

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/08/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Botucatu



Diferenciação de laticíferos articulados em plantas de *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)

YVE CANAVEZE

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

BOTUCATU-SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Botucatu



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

Diferenciação de laticíferos articulados em plantas de
***Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)**

YVE CANAVEZE

PROF^A DR^A SILVIA RODRIGUES MACHADO
ORIENTADORA

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

BOTUCATU-SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Canaveze, Yve.

Diferenciação de laticíferos articulados em plantas de
Tabernaemontana catharinensis (Apocynaceae) / Yve
Canaveze. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Silvia Rodrigues Machado

Capes: 20302029

1. Apocináceas. 2. Imunocitoquímica. 3. Plantas -
Diferenciação celular. 4. Plantas - Reguladores. 5. Parede
Celular.

Palavras-chave: Apocynaceae; Diferenciação celular;
Imunocitoquímica vegetal; Parede celular; Reguladores
vegetais.

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
Ao Danilo
- porque ele faz parte disto!

Agradecimentos

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela bolsa de estudos concedida nos meses iniciais do doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Fapesp) pela bolsa de doutorado que usufruo atualmente (Proc. 2012/16441-3) e pelo suporte financeiro (TEM-Biota proc. 2008/55434-7; Coordenadora 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.

À **Profa. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti** e ao **Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath**, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, pelo acolhimento e ensinamentos no período em que estive no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg), UFRGS, Porto Alegre/RS. Em especial à **Profa. Alexandra** pelos auxílios no processamento e interpretação de resultados em imunolocalização de componentes de parede celular.

Ao **Prof. Dr. Paul Knox** (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) pelos anticorpos monoclonais de rato JIM5, JIM7, LM5 e LM6 gentilmente doados.

Ao **Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior** e à **Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**, ambos do Departamento de Anatomia desta Instituição, pela paciência e por toda a sabedoria que compartilharam comigo nos inúmeros momentos de dúvida sobre as técnicas de imunolocalização.

Ao **Prof. Dr. João Domingos Rodrigues**, à **Profa. Dra. Elizabeth Orika Ono** e à pós-doutoranda **Amanda Cristina Esteves Amaro**, todos do Departamento de Botânica desta Instituição, pelos esclarecimentos com relação aos reguladores vegetais e empréstimo e utilização de equipamentos.

Aos **Profs. Dr. Felipe W. Amorim** e **Dr. Luiz Fernando R. de Almeida** e ao mestrando **Roberto de O. Portella** pelo auxílio com os testes estatísticos.

À empresa **Carolina Soil do Brasil** pela doação de seis sacos de substrato Carolina II e C 0,7.

A **todos os alunos, funcionários e professores do Departamento de Botânica** desta instituição, pela agradável convivência e pela pronta ajuda.

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

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

Aos funcionários do **Centro de Microscopia Eletrônica de Botucatu** (CME), desta Instituição, pelo processamento das amostras destinadas à microscopia eletrônica de transmissão e pela amizade.

Aos meus grandes amigos, **Clívia Carolina Fiorilo Possobom**, **Sérgio Akira Adachi** e **Camila A. Zanetti**, companheiros em todos os momentos e que foram essenciais para o desenvolvimento desta tese. Agradeço infinitamente as numerosas ajudas e o companheirismo!

Ao **Danilo Rosa de Lima**, que me ensina diariamente a ser uma pessoa melhor e que foi fundamental em diversos momentos desta tese. Agradeço por cada momento que passamos juntos.

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

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	17
CAPÍTULO I – Change in glycans epitopes and cellular dynamic on the incorporation of cells and intrusive growth in articulated laticifers of <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A.DC. (Apocynaceae).....	18
Abstract.....	18
Introduction.....	19
Material and methods.....	21
Results.....	25
Discussion.....	31
Conclusions.....	38
References.....	38
Table, Figures and Figure Capitions.....	44
CAPÍTULO II – Influence of exogenous ethylene and jasmonic acid on the laticifers differentiation: evidence obtained from <i>Tabernaemontana catharinensis</i> (Apocynaceae) plants	56
Abstract.....	56
Introduction.....	57
Material and methods.....	59
Results.....	61
Discussion.....	63
Acknowledgements.....	65
Literature Cited.....	66
Table, Figures and Figure Capitions.....	70
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

Canaveze, Y. **Diferenciação de laticíferos articulados em plantas de *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)**. 2016. TESE DE DOUTORADO – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, CAMPUS DE BOTUCATU.

RESUMO – Neste estudo buscamos avaliar diferentes aspectos da diferenciação de laticíferos. O crescimento intrusivo (capacidade de crescer penetrando a lamela média de células adjacentes) e a ação indutora dos laticíferos (capacidade de induzir uma célula vizinha a adquirir características de laticíferos) são mecanismos de crescimento interessantes que podem ocorrer nos laticíferos, mas que são mal compreendidos. O etileno e o ácido jasmônico são hormônios vegetais liberados durante a herbivoria e podem afetar a diferenciação de estruturas secretoras relacionadas à defesa, como laticíferos e ductos resiníferos. Utilizando métodos convencionais em microscopia eletrônica de transmissão, para caracterização da ultraestrutura celular, e imunocitoquímicos, para a detecção de componentes de parede celular, exploramos o desenvolvimento de laticíferos articulados anastomosados com crescimento intrusivo e a ação indutora dos laticíferos no embrião maduro e na planta de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae). Além disso, pulverizamos soluções de etileno 2%, ácido jasmônico 0,1% ou água deionizada em plantas ($n = 33$) de *T. catharinensis* cultivadas em condições controladas e avaliamos a influência destes reguladores vegetais sobre a diferenciação dos laticíferos nos tecidos primários e floema secundário. Ultraestruturalmente, verificamos que o processo de incorporação de células ao sistema laticífero é distinto no embrião e na planta. Entretanto, em ambos os casos, o protoplasto da célula incorporada adquire características semelhantes à de laticíferos, e a incorporação é restrita às células em contato com laticíferos. Os tratamentos imunocitoquímicos revelaram que as paredes celulares dos laticíferos e

das células do meristema fundamental no embrião maduro marcaram de maneira semelhante para JIM7 e JIM5 (homogalaturonanos com grau de alta e baixa de metil-esterificação, respectivamente), LM6 ((1→5)- α -L-arabinanos) e BS400-2 (calose). Em porções indiferenciadas do ápice caulinar na planta, as paredes dos laticíferos marcaram mais intensamente para JIM5 e LM6 e exibiram fraca ou nenhuma marcação para LM5 ((1→4)- β -D-galactanos) e BS400-2 do que as células meristemáticas adjacentes. A detecção de epitopos glicanos no ápice caulinar da planta é compatível com crescimento intrusivo em laticíferos. Análises quantitativas revelaram que a diferenciação dos laticíferos originados do meristema fundamental (córtex e medula) é reduzida por etileno exógeno, enquanto o ácido jasmônico parece não influenciar a diferenciação dos laticíferos. A diferenciação dos laticíferos originados do procâmbio e do câmbio vascular parece não ser influenciada pelo etileno e ácido jasmônico exógenos. Assim, considerando as funções protetoras do látex, plantas tratadas com etileno exógeno podem ficar mais vulneráveis ao ataque de herbívoros e patógenos.

Palavras-chave: ácido jasmônico, Apocynaceae, imunocitoquímica, etileno, sistema laticífero, ultraestrutura

Canaveze, Y. **Differentiation of articulated laticifers in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)**. 2016. TESE DE DOUTORADO – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, CAMPUS DE BOTUCATU.

ABSTRACT – In this study, we evaluated different aspects of the laticifer differentiation. The intrusive growth (the capacity of grow penetrating the middle lamella that cements adjacent cells) and the inducing action of laticifers (the capacity of induced an adjacent cell to acquirer laticifer features) are exciting growth mechanisms that may occur in laticifers, but they are poorly understood. Ethylene and jasmonic acid are plant hormones released during the herbivory and may affect the differentiation of secretory structures related with plant defense, as laticifers and resin ducts. Using transmission electron microcopy conventional methods (for characterization of the cell ultrastructure), and immunocytochemistry (for detection of the cell wall compounds), we explored the development of the articulated anastomosing laticifers with intrusive growth and the induction action of laticifer in the mature embryo and plant of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae). Additionally, we sprayed solutions of the 2% ethephon, 0.1% jasmonic acid and deionized water in plants of *T. catharinensis* ($n = 33$) growing under controlled conditions and evaluated the influence of these plant regulators on laticifer differentiation in the primary tissues and secondary phloem. In the ultrastructure, we verified that the process of cell incorporation within the laticifer system is distinct in the embryo and plant. However, in both the cases the protoplast of the incorporated cells acquires similar features of laticifers, and the incorporation is restricted to those cells in contact with laticifers. The immunolocalization analyses revealed that walls of laticifers and ground meristem cells in the mature embryo have

similar labeled for JIM7 and JIM5 (homogacturonans with high and low degree of methyl-esterification, respectively), LM6 ((1→5)- α -L-arabinans) and BS400-2 (calose). In undifferentiated portions of the plant shoot apex, the laticifer walls show more intense labeling for JIM5 and LM6 and exhibit weak or no labeling for LM5 ((1→4)- β -D-galactans) and BS400-2 than the adjacent meristematic cells. The labeling of glycan epitopes in the shoot apex of plant is compatible with intrusive growth in laticifers. Quantitative analyzes revealed that the differentiation of laticifers from ground meristem (in cortex and pith) is reduced by exogenous ethylene, while jasmonic acid appears not to influence on the laticifer differentiation. Laticifer differentiation from procambium and vascular cambium seems be not influenced by ethylene or jasmonic acid. Thus, considering the protective latex functions, we suggest that the negative effect of exogenous ethylene on laticifer differentiation in *T. catharinensis* would make the plants most vulnerable to attack by herbivores and pathogens.

Key words: Apocynaceae, ethylene, immunocytochemistry, jasmonic acid, laticifer system, ultrastructure

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 atribuíram o maior sucesso das plantas latescentes nos diversos ambientes, em relação às não latescentes, às funções protetoras do látex (Farrell et al. 1991, Agrawal & Konno 2009, Konno 2011).

Estruturalmente, os laticíferos são classificados em dois tipos: não-articulados e articulados (Esau 1953). 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 (Evert 2006). Laticíferos articulados são formados por fileiras de células alongadas, que se dispõem em série, podendo suas paredes terminais permanecer íntegras ou serem parcial ou totalmente dissolvidas (Evert 2006). Se houver conexões entre fileiras axiais distintas, os laticíferos são classificados como articulados anastomosados, em não ocorrendo tais conexões, os laticíferos são classificados como articulados não-anastomosados (Evert 2006).

Em laticíferos articulados, a incorporação de células parenquimáticas (em tecidos diferenciados) ou de células do meristema fundamental (em tecidos indiferenciados) ao sistema laticífero tem sido relatada para diferentes espécies (Milanez 1959, 1977, Lopes et al. 2009, Canaveze & Machado *in press*). A ramificação horizontal em laticíferos do

embrião maduro de *Nerium oleander* (Apocynaceae), parece ser resultado da ação indutora do laticífero sobre uma célula meristemática vizinha; o laticífero emite uma projeção lateral fina que penetra no citoplasma da célula adjacente e, posteriormente, essa célula se diferencia apresentando características de laticíferos (Milanez 1977). A ação indutora do laticífero ainda não é clara e merece ser estudada.

Laticíferos articulados e não articulados podem se ramificar em regiões meristemáticas ou de alongamento por crescimento intrusivo através de projeções apicais ou laterais (Rudall 1987, Canaveze and Machado *in press*). Este tipo de crescimento tem sido estudado com maior detalhe em laticíferos não articulados (Serpe et al. 2001, 2002, 2004) e requer alterações e rearranjos dos componentes de parede celular, além da quebra de conexões simplásticas (Mahlberg 1993, Serpe et al. 2002). Métodos imunocitoquímicos para a localização de componentes de parede celular podem auxiliar na compreensão da dinâmica da parede durante o crescimento intrusivo em laticíferos (Serpe et al. 2001, 2002, 2004).

Diversas linhas de evidência demonstram que a produção de látex é afetada por condições bióticas e abióticas, dentre elas a herbivoria (Agrawal & Konno 2009). As injúrias causadas na planta durante a herbivoria estimulam a produção de hormônios vegetais que desencadeiam diferentes respostas fisiológicas nas plantas: o etileno é o hormônio liberado em função do estresse mecânico e o ácido jasmônico, em função ao estresse químico (Taiz & Zeiger 2006).

Nesse sentido, alguns estudos têm buscado compreender a atuação dos hormônios/reguladores vegetais na formação de estruturas secretoras relacionadas à defesa das plantas, como ductos e laticíferos. Etileno (Yamamoto & Kozlowski 1987, Fahn 1988, Hudgins & Franceschi 2004) e metil jasmonato (Hudgins & Franceschi 2004)

exógenos induzem a formação de ductos resiníferos traumáticos em diferentes espécies, especialmente coníferas.

Em cultivos comerciais de *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae), o ethephon, um agente liberador de etileno, é comumente aplicado para estimular o fluxo de látex (Hao & Hu 2000). Entretanto, o etileno não causa alterações quantitativas observáveis nos laticíferos de indivíduos de *H. brasiliensis* em que não há coleta de látex (Hao & Hu 1984). A aplicação de ácido jasmônico e ácido linolênico em plantas de *H. brasiliensis* promovem o aumento do número de laticíferos no córtex e no floema secundário (Hao & Hu 2000). O ácido linolênico é precursor do ácido jasmônico e esses hormônios são associados à defesa contra patógenos e ataque de insetos (Hao & Hu 2000). Nesse mesmo estudo, a aplicação de ácido abscísico, etileno e ácido salicílico não promovem efeito detectável na diferenciação dos laticíferos (Hao & Hu 2000). Assim, a influência dos reguladores vegetais na diferenciação de laticíferos merece ser melhor investigada.

Tabernaemontana catharinensis A.DC. (Apocynaceae) tem uma ampla distribuição geográfica que se estende a diferentes domínios fitogeográficos do Brasil (Koch et al. 2015). Esta espécie é abundante em áreas com forte alteração antrópica, além de ocorrer em pastagens e culturas (Pott et al. 2006). O extrato desta planta exhibe atividades tripanocida (Pereira et al. 1999), leishmanicida (Soares et al. 2007), anti-tumoral (Almeida et al. 2004) e anti-ofídica (Batina et al. 2000, Almeida et al. 2004, Veronese et al. 2005, Gomes et al. 2010). Alcalóides indólicos com diferentes propriedades farmacológicas e aplicações em medicina popular também foram registrados *T. catharinensis* (Pereira et al. 2004, Gonçalves 2011).

T. catharinensis possui laticíferos articulados anastomosados com crescimento intrusivo nos corpos primário e secundário da planta e seu desenvolvimento envolve

fusão de protoplastos, adição de células e crescimento intrusivo (Canaveze & Machado *in press*).

Neste estudo buscamos compreender aspectos importantes da diferenciação de laticíferos articulados. Utilizando métodos convencionais em microscopia eletrônica de transmissão, para caracterização da ultraestrutura celular, e imunocitoquímicos, para a detecção de componentes de parede celular, exploramos o desenvolvimento de laticíferos articulados anastomosados com crescimento intrusivo e a ação indutora dos laticíferos em embrião maduro e planta de *T. catharinensis*. Outro aspecto da diferenciação dos laticíferos que avaliamos foi a influência do etileno e ácido jasmônico sobre a diferenciação dos laticíferos nos tecidos primários e floema secundário, utilizando plantas de *T. catharinensis* cultivadas em condições controladas.

Nosso estudo, que leva em conta diferentes aspectos referentes à diferenciação de laticíferos, pode contribuir para programas de melhoramento da produção e da coleta de látex, porque além das diferentes funções ecológicas já apresentadas, alguns componentes do látex também apresentam importância econômica relevante (Agrawal & Konno 2009).

Considerações gerais

Mais de 20.000 espécies distribuídas em mais de 40 famílias de Angiospermas (8,9% das Angiospermas) exudam látex. O látex da maioria das espécies contém uma variedade de compostos biologicamente ativos, como terpenóides, alcalóides, borracha, proteases, quitinases e glicosidades. Os laticíferos, células que produzem e armazenam látex, constituem importante objeto de estudo; entretanto, os estudos são restritos a poucas espécies de interesse econômico.

Neste estudo, buscamos compreender aspectos relacionados à diferenciação dos laticíferos articulados em *Tabernaemontana catharinensis* A.DC., uma Apocynaceae nativa e amplamente distribuída no Brasil, portadora de um sistema laticífero complexo cujo desenvolvimento envolve a fusão de protoplastos, adição de células e crescimento intrusivo.

As semelhanças na composição de glicanos da parede celular dos laticíferos no ápice caulinar da planta entre espécies portadoras de laticíferos articulados e não articulados com crescimento intrusivo revela que mecanismos envolvidos neste tipo de crescimento são independentes do tipo de laticífero. Uma abordagem interessante para estudos futuros é a verificação destes glicanos de parede em espécies de Apocynaceae com laticíferos articulados, mas que não apresentam crescimento intrusivo.

A semelhança nas características das paredes dos laticíferos e de células meristemáticas no embrião é um indício de que, embora os laticíferos no embrião maduro sejam considerados ativos em secreção, suas paredes ainda podem estar num estado “imaturo”. Nosso estudo é o primeiro a comparar a composição de glicanos de parede celular em laticíferos no embrião e na planta. Assim, estudos que aprofundem

estas comparações para outras espécies vegetais podem ser promissores e importantes para a compreensão da dinâmica da parede celular.

A ação indutora dos laticíferos, levando à aquisição de características de laticíferos por células adjacentes, meristemáticas ou parenquimáticas, foi suportada neste estudo e ocorre por mecanismos distintos no embrião maduro e na planta. No embrião maduro, o crescimento dos laticíferos parece ocorrer predominantemente pela fusão de protoplastos e ação indutora dos laticíferos sobre células adjacentes. O predomínio destes mecanismos de desenvolvimento pode estar relacionado às baixas taxas de multiplicação e alongamento celular no embrião maduro, o que restringiria a expansão dos laticíferos por crescimento intrusivo.

Os resultados obtidos com a aplicação de reguladores vegetais divergiram daqueles encontrados na literatura. O etileno exógeno diminuiu a diferenciação de laticíferos originados do meristema fundamental, enquanto o ácido jasmônico não influenciou a diferenciação dos laticíferos. A influência negativa do etileno exógeno pode ser consequência da concentração utilizada, idade da planta, dentre outros fatores. A indução na diferenciação dos laticíferos pode estar relacionada a outros reguladores vegetais, como por exemplo, o ácido salicílico, um hormônio vegetal também relacionado à resposta a resistência induzida, ou mesmo a uma combinação de reguladores e sinalizadores celulares. Neste contexto, experimentos laboratoriais simulando a herbivoria (e.g. remoção das folhas) ou mesmo a interação da planta com o herbívoro e a imediata avaliação dos níveis de hormônios (etileno, ácido jasmônico, ácido salicílico, ácido abscísico, entre outros) no látex podem contribuir para a escolha das dosagens e hormônios que possam induzir a diferenciação dos laticíferos.

Embora tenhamos encontrado alguns problemas técnicos durante o cultivo de *T. catharinensis* em condições controladas, esta espécie não requer cuidados especiais, a germinação das sementes e a obtenção de plântulas seguem protocolos rotineiros e as plantas podem ser mantidas por períodos longos (cerca de dois anos) em vasos. Estas características favorecem a sua utilização em experimentos laboratoriais. Além disso, o modo de desenvolvimento do seu sistema laticífero a torna ainda mais interessante como um modelo de planta portadora de látex para ser estudada.

Referências Bibliográficas

- 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.
- Cai, X., Li, W. & Yin, L. 2009. Ultrastructure and cytochemical localization of acid phosphatase of laticifers in *Euphorbia kansui* Liou. *Protoplasma* 238:3-10.
- Canaveze, Y. 2012. Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos e coléteres em plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Rauvolfioideae, Apocynaceae) em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo. Dissertação de mestrado – UNESP, Campus de Botucatu.
- Canaveze, Y., Machado, S. R. 2015. Leaf colleters in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis, and cellular secretion. *Botany* 93(5): 287-296.
- Condon, J.M. & Fineran, B.A. 1989. Distribution and organization of articulated laticifers in *Calystegia silvatica* (Convolvulaceae). *Botanical Gazette* 150(3): 289-302.
- Da Cunha, M., Gomes, V.M., Xavier-Filho, J., Attias, M., De Souza, W. & Miguens, F.C. 2000. The laticifer system of *Chamaesyce thymifolia*: a closed environment for plant trypanosomatids. *Biocell* 24: 123-132.
- 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. 2015. Micromorfología y histoquímica de los laticíferos de órganos vegetativos de especies de Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Acta Biológica Colombiana* 20(1):57-65.
- Demarco, D., Kinoshita, L.S. & Castro, M.M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 133-144.
- Dusotoit-Coucaud, A., Brunel, N., Kongsawadworakul, P., Viboonjun, U., Lacointe A., Julien, J-L, Chrestin, H. & Sakr, S. 2009. Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Annals of Botany* 104: 635-647.
- Esau, K. 1953. Plant anatomy. John Wiley & Sons, Inc.: New York
- 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. 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.
- Fay, E., Sanier, C. & Hebant, C. 1989. The distribution of plasmodesmata in the phloem of *Hevea brasiliensis* in relation to laticifer loading. *Protoplasma* 149:155-162.
- Fineran, B.A., Condon, J.M. & Ingerfeld, M. 1988. An impregnated suberized wall layer in laticifers of the Convolvulaceae, and its resemblance to that in walls of oil cells. *Protoplasma* 147: 42- 54.
- Gale, E.F., Wayman, F. & Orlean, P.A. 1984. The action of 2-Deoxy-D-glucose on the incorporation of glucose into (1→3)-β-D-glucan in stationary phase cultures of *Candida albicans*. *Journal General Microbiology* 130(12): 3303-11.

- 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.
- Hao, B.Z & Wu, J.L. 1984. Acceleration of laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis* by latex drainage. *Chinese Journal of Tropical Crops* 5: 19-23.
- Hervé, C., Marcus, S.E. & Knox, J.P. 2011. Monoclonal Antibodies, Carbohydrate-Binding Modules, and the Detection of Polysaccharides in Plant Cell Walls. *In The Plant Cell Wall - Methods and Protocols*. Z.A. Popper. Humana Press: New York. pp: 103-114.
- Hervé, C., Rogowski, A., Gilbert, H.J., & Knox, J.P. 2009. Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls. *The Plant Journal* 58: 413-422.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.
- Jones, L., Seymour, G.B. & Knox, J.P. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. *Plant Physiology* 113(4):1405-1412.
- 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.
- 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 atrovilacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). *Canadian Journal of Botany* 87(2): 202-209.
- Mahlberg, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* 59(1):1-23.

- Malhberg, P.G. 1966. Mitotic Waves in Laticifers of *Euphorbia marginata*. *Science* 152:518-519.
- Marcus, S.E., Blake, A.W., Benians, T.S.A., Lee, S.K.J.D., Poyser, C., Donaldson, L., Leroux, O., Rogowski, A., Petersen, H.L., Boraston, A., Gilbert, H.J., Willats, G.W.T & Knox, J.P. 2010. Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *The Plant Journal* 64: 191-203.
- Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T. & Knox, J.P. 2008. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* 1-12 (doi:10.1186/1471-2229-8-60).
- Matile, P. 1987. The sap of the plant cells. *New Phytologist* 105: 1-26.
- McCartney, L., Steele-King, C.G., Jordan, E. & , Knox, J.P. 2003. Cell wall pectic (1→4)-β-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *The Plant Journal* 33(3): 447-454.
- McCartney, L., Ormerod, A.P., Gidley, M.J. & Knox, J.P. 2000. Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *The Plant Journal* 22 (2): 105-113.
- McDowel, E.M. & Trump, B.F. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100(8): 405-414.
- Meikle, P.J., Bönig, I., Hoogenraad, N.J., Clarke, A.E. & Stone, B.A. 1991. The location of (1→3)-β-glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1→3)-β-glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185:1-8.

- Meikle, P.J., Hoogenraad, N.J., Bönig, I., Clarke, A.E. & Stone, B.A. 1994. A (1→3, →4)- β -glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1→3, →4)- β -glucans. *The Plant Journal* 5(1): 1-9.
- Micheli, F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *TRENDS in Plant Science* 6(9): 414-419.
- Milanez, F.R. 1952. Sobre os núcleos dos laticíferos de *Euphorbia phosphorea* Mart. *Rodriguesia* 163-179.
- Milanez, F.R. 1959. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – I. Embrião. *Rodriguesia* 21/22(33-34): 347-394.
- Milanez, F.R. 1966. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* - III. Nota sobre a estrutura secundária. *Rodriguesia* 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.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 266–277.
- Monacelli, B., Valleta, A., Rascio, N., Moro, I. & Pasqua, G. 2005. Laticifers in *Camptotheca acuminata* Decne: distribution and structure. *Protoplasma* 226: 155-161.
- Nessler, C.L. & Mahlberg, P.G. 1977. Cell wall perforation in laticifers of *Papaver somniferum* L. *Botanical Gazette* 138(4): 402-408.
- Northcote D.H., Davey, R. & Lay, L. 1989. Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta* 178(3): 353-366.

- 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.C., Magalhães, T.A., Ferreira, B.G., Teixeira, C.T., Formiga, A.T., Fernandes, G.W., Isaias, R.M.S. 2014. Variation in the Degree of Pectin Methylesterification during the Development of *Baccharis dracunculifolia* Kidney-Shaped Gall. *Plos One* 9(4) e94588.
- Onoyovwe, A., Hagel, J.M., Chen, X., Khan, M.F., Schriemer, D.C. & Facchini, P.J. 2013. Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *The Plant Cell* 1-13.
- Radford, J.E., Vesik, M., & Overall, R.L. 1998. Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma* 201: 30-37.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
- Roy, A.S. & Deepsh, N. 1992. Studies on Differentiation of Laticifers through Light and Electron Microscopy in *Calotropis gigantea* (Linn.) R.Br. *Annals of Botany* 70(5): 443-449.
- Rudall, P. J. 1987. Laticifers in Euphorbiaceae-A conspectus. *Botanical Journal Linnean of the Society* 94: 143-163.
- Rudall, P. 1994. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 270-282.
- Serpe, M.D., Muir, A.J. & Keidel, A.M. 2001. Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. *Protoplasma* 216:215-226.
- Serpe, M.D., Muir, A.J. & Driouich, A. 2002. Immunolocalization of β -D-glucans, pectins, and arabinogalactan-proteins during intrusive growth and elongation of nonarticulated laticifers in *Asclepias speciosa* Torr. *Planta* 215: 357-370.

- Serpe, M.D., Muir, A.J., Andème-Onzighi, C. & Driouich, A. 2004. Differential distribution of Callose and a (1→4)β-D-galactan Epitope in the Laticiferous Plant *Euphorbia heterophylla* L. *International Journal of Plant Sciences* 165(4): 571-585.
- Sørensen S.O., Pauly, M., Bush, M., Skjøl, M., McCann, M., Borkhardt, B. & Ulvskov, P. 2000. Pectin engineering: modification of potato pectin by in vivo expression of an endo-1,4-β-D-galactanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7639-7644.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*. Sinauer Associates of Sunderland: Massachusetts. 3ed. 690 pp.
- Verhertbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J.J., Knox, J.P. 2009. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research* 344: 1858-1862.
- Vitha, S., Baluška, F., Jasik, J., Volkmann, D. & Barlow P. 2000. Steedman's wax for F-actin visualization. *In* *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions* C. J. Staiger. Kluwer Academic Publishers: Netherlands pp: 619-636.
- Willats W.G.T., Limberg, G., Buchholt, H.C., Van Alebeek, G.J., Benen, J., Christensen, T.M.I.E., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D. & Knox J.P. 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* 327: 309-320.
- Willats, W.G.T., Marcus, S.E. & Knox, J.P. 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1-5)-α-L-arabinan. *Carbohydrate Research* 308:149-152.
- Willats, W.G.T., Steele-King, C.G., Marcus, S.E. & Knox, J.P. 1999. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *Plant Journal* 20: 619-628.

- Wilson, K.J., Nessler, C.L. & Mahlberg, P.G. 1976. Pectinase in *Asclepias* latex and its possible role in laticifer growth and development. *American Journal of Botany* 63: 1140-1144.
- 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.