e articulados por Demarco & Castro (2008). Neste contexto, estudos de ontogênese e desenvolvimento de laticíferos em diferentes órgãos da mesma planta podem auxiliar na classificação do(s) tipo(s) de laticífero em determinada espécie.

Embora os laticíferos sejam considerados um potente sistema de defesa das plantas, poucos trabalhos relacionados à ontogênese, organização estrutural e características histoquímicas dos laticíferos foram realizados para as espécies brasileiras de Apocynaceae, destacando-se aqueles realizados em *Cryptostegia grandiflora* (Milanez 1960/1961), *Nerium oleander* (Milanez 1977), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), *Aspidosperma australe* e *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006), *Asclepias curassavica*, *Fischeria stellata*, *Matelea denticulata*, *Gonioanthela axillares* e *Oxypetalum banksii* (Demarco & Castro 2008) e *Mandevilla atrviolacea* (Lopes *et al.* 2009).

Coléteres

A palavra coléter é derivada do grego *colla*, que significa cola, goma, referindo-se à secreção pegajosa produzida por essa estrutura (Thomas 1991; Evert 2006). Essa secreção pegajosa é constituída por uma mistura de mucilagens e terpenos, que lubrifica e protege as gemas em início de desenvolvimento (Fahn 1979, 1990).

Os coléteres originalmente descritos como “*glandular shaggy hairs*” (tricomas glandulares plumosos) por Solereder (1908), foram denominados “*standard*” (padrão) por Lersten (1974a, b) em Rubiaceae e essa nomenclatura tem sido bastante usada para outras famílias de Angiospermas (Simões *et al.* 2006). Thomas (1991) resumiu os seis tipos adicionais de coléteres descritos para Rubiaceae: filiforme, alado, padrão reduzido, intermediário, dendróide e escova.

Estruturalmente, os coléteres podem ser tricomas ou emergências, estas podem ser vascularizadas ou não (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991). Os coléteres são classificados como emergências quando, a partir da ontogênese, verifica-se que células da protoderme e da subprotoderme contribuem para a formação dessa estrutura secretora, como é o caso dos

coléteres descritos em espécies de *Allamanda* (Apocynaceae) (Ramayya & Bahadur 1968), em *Nerium indicum* (Thomas & Dave 1989), em espécies de *Mandevilla* (Apocynaceae) (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000), em espécies de *Simira* (Rubiaceae) (Klein *et al.* 2004), entre outros. Quanto à vascularização, a presença dos tecidos vasculares já foi diretamente associada ao tamanho dos coléteres (Carlquist 1969), ao órgão em que o coléter está ligado (Thomas 1991), ou ainda, à proximidade de traços vasculares onde essas estruturas estão conectadas (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000). Para verificar a presença de vascularização nos coléteres são importantes cortes seriados transversais e longitudinais que, dependendo do plano de corte, podem ou não estar evidentes (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002).

Coléteres ocorrem amplamente em Apocynaceae e sua presença é mencionada nas cinco subfamílias (Endress & Bruyns 2000), sendo a segunda maior família de Angiospermas a apresentar tais estruturas (Simões *et al.* 2006). Apesar de terem sido registrados em 67 gêneros (Simões *et al.* 2006), essas estruturas podem estar ausentes em alguns gêneros (Endress & Bruyns 2000), como registrado em duas espécies de *Aspidosperma* (Demarco 2005). A distribuição e número dessa estrutura são usados como uma característica taxonômica importante para essa família (Woodson & Moore 1938; Ezcurra *et al.* 1992; Apezzato-da-Glória & Estelita 2000; Simões & Kinoshita 2002).

Em Apocynaceae, os coléteres são emergências (Thomas 1991) e podem estar presentes na base da lâmina foliar, pecíolo, brácteas, bractéolas e sépalas (Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998). Nas estruturas vegetativas são observados na base da lâmina foliar e na face adaxial do pecíolo (Thomas 1991), podendo ocupar posição inter ou intrapeciolar (Sennblad *et al.* 1998). Para a família, os coléteres descritos, geralmente, são do tipo padrão (Thomas 1991; Rio *et al.* 2002); contudo, tipos inéditos descritos como bifurcados, também chamados de partidos, ramificados e fimbriados, e sésseis foram descritos para espécies de Apocynoideae (Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006; Martins *et al.* 2010) e Asclepiadoideae (Demarco 2005, 2008).

A ocorrência de coléteres foliares foi registrada para 50 gêneros de Apocynaceae, em sua maioria, presentes no pecíolo; somente na lâmina foliar no gênero *Telosma* e no pecíolo e lâmina foliar nos gêneros *Forsteronia*, *Mandevilla* e *Calotropis* (Rio *et al.* 2002). Nesta família as espécies possuem folhas inteiras desprovidas de estípulas ou com estípulas reduzidas (Thomas 1991; Judd *et al.* 2009); entretanto, segundo a teoria estipular de Woodson & Moore (1938), tanto os coléteres foliares quanto os calicinais pertencem à categoria de estípulas (Rio *et al.* 2002; Demarco 2005, 2008; Martins *et al.* 2010)

Apesar dos vários registros sobre a presença de coléteres em espécies de Apocynaceae ocorrentes no Brasil, as informações sobre aspectos do desenvolvimento, estrutura e secreção dessas estruturas ainda são escassas com destaque para os estudos realizados em *Gonioanthea odorata* e *G. hilariana* (Silva *et al.* 1975), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000), *Prestonia colciata* (Rio *et al.* 2002), *Forsteronia* (Rio *et al.* 2005), *Oxypetalum* (Schwarz & Furlan 2002), *Aspidosperma* e *Blepharodon* (Demarco 2005, 2008), *Macrosiphonia longiflora*, *Mandevilla pycnantha*, *Mn. tenuifolia* e *Mn. scabra*, *Mesechiteae mansoana*, *Secondatia densiflora*, *S. floribunda* (Simões *et al.* 2006) e *Temnadenia violacea* (Martins *et al.* 2010). Registros de ocorrência de coléteres em cotilédones são raros, sendo descritos em *Nerium oleander* (Williams *et al.* 1982) e duas espécies de *Mandevilla* (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000).

***Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae)**

Incluída na subfamília Rauvolfioideae de Apocynaceae (Endress & Bruyns 2000), a tribo Tabernaemontaneae compreende 16 gêneros e cerca de 170 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo *Tabernaemontana* o maior gênero com cerca de 100 espécies (Endress *et al.* 2007), das quais 27 espécies ocorrem no Brasil (Leeuwenberg 1994; Figueiredo *et al.* 2010). Representantes do gênero *Tabernaemontana* produzem uma ampla variedade de alcalóides indólicos com diversas propriedades e possibilidades de aplicação, desempenhando importante papel na medicina popular (Van Beek *et al.* 1984; Araújo *et al.* 1984; Achenbach *et al.* 1997; Pereira *et al.* 1999a, b, c; Batina *et al.* 2000; Federici *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2003; Zocoler *et al.* 2005; Monnerat *et al.* 2005; Soares *et al.* 2007; Gomes *et al.* 2010; Figueiredo *et al.* 2010). A partir de extratos de *T. catharinensis* já foram confirmadas a atividade tripanocida (Pereira *et al.* 1999a), a atividade leishmanicida (Soares *et al.* 2007), a atividade antiofídica (Batina *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2004; Veronese *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2010) e a atividade antitumoral (Almeida *et al.* 2004).

Tabernaemontana catharinensis A.DC., objeto deste estudo, é popularmente conhecida como leiteira e casca-de-cobra e tem como sinônimas: *Peschiera acuminata* (Müll. Arg.) Miers, *Peschiera affinis* (Müll. Arg.) Miers, *Peschiera australis* (Müll. Arg.) Miers, *Peschiera albidiflora* Miers, *Peschiera affinis* var. *acuminata* L. Allorge, *Peschiera australis* var. *hilariana* (Müll. Arg.) L. Allorge, *Peschiera catharinensis* (A. DC.) Miers, *Peschiera hilariana* (Müll. Arg.) Miers, *Tabernaemontana acuminata* Müll. Arg., *Tabernaemontana affinis* Müll. Arg., *Tabernaemontana affinis* var. *lanceolata* Müll. Arg., *Tabernaemontana*

salicifolia Hand.-Mazz., *Tabernaemontana hybrida* Hand.-Mazz.; *Tabernaemontana australis* Müll. Arg., *Tabernaemontana hilariana* Müll. Arg. (Tropicos.org 2011).

Segundo Koch & Rapini (2011), *T. catharinensis* é nativa, mas não endêmica, do Brasil e ocorre em diferentes domínios fitogeográficos (Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica), com ampla distribuição geográfica incluindo o Nordeste (Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul). Na região de Botucatu é frequentemente encontrada em áreas de cerrado com forte alteração antrópica e pastagens. Na região de estudo, as plantas desta espécie são heliófitas, semidecíduas e abundantes em fragmentos de cerrado com forte alteração antrópica, sendo comumente encontradas como invasoras de pastagens e culturas.

Embora coléteres e laticíferos sejam estruturas frequentes em espécies de *Tabernaemontana* poucos trabalhos sobre essas estruturas foram realizados neste grupo de plantas, destacando-se aqueles realizados sobre a presença de coléteres calicinais em diversas espécies de *Tabernaemontana* (Ramayya & Bahadur 1968) e *Tabernaemontana catharinensis* (Aguiar 2003); a descrição de laticíferos (não-articulados ramificados e não-ramificados) em órgãos vegetativos e reprodutivos e a caracterização do látex em *Tabernaemontana coronaria* (Rao & Malaviya 1966); a presença de laticíferos não-articulados no mesocarpo de *Tabernaemontana catharinensis* (Aguiar 2003); a presença de laticíferos nos cotilédones do embrião maduro em *Tabernaemontana arborea* (Aguiar 2009) e presença de laticíferos no caule em estrutura secundária de *Tabernaemontana catharinensis*, especificamente no floema secundário colapsado, sendo descritos como laticíferos articulados não-ramificados (Gimenez 2004).

Em síntese, é importante ressaltar que embora estruturas secretoras em Apocynaceae, especialmente laticíferos e coléteres tenham sido revisadas e investigadas por meio de diversos estudos de grande relevância científica, de modo geral, as investigações se concentram em um órgão e em uma única fase do desenvolvimento vegetal. Informações sobre a ocorrência, distribuição e características estruturais e histoquímicas de coléteres e laticíferos abrangendo desde a fase embrionária até planta adulta permitem aprofundar o conhecimento sobre a biologia dessas estruturas secretoras e inferir sobre o papel das secreções nas interações planta-ambiente.

Apresentação dos capítulos

Conforme estabelecido pelo Conselho da área de Botânica do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), expresso na PORTARIA Nº 01/2010-SPG/IBB/UNESP, os resultados obtidos durante a execução deste projeto de mestrado foram redigidos na forma de artigos segundo as normas da revista *Acta Botanica Brasilica*.

Capítulo I - Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos em embriões, plântulas e plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae)

Capítulo II - Coléteres foliares em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae): estrutura, origem e desenvolvimento

Capítulo I

Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos em embriões, plântulas e plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae)**RESUMO**

(Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos em embriões, plântulas e plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae)). Laticíferos em *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae, Rauvolfioideae) foram estudados no embrião maduro, plântulas aos 20 dias e plantas aos 80 dias após a germinação. Laticíferos articulados, anastomosados e não-anastomosados, com crescimento intrusivo e, possivelmente, laticíferos não-articulados ramificados ocorrem em todos os estágios analisados. A fase meristemática dos laticíferos é breve e sua função secretora em regiões próximas ao promeristema foi confirmada histoquimicamente. Laticíferos apresentam crescimento axial, lamela média espessa, protoplasto granuloso e número variável de núcleos. Laticíferos do sistema primário se originam do meristema fundamental e procâmbio, sendo que em regiões diferenciadas da raiz e sistema caulinar, os laticíferos ocorrem imersos no parênquima fundamental e associados ao floema primário; células parenquimáticas na região cortical do caule, nervura principal e mesofilo podem ser adicionadas aos laticíferos. Laticíferos de origem secundária se originam do câmbio vascular em direção ao floema secundário. Grãos protéicos, gotas de lipídeos e terpenos foram detectados nos laticíferos em todas as regiões analisadas. Considerando que plântulas de *T. catharinensis* são fanerocotiledonares, portanto, vulneráveis aos fatores ambientais adversos, é inegável a proteção conferida pelos laticíferos desde as fases iniciais do desenvolvimento vegetativo. Sugere-se que a diversidade de tipos de laticíferos observada nestas plantas confere proteção adicional contra herbivoria.

Palavras-chave: Apocynaceae, laticíferos, leiteira, ontogênese, *Tabernaemontana catharinensis*

ABSTRACT

(Structure, origin and development of laticifers in the mature embryos, seedlings and plants of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae)). Laticifers of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae, Rauvolfioideae) have been studied in mature embryos, 20-day seedlings and 80-day plants after the germination. Laticifers articulated, anastomosing and nonanastomosing, and, possibly, nonarticulated branched types

occur at all the analyzed stages. The meristematic phase of laticifers is brief and its secretory function in the regions close of the promeristem was histochemically confirmed. The laticifers showed elongated form, thick middle lamella, granular protoplast and nuclei in variable number. The primary system of laticifers arises from the ground meristem and procambium. In differentiated regions of the root and shoot system, the laticifers occur immersed in the fundamental parenchyma and associated to the primary phloem; parenchyma cells of stem cortical and medullary region, midrib and mesophyll may be added to laticifers. Laticifers of secondary system were produced from the vascular cambium toward secondary phloem. Protein grains, lipid droplets and terpenes were detected in the laticifers in all analyzed regions. The seedlings of *T. catharinensis* are phanerocotyledonar, then, vulnerable to adverse environmental factors; so, the protection afforded by laticifers from the early phases of the vegetative development should be considered. It is suggested that the diversity of laticifers types observed in these plants provides additional protection against herbivore.

Key words: Apocynaceae, laticifers, leiteira, ontogeny, *Tabernaemontana catharinensis*

Introdução

Laticíferos, estruturas secretoras internas portadoras de látex, formam um sistema que permeia vários tecidos e órgãos no corpo da planta e representam um potente sistema de defesa contra predadores tais como insetos e microorganismos e como selante de ferimentos (Fahn 1979, 1990; Evert 2006), além de beneficiarem as plantas ao isolarem substâncias químicas de defesa dos tecidos sensíveis (Farrell *et al.* 1991). O papel defensivo do látex tem sido suportado por muitas linhas de evidência e alguns autores atribuem o maior sucesso das plantas latescentes nos diversos ambientes em relação às não latescentes às funções protetoras do látex (Farrell *et al.* 1991; Demarco *et al.* 2006; Agrawal & Konno 2009; Konno 2011).

Em Apocynaceae a ocorrência de laticíferos é uma característica universal (Metcalf & Chalk 1950; Demarco *et al.* 2006) e foram registrados em órgãos vegetativos e reprodutivos de cerca de 90 gêneros (Solereider 1908; Blaser 1945; Metcalfe & Chalk 1950; Milanez 1960/1961; 1966; 1977; Mahlberg 1961; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murungan & Inamdar 1987a, b; Wilson & Maxam 1987; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Sacchetti *et al.* 1999; Serpe *et al.* 2001; Gimenez 2004; Demarco *et al.* 2006; Demarco & Castro 2008; Lopes *et al.* 2009).

A maioria dos laticíferos descritos para as espécies da família é do tipo não-articulado (Rao & Malaviya 1966; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murugan &

Inamdar 1987a, b; Wilson & Malhberg 1978, 1980; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992, Mahlberg 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Entretanto, com o aumento no número de espécies estudadas sob essa perspectiva, tem sido registrada a presença de laticíferos articulados em representantes de Apocynaceae (Milanez 1960/1961, 1966; Milanez 1977; Sacchetti *et al.* 1999; Gimenez 2004; Demarco *et al.* 2006; Demarco & Castro 2008; Lopes *et al.* 2009). Para algumas espécies dessa família, existem divergências quanto à classificação dos laticíferos, como por exemplo, em *Cryptostegia grandiflora* os laticíferos são do tipo não-articulados segundo Blaser (1945) e “contínuos” (articulados) segundo Milanez (1960/1961, 1966); em *Nerium oleander* os laticíferos foram descritos como sendo não-articulados por Mahlberg (1961) e “contínuos” (articulados) por Milanez (1977); em *Asclepias curassavica* os laticíferos foram considerados não-articulados por Giordani (1978) e articulados por Demarco e Castro (2008). Tais divergências podem estar relacionadas à rapidez com que ocorrem as fusões celulares, com total dissolução das paredes celulares, não deixando vestígios (Hanstein 1864 *apud* Milanez 1977).

Informações sobre a ontogênese, organização estrutural e características citológicas dos laticíferos, bem como sobre a natureza química do látex em espécies nativas são escassas. No Brasil, poucas espécies de Apocynaceae foram estudadas com relação à estrutura, origem e desenvolvimento dos laticíferos, podendo ser citados os estudos realizados por Milanez (1960/1961), Milanez (1977), Appezzato-da-Glória & Estelita (1997), Demarco *et al.* (2006), Demarco & Castro (2008) e Lopes *et al.* (2009).

A tribo Tabernaemontaneae (Rauvolfioideae, Apocynaceae), possui 16 gêneros e cerca de 170 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo *Tabernaemontana* L. o maior gênero, com cerca de 100 espécies (Endress *et al.* 2007; Simões *et al.* 2010), sendo citadas 27 espécies para o Brasil (Leeuwenberg 1994; Figueiredo *et al.* 2010). Representantes deste gênero produzem uma ampla variedade de alcalóides indólicos com diversas propriedades e possibilidades de aplicação na medicina popular (Van Beek *et al.* 1984; Araújo *et al.* 1984; Achenbach *et al.* 1997; Pereira *et al.* 1999a, b, c; Batina *et al.* 2000; Federici *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2003; Zocoler *et al.* 2005; Monnerat *et al.* 2005; Soares *et al.* 2007; Gomes *et al.* 2010; Figueiredo *et al.* 2010), sendo comprovadas as atividades tripanocida (Pereira *et al.* 1999a), leishmanicida (Soares *et al.* 2007), antiofídica (Batina *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2004; Veronese *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2010) e antitumoral (Almeida *et al.* 2004) de extratos de plantas de *T. catharinensis*.

Tabernaemontaneae catharinensis A.DC. é uma espécie nativa, mas não endêmica, do Brasil e apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas regiões Nordeste,

Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, em diferentes domínios fitogeográficos (Koch e Rapini 2011). Na região de estudo, as plantas desta espécie são heliófitas, semidecíduas e abundantes em fragmentos de cerrado com forte alteração antrópica, ocorrendo também como invasoras de pastagens e cultivos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos em embriões, plântulas e plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae).

Material e métodos

Frutos maduros de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC., isto é, aqueles que se encontravam abertos naturalmente, com a face externa de coloração verde-alaranjado e que apresentavam as sementes com arilo laranja-avermelhado e brilhante, foram coletados de indivíduos vegetando em áreas de cerrado *sensu lato* localizadas no município de Botucatu/SP (Estrada da Mina - 22°42'21,4''S e 48°18'23,7''W; Fazenda Lageado - 22°51'16,8''S e 48°25'53,2''W) e no município de Pratânia/SP (Fazenda Palmeira da Serra - 22°48'48,8''S e 48°44'33,7''), nos meses de março a maio de 2010 e 2011. Exsiccatas foram incorporadas no Herbário BOTU sob os números de registro BOTU 27625- 27627.

Para a obtenção dos embriões foram utilizadas cerca de 50 sementes provenientes de frutos maduros, sendo o arilo removido manualmente e as sementes colocadas para embeber durante 36 horas em recipiente com água destilada (Wilson & Mahlberg 1978). O tegumento e o endosperma foram retirados e os embriões foram coletados e processados para os estudos anatômicos.

Para a obtenção de plântulas, 400 sementes, após remoção manual do arilo, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos para desinfestação, lavadas em água corrente e em água destilada. Em seguida, foram colocadas em caixas transparentes de germinação sobre papel filtro umedecido com 2,5 vezes o seu peso seco com água deionizada e levadas para germinador Tecnal modelo TE - 401 sob temperatura constante de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo alternado (12 horas de luz e 12 horas de escuro - lâmpadas Phillips tipo luz do dia), sendo monitoradas diariamente. Para controle fúngico as sementes foram tratadas com solução de Nistatina 1% em dias alternados. Após o início da germinação, determinado pela protrusão da raiz primária, as plântulas foram transferidas para caixas transparentes contendo vermiculita autoclavada e, posteriormente, transferidas para tubetes plásticos contendo o mesmo substrato e mantidas no germinador nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo. A partir do 30º até o 80º dias, ainda no germinador, cada indivíduo

passou a ser tratado com aproximadamente 6 mL de solução nutritiva número 2 de Hoagland & Arnon (1950) em dias alternados.

Considerou-se plântula a fase transcorrida entre a protrusão da raiz primária e a expansão do primeiro eofilo (ou primeiro par) e planta jovem as diversas formas apresentadas pelo indivíduo até a produção e expansão do primeiro metafile (*sensu* Oliveira 2001). A partir dessa fase considerou-se planta. A definição do metafile foi feita com base na análise das plantas utilizadas como matrizes.

Neste estudo, optamos por trabalhar com plântulas de 20 dias após a germinação (determinada pela emissão da raiz primária) e plantas com 80 dias, as quais já apresentavam crescimento secundário incipiente.

Amostras de embriões maduros (íntactos e fragmentados), de plântulas (ápice caulinar; cotilédones ínteiros; terços apical, mediano e basal do hipocótilo; colo; ápice, região de absorção e região de ramificação da raiz principal) e de plantas (ápice caulinar; terços apical, mediano e basal de metafiles e eofilos, cotilédones ínteiros; entrenós acima do epicótilo; epicótilo; terços apical, mediano e basal do hipocótilo; colo; ápice, região de absorção e região de ramificação da raiz principal), coletadas com o auxílio de uma lâmina aquecida para evitar o extravasamento do látex (Milanez 1960/1961), foram fixadas em mistura de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24h e levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos; o armazenamento foi feito em etanol 70%. Parte do material foi desidratado em série etílica e infiltrado em historresina (Leica Historesin®), segundo protocolo do fabricante. Secções transversais e longitudinais, com aproximadamente 5 µm de espessura, obtidas com uso micrótopo rotativo e navalha de aço do tipo C, foram coradas com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montadas com Entelan®. Outra parte do material fixado foi seccionada com auxílio de micrótopo de Ranvier e as secções (cerca de 12 µm de espessura) foram clarificadas em hipoclorito de sódio a 20%, lavadas em água acética 1%, coradas com Safrablau (Bukatsch 1972; Burger & Richter 1991) e montadas com glicerina ou gelatina glicerinada.

Secções de material fresco e/ou material fixado (incluído em historresina) foram tratadas com sudan IV (Johansen 1940) e sudan black (Pearse 1980) para detecção de lípidios totais; solução de vermelho de rutênio 0,02% para polissacarídeos diversos e pectina (Jensen 1962); reagente de Lugol para grãos de amido (Johansen 1940); solução aquosa de cloreto férrico 10% para substâncias fenólicas (Johansen 1940); floroglucinol acidificado para lignina (Sass 1951); solução de azul mercúrio de bromofenol para detecção de proteínas totais (Mazia *et al.* 1953); reagente de Nadi para terpenos (David & Carde 1964); ácido periódico/reagente

de Schiff (PAS) para polissacarídeos neutros (McManus 1948); reagente de Dragendorff para alcalóides (Svendsen & Verpoorte 1983); e acetato cúprico 7% para resinas (Johansen 1940). As lâminas foram montadas em solução aquosa de glicerina 1:1.

As imagens digitais foram obtidas em microscópio Olympus BX41 acoplado a câmera digital Olympus C7070. As escalas foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

Resultados

Nas sementes maduras e embebidas, o embrião é axial, tem cerca de 5 mm de comprimento e composto por dois cotilédones brancos, foliáceos, sésseis, justapostos e subiguais com venação evidente na face abaxial, unidos pelas bases ao eixo embrionário branco, cilíndrico, com a extremidade radicular exposta; a plúmula mostra-se indiferenciada.

Plântulas com 20 dias apresentam os dois cotilédones completamente expandidos e com pecíolo evidente; hipocótilo com cerca de 40 mm de comprimento e a raiz principal cerca de 50 mm. Plantas com 80 dias apresentam 2 a 3 pares de metafilos e o eixo caulinar com cerca de 80 mm de comprimento composto pelo hipocótilo, epicótilo e um a dois entrenós subjacentes ao ápice caulinar; a raiz principal tem cerca de 95 mm de comprimento. Nesta fase do desenvolvimento vegetativo, os cotilédones são senescentes e os tecidos vasculares, antes em feixes individualizados, se apresentam como um anel vascular contínuo no hipocótilo, região basal do epicótilo e região proximal da raiz primária. Produção de floema e xilema secundários e início de instalação do felogênio foram observados no hipocótilo e epicótilo.

Distribuição

Laticíferos ocorrem por todo o corpo do embrião (Fig. 1A-E e 2A-E), plântula e planta (Fig. 3A-C, 4A-E, 5A-C, 6A-C e 7A-F).

A secreção, *in vivo*, de amostras do sistema aéreo e subterrâneo da plântula e planta é liberada imediatamente após o seccionamento e apresenta coloração branca leitosa de aspecto denso, sendo menos denso na raiz. Em função do tamanho diminuto do embrião, não foi possível observar as características da secreção ao seccioná-lo.

Os laticíferos no embrião (Fig. 1A-E e 2A-E) e nos ápices caulinar (Fig. 3A-C) e radicial (Fig. 4A-C), de plântulas e plantas, ocorrem associados ao procâmbio e ao meristema fundamental, não sendo observados laticíferos invadindo o promeristema. Nos tecidos diferenciados de plântulas e plantas (Fig. 4D e E, 5A-C, 6A-C, 7A-F e 8A-D), os laticíferos

ocorrem imersos no parênquima e associados ao floema. O calibre dos laticíferos é variável, sendo, geralmente, mais espessos na periferia dos órgãos e mais estreitos quando associados ao floema (Fig. 4E, 6A e B). Os laticíferos presentes na região nodal, na periferia do cilindro vascular (Fig. 6C) e nas lâminas foliares (Fig. 5A) apresentam-se como um sistema mais ramificado do que nas demais partes do corpo vegetal.

Organização anatômica e ontogênese

Embrião

No embrião, em secções longitudinais, os laticíferos ocorrem em fileiras axiais e são distinguíveis das células adjacentes por apresentarem-se axialmente alongados, protoplasto geralmente granuloso e núcleo(s) esférico(s) com nucléolo proeminente (Fig. 1A, B e C). Em secções transversais na região do nó cotiledonar é comum a formação de projeções laterais, horizontais a oblíquas, entre os laticíferos e entre esses e as células do meristema fundamental adjacentes, as quais passam a fazer parte dos laticíferos (Fig. 1D e E). No terço mediano do eixo embrionário, os laticíferos são mais alongados axialmente e apresentam dois ou mais núcleos por célula (Fig. 2A-C). É possível observar a conexão entre laticíferos de séries longitudinais adjacentes pelas paredes terminais rombudas e ligeiramente oblíquas, sugerindo a formação de um sistema anastomosado (Fig. 2A); também são observadas fusões de protoplasto de laticíferos vizinhos e de laticíferos com outras células do meristema fundamental (Fig. 2C), além de laticíferos com projeções apicais tubulares (Fig. 1C) por entre células adjacentes sugerindo a ocorrência de crescimento apical intrusivo. Os laticíferos próximos ao ápice radicular são mais delgados do que nas demais regiões do embrião (Fig. 2D e E).

Plântulas e plantas

Em todas as regiões analisadas do corpo primário de plântulas e plantas, em secção longitudinal, os laticíferos se distinguem das células vizinhas pela sua forma alongada, contorno e diâmetro variáveis, lamela média espessada e rica em compostos pécticos e conteúdo protoplasmático de aspecto variável, geralmente, granuloso, podendo apresentar um a vários núcleos esféricos a elipsóides com nucléolo evidente (Fig. 3A-C). É comum, tanto em regiões meristemáticas quanto em regiões diferenciadas dos sistemas caulinar e radicular a ocorrência de fusões de protoplastos entre laticíferos de uma mesma série axial ou, conexões laterais entre laticíferos adjacentes originando um sistema articulado anastomosado (Fig. 3A, 4A-D, 5A-C). A presença de protuberâncias laterais (Fig. 3B, 7A) e projeções apicais (Fig. 7B

e C) em laticíferos sugere que essas células apresentam crescimento intrusivo. Também são observadas células únicas, axialmente alongadas, com crescimento apical intrusivo, multinucleadas, sem resquícios de septos e com ramificação lateral (Fig. 7B), sendo impossível determinar, neste estágio, se é um laticífero articulado anastomosado ou um laticífero não-articulado ramificado. Especialmente nas regiões nodais, na periferia do cilindro vascular (Fig. 6C), as ramificações de laticíferos são mais evidentes, originando configurações em formato-Ψ (Fig. 5B) e formato-Y (Fig. 5C e 6C); as ramificações podem apresentar (Fig. 5B e C) ou não (detalhe na Fig. 6C) resquícios de paredes transversais ou oblíquas.

No sistema caulinar, os laticíferos associados aos parênquimas do córtex, medula (Fig. 6A) e mesofilo (Fig. 8C), portanto de origem do meristema fundamental, geralmente, possuem calibre maior (Fig. 5A, 6A e 8C), sendo comum a ocorrência de seqüências axiais de células laticíferas retangulares curtas com paredes transversais íntegras (Fig. 5A e 7D); também, podem ocorrer laticíferos alongados com evidências de anastomoses por dissolução de paredes terminais das células (Fig. 7C); além disso, podem ocorrer fusões do laticífero com células parenquimáticas adjacentes (Fig. 7E), as quais se convertem em laticíferos, levando à ramificação lateral do sistema laticífero anastomosado. Já, os laticíferos associados ao floema, portanto de origem procambial, caracterizam-se pelo menor calibre e protoplasto com conteúdo mais denso (Fig. 5A, 6A e 8B). Nas lâminas foliares, laticíferos de ambas as origens podem crescer e se ramificar por entre os espaços intercelulares (Fig. 8 A e C). Desde o início do desenvolvimento dos primórdios foliares já são observados laticíferos acompanhando o procâmbio que adentra o primórdio (Fig. 3A).

Nas diferentes regiões da raiz primária, exceto no promeristema onde estão ausentes, os laticíferos são delgados e alongados e são observadas fusões de protoplastos entre laticíferos de uma mesma série ou entre séries laterais adjacentes, o que sugere tratar-se de laticíferos articulados anastomosados (Fig. 4A-D). Esses laticíferos são observados, predominantemente, por entre os espaços intercelulares (Fig. 4A-D).

Nas regiões mais velhas do caule de plantas com 80 dias, onde o câmbio se encontra instalado, em adição ao sistema primário de laticíferos são produzidos laticíferos a partir do câmbio vascular em direção ao floema secundário (detalhe Fig. 7F).

Caracterização histoquímica do protoplasto e da parede celular dos laticíferos

Os dados dos testes histoquímicos estão sumarizados na tabela 1. A parede dos laticíferos reagiu positivamente ao PAS e vermelho de Rutênio, indicando que são paredes

primárias de natureza pécto-celulósica. O conteúdo do protoplasto reagiu positivamente ao sudan black e sudan IV, indicando presença de lipídios totais; ao reagente de Nadi, produzindo uma cor violeta, indicando presença de mistura de óleos essenciais e ácidos resínicos e, ao azul mercúrio de bromofenol indicando a presença de proteínas totais. O conteúdo celular dos laticíferos no hipocótilo e o epicótilo da plantas reagiu positivamente ao reagente de Dragendorff, indicando a presença de alcalóides. A reação positiva para o reagente de Lugol foi observada nos laticíferos presentes no hipocótilo de plântulas e plantas e no entrenó subjacente ao ápice caulinar da planta, indicando a presença de amido no látex dessas regiões. Não foi detectada reação aos testes com acetato cúprico e cloreto férrico em nenhuma fase estudada. Reação positiva aos tratamentos com azul mercúrio de bromofenol e reagentes de Nadi, Lugol e Dragendorff foi observada no interior dos elementos de vaso nas diferentes regiões do eixo caulinar e raiz, semelhante ao observado nos laticíferos, indicando a presença de látex no interior dos vasos.

Discussão

Embora para Apocynaceae a maioria dos laticíferos descritos seja do tipo não-articulado (Rao & Malaviya 1966; Yoder & Mahlberg 1976; Wilson & Mahlberg 1978; Murugan & Inamdar 1987a, b; Wilson & Malhberg 1978, 1980; Inamdar *et al.* 1988; Roy & De 1992, Mahlberg 1993; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), em *T. catharinensis* ocorrem laticíferos articulados, anastomosados e não-anastomosados, com crescimento intrusivo e, possivelmente, laticíferos não-articulados ramificados. Crescimento intrusivo é comumente associado à maneira de crescimento e ramificação de laticíferos não-articulados (Fahn 1979; Evert 2006). Contudo, crescimento intrusivo já foi reportado para laticíferos articulados para alguns gêneros de Euphorbiaceae como *Hevea*, *Manihot* e *Cnidoscolus* (Rudall 1987).

Ocorrência de mais de um tipo de laticífero em uma mesma espécie de Apocynaceae foi relatada para *Tabernaemontana coronaria* (Rao & Malaviya 1966). Em *T. coronaria* apesar da presença de paredes celulares parcialmente dissolvidas ou septos entre laticíferos desenvolvidos, os autores optaram por classificar o tipo de laticífero como não-articulado não-ramificado ou raramente ramificado, justificando que a ocorrência de laticíferos articulados eram pouco freqüentes. A presença de mais de um tipo de laticífero num mesmo órgão ou em uma mesma espécie tem sido relatada em espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) (Dehgan & Craig 1978).

A origem, estrutura e desenvolvimento dos laticíferos no embrião maduro de *T. catharinensis* são semelhantes ao descrito para o embrião maduro *Nerium oleander* por Milanez (1977), diferindo na densidade de ramificações dos laticíferos na região do nó cotiledonar, que é pouco freqüente em *T. catharinensis* e formam um plexo em *N. oleander*. O estudo da ontogênese de laticíferos em embriões maduros de Apocynaceae também foi realizado em *Nerium oleander* (Milanez 1977), *Asclepias syriaca* (Wilson & Mahlberg 1978) e espécies de *Mandevilla* (Apezato-da-Glória & Estelita 1997). Segundo Milanez (1977) embriões maduros guardam sinais evidentes de processos histogênicos o que permite discutir certas questões referentes à formação e ao desenvolvimento dos laticíferos durante a embriogênese.

Como observado no presente trabalho, os laticíferos do sistema primário de *T. catharinensis* podem apresentar diferentes origens, a partir do meristema fundamental, procâmbio; além disso, células parenquimáticas na região cortical do caule, nervura principal e mesofilo podem ser adicionadas aos laticíferos. O acréscimo de células ao sistema primário de laticíferos foi relatado para outras espécies de Apocynaceae (Milanez 1959; Milanez 1977; Murugan & Inamdar 1987b; Apezato-da-Glória & Estelita 1997; Demarco *et al.* 2006; Demarco & Castro 2008; Lopes *et al.* 2009).

Segundo Milanez (1977), a formação de novos ramos horizontais nos laticíferos do embrião maduro de *Nerium oleander*, geralmente, parece ser resultado de ação indutora do laticífero sobre uma célula vizinha do meristema fundamental; o laticífero emite uma projeção lateral fina que penetra no citoplasma da célula vizinha e, posteriormente, essa célula se diferencia apresentando características de laticíferos. Esse mesmo processo foi observado no embrião e nas células do parênquima cortical do caule de plântulas e plantas de *T. catharinensis*.

Os laticíferos presentes nas diferentes regiões da raiz primária de plântulas e plantas de *T. catharinensis* são mais delgados do que os presentes no sistema caulinar e ocorrem por entre os espaços intercelulares, o que dificultou sua visualização. Existem poucas informações sobre a ocorrência e distribuição de laticíferos em raízes (Fahn 1979) e, segundo Apezato-da-Glória & Estelita (1997), a escassez de informações deve-se ao fato do pequeno diâmetro dos laticíferos dos órgãos subterrâneos quando comparados aos de outros órgãos; outros autores também observaram essa variação no calibre dos laticíferos em órgãos aéreos e raiz (Metcalf & Chalk 1950; Murugan & Inamdar 1987b). Entretanto, também há registros de laticíferos facilmente distinguíveis em raízes de uma espécie de Apocynaceae (Lopes *et al.* 2009).

A origem de laticíferos a partir iniciais ou derivadas do câmbio vascular tem sido freqüentemente relatada para laticíferos articulados (Fahn 1979; Evert 2006; Metcalfe 1967; Rudall 1989; Lopes *et al.* 2009). A presença de laticíferos de origem secundária, como observado no floema secundário em *T. catharinensis* neste trabalho foi preliminarmente relatada por Gimenez (2004) para esta espécie. Segundo Gimenez (2004), os laticíferos ocorrem esparsamente na região do floema secundário colapsado e foram classificados como sendo do tipo articulado não-ramificado. No presente trabalho, não foi possível classificar o tipo de laticífero e nem confirmar sua origem, se a partir das iniciais ou derivadas cambiais.

A detecção histoquímica de lipídeos, proteínas e terpenos no lume de elementos de vaso na raiz, caule e folhas de *T. catharinensis* sugere a presença de laticíferos no interior desses elementos, sendo este um fato comumente relatado para diferentes espécies laticíferas (De Castells *et al.* 1984; Cortella 1989; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Jacomassi *et al.* 2007).

Como já relatado para outras espécies de Apocynaceae (Fahn 1979; Matile 1987; Demarco *et al.* 2006; Demarco & Castro 2008; Lopes *et al.* 2009), a distinção de laticíferos das demais células meristemáticas no embrião e nos ápices radicial e caulinar de *T. catharinensis*, facilmente evidenciada pelas características morfológicas e histoquímicas dos laticíferos, revela que estas estruturas diferenciam-se rapidamente e tornam-se secretoras precocemente, enquanto, os tecidos do entorno encontram-se em diferenciação.

Grãos de amido, sem morfologia específica, foram localizados nos laticíferos do hipocótilo de plântulas e plantas e nos entrenós próximos ao ápice caulinar de plantas. Mudanças na presença/ausência dos grãos de amido em laticíferos podem estar associadas com as diferentes fases do desenvolvimento vegetativo em que as análises foram realizadas, como relatado para *Nerium oleander* por Milanez (1977).

Grãos protéicos, gotas de lipídeos e terpenos foram detectados no protoplasto de laticíferos em todas as regiões analisadas do eixo vegetativo *T. catharinensis*, sendo impossível neste trabalho associar a reação com o tipo de laticífero. A presença de uma variedade de substâncias químicas no látex, entre elas terpenóides, proteínas e lipídeos é uma característica comum a diferentes espécies laticíferas (Fahn, 1979; Evert 2006 e literatura citada). De modo geral, os testes histoquímicos utilizados indicam que a natureza das paredes celulares e a composição do protoplasto dos laticíferos difere muito pouco nas diferentes fases do desenvolvimento e nos diferentes órgãos analisados. O papel dos laticíferos como um sistema envolvido com o seqüestro de metabólitos secundários tóxicos, que podem funcionar

como proteção contra herbívoros e patógenos foi ressaltado por diferentes autores (Farrell *et al.* 1991; Evert 2006).

Evidências circunstanciais e experimentais têm comprovado o papel do látex como um potente sistema de defesa contra herbívoros mandibulados, além de atuar como selante de ferimentos ao coagular quando exposto ao ar (Agrawal & Konno 2009; Konno 2011). Pesquisas têm demonstrado que folhas com laticíferos articulados são melhor protegidas contra herbívoros mandibulados em relação às que possuem laticíferos não-articulados, pois um único corte no laticífero não-articulado da nervura principal interrompe todo o fluxo do látex acima do local predado; no caso do laticífero articulado anastomosado, mesmo que o inseto corte várias nervuras, existem outras rotas para a continuidade do fluxo (Agrawal & Konno 2009 e literatura citada). Segundo Agrawal & Konno (2009) diversas linhas de evidência demonstram que a produção de látex é afetada pelos níveis de luz, déficit de água, umidade e fertilidade do solo e pressão de herbivoria; além disso, estudos têm demonstrado que espécies vegetais relacionadas variam até dez vezes em sua produção de látex dependendo das condições bióticas e abióticas.

Embora não tenhamos evidências experimentais, sugerimos que a diversidade de tipos de laticíferos em *T. catharinensis* poderia otimizar a defesa dessas plantas face às condições ambientais extremas a que essas plantas estão submetidas, incluindo intensidades luminosas altas, estresse hídrico, solos pobres em nutrientes, pressão de herbivoria, entre outros fatores ambientais, sendo esta hipótese objeto de estudos futuros. Adicionalmente, considerando que as plântulas de *T. catharinensis* são fanerocotiledonares e, portanto vulneráveis aos fatores ambientais adversos (Rodrigues *et al.* 2011), é inegável a proteção conferida pelos laticíferos desde as fases iniciais do seu desenvolvimento vegetativo.

Agradecimentos

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado à primeira autora e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo suporte financeiro (TEM-Biota Proc. 2008/55434-7).

Referências bibliográficas

Achenbach, H.; Benirshke, M. & Torrenegra, R. 1997. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. **Phytochemistry** 45 (2): 325-335.

- Agrawal, A.A. & Konno, K. 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 40: 311-331.
- Almeida, L.; Cintra, A.C.O.; Veronese, E.L.G.; Nomizo, A.; Franco, J.J.; Arantes, E.C.; Giglio, J.R. & Sampaio, S.V. 2004. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology** 137: 19-27
- Appezato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 66: 301-306.
- Araújo, A.R.; Kascheres, C.; Fujiwara, F. & Marsaioli, A.J. 1984. Catharinensine, an oxindole alkaloid from *Peschiera catharinensis*. **Phytochemistry** 23(10): 2359-2363.
- Batina, M.F.; Cintra, A.C.; Veronese, E.L.; Lavrador, M.A.; Giglio, J.R.; Pereira, P.S.; Dias, D.A.; França, S.C. & Sampaio, S.V. 2000. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica** 66: 424-428.
- Blaser, H.W. 1945. Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. **American Journal of Botany** 32: 135-141.
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos** 61:255.
- Burger, L.M. & Richter, H.G. 1991. **Anatomia da Madeira**. Nobel, São Paulo, 154 p.
- Cortella, A.R. 1989. Secretory tissue in *Ipomea purpurea* (Convolvulaceae), Laticifers and glands. **Darwiniana** 29: 17-23
- David, R. & Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris** 258: 1338-1340.
- De Castells, A.R.C.; Osmond, W.T. & Braconi, A. 1984. Contribuição ao estudo da biologia de *Jatropha gossipifolia* L. (Euphorbiaceae): I. Laticíferos e Glândulas. **Revista Brasileira de Biologia** 44: 149-158.
- Dehgan, B. & Craig, M.E. 1978. Types of laticifers and crystals in *Jatropha* and their taxonomic implications. **American Journal of Botany** 65(3): 345-352.
- Demarco, D. & Castro, M.M. 2008. Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas. **Revista Brasileira de Botânica** 31(4): 701-713.

- Demarco, D.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. **Revista Brasileira de Botânica** 29(1): 133-144.
- Endress, M.E.; Van der Ham, R.W.J.M.; Nilsson, S.; Civeyrel, L.; Chase, M.W.; Sennblad, B.; Potgieter, K.; Joseph, J.; Powell, M.; Lorence, D.; Zimmerman, Y.M. & Albert, V.A. 2007. A phylogenetic analysis of Alyxieae (Apocynaceae) based on rbcL, matK, trnLintron, trnL-K spacer sequences, and morphological characters. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 94(1): 1-35.
- Evert, R.F. 2006. **Esau's plant anatomy**, 3ed. Wiley-Interscience: New York.
- Fahn, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. London, Academic Press.
- Fahn, A. 1990. **Plant anatomy**. 4th ed., Oxford, Pergamon Press.
- Farrell, B.D.; Dussourd, D.E. & Mitter, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? **American Naturalist** 138(4): 881-900.
- Federici, E.; Palazzino, G.; Nicoletti, M. & Galeffi, C. 2000. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. **Planta Medica** 66(1): 93-95.
- Figueiredo, E.R.; Vieira, I.J.C.; Souza, J.J.; Braz-Filho, R.; Mathias, L.; Kanashiro, M.M. & Côrtes, F.H. 2010. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* (A. DC.), Apocynaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(1): 75-81.
- Gimenez, A.M. 2004. Anatomia de leño y corteza de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC (Apocynaceae). **Quebracho** 11: 22-33.
- Giordani, R. 1978. Autophagie cellulaire et differenciation des laticiferes non articulés chez une Asclepiade. **Biologie Cellulaire** 33: 253-260.
- Gomes, A.; Das, R.; Sarkhel, S.; Mishra, R.; Mukherjee, S.; Bhattacharya, S. & Gomes, A. 2010. Herbs and herbal constituents active against snake bite. **Indian Journal of Experimental Biology** 48: 865-878
- Hanstein, I. 1864. Die Milchsaftgefäße und deren Stellung in dem Gefäßbündelsysteme der milchenden Gewächse. Rotterdam *apud* Milanez, F.R. 1977. Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium (Nerium) oleander* L. **Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica**, Rio de Janeiro 1975: 343-379.
- Hoagland, D.R. & D.I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular** 347: 1-32.
- Inamdar, J.A.; Murugan, V. & Subramanian, R.B. 1988. Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. **Annals of Botany** 62(6): 583-588.

- Jacomassi, E.; Moscheta, I.S. & Machado, S.R. 2007. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). **Acta Botânica Brasileira** 21(3): 575-597.
- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company 523p.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology** 27: 137-138.
- Koch, I. & Rapini, A. 2011. Apocynaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB004861>).
- Konno, K. 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry** 72 (13): 1510-1530.
- Leeuwenberg, A.J.M. 1994. **A Revision of *Tabernaemontana*. The new world species and *Stemmadenia***. UK: Royal Botanic.
- Lopes, K.L.B.; Thadeo, M.; Azevedo, A.A.; Soares, A.A. & Meira, R.M.S.A. 2009. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Canadian Journal of Botany** 87(2): 202-209.
- Mahlberg, P.G. 1961. Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. **American Journal of Botany** 48(1): 90-99.
- Mahlberg, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. **Botanical Review** 59(1): 1-23.
- Matile, P. 1987. The sap of the plant cells. **New Phytologist** 105: 1-26.
- Mazia, D.; Brewer, P.A. & Alfert, M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. **Biological Bulletin** 104: 57-67.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** 23: 99-108.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses, v.II**. Clarendon Press: Oxford.
- Metcalf, C.R. 1967. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany** 21(2): 115-127.
- Milanez, F.R. 1959. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – I. Embrião. **Rodriguésia** 21/22(33-34): 347-394.
- Milanez, F.R. 1960/1961. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária. **Rodriguésia** 35/36: 99-128.
- Milanez, F.R. 1966. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - III. Nota sobre a estrutura secundária. **Rodriguésia** 25(37): 335-350.

- Milanez, F.R. 1977. Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium (Nerium) oleander* L. **Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica**, Rio de Janeiro 1975: 343-379.
- Monnerat, C.S.; Souza, J.J.; Mathias, L.; Braz-Filho, R. & Vieira, I.J.C. 2005. A new indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana hystrix* Steud. (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16(6): 1331-1335.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987a. Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. **Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences)** 97(1): 25-31.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987b. Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. **Phytomorphology** 37(2/3): 209-214.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373.
- Oliveira, A.J.B.; Carvalho, V.M.; Ferreira, A.; Sato, F.Y. & Machado, M.F.P.S. 2003. *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore** 27(4): 421-425.
- Oliveira, D.M.T. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. **Revista Brasileira de Botânica** 24(1): 85-97.
- Pearse, A.G.E. 1980. **Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology**. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
- Pereira, P.S.; Dias, D.A.; Franca, S.C.; Toldo, M.P.A. & Albuquerque, S. 1999a. Trypanocidal activity from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticulturae** 501: 165-170.
- Pereira, P. S.; Franca, S.C.; Sampaio, S.V. & Dias, D.A. 1999b. Indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticulturae** 501: 171-176.
- Pereira, P. S.; Franca, S.C.; Sampaio, S.V.; Dias, D.A. 1999c. Indole alkaloid and pentacyclic triterpene contents in several parts of *Tabernaemontana catharinensis* plant. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 51 (suppl): 249.
- Rao, A.R. & Malaviya, M. 1966. The non-articulated laticifers and latex of *Tabernaemontana coronaria* Willd. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India** 32: 233-242.
- Rodrigues, T.M.; Teixeira, S.P. & Machado, S.R. 2011. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–

- Caesalpinioideae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants** 206(6): 585-594.
- Roy, A.T. & De, D.N. 1992. Studies on differentiation of laticifers through light and electron microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. **Annals of Botany** 70: 443-449.
- Rudall, P.J. 1987. Laticifers in Euphorbiaceae – a conspectus. **Botanical Journal of the Linnean Society** 94: 143–163.
- Rudall, P.J. 1989. Laticifers in vascular cambium and wood of *Croton* spp. (Euphorbiaceae). **IAWA Bulletin** 10: 379-383.
- Sacchetti, G.; Ballero, M.; Serafini, M.; Romagnoli, C.; Bruni, A. & Poli, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). **Phyton** 39(2): 265-275.
- Sass, J.E. 1951. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Iowa: State College Press 228 p.
- Serpe, M.D.; Muir, A.J. & Keidel, A.M. 2001. Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticíferos of *Asclepias speciosa* Torr. **Protoplasma** 216: 215-226.
- Simões, A.O.; Endress, M.E. & Conti, E. 2010. Systematics and character evolution of Tabernaemontaneae (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence. **Taxon** 59(3): 772-790.
- Soares, D. C.; Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A. & Saraiva, E.M. 2007. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International** 56: 135-139.
- Solereder, H. 1908. **Systematic anatomy of the dicotyledons**, v.1 e 2. Clarendon Press: Oxford.
- Svendsen, A.B.; Verpoorte, R. 1983. **Chromatography of alkaloids**. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Van Beek, T. A.; Verpoorte, R.; Svendsen, A.B.; Leeuwenberg, A.J. & Bisset, N.G. 1984. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. **Journal Ethnopharmacology** 10: 1-156.
- Veronese, E.L.; Esmeraldino, L.E.; Trombone, A.P.; Santana, A.E.; Bechara, G.H.; Kettelhut, I.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R. & Sampaio, S.V. 2005. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine** 12(1-2): 123-30.

- Wilson, K.J. & Mahlberg, P.G. 1978. Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). **American Journal of Botany** 65(1): 98-109.
- Wilson, K.J. & Maxam, T.E. 1987. Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). **American Journal of Botany** 74: 628-628.
- Yoder, L.R. & Mahlberg, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **American Journal of Botany** 63: 1167-1173.
- Zocoler, M.A.; Oliveira, A.J.B.; Sarragiotto, M.H.; Grzesiuk, V.L. & Vidotti, G.J. 2005. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16(6): 1372-1377.

Tabelas e figuras

Tabela 1. Testes histoquímicos realizados no embrião, plântula com 20 dias e planta com 80 dias após a germinação. Reação positiva (+); reação negativa (-); parede celular (PC); conteúdo celular (CC); reação inespecífica (?).

Reagente	Embrião				Plântula com 20 dias				Planta com 80 dias			
	Inteiro	Cotilédone	Hipocótilo	Raiz primária	Cotilédone	Eofilo	Metafilo	Entrenó próximo ao ápice	Hipocótilo	Epicótilo	Ápice Caulinar	Raiz primária
Sudan IV/ Sudan black	+(CC)	+(CC)	+(CC)	?	+(CC)	?	+(CC)	+(CC)	?	+(CC)	?	
NADI	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	
Floroglucinol acidificado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cloreto ferro III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	+(CC)	+(CC)	-	
Vermelho de rutênio	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	
Lugol	-	?	+(CC)	-	-	-	-	+(CC)	+(CC)	?	-	
PAS	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	+(PC)	
Azul mercúrio de bromofenol	+(CC)	+(CC)	?	+(CC)	-	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	+(CC)	
Acetato cúprico 7%	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Figura 1. A-E. Secções longitudinais e transversais do embrião maduro de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Secção longitudinal, visão geral da parte superior do embrião, mostrando dois cotilédones (CO), plúmula indiferenciada e parte do hipocótilo (HI); setas = laticíferos. **B.** Secção longitudinal da região basal do cotilédone, laticíferos axialmente alongados, protoplasto heterogêneo e núcleo esférico com nucléolo proeminente (ponta de seta). Observar paredes terminais dos laticíferos (seta) se encontrando. **C.** Terço superior do hipocótilo, laticíferos (setas) associados ao meristema fundamental e associado ao protofloema interno e externo. Notar laticífero associado ao protofloema com projeção apical tubular por entre células adjacentes (ponta de seta). **D-E.** Secções transversais do nó cotiledonar. **D.** Laticíferos (setas) com ramificações horizontais; promeristema (PM). **E.** Projeções (pontas de seta) laterais entre laticíferos e células do meristema fundamental adjacente. Coloração: A-E (Azul de Toluidina).

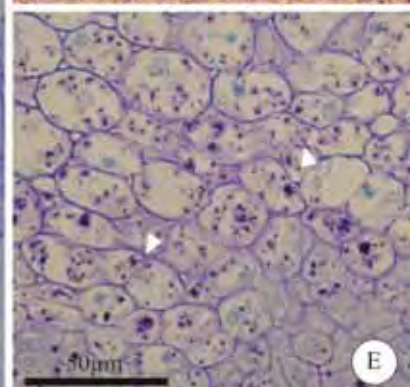
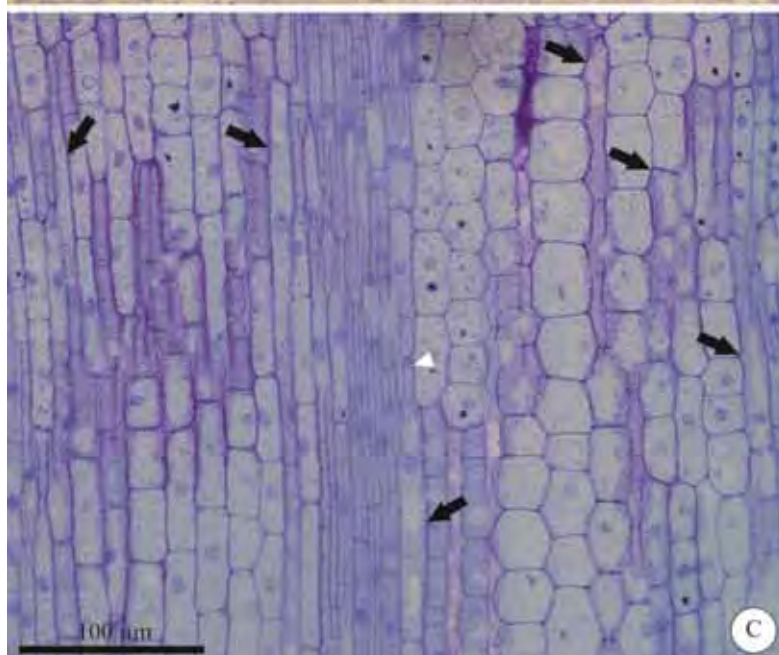
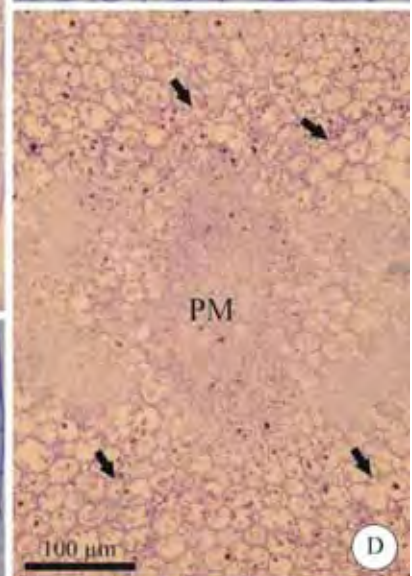
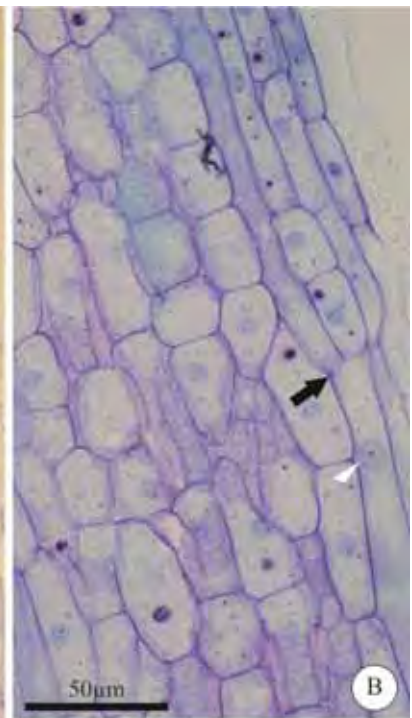
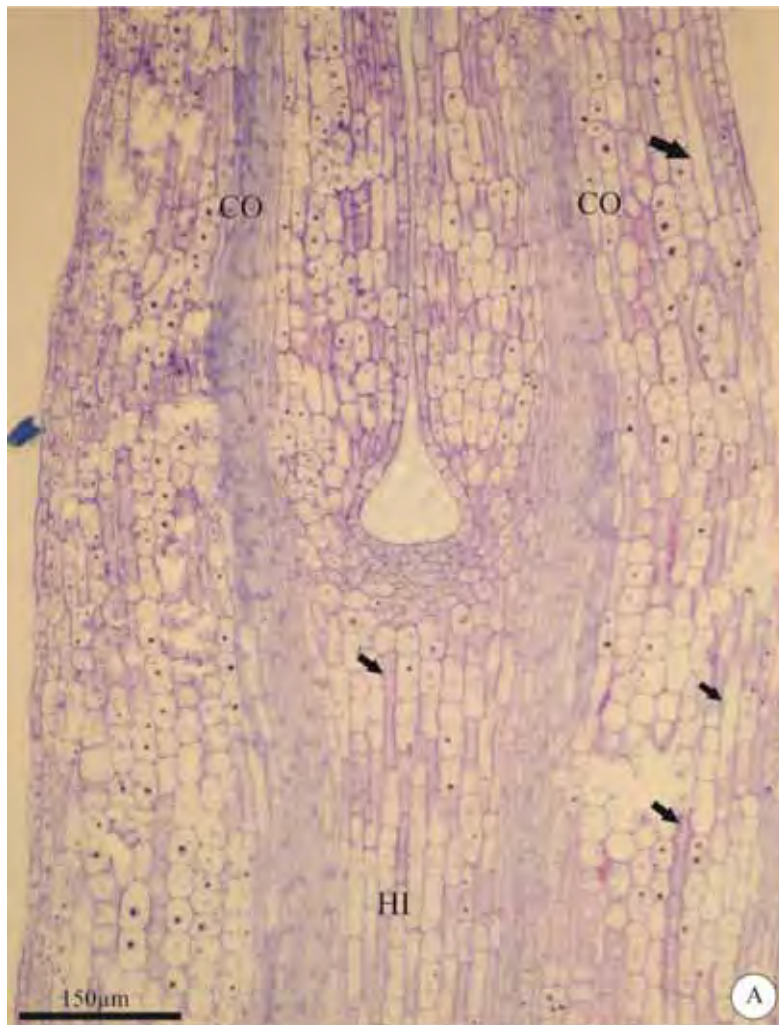


Figura 2. A-E. Secções longitudinais do embrião maduro de *T. catharinensis* A.DC. **A-C.** Secções do terço mediano do hipocótilo. **A.** Região cortical com laticíferos axilamente alongados (setas), com protoplasto granuloso e núcleo(s) esférico(s) (pontas de seta); observar conexões pelas paredes terminais (círculo pontilhado) entre diferentes séries longitudinais de laticíferos adjacentes. **B.** Região medular do hipocótilo, observar laticífero (setas) axialmente alongado com resquícios das paredes terminais, com vacúolo desenvolvido e núcleos esféricos com nucléolo proeminente (pontas de seta) **C.** Região cortical com laticíferos (setas) e fusão de protoplastos (círculo pontilhado). **D-E.** Laticíferos (setas) na radícula. Coloração: A-E (Azul de Toluidina).

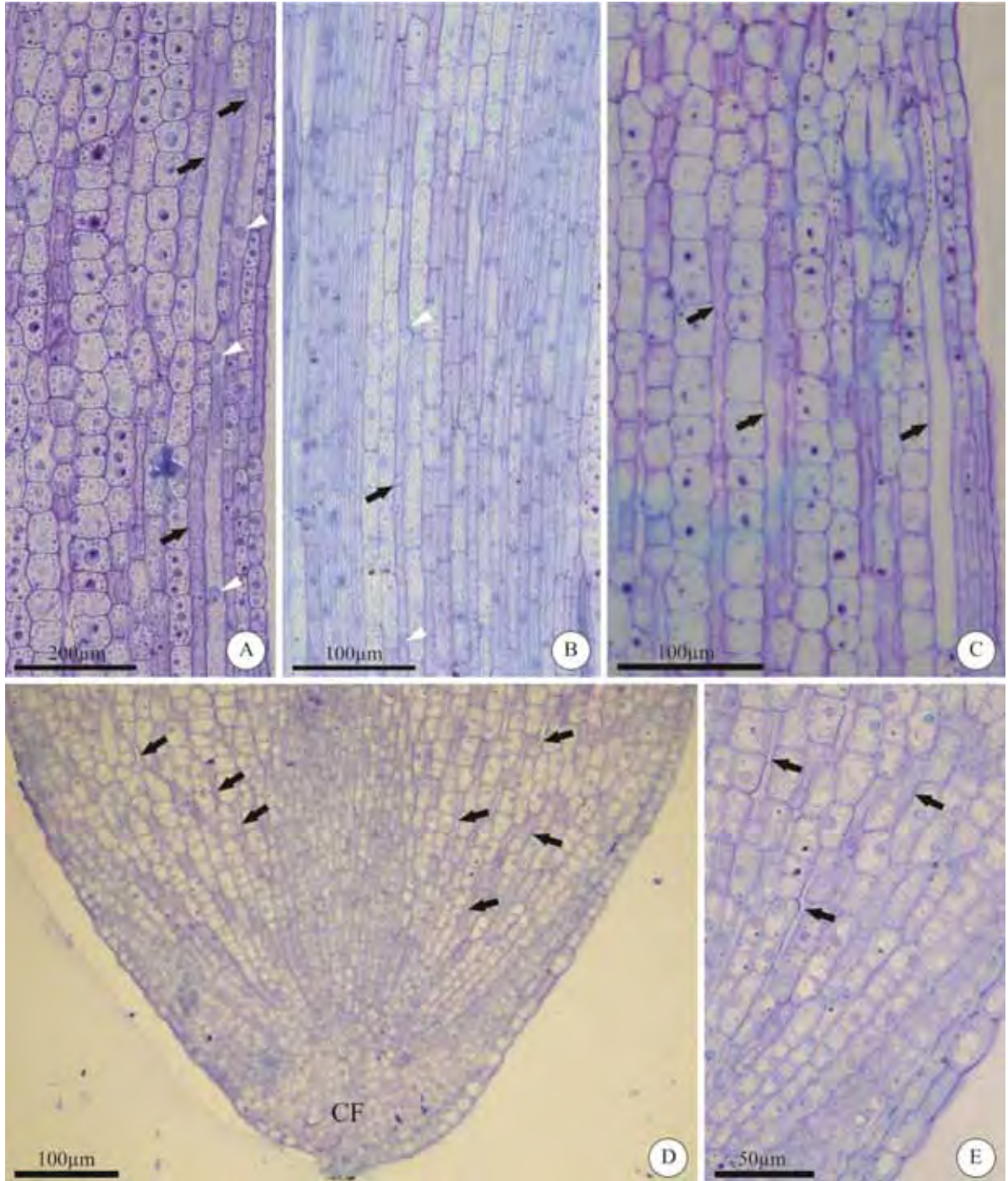


Figura 3. A-C. Secções do ápice caulinar de *T. catharinensis* A.DC. A-B. Secções longitudinais. C. Secção transversal. A. Planta com 80 dias, observar laticíferos (setas) com lamela média espessa e conteúdo granuloso acompanhando os tecidos vasculares e adentrando primórdios foliares. B. Plântula com 20 dias, observar paredes terminais do laticífero parcialmente dissolvidas (seta), lamela média espessa, conteúdo heterogêneo e núcleos elipsóides com nucléolo evidente e protuberâncias laterais, indicando crescimento intrusivo. C. Planta com 80 dias seccionada na altura de um nó próximo ao ápice caulinar, mostrando laticíferos ramificados com conteúdo granular e núcleos (pontas de seta) nas adjacências do sistema vascular. Coloração: A-C (Azul de Toluidina).

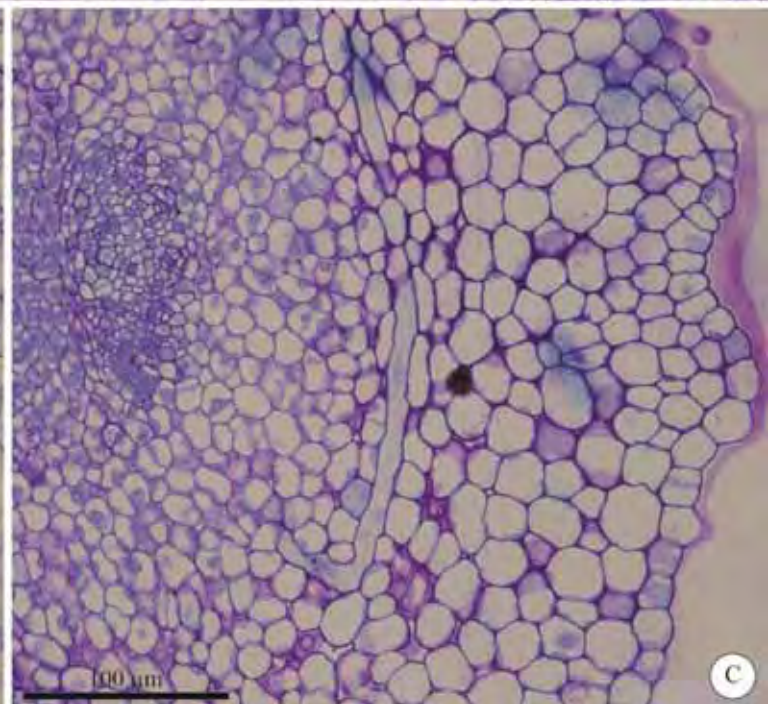
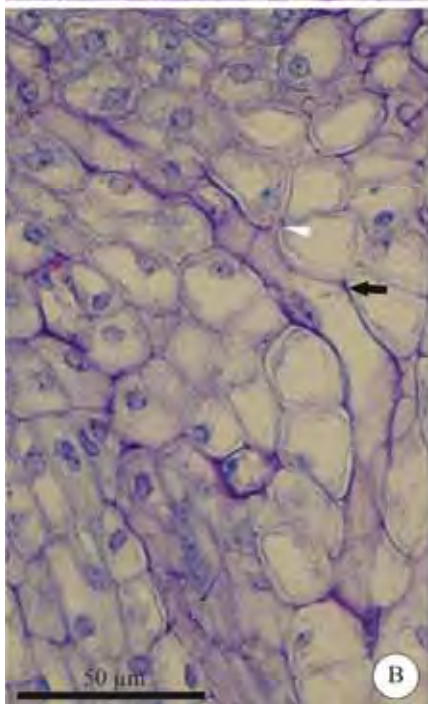
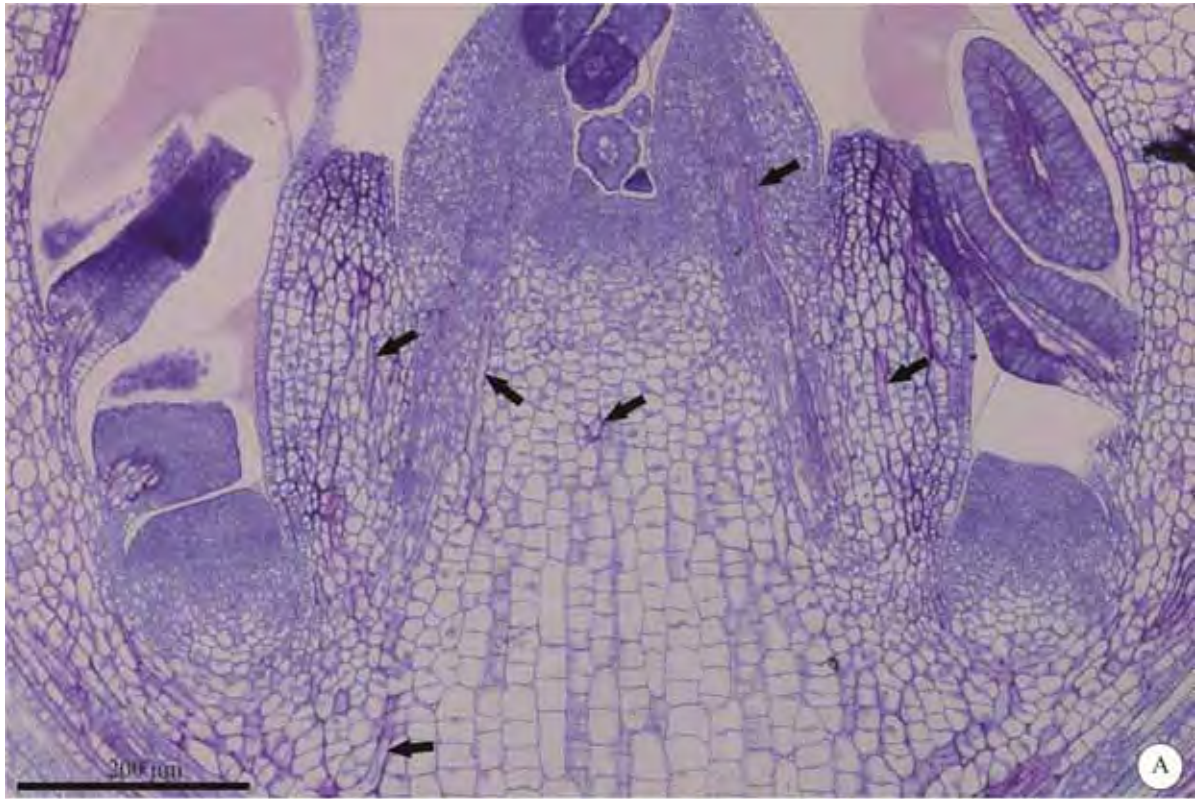


Figura 4. Secções longitudinais de *T. catharinensis* A.DC. **A-C.** Ápice radicial. **A-B.** Planta com 80 dias. Observar laticíferos (setas) delgados e alongados axialmente, com lamela média espessa. **C-D.** Plântula com 20 dias. **C.** Observar laticíferos (setas) delgados, alongados axialmente e com lamela média espessa. **D.** Região de ramificação da raiz, laticíferos (setas) delgados, axialmente alongados imersos entre células parenquimáticas no córtex. **E.** Planta com 80 dias, com laticíferos (setas) imersos no parênquima cortical e associados ao floema na região do colo. Coloração: A-E (Azul de Toluidina).

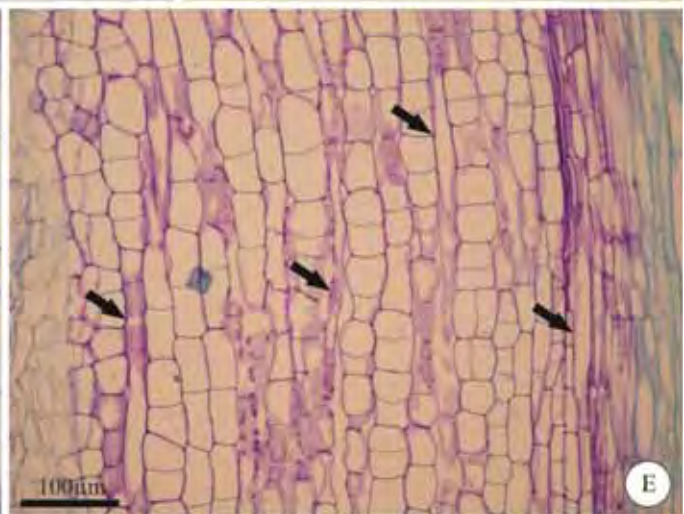
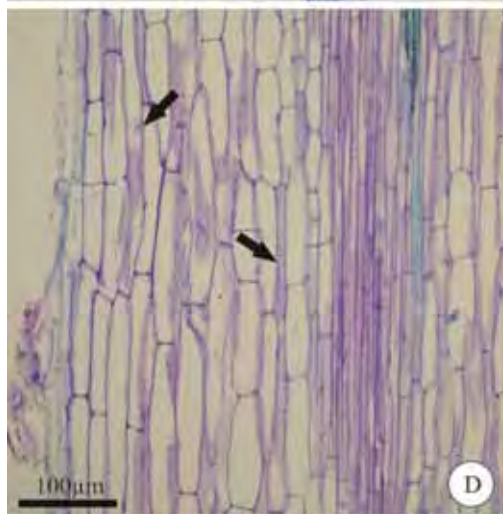
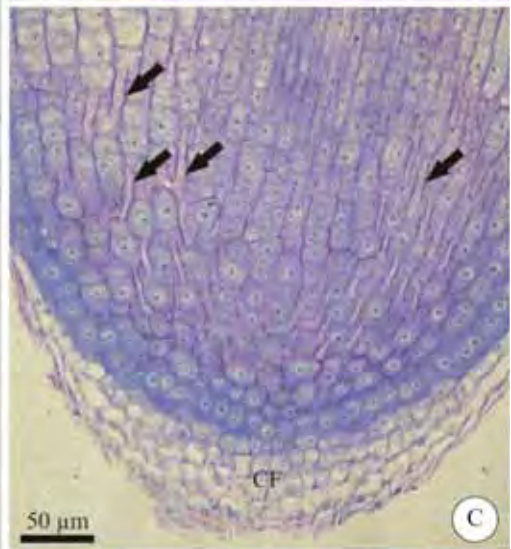
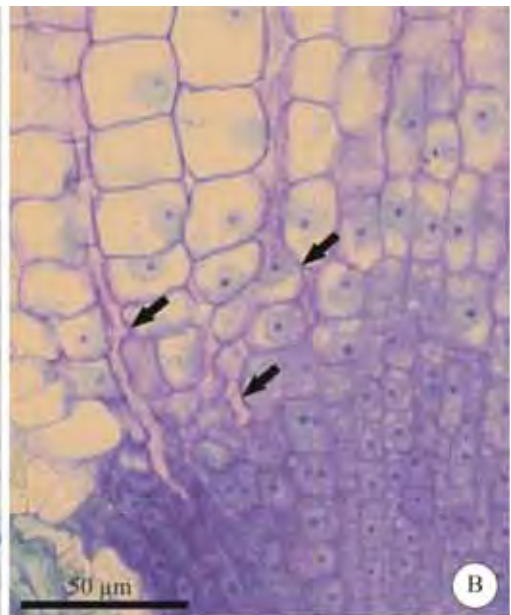
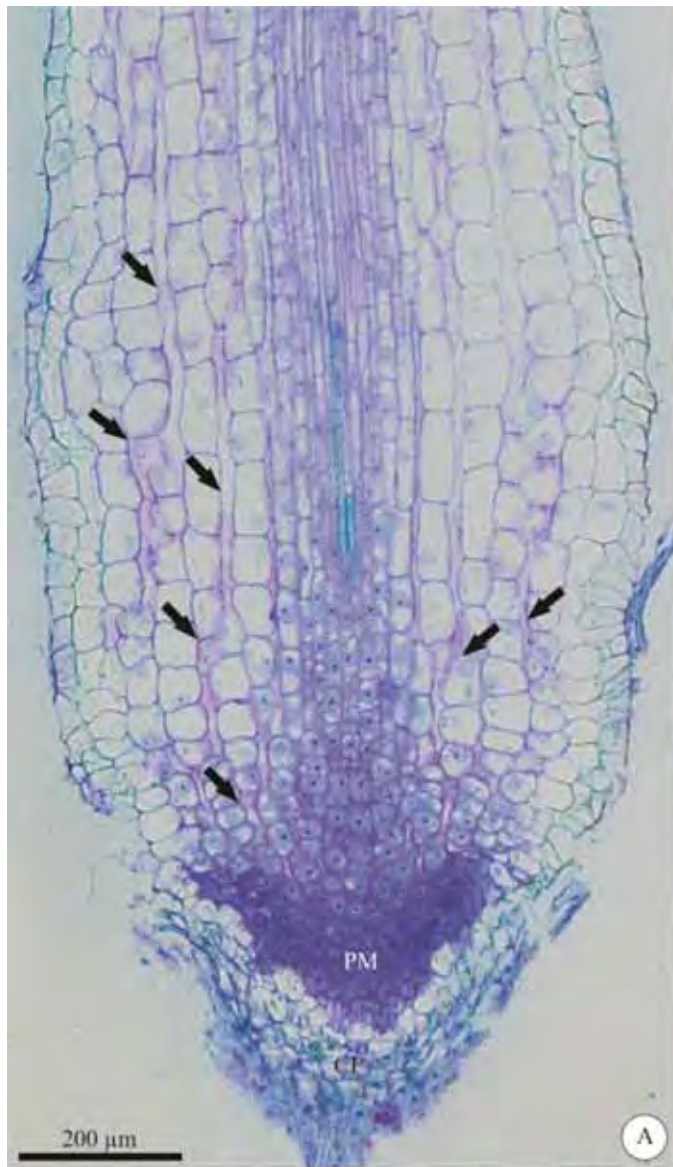


Figura 5. Secções longitudinais de *T. catharinensis* A.DC. **A-C.** Planta com 80 dias, ápice caulinar. **A.** Observar laticíferos (setas) abundantes e com diferentes calibres, os de maior calibre estão dispostos na periferia dos metafílos (ME) e os de menor calibre acompanham o feixe vascular associados ao floema; os laticíferos no primórdio foliar (PF), observado em secção paradérmica, mostram-se mais ramificados. CA= caule; GL= gema lateral. **B-C.** Laticíferos com ramificação em formato- Ψ e formato-Y com paredes terminais total ou parcialmente ausentes. Coloração: A-E (Azul de Toluidina).

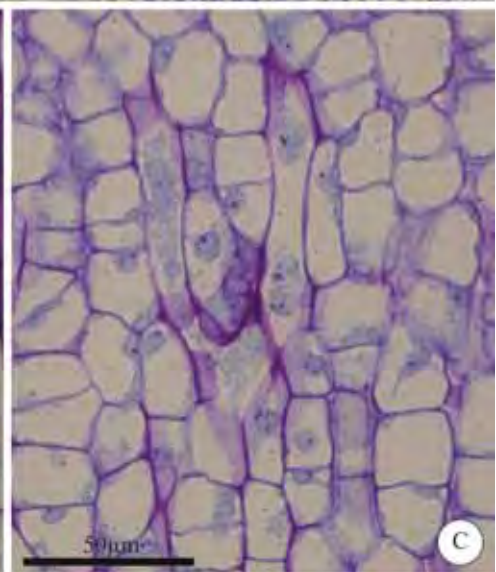
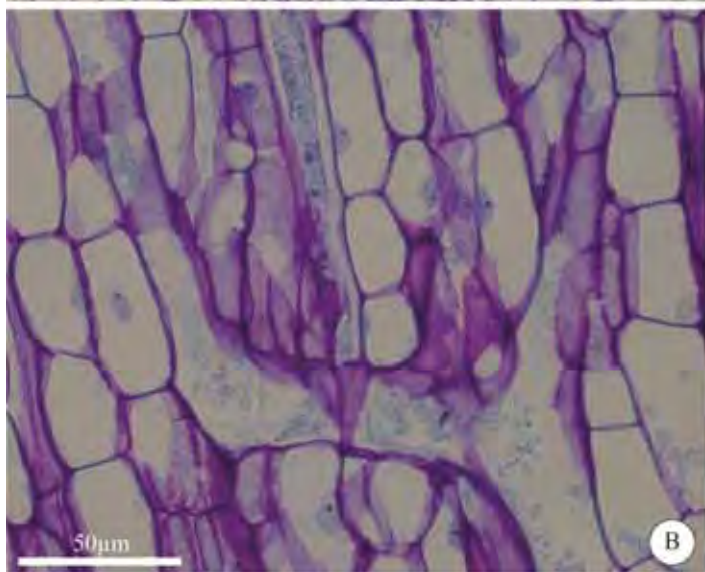
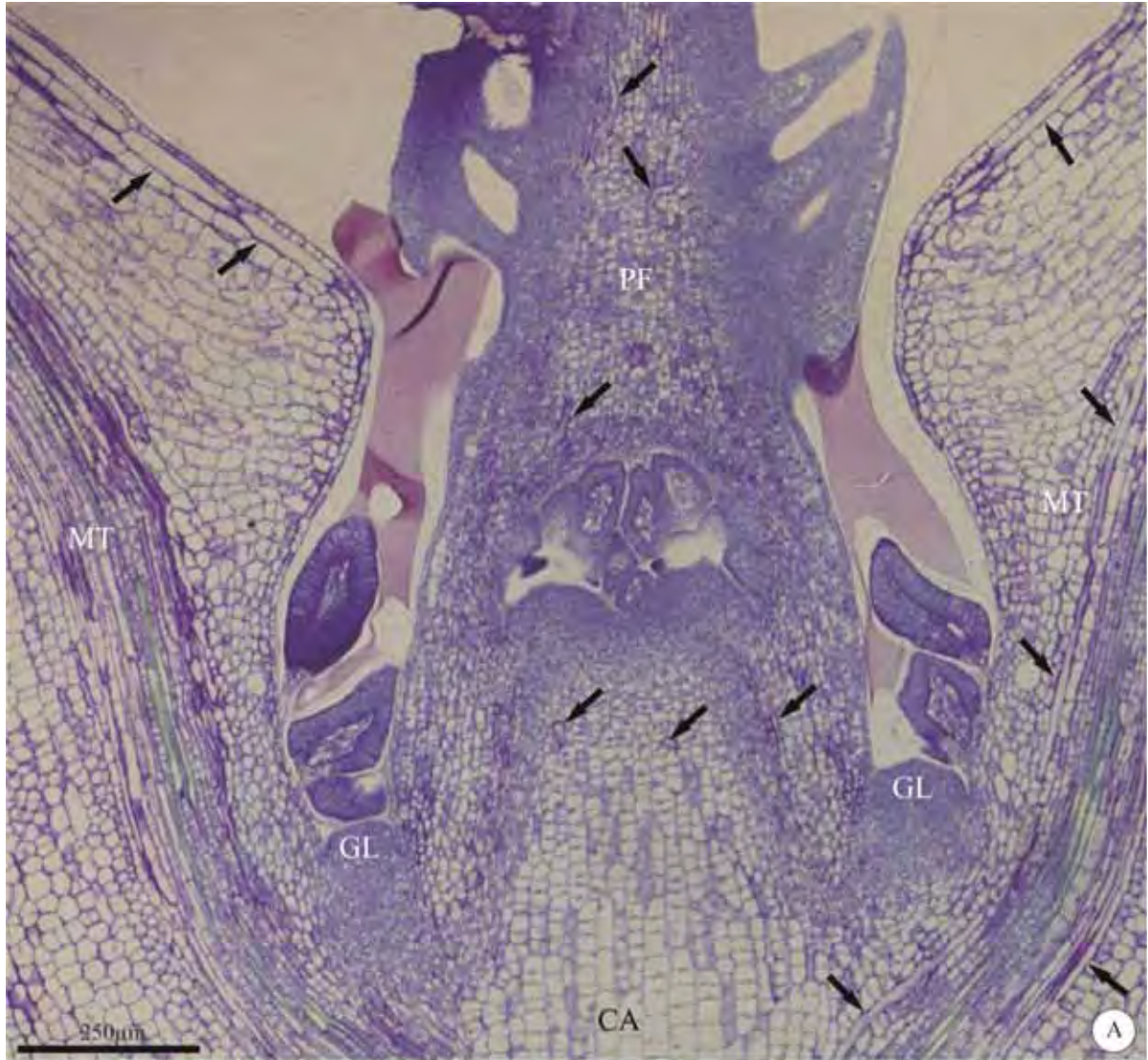


Figura 6. Secções longitudinais de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Plântula com 20 dias, região mediana do hipocótilo, observar laticíferos (setas) com diferentes calibres no córtex, medula e associados ao floema interno e externo. **B.** Planta com 80 dias, região mediana do eofilo, observar laticíferos (setas) com diferentes calibres no córtex e na periferia do feixe vascular, associado ao floema. **C.** Planta com 80 dias, notar grande quantidade de laticíferos na periferia do cilindro vascular, próximo à região nodal, com ramificação em formato-Y (seta) e paredes terminais total ou parcialmente ausentes (detalhe). Coloração: A-C (Azul de Toluidina).

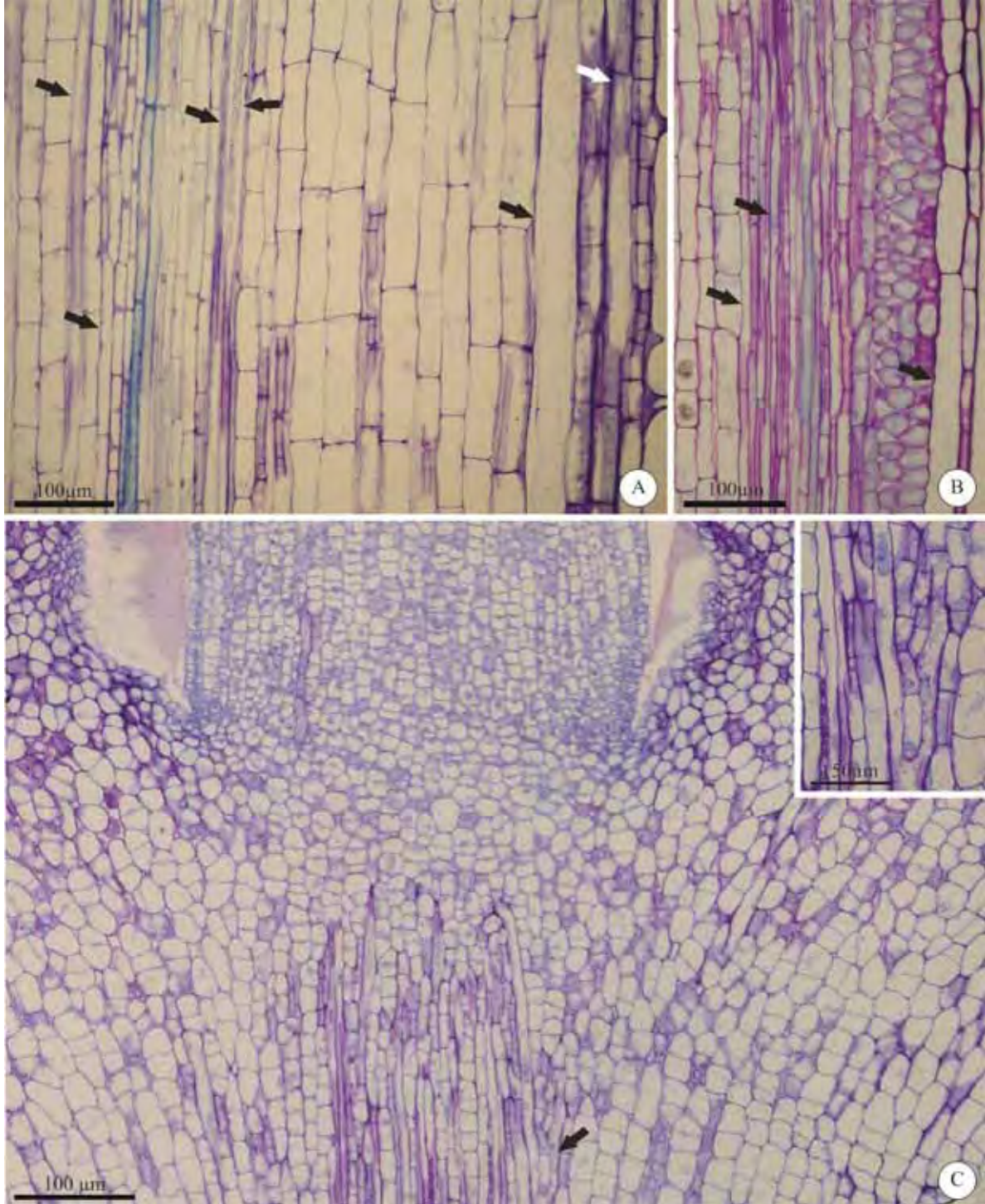


Figura 7. Tipos de laticíferos de *T. catharinensis* A.DC. **A-D e F.** Planta com 80 dias. **A.** Secção paradérmica do primórdio foliar, em destaque um laticífero articulado com projeção lateral (ponta de seta). **B.** Periferia do cilindro vascular na altura da região nodal do ápice caulinar, observar laticíferos multinucleados (setas), sem resquícios de septos, com crescimento apical intrusivo (ponta de seta). **C.** Secção longitudinal do epicótilo, laticífero articulado anastomosado (seta) e laticífero com crescimento intrusivo (ponta de seta). **D.** Secção longitudinal do pecíolo do metafilo, seqüência axial de células laticíferas retangulares curtas com paredes transversais íntegras (setas), subepidérmicas. **E.** Plântula com 20 dias, periferia da região mediana do cotilédone, laticífero subjacente à epiderme; notar adição de uma célula parenquimática (P) ao laticífero (L). **F.** Secção transversal do epicótilo tratada com reagente de Nadi. Notar laticíferos (setas) distribuídos no córtex, próximos ao periciclo e laticífero de origem secundária a partir do câmbio vascular em direção ao floema secundário (detalhe). Coloração: A-F (Azul de Toluidina).

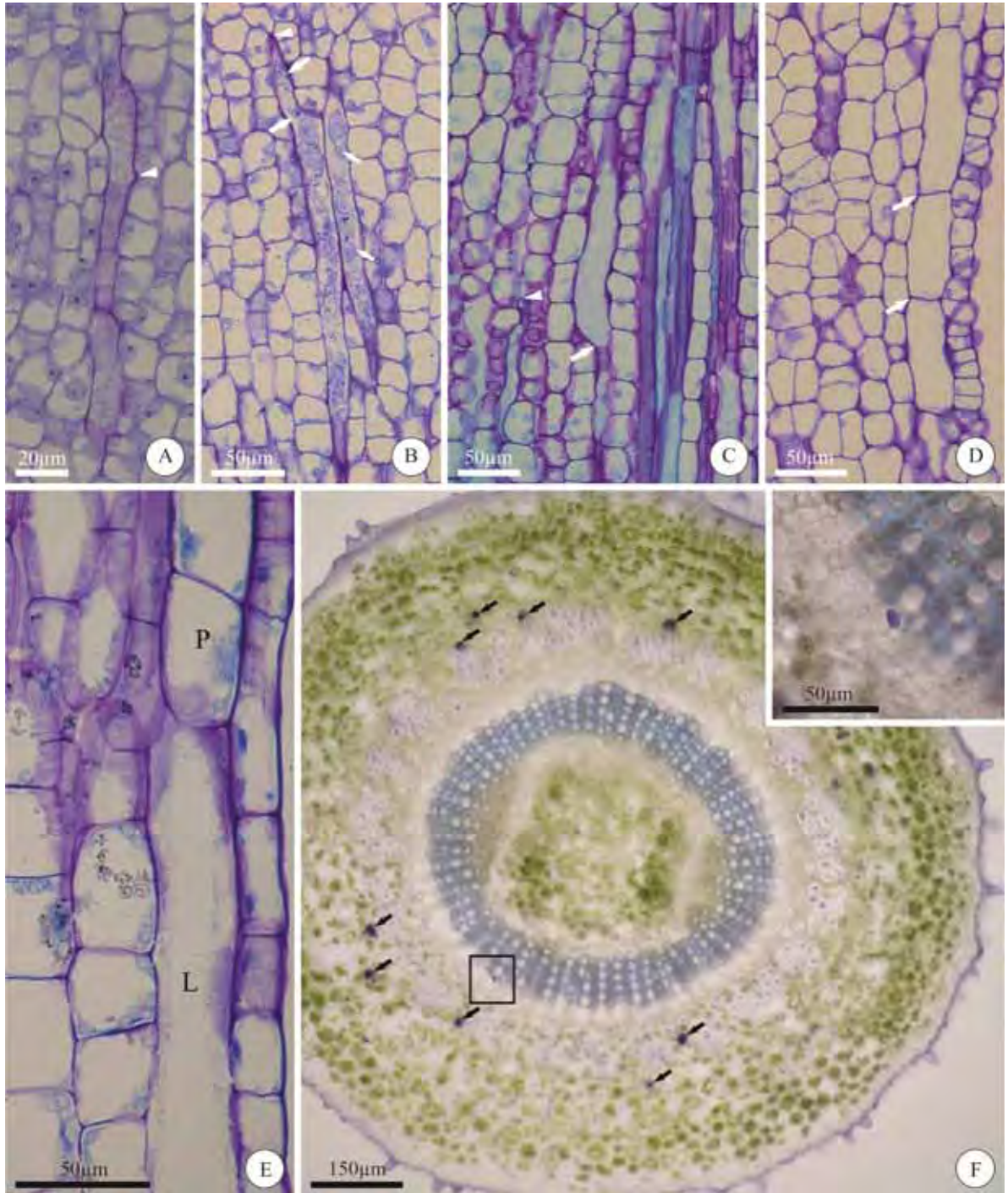
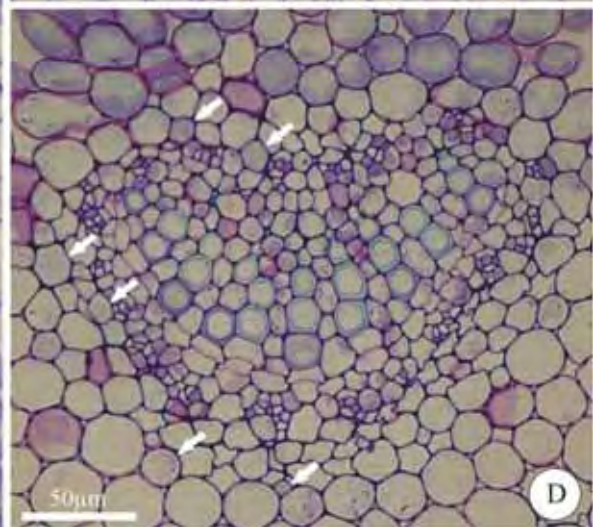
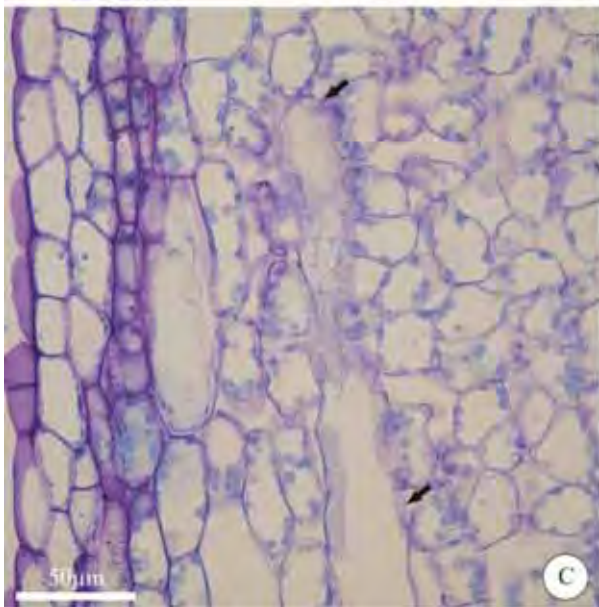
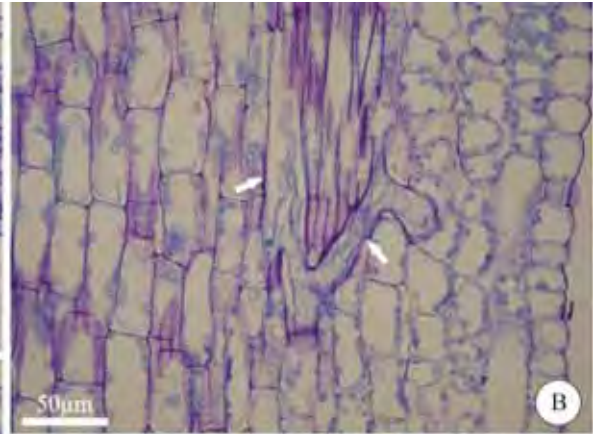
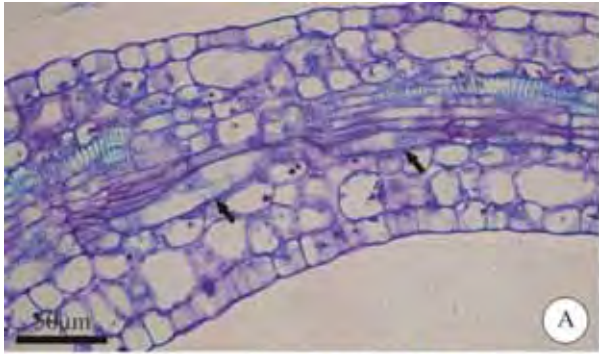


Figura 8. Laticíferos na lâmina foliar de *T. catharinensis* A.DC. **A-C.** Secção longitudinal do cotilédone da plântula com 20 dias. **A.** Região próxima ao ápice foliar, laticíferos (seta) acompanhando a nervura. **B.** Laticífero associado ao feixe vascular. **C.** Laticífero associado ao mesofilo. **D.** Secção transversal da nervura principal do metafile da planta com 80 dias, observar laticíferos associados ao floema e ao córtex. Coloração: A-C (Azul de Toluidina).



Capítulo II

Coléteres foliares em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae): estrutura, origem e desenvolvimento**RESUMO**

(Coléteres foliares em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae): estrutura, origem e desenvolvimento). Coléteres de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae) ocorrem na região nodal de cotilédones, eofilos e metafílos em posição intrapeciolar e interpeciolar (estipulares), sendo ausentes no embrião. Diferenciam-se nas fases iniciais do desenvolvimento foliar e são secretores a partir do segundo nó do ápice caulinar. São emergências não vascularizadas, persistentes, ocorrendo coléteres do tipo padrão (mais comuns), tipos bifurcado e trifurcado (raros) e tipo séssil (nas adjacências da gema axilar). Na fase secretora, possuem coloração verde-claro, são intumescidos e secretam um fluido abundante de natureza polissacarídica que recobre as regiões nodais e o ápice caulinar. A secreção extracelular acumula-se em fendas esquizógenas por entre as paredes anticlinais das células epiteliais adjacentes e espaços subcuticulares, sendo liberada para a superfície do coléter sem que ocorra rompimento da cutícula. Na fase pós-secretora, os coléteres tornam-se marrons, acumulam grânulos densos nos vacúolos, lignificam-se, sendo este processo de senescência basípeta. Uma periderme se instala em regiões subjacentes a inserção dos coléteres senescentes. Considerando que *T. catharinensis* é uma espécie heliófita e comum em áreas degradadas, portanto, vulnerável a variações importantes nas condições climáticas, a produção de mucilagem desde as fases iniciais do desenvolvimento vegetativo contribui para o estabelecimento dessas plantas nos estágios mais críticos do seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Apocynaceae, coléteres, mucilagem, ontogênese, plântula

ABSTRACT

(Leaf colleters at different stages of the vegetative development of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae): Structure, origin and development). Colleters in *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae) occur in the nodal region of cotyledons, eophylls and metaphylls at intrapetiolar and interpetiolar (stipulates) positions, being absent in the mature embryo. They differentiate in the early stages of leaf development and present secretory activity from the second node of the stem apex. They are persistent non-vascularized emergences, occurring standard types colleters (most

common), bifurcate or trifurcate types (rare) and sessile types (adjacent to the axillary bud). At the secretory phase, the colleters have a light-green color, are swollen and release a copious polysaccharide fluid that cover the nodal regions and the stem apex. The extracellular secretion accumulates in schizogenous gaps through the anticlinal walls of adjacent epithelial cells, being released toward the surface without breaking of the cuticle. At post-secretory phase, colleters become brown and lignified; dense granules accumulate in the vacuole. This process of senescence occurs basipetally. Periderm installs in the subjacent regions of the insertion of senescent colleters. *T. catharinensis* commonly appears in degraded areas and is a heliophytic species, therefore, vulnerable to significant variations in environmental conditions. Considering these features, the production of mucilage in early phases of vegetative development contributes to their establishment in the most critical stages of plant development.

Key words: Apocynaceae, colleters, mucilage, ontogeny, seedling

Introdução

Coléteres são estruturas multicelulares que produzem secreção pegajosa composta por mucilagens, terpenos ou uma mistura de ambos, geralmente associada com a proteção e lubrificação de meristemas e estruturas/órgãos em estágios iniciais de desenvolvimento (Fahn 1979; 1990). Coléteres ocorrem amplamente em Apocynaceae, contudo alguns gêneros são caracterizados pela ausência desta estrutura (Endress & Bruyns 2000). Assim, a distribuição, o tipo e o número de coléteres são variáveis e podem ser usados como uma característica taxonômica importante (Evert 2006).

Em Apocynaceae, coléteres foram registrados em 71 gêneros incluindo *Tabernaemontana* (Ramayya & Bahadur 1968; Aguiar 2003; Simões *et al.* 2006), ocorrendo na forma de emergências caducas ou persistentes em ápices vegetativos, folhas, brácteas, bractéolas e sépalas (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Silva *et al.* 1975; Fjell 1983; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a, b, c; 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Simões *et al.* 2006). Nas estruturas vegetativas, os coléteres são observados na base da lâmina foliar e na face adaxial do pecíolo (Thomas 1991), podendo ocupar posição inter ou intrapeciolar (Sennblad *et al.* 1998). Para a família, predominam coléteres do tipo padrão (Thomas 1991; Rio *et al.* 2002), contudo tipos inéditos descritos como bifurcados, também chamados de partidos, ramificados e fimbriados,

e sésseis foram descritos para espécies de Apocynoideae (Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006; Martins *et al.* 2010) e Asclepiadoideae (Demarco 2005; 2008).

Estudos detalhados sobre coléteres em espécies de Apocynaceae ocorrentes no Brasil ainda são escassos, com destaque para os estudos de Silva *et al.* (1975), Appezzato-da-Glória & Estelita (2000), Rio *et al.* (2002; 2005), Schwarz & Furlan (2002), Demarco (2005, 2008), Simões *et al.* (2006) e Martins *et al.* (2010). Registros de ocorrência de coléteres em cotilédones são raros, sendo descritos em *Nerium oleander* (Williams *et al.* 1982) e em duas espécies de *Mandevilla* (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

Tabernaemontaneae, tribo incluída na subfamília Rauvolfioideae de Apocynaceae (Endress & Bruyns 2000), possui 16 gêneros e cerca de 170 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo *Tabernaemontana* L. o maior gênero com cerca de 100 espécies (Endress *et al.* 2007), das quais 27 espécies ocorrem no Brasil (Leeuwenberg 1994; Figueiredo *et al.* 2010). Representantes deste gênero produzem uma ampla variedade de alcalóides indólicos com diversas propriedades e possibilidades de aplicação na medicina popular (Van Beek *et al.* 1984; Araújo *et al.* 1984; Achenbach *et al.* 1997; Pereira *et al.* 1999a, b, c; Batina *et al.* 2000; Federici *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2003; Zocoler *et al.* 2005; Monnerat *et al.* 2005; Soares *et al.* 2007; Gomes *et al.* 2010; Figueiredo *et al.* 2010), sendo comprovadas as atividades tripanocida (Pereira *et al.* 1999a), leishmanicida (Soares *et al.* 2007), antiofídica (Batina *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2004; Veronese *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2010) e antitumoral (Almeida *et al.* 2004) de extratos de plantas de *T. catharinensis*.

Tabernaemontaneae catharinensis A.DC. é uma espécie nativa, mas não endêmica, do Brasil e ocorre em domínios fitogeográficos distintos como Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica com ampla distribuição geográfica nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (Koch e Rapini 2011). Na região de estudo, as plantas desta espécie são heliófitas, semidecíduas e abundantes em fragmentos de cerrado com forte alteração antrópica, sendo comumente encontradas como invasoras de pastagens e culturas.

Frente à relevância taxonômica, filogenética e ecológica dos coléteres, o objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura, origem e desenvolvimento dos coléteres foliares de *Tabernaemontana catharinensis* em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo.

Material e métodos

Frutos maduros de *Tabernaemontana catharinensis*, isto é, aqueles que se encontravam abertos naturalmente, com a face externa de coloração verde-alaranjado e que apresentavam as sementes com arilo laranja-avermelhado e brilhante, foram coletados em áreas de cerrado

sensu lato localizadas no município de Botucatu/SP (Estrada da Mina - 22°42'21,4''S e 48°18'23,7''W; Fazenda Lageado - 22°51'16,8''S e 48°25'53,2''W) e no município de Pratânia/SP (Fazenda Palmeira da Serra - 22°48'48,8''S e 48°44'33,7''), nos meses de março a maio de 2010 e 2011. Exsiccatas foram incorporadas no Herbário BOTU sob os números de registro BOTU 27625- 27627.

Para a obtenção dos embriões foram utilizadas cerca de 50 sementes provenientes de frutos maduros, sendo o arilo removido manualmente e as sementes colocadas para embeber durante 36 horas em recipiente com água destilada (Wilson & Mahlberg 1978). O tegumento e o endosperma foram retirados e os embriões, foram coletados e processados para os estudos anatômicos.

Para a obtenção de plântulas, 400 sementes, após remoção manual do arilo, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos para desinfestação, lavadas em água corrente e em água destilada. Em seguida, foram colocadas em caixas transparentes de germinação sobre papel filtro umedecido com 2,5 vezes o seu peso seco com água deionizada e levadas para germinador Tecnal modelo TE - 401 sob temperatura constante de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo alternado (12 horas de luz e 12 horas de escuro - lâmpadas Phillips tipo luz do dia), sendo monitoradas diariamente. Para controle fúngico as sementes foram tratadas com solução de Nistatina 1% em dias alternados. Após o início da germinação, determinado pela protrusão da raiz primária, as plântulas foram transferidas para caixas transparentes contendo vermiculita autoclavada e, posteriormente, transferidas para tubetes plásticos contendo o mesmo substrato e mantidas no germinador nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo. A partir do 30° até o 80° dias, ainda no germinador, cada indivíduo passou a ser tratado com aproximadamente 6 mL de solução nutritiva número 2 de Hoagland & Arnon (1950) em dias alternados. Após este período, plantas remanescentes foram transplantadas para vasos PVC com substrato proveniente de cerrado, sendo mantidas em casa-de-vegetação sob sombrite 50% e regadas em dias alternados, visando estudos posteriores.

Das plântulas e plantas jovens obtidas, alguns exemplares foram conservados em etanol a 70% para as descrições e ilustrações. As imagens digitais da morfologia externa foram obtidas em estereomicroscópio Leica M205C com câmara Leica DFC 425 acoplada. As medidas foram tomadas com paquímetro digital Mitutoyo Digmatic Caliper (Suzano/SP, Brasil).

Considerou-se plântula a fase transcorrida entre a protrusão da raiz primária e a expansão do primeiro eofilo (ou primeiro par) e planta jovem as diversas formas apresentadas

pelo indivíduo até a produção e expansão do primeiro metafile (*sensu* Oliveira 2001). A partir dessa fase considerou-se planta. A definição do metafile foi feita com base na análise das plantas utilizadas como matrizes.

Para o estudo anatômico, foram coletadas amostras de embriões, intactos ou fragmentados, e amostras do eixo caulinar de plântulas com 20 dias e de plantas com 80 dias incluindo o ápice caulinar e os três nós subseqüentes, além do nó cotiledonar em plantas com 80 dias. As amostras foram fixadas em mistura de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 h. Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois estocado em álcool etílico 70%. O material foi desidratado em série etílica e infiltrado em historresina (Leica Historesin®), segundo protocolo do fabricante. Secções transversais e longitudinais, com aproximadamente 5 µm de espessura foram obtidas com uso micrótomo rotativo e navalha de aço do tipo C, coradas com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montados entre lâmina e lamínula com Entelan®. A presença de polissacarídeos no protoplasto das células secretoras e na secreção extracelular dos coléteres foi testada em secções de material fixado em mistura de Karnovsky e incluído em historresina com o uso de vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) e também submetidas à reação com ácido tânico/cloreto de ferro III (Pizzolato & Lillie 1973) e à reação PAS (Periodic-Acid-Schiff's reaction; McManus 1948). As lâminas foram montadas em glicerina aquosa.

As imagens digitais foram obtidas em microscópio Olympus BX41 com câmera digital Olympus C7070 acoplada. As escalas foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações. As medidas de comprimento dos coléteres foram realizadas em secções longitudinais, utilizando-se o Programa Cell B da Olympus. A classificação dos coléteres foi realizada de acordo com Lersten (1974a, b), Simões *et al.* (2006) e Rio *et al.* (2005).

Resultados

Embrião e desenvolvimento pós-seminal

O embrião maduro de *T. catharinensis* é axial, tem cerca de 5 mm de comprimento e composto por dois cotilédones brancos, foliáceos, sésseis, justapostos e sub-iguais com venação evidente, unidos pelas bases ao eixo embrionário branco, cilíndrico, com a extremidade radicular exposta (Fig. 1A); a plúmula mostra-se indiferenciada (Fig. 1B). O embrião encontra-se imerso em um fluido viscoso (Fig. 1C), de aspecto heterogêneo, que se corou de azul-esverdeado com o Azul de Toluidina (Fig. 1B) e reagiu positivamente ao

tratamento com PAS (Fig. 1C e 1D), ácido tânico/cloreto férrico e vermelho de rutênio indicando a natureza polissacarídica desta substância.

A germinação de *T. catharinensis* é epígea e a plântula é fanerocotiledonar com cotilédones foliáceos verdes opostos. O início da germinação, determinado pela protrusão da raiz primária, se dá a partir do quinto dia da sementeira, sendo que aos 20 dias os cotilédones estão completamente expandidos e com pecíolo evidente; nesta fase, o hipocótilo atinge cerca de 40 mm de comprimento e a raiz principal cerca de 50 mm (Fig. 2A). Aos 60 dias, surge o primeiro par de eofilos e aos 70 dias, aproximadamente, surge o primeiro par de metafílos. Plantas com 80 dias apresentam de 2 a 3 pares de metafílos sub-iguais, com filotaxia oposta cruzada, e o eixo caulinar representado pelo hipocótilo, epicótilo e entrenós adjacentes mede cerca de 80 mm de comprimento, enquanto a raiz principal tem cerca de 95 mm de comprimento (Fig. 2B).

Distribuição, número de coléteres e secreção

No embrião os coléteres estão ausentes (Fig. 1B). Coléteres foliares ocorrem na região nodal, na face adaxial das estípulas (interpeciolar) e em concavidades intrapeciolares localizadas na base do pecíolo de cotilédones expandidos (Fig. 3A), eofilos (Fig. 3B) e metafílos (Fig. 3C). Nos primórdios foliares, a presença e o número de coléteres variam de acordo com a fase de desenvolvimento do primórdio. Em plântulas com 20 dias na região basal dos cotilédones expandidos podem ser observados coléteres ativos em secreção (Fig. 3D, 4A e B). Em plantas com 80 dias, os coléteres presentes na base dos cotilédones e dos eofilos (Fig. 3B) apresentam sinais de senescência visíveis pelas mudanças no aspecto (intumescido para ressecado) e coloração (verde-claro para parda a marrom-escuro). Coléteres ativos em secreção podem ser observados no ápice caulinar, exatamente na região basal dos metafílos do terceiro entrenó (Fig. 4C e D), cuja secreção extracelular de natureza polissacarídica, confirmada pelas reações positivas ao Vermelho de Rutênio, PAS e ácido tânico/cloreto férrico, é abundante e permeia todas as estruturas meristemáticas (Fig. 4D).

Na base dos diferentes tipos foliares estudados (cotilédones expandidos, eofilos e metafílos) ocorrem cerca de 12-20 coléteres, totalizando 24-40 coléteres por nó; o comprimento dos coléteres varia de 95 a 275 μm nos cotilédones e de 130 a 285 μm nos metafílos.

Estrutura

Os coléteres presentes nos cotilédones, eofilos, metafilos e primórdios foliares não diferem quanto à forma e organização. Em secção longitudinal são cônicos a deltóides, não vascularizados e consistem de um corpo principal e um pedúnculo curto assimétrico (Fig. 5A), que pode estar ausente (Fig. 5B). Em regiões em que os coléteres estão mais adensados, o pedúnculo se apresenta assimétrico e o corpo principal mais alongado e com formato irregular se projetando sobre as demais estruturas (Fig. 4D).

O corpo principal de um coléter diferenciado é formado por um núcleo central de células parenquimáticas de formato retangular, alongadas em direção ao ápice, rodeado por uma epiderme secretora uniestratificada com células retangulares, de tamanhos variáveis dispostas em paliçada, aqui denominadas células epiteliais, recobertas por cutícula delgada e contínua (Fig. 5A-D). As células epidérmicas que revestem o corpo principal apresentam paredes delgadas, núcleo central esférico, conspicuo e com nucléolo evidente, citoplasma denso e vacuoma pouco desenvolvido caracterizando o tecido secretor (Fig. 5A-D). O conteúdo de algumas células centrais e das células epidérmicas do corpo principal do coléter reagiu positivamente aos testes para polissacarídeos, incluindo mucilagem. O pedúnculo, quando presente, é curto e formado por duas a seis camadas de células parenquimáticas retangulares e a epiderme que o recobre é composta por células não-secretoras de formato cúbico a retangular (Fig. 5A e B).

Em todos os tipos foliares analisados, ocorrem coléteres dos tipos padrão, bifurcado, trifurcado e séssil, caracterizados a seguir.

Tipo Padrão: coléter formado por um corpo principal alongado indiviso, geralmente de formato deltóide e com pedúnculo curto (Fig. 5A e B), sendo este o tipo mais abundante.

Tipo Bifurcado ou Trifurcado: coléteres semelhantes ao tipo padrão quanto à forma, diferindo por apresentar uma ou duas divisões, bifurcado (Fig. 5C) ou trifurcado (Fig. 5D), respectivamente, no corpo principal próximo à sua base, sendo que as partes divididas permanecem livres entre si e recobertas por epiderme secretora em paliçada. São raramente observados.

Tipo Séssil: coléteres menores que os demais, com o corpo principal semelhante ao tipo padrão, mas não apresentam pedúnculo (Fig. 5B); caracteristicamente, localizam-se nas adjacências da gema axilar.

Ontogênese e desenvolvimento

Na base do pecíolo de cotilédones expandidos, eofilos e metafilos ocorrem expansões laminares vascularizadas (estípulas) (Fig. 4D e 6B) que, durante o seu desenvolvimento, fundem-se na região basal formando um anel contínuo (ou arco estipular) em torno do nó (Fig. 4A). Os coléteres interpeciolares, mais periféricos e distantes da base do pecíolo, provavelmente de origem estipular (Fig. 3C e 4D), são os primeiros a se formarem (Fig. 6A).

Nos eofilos e metafilos, os coléteres iniciam o seu desenvolvimento já no primeiro nó, na região interna de primórdios foliares que se apresentam em início de extensão lateral para formação da futura lâmina foliar (P2) (Fig. 6A). Primórdios foliares cônicos, isto é, na fase que antecede a iniciação da lâmina foliar (P1) (Fig. 6B), ainda não apresentam coléteres. Inicialmente, forma-se um coléter do tipo padrão em lados alternados de cada um dos dois primórdios opostos, em alturas ligeiramente distintas (Fig. 7A); esses coléteres são adpressos e ocupam um espaço relativamente amplo entre os dois primórdios (Fig. 6A e 7A), cuja face adaxial plana se torna côncava para comportá-los (Fig. 19, 21). Nas fases mais avançadas do desenvolvimento desses primórdios (Fig. 6A e 7A), os coléteres mais periféricos (estipulares) já estão diferenciados, em fase pré-secretora (Fig. 7A e B), enquanto os da região central (intrapeciolares) estão em diferenciação (Fig. 7A, D e E). Coléteres em fase secretora são observados a partir do terceiro nó e, nessas folhas, nas adjacências da gema axilar, novos coléteres podem se formar (Fig. 8A e B).

Todos os tipos de coléteres observados neste trabalho iniciam-se como protuberâncias constituídas por células protodérmicas e células do meristema fundamental subjacente (Fig. 7B-E). As células que irão compor o coléter distinguem-se das demais células adjacentes por apresentarem maiores dimensões e formato retangular, núcleo volumoso com nucléolo conspícuo e citoplasma denso e abundante (Fig. 7B e C). Inicialmente, as células protodérmicas dividem-se anticlinalmente, aumentando a superfície do coléter, enquanto que as células do meristema fundamental dividem-se em diversos planos, predominantemente no plano periclinal, propiciando o aumento do volume do coléter. Nos coléteres do tipo padrão, o primórdio se alonga (Fig. 7C) e, numa fase posterior do desenvolvimento, distinguem-se corpo e pedúnculo. Em uma mesma secção transversal, observam-se coléteres em diferentes fases de desenvolvimento, sendo os mais periféricos mais desenvolvidos que os mais internos (Fig. 7B e C). Em todas as amostras analisadas, não foram observados tecidos vasculares no interior dos coléteres.

A bifurcação de um coléter inicia-se como uma reentrância do epitélio secretor na região distal do coléter (Fig. 5C). Posteriormente, uma protuberância lateral se forma na

região basal do coléter bifurcado, resultando num coléter trifurcado (Fig. 5D). Estudos mais detalhados são necessários para compreender o desenvolvimento desses coléteres.

Na fase secretora, as células epiteliais se caracterizam pelo formato claviforme resultante da protrusão da parede periclinal externa e retração das paredes anticlinais (Fig. 9A); o núcleo é esférico, em posição central, e com nucléolo evidente (Fig. 9A e B), o citoplasma é denso e os vacúolos são geralmente pequenos (Fig. 9A e B). Nesta fase, formam-se fendas intercelulares verticais resultantes da dissolução da lamela média ao longo das paredes anticlinais de células epiteliais adjacentes, onde a secreção fica inicialmente acumulada (Fig. 9A). Nessas regiões do coléter, a cutícula se distende com a formação de espaços subcuticulares amplos onde a secreção fica temporariamente acumulada (Fig. 9A e B). A liberação da secreção para a superfície do coléter parece ocorrer via poros na cutícula (Fig. 9A, B e C), uma vez que a cutícula permanece intacta em coléteres na fase pós-secretora (Fig. 9C e D).

Células epiteliais em fase pós-secretora se caracterizam pelo citoplasma reduzido a uma estreita faixa periférica e fortemente corado com o Azul de Toluidina, vacúolos de diferentes tamanhos translúcidos ou com glóbulos densos, podendo ocorrer ou não retração do protoplasto e das paredes celulares (Fig. 9D). Esse conjunto de mudanças ocorre de modo assíncrono em um mesmo coléter, isto é, no mesmo epitélio alguns grupos de células exibem características secretoras ou pós-secretoras, enquanto, outros se mantêm com características pré-secretoras (Fig. 9A e B).

Após a fase secretora, os coléteres senescem sendo que este processo tem início naqueles mais distantes da base (Fig. 10A) e periféricos. Em cada coléter, a senescência ocorre do ápice para a base (Fig. 10B). Coléteres senescentes apresentam lignificação generalizada de suas células (Fig. 10A e C) e presença de cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Fig. 10D). Na região de ocorrência dos coléteres senescentes, nota-se a formação de uma periderme a partir de divisões periclinais das células parenquimáticas subjacentes (Fig. 10D). Os coléteres podem reter sua forma após a senescência ou apresentar uma ligeira contração (Fig. 10C). Coléteres senescentes predominam na base dos cotilédones e dos eofilos de plantas com 80 dias.

Os coléteres ativos em secreção possuem coloração verde-claro, são intumescidos e secretam um fluido incolor e cintilante que forma uma camada espessa em torno do ápice caulinar. Coléteres senescentes apresentam aspecto ressecado e coloração parda a marrom-escuro.

Em todos os tipos foliares analisados, os coléteres, mesmo após sua senescência, persistem aderidos na base do pecíolo ou no arco estipular.

Discussão

Em *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. coléteres estão presentes na região nodal de cotilédones expostos, eofilos e metafílos, sendo ausentes no embrião. Assim, a mucilagem que envolve o embrião na semente madura provavelmente tem origem da degradação do endosperma e/ou é produzida pelas células do tegumento da semente, pois todas essas estruturas reagiram positivamente aos tratamentos para detecção de polissacarídeos. A presença de coléteres em folhas cotiledonares de plântulas foi registrada em *Nerium oleander* (Williams *et al.* 1982), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000) e para *Tabernaemontana catharinensis* neste trabalho. Segundo Appezzato-da-Glória & Estelita (2000), a justificativa para os raros registros de coléteres em cotilédones de Apocynaceae, provavelmente, se deve ao fato que as plântulas são pouco estudadas.

Os coléteres foliares de *T. catharinensis* se localizam em posição intrapeciolar e interpeciolar, como já relatado para outras espécies de Apocynaceae (Woodson & Moore 1938; Thomas 1991; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; 2008; Martins *et al.* 2010). O presente estudo mostrou que os coléteres interpeciolares se originam a partir de expansões laterais da base do primórdio foliar, consideradas como sendo estípulas (Woodson & Moore 1938; Thomas 1991; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; 2008), as quais gradualmente se fundem formando um arco entre os pecíolos. Nossos resultados confirmam a natureza estipular dos coléteres interpeciolares, segundo a teoria de Woodson & Moore (1938) para Apocynaceae. É importante ressaltar que retenção dos coléteres com tendência à redução das estípulas tem sido comumente reconhecida em Apocynaceae e demais famílias da ordem Gentianales (Thomas 1991; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; 2008).

Em *T. catharinensis* foram registrados coléteres dos tipos padrão, bifurcado, trifurcado e sésil, sendo o tipo padrão predominante, conforme registrado para outras espécies de Apocynaceae das subfamílias Apocynoideae e Asclepiadoideae (Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006; Martins *et al.* 2010; Demarco 2005; 2008). Para a subfamília Rauvolfioideae este é o primeiro registro sobre a ocorrência de diferentes tipos de coléteres. De acordo com Simões *et al.* (2006) o tipo padrão é o estado plesiomórfico em Apocynaceae e os demais tipos são derivações deste; esses autores ressaltam que todas essas derivações compartilham uma única característica - o aumento na área da epiderme secretora, otimizando a função secretora. De

fato, embora no presente estudo a secreção não tenha sido quantificada, a produção de mucilagem é abundante e permeia todas as estruturas meristemáticas e órgãos em desenvolvimento, e formam grandes acúmulos na região nodal e recobrir o ápice caulinar. A alta densidade e a disposição congesta dos coléteres nos primórdios foliares em desenvolvimento, em um espaço limitado, poderia explicar essas derivações (Simões *et al.* 2006) e os formatos assimétricos assumidos por essas estruturas secretoras em *T. catharinensis*.

A ausência de vascularização nos coléteres de *T. catharinensis*, confirmada em análise de secções seriadas transversais e longitudinais, corrobora com outros relatos para Apocynaceae (Willians *et al.* 1982; Thomas *et al.* 1989; Demarco 2008), devendo-se ressaltar que também ocorrem coléteres vascularizados em algumas espécies da família (Dave *et al.* 1987; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002).

Os coléteres de *T. catharinensis* são emergências, portanto de natureza mista, conforme comprovado por estudos ontogenéticos em espécies de *Allamanda* (Ramayya & Bahadur 1968), *Nerium indicum* (Thomas & Dave 1989b), *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), duas espécies de *Mandevilla* (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000), *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005), *Asclepias curassavica*, *Fischeria stellata*, *Matelea denticulata*, *Gonioanthela axillares* e *Oxypetalum banksii* (Demarco 2008).

Os sítios de acúmulo da secreção extracelular nos coléteres de *T. catharinensis*, inicialmente em fendas esquizogênicas formadas ao longo das paredes anticlinais de células epiteliais adjacentes e, posteriormente, em pequenos espaços subcuticulares é similar ao observado em espécies de *Plumeria* (Mohan & Inamdar 1986), *Allamanda* (Thomas & Dave 1989a), *Mandevilla* (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000), *Blepharodon* (Demarco 2005), *Asclepias*, *Fischeria*, *Matelea*, *Gonioanthela*, *Oxypetalum* (Demarco 2008) e *Temnadenia* (Martins *et al.* 2010).

A liberação da secreção para a superfície do coléter de *T. catharinensis*, provavelmente, ocorra através de microcanalículos ou poros na cutícula uma vez que esta permanece íntegra nos coléteres senescentes. Tal mecanismo é freqüentemente mencionado para Apocynaceae (Mohan & Inamdar 1986; Thomas & Dave 1989a; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Demarco 2005; 2008; Martins *et al.* 2010), embora, a ruptura da cutícula tenha sido observada em coléteres peciolares de *Alstonia scholaris* (Thomas & Dave 1989c).

Os aspectos da senescência dos coléteres em *T. catharinensis*, incluindo alterações na coloração, senescência basípeta, acúmulo de glóbulos no vacúolo e lignificação generalizada das células constituintes do coléter são similares aos observados em outras espécies de

Apocynaceae (Fjell 1983; Thomas & Dave 1989a,b,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

Em *T. catharinensis* os coléteres foliares são persistentes como também descrito para coléteres localizados em nós vegetativos de *Allamanda* (Thomas & Dave 1989a), *Alstonia* (Thomas & Dave 1989c), *Nerium* (Thomas & Dave 1989b) *Mandevilla* (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000) e *Oxypetalum* (Schwarz & Furlan 2002). A instalação de uma periderme nas regiões subjacentes à inserção dos coléteres, concomitante com a senescência dessas estruturas secretoras, sugere a proteção dos tecidos internos subjacentes contra dessecação e patógenos.

A diferenciação precoce dos coléters foliares no ápice caulinar de plântulas e plantas de *T. catharinensis* e início da atividade secretora antes mesmo de a folha completar sua expansão são aspectos comuns a coléteres e descritos para diferentes espécies de Apocynaceae (Thomas 1991; Rio *et al.* 2002; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Demarco 2005; 2008; Martins *et al.* 2010). Essas características associadas com a natureza mucilagínosa da secreção reforçam o suposto papel dos coléteres na lubrificação e proteção de meristemas e órgãos/estruturas em desenvolvimento, principalmente, contra dessecação, conforme sugerido por diferentes autores (Thomas & Dave 1989a, b, c; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Pimentel *et al.* 2011).

É importante ressaltar que as plântulas de *T. catharinensis* são fanerocotiledonares, cujos cotilédones foliáceos e fotossintetizantes funcionam como órgãos de assimilação nas fases iniciais do desenvolvimento até o aparecimento das folhas definitivas. Plântulas com germinação epígea são capazes de explorar as múltiplas possibilidades do ambiente de cerrado, principalmente aqueles relacionados às condições de luz (Franco 2002; Rodrigues *et al.* 2011), porém, ao mesmo tempo, a exposição dos cotilédones torna as plântulas mais vulneráveis aos fatores ambientais adversos (Rodrigues *et al.* 2011). Assim, sugerimos que a presença de coléteres ativos em secreção em plântulas de *T. catharinensis* contribui para o desenvolvimento inicial e o estabelecimento dessas plantas em áreas de cerrado, sendo a função protetora dos coléteres também ressaltada por Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) para plântulas de *Mandevilla illustris* e *M. vellutina* ocorrentes no cerrado. Além disso, o suposto papel protetor dos coléteres reveste-se de grande importância nos metafilos de *T. catharinensis*, considerando que essas plantas são heliófitas e comuns em áreas degradadas, sendo mais vulneráveis a variações importantes nas condições climáticas.

Agradecimentos

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado à primeira autora e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo suporte financeiro (TEM-Biota proc. 2008/55434-7) e à Clívia Carolina Fiorilo Possobom e ao Sérgio Akira Adachi pelo apoio na obtenção de fotografias.

Referências bibliográficas

- Achenbach, H.; Benirshke, M. & Torrenegra, R. 1997. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. **Phytochemistry** 45(2): 325-335.
- Aguiar, S. 2003. **Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do cerrado do estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Almeida, L.; Cintra, A.C.O.; Veronese, E.L.G.; Nomizo, A.; Franco, J.J.; Arantes, E.C.; Giglio, J.R. & Sampaio, S.V. 2004. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology** 137: 19-27
- Appezato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 23(2): 113-120
- Araújo, A.R.; Kascheres, C.; Fujiwara, F. & Marsaioli, A.J. 1984. Catharinensine, an oxindole alkaloid from *Peschiera catharinensis*. **Phytochemistry** 23(10): 2359-2363.
- Batina, M.F.; Cintra, A.C.; Veronese, E.L.; Lavrador, M.A.; Giglio, J.R.; Pereira, P.S.; Dias, D.A.; França, S.C. & Sampaio, S.V. 2000. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica** 66: 424-428.
- Dave, Y., Thomas, V. & Kuriachen, P.M. 1987. Structure and development of colleters of *Aganosma caryophyllata* G. Don. **Pakistan Journal of Botany** 19: 243-248.
- Demarco, D. 2005. **Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Demarco, D. 2008. **Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécies de Asclepiadeae (R.Br.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do**

- estado de São Paulo.** Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Endress, M.E. & Bruyns, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae *s.l.* **The Botanical Review** 66(1): 1-56.
- Endress, M.E.; Van der Ham, R.W.J.M.; Nilsson, S.; Civeyrel, L.; Chase, M.W.; Sennblad, B.; Potgieter, K.; Joseph, J.; Powell, M.; Lorence, D.; Zimmerman, Y.M. & Albert, V.A. 2007. A phylogenetic analysis of Alyxieae (Apocynaceae) based on *rbcL*, *matK*, *trnLintron*, *trnL-K* spacer sequences, and morphological characters. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 94(1): 1-35.
- Fahn, A. 1979. **Secretory tissues in plants.** London, Academic Press.
- Fahn, A. 1990. **Plant anatomy.** 4th ed., Oxford, Pergamon Press.
- Federici, E.; Palazzino, G.; Nicoletti, M. & Galeffi, C. 2000. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. **Planta Medica** 66(1): 93-95.
- Figueiredo, E.R.; Vieira, I.J.C.; Souza, J.J.; Braz-Filho, R.; Mathias, L.; Kanashiro, M.M. & Côrtes, F.H. 2010. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* (A. DC.), Apocynaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(1): 75-81.
- Fjell, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). **Nordic Journal of Botany** 3: 383-392.
- Franco, A.C. 2002. Ecophysiology of woody plants. In: Oliveira, P.S.E. Marquis, R.J. (eds). **The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna.** Columbia University Press, New York, USA p.178-197.
- Gomes, A.; Das, R.; Sarkhel, S.; Mishra, R.; Mukherjee, S.; Bhattacharya, S. & Gomes, A. 2010. Herbs and herbal constituents active against snake bite. **Indian Journal of Experimental Biology** 48: 865-878
- Gregory, M. & Baas, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel Journal of Botany** 38:125-174.
- Hoagland, D.R. & D.I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular** 347: 1-32.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology** 27: 137-138.
- Koch, I. & Rapini, A. 2011. Apocynaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB004861>).

- Leeuwenberg, A.J.M. 1994. **A Revision of *Tabernaemontana*. The new world species and *Stemmadenia***. UK: Royal Botanic.
- Lersten, N.R. 1974a. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. **Botanical Journal of Linnean Society** 69: 125-136.
- Lersten, N.R. 1974b. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 61: 973-981.
- Martins, F.M.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2010. Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violácea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. **Revista Brasileira de Botânica** 33(3): 489-500.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** 23: 99-108.
- Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. **Annals of Botany** 57: 389-401.
- Monnerat, C.S.; Souza, J.J.; Mathias, L.; Braz-Filho, R. & Vieira, I.J.C. 2005. A new indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana hystrix* Steud. (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16(6): 1331-1335.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373.
- Oliveira, D.M.T. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. **Revista Brasileira de Botânica** 24(1): 85-97.
- Oliveira, A.J.B.; Carvalho, V.M.; Ferreira, A.; Sato, F.Y. & Machado, M.F.P.S. 2003. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore** 27(4): 421-425.
- Pereira, P.S.; Dias, D.A.; Franca, S.C.; Toldo, M.P.A. & Albuquerque, S. 1999a. Trypanocidal activity from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticulturae** 501: 165-170.
- Pereira, P. S.; Franca, S.C.; Sampaio, S.V. & Dias, D.A. 1999b. Indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticulturae** 501: 171-176.
- Pereira, P. S.; Franca, S.C.; Sampaio, S.V.; Dias, D.A. 1999c. Indole alkaloid and pentacyclic triterpene contents in several parts of *Tabernaemontana catharinensis* plant. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 51 (suppl): 249.

- Pimentel, R.R.; Machado, S.R. & Rocha, J.F. 2011. Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. *Rodriguésia* 62(2): 253-262.
- Pizzolato, T.D. & Lillie, R.D. 1973. Maye's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 21: 56-64.
- Ramayya, N. & Bahadur, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. **Current Science** 18: 520-522.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. **Journal of the Indian Botanical Society** 42: 419-435.
- Rio, M.C.S.; Castro, M.M. & Kinoshita, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 25(3): 339-349.
- Rio, M.C.S.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. **Revista Brasileira de Botânica** 28(4): 713-726.
- Rodrigues, T.M.; Teixeira, S.P. & Machado, S.R. 2011. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants** 206(6): 585-594.
- Schwarz, E.A. & Furlan, A. 2002. Coléteres foliares de *Oxypetalum* R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) — aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). **Acta Biológica Paranaense** 31(1,2,3,4): 79-97.
- Sennblad, B.; Endress, M.E. & Bremer, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. **American Journal of Botany** 85(8): 1143-1158.
- Silva, N.M.F.; Valente, M.C.; Alencastro, F.M.M.R.; Pereira, J.F. & Sucre, B.D. 1975. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. - X. Estudo taxonômico e anatômico de: *Gonioanthea odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthea hilariana* (Fourn.) Malme. **Revista Brasileira de Biologia** 35:745-756.
- Simões, A.O.; Castro, M.M. & Kinoshita, L.S. 2006 Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 152(3): 387-398.
- Soares, D. C.; Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A. & Saraiva, E.M. 2007. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International** 56: 135-139.

- Thomas, V. & Dave, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of collectors in Apocynaceae. **Feddes Repertorium** 102: 23-28.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of collectors of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). **Annals of Botany** 64(2): 201-203.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989b. Structure, origin, development and senescence of collectors in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). **Korean Journal of Botany** 32(3): 163-172.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989c. The collectors of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). **Indian Botanical Contact** 6: 25-29.
- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the collector. **Annals of Botany** 68(4): 287-305.
- Thomas, V.; Dave, Y. & Menon, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of collectors in *Roupelia grata* (Apocynaceae). **Nordic Journal of Botany** 8(5): 493-496.
- Van Beek, T. A.; Verpoorte, R.; Svendsen, A.B.; Leeuwenberg, A.J. & Bisset, N.G. 1984. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. **Journal Ethnopharmacology** 10: 1-156.
- Veronese, E.L.; Esmeraldino, L.E.; Trombone, A.P.; Santana, A.E.; Bechara, G.H.; Kettelhut, I.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R. & Sampaio, S.V. 2005. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine** 12(1-2): 123-30.
- Williams, R.F.; Metcalfe, R.A. & Gust, L.W. 1982. The genesis of form in oleander (*Nerium oleander* L.). **Australian Journal of Botany** 30: 677-687.
- Wilson, K.J. & Mahlberg, P.G. 1978. Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). **American Journal of Botany** 65(1): 98-109.
- Woodson, R.E. Jr & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 65: 135-165.
- Zocoler, M.A.; Oliveira, A.J.B.; Sarragiotto, M.H.; Grzesiuk, V.L. & Vidotti, G.J. 2005. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16(6): 1372-1377.

Figuras

Figura 1. Embrião maduro de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Vista geral do embrião, notar cotilédones sésseis e eixo embrionário. **B.** Secção longitudinal do embrião, observar plúmula indiferenciada e presença de fluido viscoso de aspecto heterogêneo entre os cotilédones (CO), corado de azul-esverdeado com Azul de Toluidina. **C.** Secção transversal da semente madura, mostrando o embrião (EM) imerso em um fluido de natureza polissacarídica (reação positiva ao PAS); EN= endosperma, TE= tegumento. **D.** Detalhe do embrião mostrando o material polissacarídico entre os cotilédones (reação com PAS).

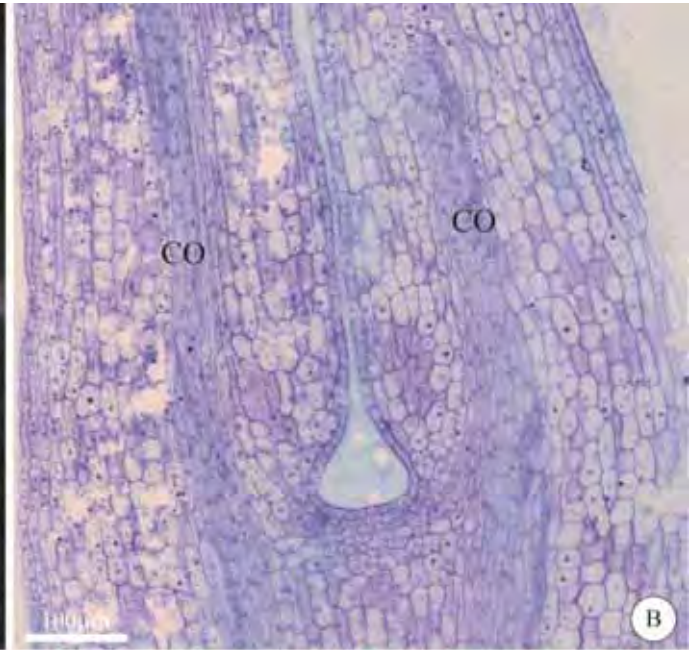


Figura 2. Duas fases do desenvolvimento vegetativo de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Plântula com 20 dias, observar a presença de dois cotilédones verdes, expandidos. **B.** Planta com 80 dias, observar par de cotilédones, par de eofilos e dois pares de metafilos com filotaxia oposta cruzada.

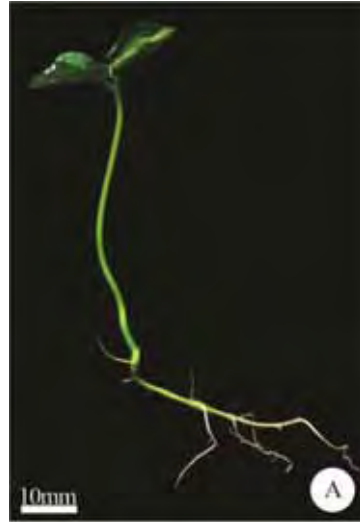


Figura 3. Distribuição dos coléteres foliares em *T. catharinensis* A.DC. **A.** Nó cotiledonar da plântula, observar expansões laterais da base foliar (*) em torno do caule, epicótilo pouco desenvolvido com primórdios eofilares cônicos (P1) e coléteres (ponta de seta) inseridos na base dos cotilédones; PE= pecíolos. **B.** Eofilo na planta de 80 dias parcialmente destacado, observar concavidade da base do pecíolo (PE) e expansão lateral da base foliar (*) onde os coléteres (ponta de seta) estão localizados. Notar a alteração na coloração de alguns coléteres. **C.** Coléteres presentes na base do metafile do terceiro nó da planta com 80 dias; setas indicam coléteres estipulares; P1= primórdios de metafilos cônicos. **D.** Coléteres ativos em secreção inseridos na base do pecíolo cotiledonar da plântula; ponta de seta indica secreção do coléter.

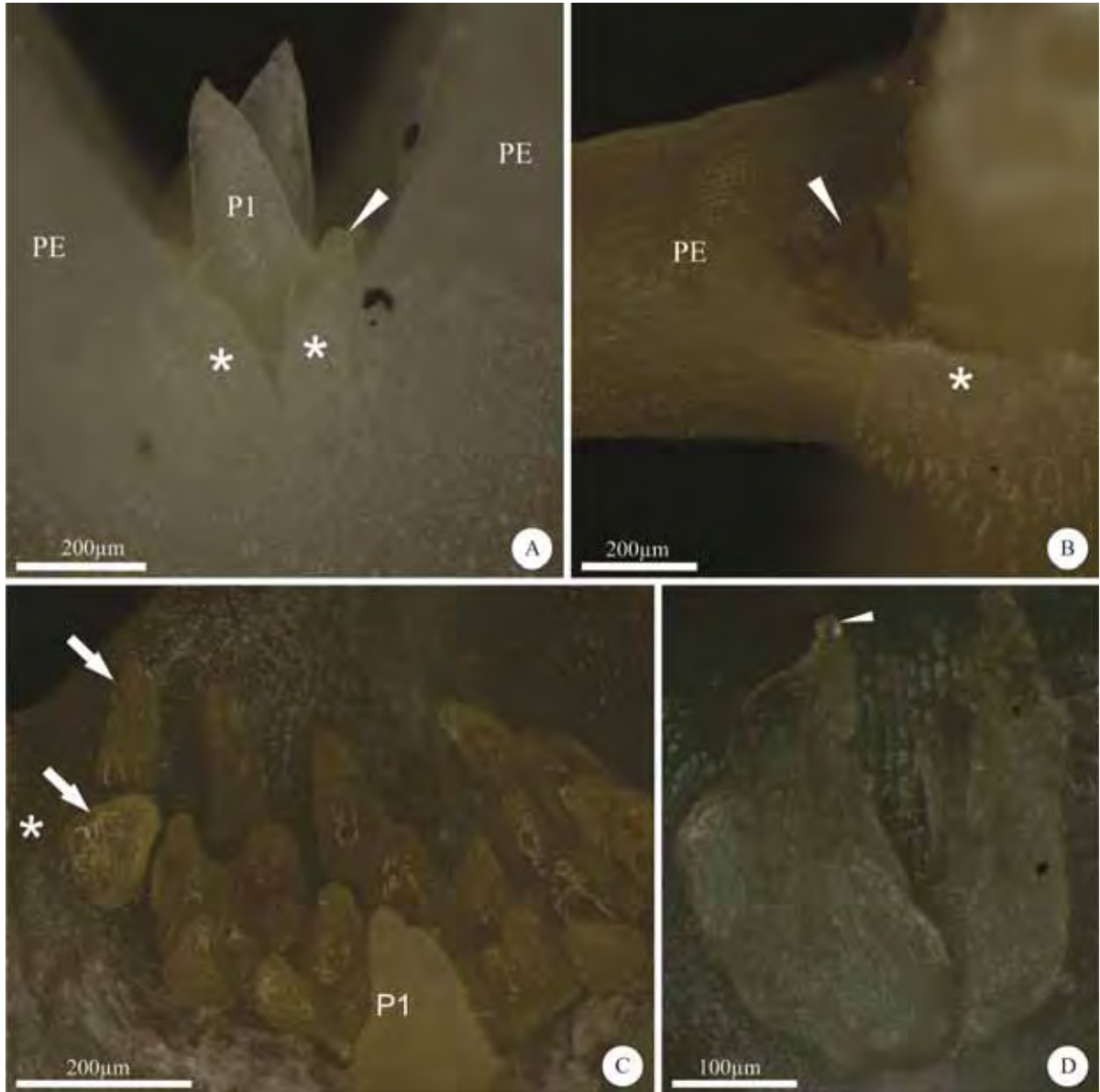


Figura 4. Ápice caulinar de *T. catharinensis* A.DC. **A-B.** Plântula com 20 dias. **A.** Secção transversal, observar coléteres inseridos na base dos cotilédones e o arco estipular (*) e dois primórdios eofilares com expansões laminares (P2). **B.** Secção longitudinal, observar coléteres inseridos na base do pecíolo do cotilédone (PE) e primórdios foliares cônicos (P1). **C-D.** Planta com 80 dias. **C.** Secção longitudinal, observar coléteres inseridos na base do pecíolo dos metafilos (PE) e, em vista tangencial, os coléteres oriundos dos primórdios de metafilos com expansões laterais (P2) e, na região central, primórdios foliares cônicos (P1); ponta de seta indica secreção mucilaginosa produzida pelos coléteres. **D.** Secção transversal, observar coléteres inseridos na base dos metafilos em posição estipular (*) e intrapeciolar; primórdios de metafilos com expansões laminares (P2) e vascularização da estipula (setas). Coloração: A-D (Azul de Toluidina).

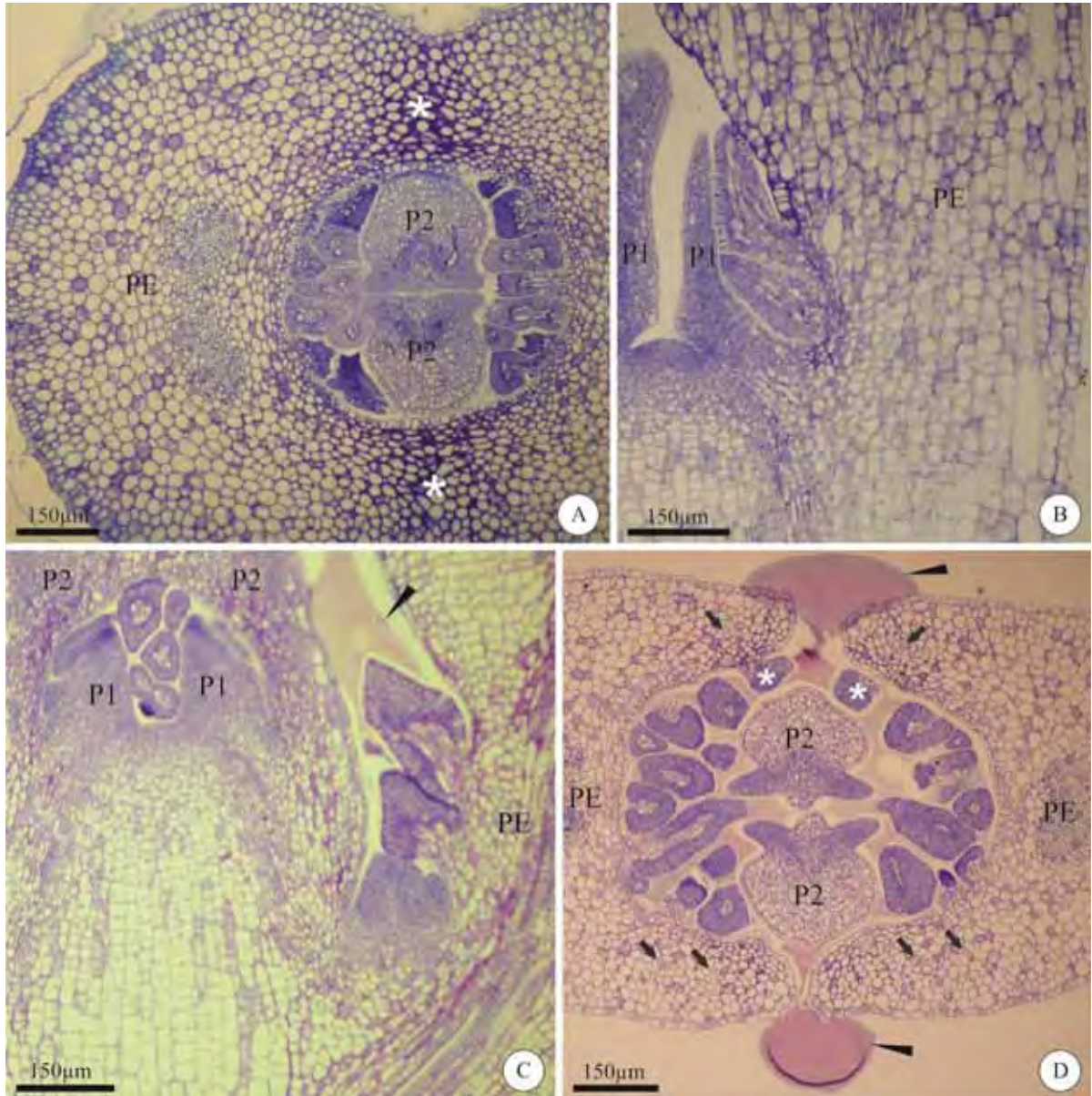


Figura 5. Tipos de coléteres encontrados na base dos diferentes tipos foliares de *T. catharinensis* A.DC. **A-D.** Coléteres no metafile do terceiro nó (a partir do ápice caulinar) da planta com 80 dias. **A-B.** Secções longitudinais. **C-D.** Secções transversais. **A.** Coléter do tipo padrão. **B.** Coléter do tipo padrão (CP) e do tipo séssil (CS). **C.** Coléter do tipo bifurcado. **D.** Coléter do tipo trifurcado. Coloração: A-C (Azul de Toluidina).

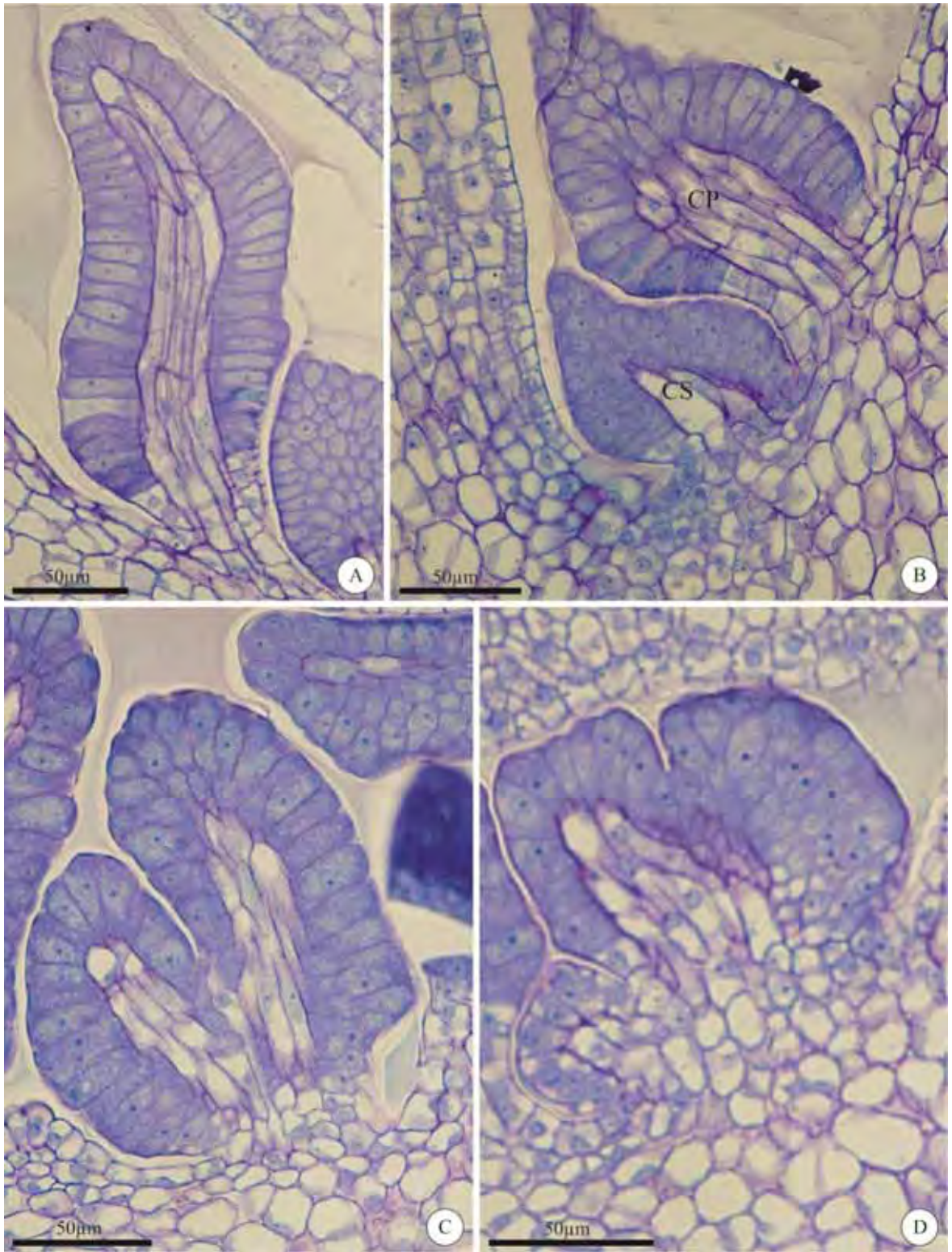


Figura 6. Ontogênese de coléteres foliares de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Secção transversal, ápice caulinar da plântula com 20 dias, observar coléter adpresso e que ocupa espaço relativamente amplo entre os dois primórdios, inserido em uma expansão lateral do primórdio eofilar (P2), provavelmente, de origem estipular; detalhe do coléter no canto superior direito. **B.** Secção transversal, ápice caulinar da planta com 80 dias, observar coléteres em diferentes fases de desenvolvimento nos primórdios do metafile com expansões laminares (P2) e primórdios cônicos (P1) sem coléteres; seta= vascularização do arco estipular. Detalhe de um primórdio cônico (P1) e de coléteres desenvolvidos no canto superior direito. Coloração: A-D (Azul de Toluidina).

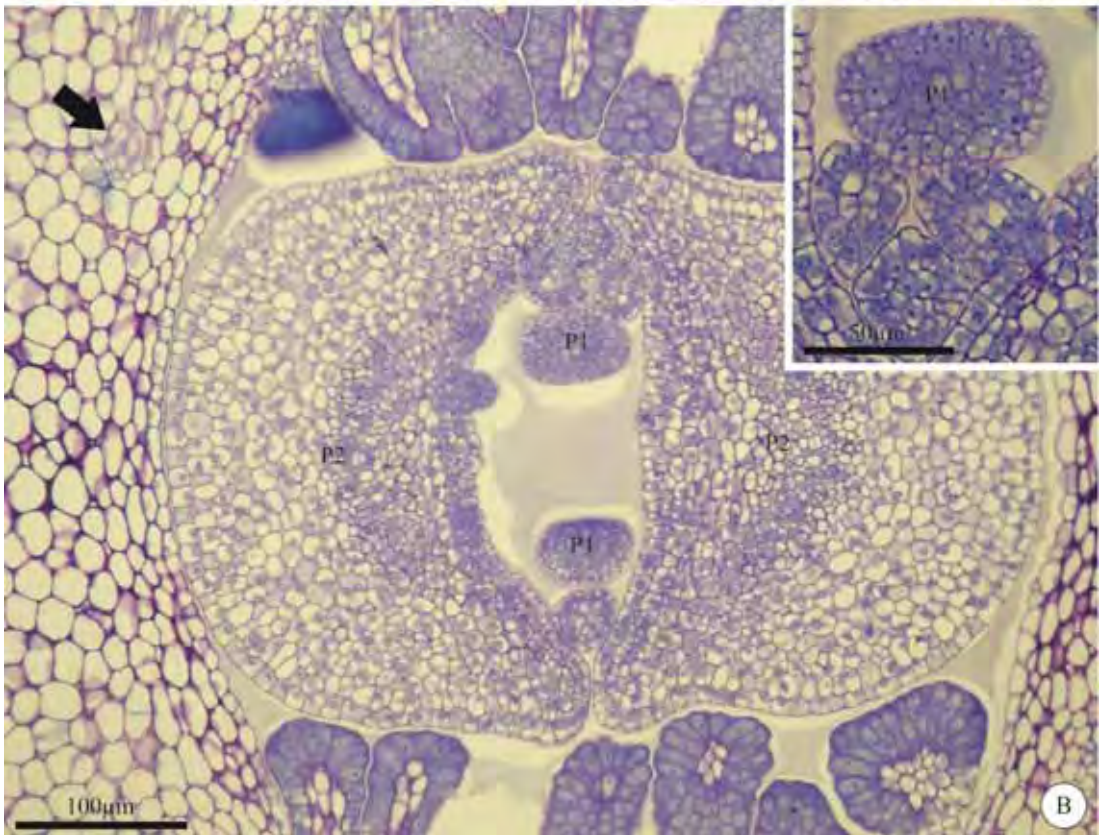
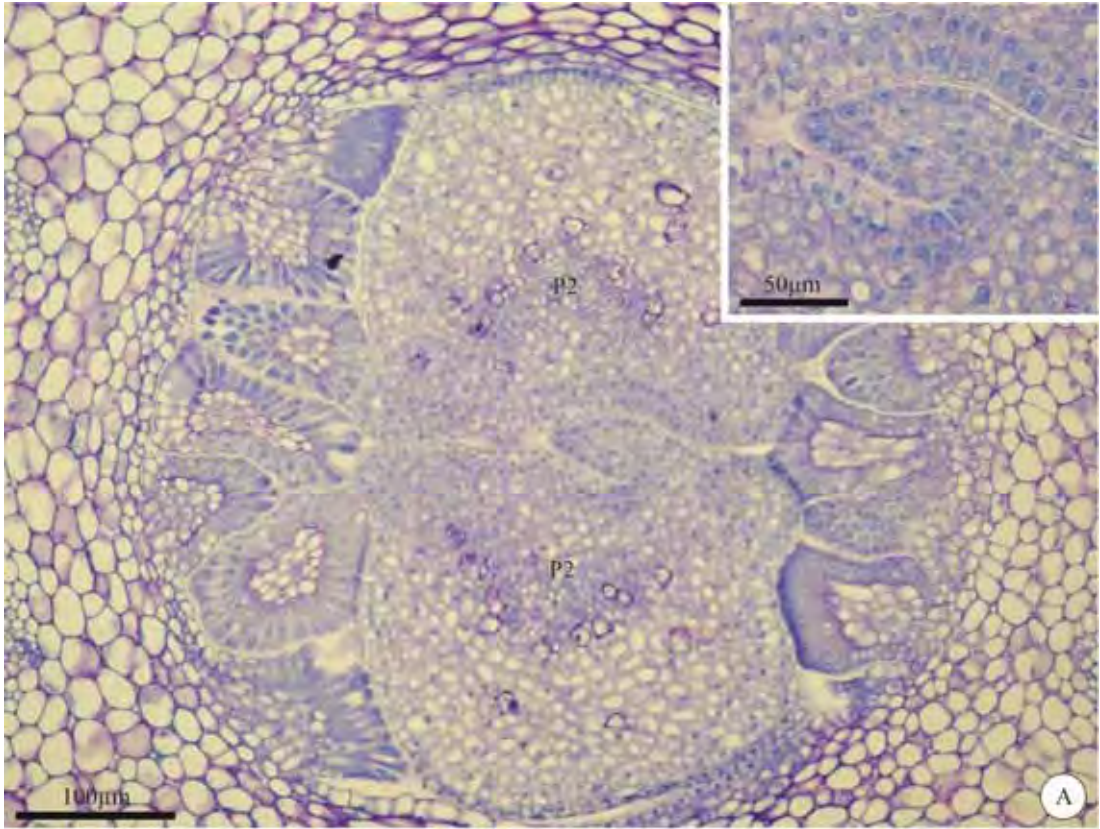


Figura 7. Ontogênese de coléteres foliares de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Secção transversal, ápice caulinar da plântula com 20 dias, observar disposição alterna dos coléteres e em alturas ligeiramente distintas, em cada um dos dois primórdios eofilares (P2) opostos; esses coléteres ocupam um espaço relativamente amplo entre os dois primórdios. **B-E.** Secções transversais do ápice caulinar da planta com 80 dias. **B.** Observar coléteres se formando na base dos primórdios de metafilos (P2) em diferentes fases de diferenciação, sendo os mais periféricos mais diferenciados do que os mais internos; primórdios foliares cônicos (P1) sem coléteres. **C.** Detalhe mostrando coléteres em diferentes fases de desenvolvimento inseridos, lado a lado, em um mesmo primórdio; P1= primórdio cônico. **D-E.** Protuberâncias formadas por células protodérmicas e células do meristema fundamental subjacente. Coloração: A-E (Azul de Toluidina).

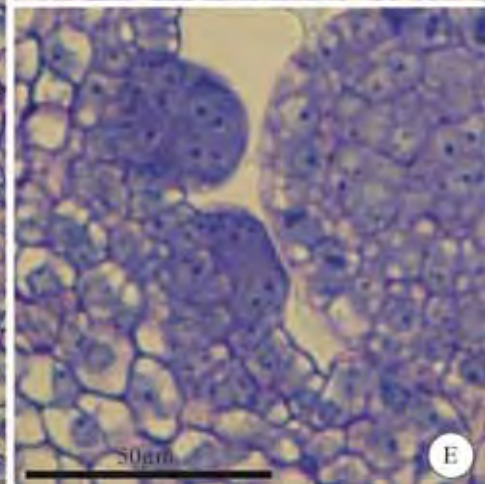
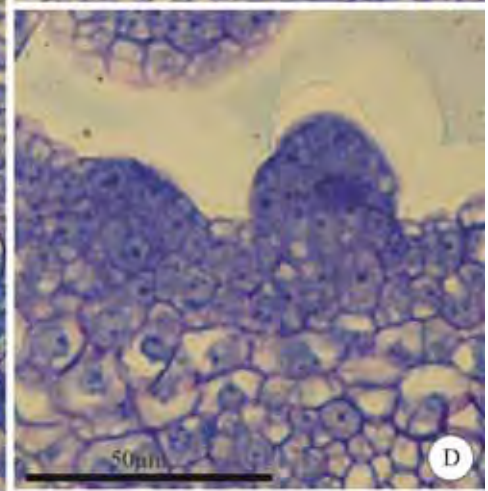
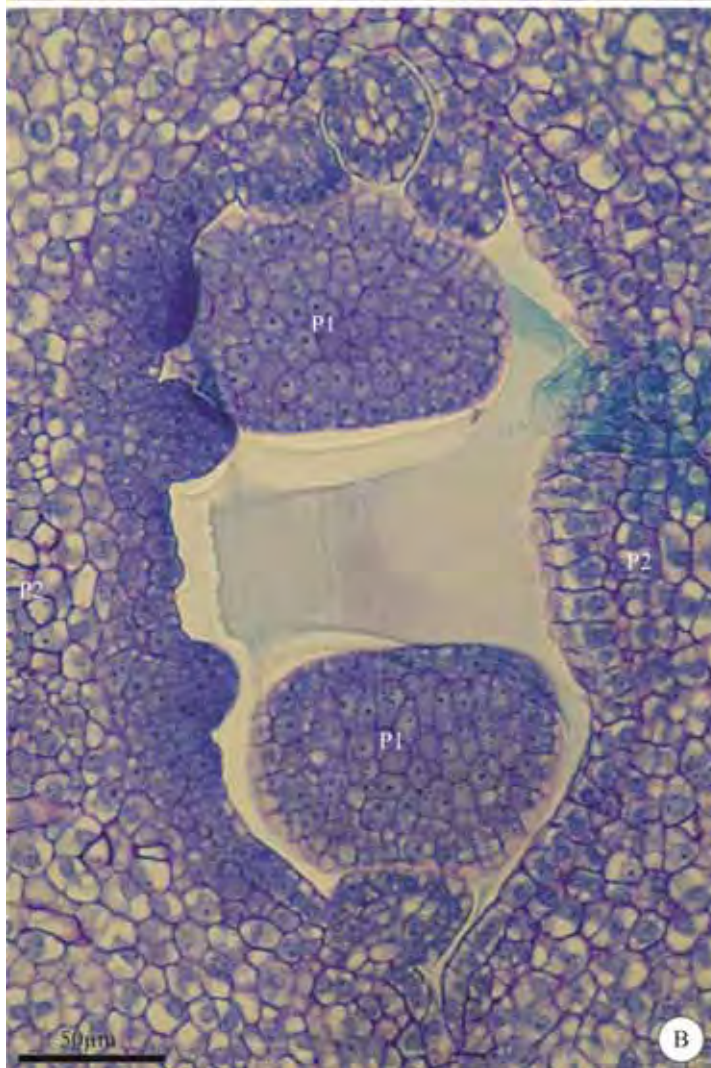
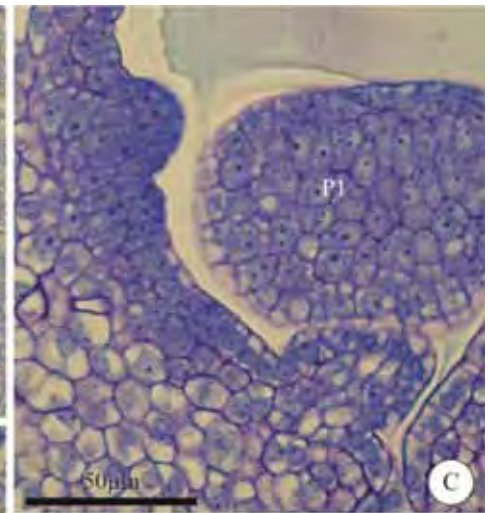
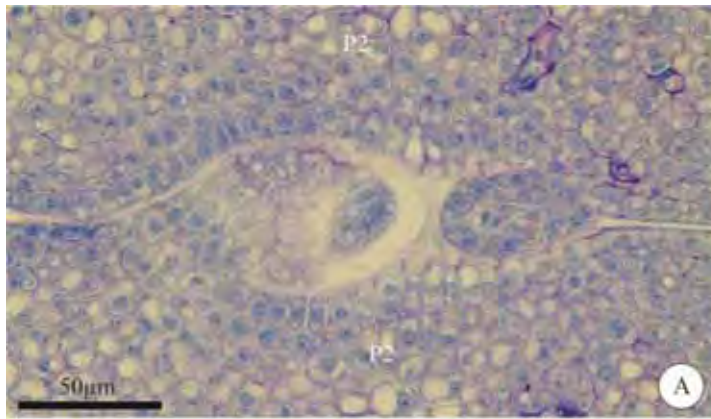


Figura 8. Secções longitudinais do ápice caulinar da planta com 80 dias de *T. catharinensis* A.DC. **A.** Observar coléteres ativos em secreção no terceiro nó e coléter em formação próximo à gema axilar (círculo). **B.** Coléter em desenvolvimento adjacente à gema axilar e, mais acima, um coléter desenvolvido. Coloração: A-B (Azul de Toluidina).

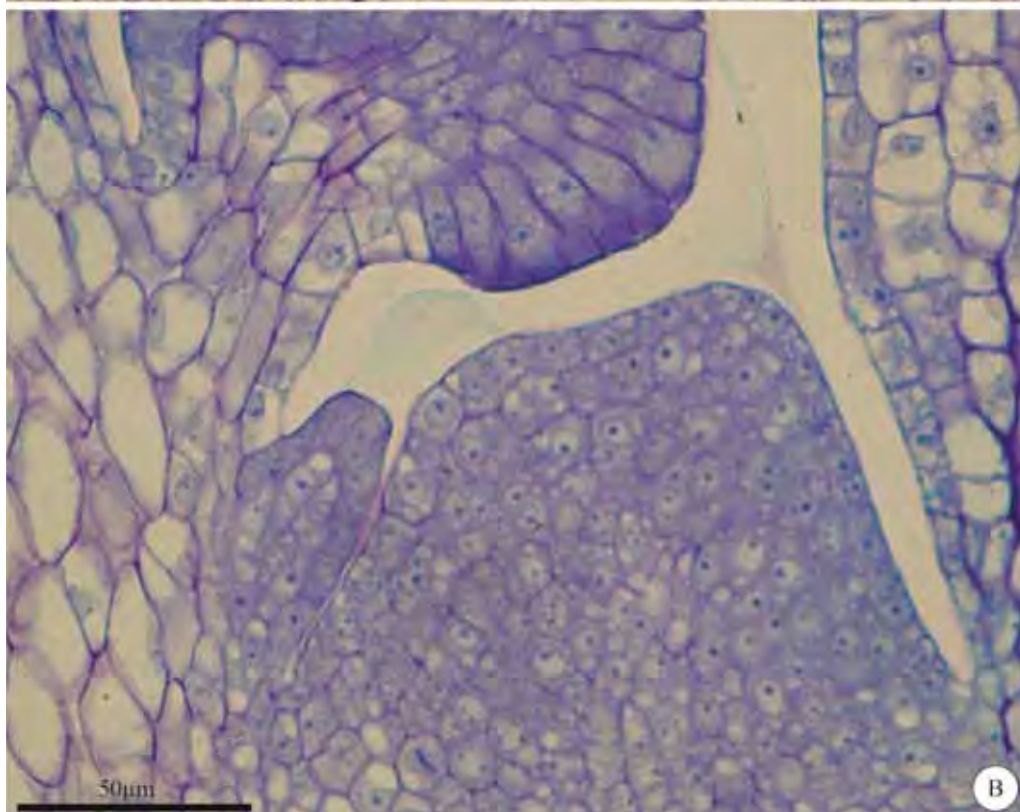
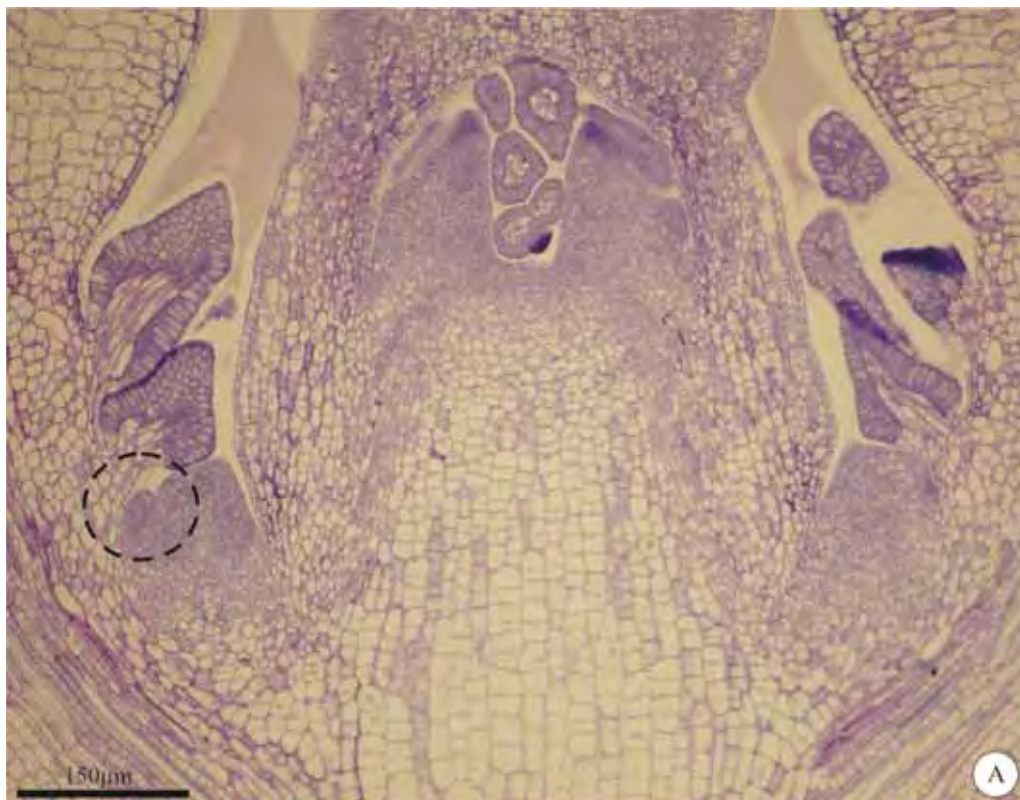


Figura 9. Coléteres de *T. catharinensis* A.DC. **A, B e D.** Secções transversais da região do nó cotiledonar da plântula com 20 dias. **C.** Secção longitudinal na região do nó cotiledonar da planta com 80 dias. **A.** Observar células do epitélio secretor com formato de chave e a secreção acumulada no espaço subcuticular (*). **B.** Observar que as células do epitélio secretor de um mesmo coléter exibem características pré-secretoras (elipse 1), secretoras (elipse 2) e pós-secretoras (elipse 3). Notar espaço subcuticular (*) com secreção acumulada. **C.** Coléter senescente com cutícula intacta. **D.** Coléter em fase pós-secretora; notar células epiteliais com citoplasma fortemente corado com o Azul de Toluidina, vacúolos de diferentes tamanhos translúcidos ou com glóbulos densos, e retração do protoplasto e das paredes celulares; a cutícula permanece intacta. Coloração: A-D (Azul de Toluidina).

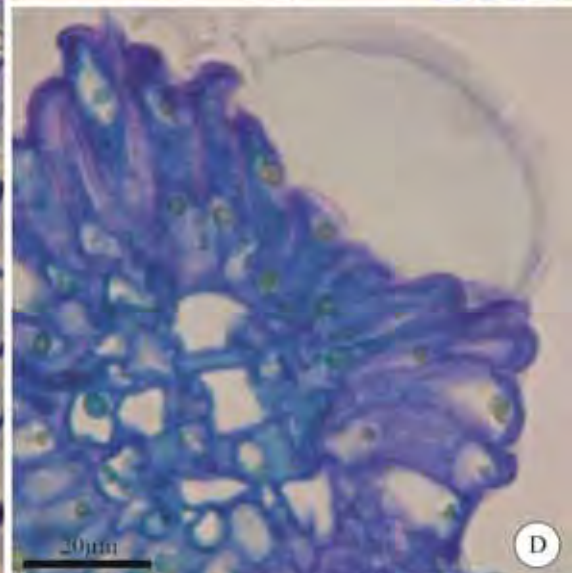
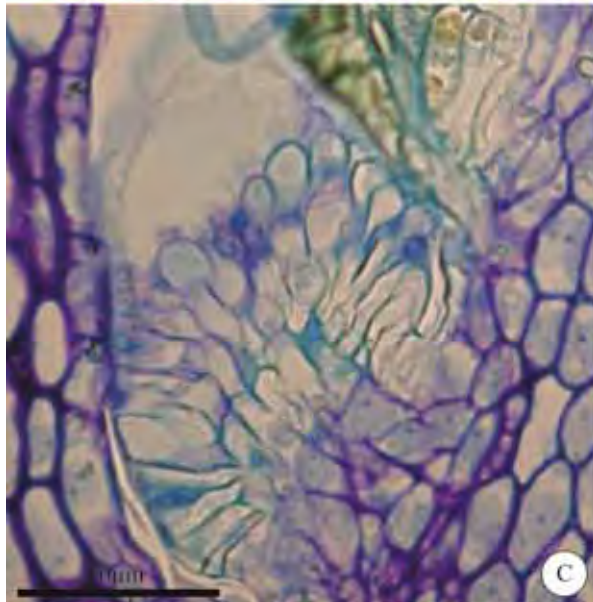
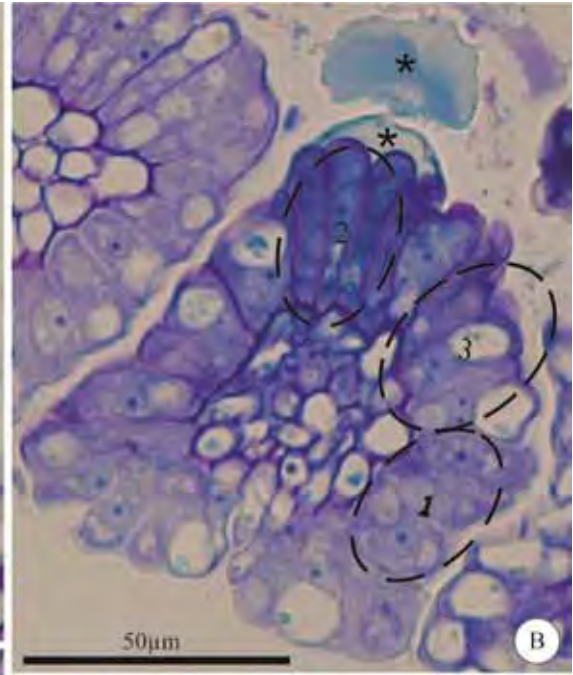
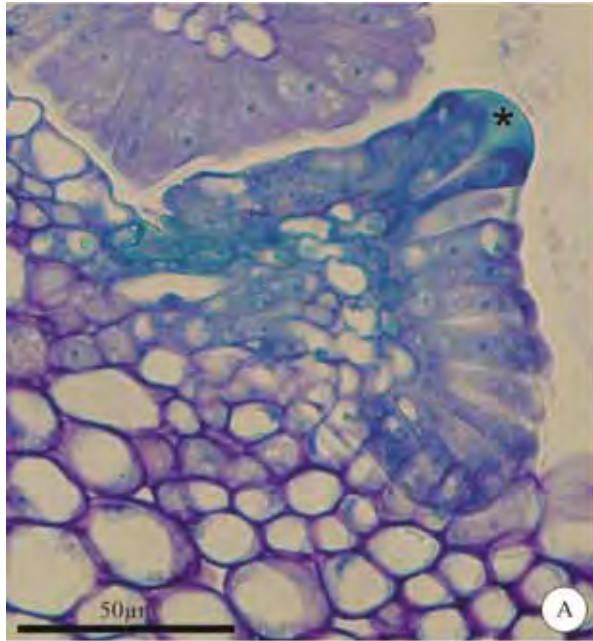
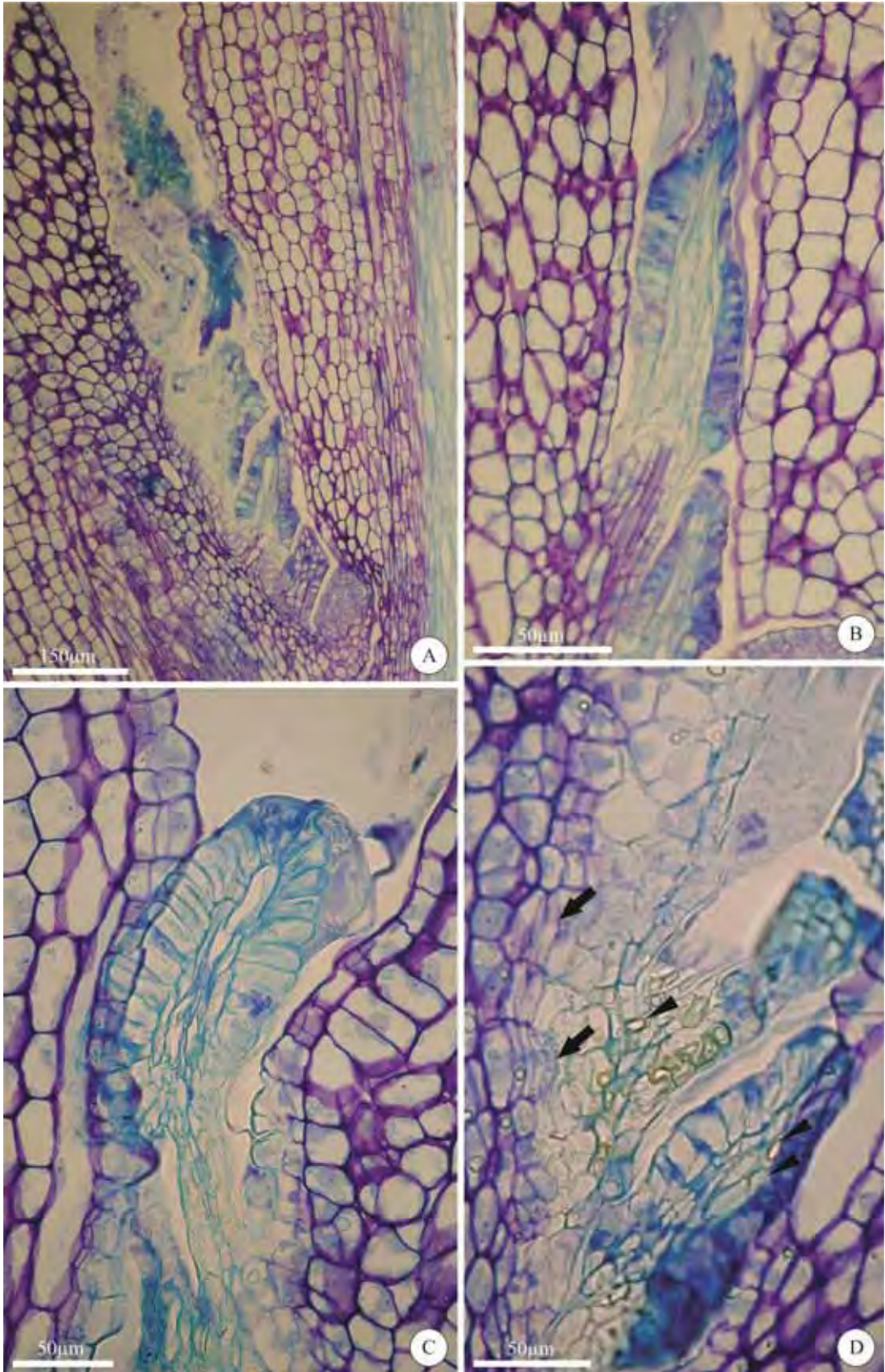


Figura 10. Secções longitudinais do nó cotiledonar da planta de *T. catharinensis* A.DC. com 80 dias mostrando coléteres senescentes. **A.** Coléteres mais distantes da base foliar encontram-se em processo de senescência mais avançado do que os que estão próximos à base. **B.** Coléter mostrando que a senescência ocorre do ápice para a base. **C.** Os coléteres senescentes apresentam lignificação generalizada; notar ligeira contração do coléter. **D.** Cristais prismáticos de oxalato de cálcio (pontas de seta) e lignificação generalizada das células do coléter. Notar também a formação de uma periderme subjacente aos coléteres senescentes (setas).



Considerações gerais

Considerações gerais

O presente estudo mostrou que *Tabernaemontana catharinensis*, uma espécie de Apocynaceae conhecida como leiteira ou casca-de-cobra, apresenta coléteres e laticíferos ativos em secreção desde as fases iniciais do desenvolvimento vegetativo.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o papel atribuído a secreção produzida pelos coléteres na proteção e lubrificação de meristemas e estruturas em início de desenvolvimento, enquanto laticíferos constituem um potente sistema de defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Assim, esta espécie constitui um excelente modelo para estudos sobre o papel das estruturas secretoras no sucesso adaptativo.

Mesmo estudando uma única espécie, os resultados obtidos certamente trouxeram importantes contribuições com relação ao conhecimento da estrutura, ontogênese e desenvolvimento de coléteres e laticíferos para a família Apocynaceae. No entanto, alguns aspectos importantes dessas estruturas merecem um aprofundamento, como:

- a) Ontogênese de coléteres dos tipos bifurcado e trifurcado e fatores determinantes;
- b) Mecanismo de liberação da secreção para a superfície dos coléteres;
- c) Dinâmica da secreção e modificações celulares durante o ciclo secretor em coléteres e laticíferos;
- d) Influência dos estresses bióticos e abióticos nos tipos estruturais e abundância de laticíferos e na composição do látex;
- e) Mecanismos envolvidos na incorporação de células parenquimáticas aos laticíferos articulados,
- f) Mecanismo de crescimento intrusivo dos laticíferos, sob o ponto de vista ultra-estrutural e citoquímico;
- g) Aspectos celulares relacionados ao mecanismo de transporte e comunicação entre laticíferos e células adjacentes.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- Achenbach, H.; Benirshke, M. & Torrenegra, R. 1997. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. **Phytochemistry** 45(2): 325-335.
- Agrawal, A.A. & Konno, K. 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 40: 311-331.
- Aguiar, S. 2003. **Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do cerrado do estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Aguiar, S. 2009. **Morfoanatomia de frutos e sementes em Apocynaceae**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Almeida, L.; Cintra, A.C.O.; Veronese, E.L.G.; Nomizo, A.; Franco, J.J.; Arantes, E.C.; Giglio, J.R. & Sampaio, S.V. 2004. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology** 137: 19-27
- Appezato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 66: 301-306.
- Appezato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 23(2): 113-120
- Araújo, A.R.; Kascheres, C.; Fujiwara, F. & Marsaioli, A.J. 1984. Catharinensine, an oxindole alkaloid from *Peschiera catharinensis*. **Phytochemistry** 23(10): 2359-2363.
- Batina, M.F.; Cintra, A.C.; Veronese, E.L.; Lavrador, M.A.; Giglio, J.R.; Pereira, P.S.; Dias, D.A.; França, S.C. & Sampaio, S.V. 2000. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica** 66: 424-428.
- Blaser, H.W. 1945. Anatomy of *Cryptostegia grandiflora* with special reference to the latex system. **American Journal of Botany** 32: 135-141.
- Carlquist, S. 1969. Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. **Phytomorphology** 19: 332-362.
- Castro, M. M. & Machado, S. R. 2006. Células e tecidos secretores. In: Appezato-da- Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M. (eds.). **Anatomia vegetal**, 2ed. UFV: Viçosa. 179-204.

- De Bary, A. 1884. **Comparative anatomy of the vegetative organs of the phanerogams and ferns**. English transl. By F.O. Bower and D.H. Scott. Clarendon Press, Oxford.
- Demarco, D. & Castro, M.M. 2008. Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas. **Revista Brasileira de Botânica** 31(4): 701-713.
- Demarco, D. 2005. **Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Demarco, D. 2008. **Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécies de Asclepiadeae (R.Br.) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do estado de São Paulo**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Demarco, D.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. **Revista Brasileira de Botânica** 29(1): 133-144.
- Endress, M.E. & Bruyns, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae s.l. **The Botanical Review** 66: 1-56.
- Endress, M.E. & Bruyns, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae s.l. **The Botanical Review** 66(1): 1-56.
- Endress, M.E.; Van der Ham, R.W.J.M.; Nilsson, S.; Civeyrel, L.; Chase, M.W.; Sennblad, B.; Potgieter, K.; Joseph, J.; Powell, M.; Lorence, D.; Zimmerman, Y.M. & Albert, V.A. 2007. A phylogenetic analysis of Alyxieae (Apocynaceae) based on rbcL, matK, trnLintron, trnL-K spacer sequences, and morphological characters. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 94(1): 1-35.
- Esau, K. 1953. **Plant anatomy**. John Wiley & Sons, Inc.: New York.
- Evert, R.F. 2006. **Esau's plant anatomy**, 3ed. Wiley-Interscience: New York.
- Ezcurra C, Endress ME, Leeuwenberg AJM. 1992. Apocynaceae. In: Spichiger R, Ramella L, eds. Flora del Paraguay, v. 7. **Genève: Conservatoire et Jardin Botanique de la ville de Genève and St Louis: Missouri Botanical Garden**.
- Fahn, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. London, Academic Press.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist** 108(3): 229- 257.
- Fahn, A. 1990. **Plant anatomy**. 4th ed., Oxford, Pergamon Press.
- Farrell, B.D.; Dussourd, D.E. & Mitter, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? **American Naturalist** 138(4): 881-900.

- Federici, E.; Palazzino, G.; Nicoletti, M. & Galeffi, C. 2000. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. **Planta Medica** 66(1): 93-95.
- Figueiredo, E.R.; Vieira, I.J.C.; Souza, J.J.; Braz-Filho, R.; Mathias, L.; Kanashiro, M.M. & Côrtes, F.H. 2010. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* (A. DC.), Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20(1): 75-81.
- Gimenez, A.M. 2004. Anatomia de leño y corteza de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC (Apocynaceae). **Quebracho** 11: 22-33.
- Giordani, R. 1978. Autophagie cellulaire et differenciation des laticiferes non articulés chez une Asclepiade. **Biologie Cellulaire** 33: 253-260.
- Gomes, A.; Das, R.; Sarkhel, S.; Mishra, R.; Mukherjee, S.; Bhattacharya, S. & Gomes, A. 2010. Herbs and herbal constituents active against snake bite. **Indian Journal of Experimental Biology** 48: 865-878
- Hagel, J.M.; Yeung, E.C. & Facchini, P.J. 2008. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Sciences** 13(12): 631-639.
- Inamdar, J.A.; Murugan, V. & Subramanian, R.B. 1988. Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. **Annals of Botany** 62(6): 583-588.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. Sistemática Vegetal: um enfoque filogenética. Porto Alegre: Artmed. 3a.ed.
- Klein, D.E.; Gomes, V.M.; Silva-Neto, S.J. & Da Cunha, M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). **Annals of Botany** 94: 733-740.
- Koch, I. & Rapini, A. 2011. Apocynaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB004861>).
- Konno, K. 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry** 72(13): 1510-1530.
- Leeuwenberg, A.J.M. 1994. **A Revision of *Tabernaemontana*. The new world species and *Stemmadenia***. UK: Royal Botanic.
- Lersten, N.R. 1974a. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. **Botanical Journal of Linnean Society** 69: 125-136.
- Lersten, N.R. 1974b. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 61: 973-981.

- Lopes, K.L.B.; Thadeo, M.; Azevedo, A.A.; Soares, A.A. & Meira, R.M.S.A. 2009. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Canadian Journal of Botany** 87(2): 202-209.
- Lorenzi, H. 1992. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum: Nova Odessa.
- Mahlberg, P.G. 1961. Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. **American Journal of Botany** 48(1): 90-99.
- Mahlberg, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. **Botanical Review** 59(1): 1-23.
- Martins, F.M.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2010. Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violácea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. **Revista Brasileira de Botânica** 33(3): 489-500.
- Matile, P. 1987. The sap of the plant cells. **New Phytologist** 105: 1-26.
- Mauseth, J.D. 1978. Further studies of the unusual type of laticiferous canals in *Mammillaria* (Cactaceae): structure and development of the semi-milky type. **American Journal of Botany** 65(10): 1098-1102.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses, v.II. Clarendon Press: Oxford.
- Metcalf, C.R. 1967. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany** 21: 115-127.
- Milanez, F.R. 1959. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – I. Embrião. **Rodriguésia** 21/22(33-34): 347-394.
- Milanez, F.R. 1960/1961. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - II. Sobre os laticíferos da estrutura primária. **Rodriguésia** 35/36: 99-128.
- Milanez, F.R. 1966. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - III. Nota sobre a estrutura secundária. **Rodriguésia** 25(37): 335-350.
- Milanez, F.R. 1977. Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium (Nerium) oleander* L. **Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica**, Rio de Janeiro 1975: 343-379.
- Monnerat, C.S.; Souza, J.J.; Mathias, L.; Braz-Filho, R. & Vieira, I.J.C. 2005. A new indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana hystrix* Steud. (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16(6): 1331-1335.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987a. Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. **Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences)** 97: 25-31.

- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987b. Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea* (Roth) O. **Ktze. Phytomorphology** 37: 209-214.
- Nessler, C.L. & Mahlberg, P.G. 1977. Cell wall perforation in laticifers of *Papaver somniferum* L. *Botanical Gazzete* 138(4): 402-408.
- Oliveira, A.J.B.; Carvalho, V.M.; Ferreira, A.; Sato, F.Y. & Machado, M.F.P.S. 2003. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore** 27(4): 421-425.
- Pereira, P.S.; Dias, D.A.; Franca, S.C.; Toldo, M.P.A. & Albuquerque, S. 1999a. Trypanocidal activity from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticulturae** 501: 165-170.
- Pereira, P. S.; Franca, S.C.; Sampaio, S.V. & Dias, D.A. 1999b. Indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. **Acta Horticulturae** 501: 171-176.
- Pereira, P. S.; Franca, S.C.; Sampaio, S.V.; Dias, D.A. 1999c. Indole alkaloid and pentacyclic triterpene contents in several parts of *Tabernaemontana catharinensis* plant. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 51 (suppl): 249.
- Ramayya, N. & Bahadur, B. 1968. Morphology of the “squamellae” in the light of their ontogeny. **Current Science** 18: 520-522.
- Rao, A.R. & Malaviya, M. 1966. The non-articulated laticifers and latex of *Tabernaemontana coronaria* Willd. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India** 32: 233-242.
- Rapini, A. 2004. Apocynaceae (dogbane and milkweed family). *In*: Smith, N. et al. (Ed.). **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: Princeton University Press. p. 23-26.
- Rio, M.C.S.; Castro, M.M. & Kinoshita, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 25(3): 339-349.
- Rio, M.C.S.; Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. **Revista Brasileira de Botânica** 28(4): 713-726.
- Rizzini, C. T. 1955. **Latim para botânicos**. Fundação Gonçalo Moniz, 226 p.
- Roy, A.T. & De, D.N. 1992. Studies on differentiation of laticifers through light and electron microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. **Annals of Botany** 70: 443-449.
- Sacchetti, G.; Ballero, M.; Serafini, M.; Romagnoli, C.; Bruni, A. & Poli, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoia* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). **Phyton** 39(2): 265-275.

- Schwarz, E.A. & Furlan, A. 2002. Coléteres foliares de *Oxypetalum* R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) — aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). **Acta Biológica Paranaense** 31(1,2,3,4): 79-97.
- Sennblad, B.; Endress, M.E. & Bremer, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. **American Journal of Botany** 85(8): 1143-1158.
- Serpe, M.D.; Muir, A.J. & Keidel, A.M. 2001. Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticíferos of *Asclepias speciosa* Torr. **Protoplasma** 216: 215-226.
- Silva, N.M.F.; Valente, M.C.; Alencastro, F.M.M.R.; Pereira, J.F. & Sucre, B.D. 1975. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. - X. Estudo taxonômico e anatômico de: *Gonioanthea odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthea hilariana* (Fourn.) Malme. **Revista Brasileira de Biologia** 35:745-756.
- Simões, A.O. & Kinoshita, L.S. 2002. The Apocynaceae s.str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. **Darwiniana** 40: 127-169.
- Simões, A.O.; Castro, M.M. & Kinoshita, L.S. 2006 Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** 152(3): 387-398.
- Soares, D. C.; Pereira, C.G.; Meireles, M.A.A. & Saraiva, E.M. 2007. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International** 56: 135-139.
- Solereder, H. 1908. **Systematic anatomy of the dicotyledons**, v.1 e 2. Clarendon Press: Oxford.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2005. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa.
- Spitzer, V.; Rates, M.K.; Henriques, A.T. & Marx, F. 2006. The fatty acid composition of the seed oil of *Peschiera australis*, Fett (Germany) 97(1995) 334.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). **Korean Journal of Botany** 32: 163-172.
- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. **Annals of Botany** 68(4): 287-305.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <<http://www.tropicos.org/Name/1800579>> (acesso em 20/12/2011)

- Van Beek, T. A.; Verpoorte, R.; Svendsen, A.B.; Leeuwenberg, A.J. & Bisset, N.G. 1984. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal Ethnopharmacology* 10: 1-156.
- Veronese, E.L.; Esmeraldino, L.E.; Trombone, A.P.; Santana, A.E.; Bechara, G.H.; Kettelhut, I.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R. & Sampaio, S.V. 2005. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). *Phytomedicine* 12(1-2): 123-30.
- Williams, R.F.; Metcalfe, R.A. & Gust, L.W. 1982 The genesis of form in oleander (*Nerium oleander* L.). *Australian Journal of Botany* 30: 677-687.
- Wilson, K.J. & Mahlberg, P.G. 1978. Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 65(1): 98-109.
- Wilson, K.J. & Mahlberg, P.G. 1980. Ultrastructure of developing and mature nonarticulated laticifers in the milkweed *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 67(8): 1160-1170.
- Wilson, K.J. & Maxam, T.E. 1987. Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 74: 628-628.
- Woodson, R.E. Jr & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-165.
- Yoder, L.R. & Mahlberg, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63: 1167-1173.
- Zocoler, M.A.; Oliveira, A.J.B.; Sarragiotto, M.H.; Grzesiuk, V.L. & Vidotti, G.J. 2005. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(6): 1372-1377.