

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**COLÉTERES DENDRÓIDES EM *Alibertia sessilis* (VELL.) K. SCHUM. (RUBIACEAE)**

**DANIELA PACHECO BARREIRO**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas (Botânica), AC:  
Morfologia Vegetal**

**BOTUCATU – SP**

**-2006-**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**COLÉTERES DENDRÓIDES EM *Alibertia sessilis* (VELL.) K. SCHUM. (RUBIACEAE)**

**DANIELA PACHECO BARREIRO**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SILVIA RODRIGUES MACHADO**

**ORIENTADORA**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas (Botânica), AC:  
Morfologia Vegetal**

**BOTUCATU – SP**

**-2006-**

*“Preste atenção nos sinais – não deixe que as  
loucuras do dia o deixem cego para a melhor  
coisa da vida: o AMOR!”*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

*Ofereço este trabalho a **Deus** em forma de agradecimento pela graça da vida, pelas oportunidades, pelas conquistas e também pelas derrotas que me fizeram exteriorizar uma capacidade que eu não julgava possuir!*

*Aos meus amados pais, **Terezinha e Milton**, dedico-lhes este trabalho porque a vocês devo toda a minha integridade como ser humano. Sei que vocês têm por filosofia que a melhor herança que os pais podem deixar para os filhos é o estudo, mas vocês me deixaram muito mais; me ensinaram a ser honesta, a lutar e a jamais permitir que alguma pressão ou dificuldade fira a nobreza do meu caráter. A vocês, minha gratidão é eterna.*

*Aos meus irmãos, **Adriana e Rafael**, pelo apoio, sempre que se fez necessário, e grande amizade.*

*Aos meus avós, **Eugênia e Alceu, Maria e Joaquim (in memoriam)**, por me darem uma família tão maravilhosa como a minha!*

*Ao **Fabio**, meu amado, meu ombro amigo, mistura perfeita de doçura e fortaleza. É maravilhoso poder contar com você em todos os momentos da minha vida e obrigada por me ensinar o verdadeiro significado da palavra **AMOR**..*

*Amo vocês!*

*Às pessoas que de alguma forma contribuíram para que esta etapa de minha vida fosse concretizada:*

*Com carinho especial... À minha orientadora **Profa. Dra. Sílvia Rodrigues Machado**, pela decisiva orientação, estímulo em despertar em mim o interesse pela pesquisa, além da sua capacidade motivadora e apoio, que foram fundamentais para a minha formação científica e conclusão deste trabalho, meu profundo agradecimento; tenho muito orgulho, admiração e eterna gratidão de ser sua orientada e muito obrigada pela confiança e amizade.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela bolsa concedida através do Processo nº 03/11747-8 e auxílio financeiro durante o programa do mestrado.*

*À **Universidade Estadual Paulista e ao corpo docente** do Departamento de Botânica, IBB, UNESP, pela oportunidade de realizar este curso.*

*Ao amigo e auxiliar acadêmico **Clemente Campos**, pelo auxílio e companhia nos dias de coleta.*

*Ao técnico de laboratório **Kléber Campos**, pelo auxílio na rotina do laboratório.*

*À **equipe do Centro de Microscopia Eletrônica, IBB, UNESP**, pela assistência técnica.*

*Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação, IBB, UNESP**, pela amizade e colaboração.*

*Aos **funcionários da Seção Gráfica da UNESP, Câmpus de Botucatu**, pela encadernação deste trabalho.*

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

*Aos amigos pós-graduandos **Tatiane, Juliana, Camilla, Alexandre e Suzana**, e ao amigo **Joel** pelo convívio agradável, pela amizade e companheirismo sempre presentes e pelas dicas e apoio recebido ao longo do mestrado.*

*À amiga **Maria Helena Godoy**, que sempre me socorreu quando precisei, pelo carinho e incentivo, pela força e amizade!*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

**Muito Obrigada!**

## Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Revisão bibliográfica.....	5
Capítulo 1.....	11
Resumo.....	11
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	13
Resultados.....	14
Discussão.....	16
Referências bibliográficas.....	19
Ilustrações.....	23
Capítulo 2.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	30
Resultados.....	32
Discussão.....	35
Referências bibliográficas.....	39
Ilustrações.....	43
Considerações finais.....	50
Referências bibliográficas.....	51

BARREIRO, D.P. COLÉTERES DENDRÓIDES EM *ALIBERTIA SESSILIS* (VELL.) K. SCHUM. (RUBIACEAE). 2006. 58 P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**RESUMO** – A presença de coléteres na superfície adaxial de órgãos jovens constitui uma característica relevante de Rubiaceae. *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., conhecida como “marmelinho” ou “marmelo-do-cerrado”, é uma espécie subarbustiva de Rubiaceae nativa de cerrado e tem grande importância alimentícia e medicinal neste bioma. Os ápices vegetativo e reprodutivo apresentam-se recobertos por uma secreção hialina, de aspecto vítreo e hidrofóbico produzida por coléteres. Neste trabalho foram investigados a distribuição, estrutura, histoquímica e o modo de secreção dos coléteres presentes em ápices vegetativos e reprodutivos desta espécie. Para estudos convencionais, as amostras foram preparadas segundo técnicas usuais em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET); técnica especial foi aplicada para dissolução da secreção e observação dos coléteres ao MEV. A técnica do ZIO foi empregada para maior visualização do sistema de endomembranas ao MET. Testes histoquímicos foram feitos em secções de material recém coletado. Coléteres nesta espécie são do tipo dendróide e ocorrem em abundância na face adaxial das estípulas, brácteas e sépalas; consistem de um eixo central multicelular e multisseriado revestido por numerosas células epidérmicas digitiformes ou pontiagudas, de tamanhos irregulares, unidas entre si somente na porção proximal e separadas umas das outras na porção distal. As células colunares são axialmente alongadas e possuem paredes espessas, núcleo conspicuo, citoplasma abundante e vacúolos desenvolvidos. As células epidérmicas possuem paredes delgadas, núcleo conspicuo, citoplasma abundante e vacuoma pouco desenvolvido. Os coléteres, de ambos os ápices, não possuem cutícula. Lipídeos, proteínas e polissacarídeos foram detectados nas células epidérmicas e colunares; compostos fenólicos foram detectados unicamente nas células colunares. Abundância de dictiossomos, retículo endoplasmático liso desenvolvido, mitocôndrias globulares com cristas desenvolvidas, plastídeos polimórficos com inclusões osmiofílicas e vacúolos e espaço periplasmático amplo contendo corpos multilamelares elétron-densos caracterizam as células epidérmicas dos coléteres estipulares no pico da secreção. Dictiossomos pouco desenvolvidos ou ausentes, retículo endoplasmático liso muito desenvolvido, plastídeos circundados por cisternas do retículo endoplasmático e espaço periplasmático preenchido com substância elétron-lucente, de aspecto homogêneo, são características das células epidérmicas dos coléteres presentes no ápice reprodutivo. Secreção granulócrica foi observada nos coléteres das três estruturas. A liberação da secreção para a superfície dos coléteres se dá através da parede celular, que sofre parcial ou total desintegração. A secreção extracelular acumula-se entre as estruturas em desenvolvimento nos ápices vegetativo e reprodutivo, sendo extraída unicamente com o solvente éter dietílico, indicando sua natureza resinosa. Não foram observados nódulos bacterianos nas folhas desta espécie.

**Palavras-chave:** *Alibertia sessilis*, anatomia, coléteres dendróides, histoquímica, Rubiaceae, secreção, ultra-estrutura.

## ABSTRACT

### DENDROID COLLETTERS IN *ALIBERTIA SESSILIS* (VELL.) K. SCHUM. (RUBIACEAE)

The presence of colleters in the adaxial surface of young organs constitutes a relevant characteristic of Rubiaceae. *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., known as "marmelinho" or "marmelo-do-cerrado", is a subshrub native Rubiaceae species of cerrado and it has great nutritious and medicinal importance in this biome. The vegetative and reproductive apices present recovered for a hyaline secretion, of glass aspect and hydrophobic produced by colleters. In this work the distribution, structure, histochemistry and the way of secretion of the colleters present in vegetative and reproductive apices of this species were investigated. For conventional studies, the samples were prepared according to usual techniques in light microscopy and scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM); special technique was applied for dissolution of the secretion and observation of the colleters to MEV. The technique of ZIO was used for larger visualization of the endomembranes system to MET. Histochemical assays were made in fresh material sections. Colleters in this species are of the dendroid type and occur abundantly in the adaxial surface of the stipules, bracts and sepals; they consist of a multicellular and multiseriate central axis recovered by numerous digitiform or sharp epidermal cells of irregular sizes, joined among themselves only in the proximal portion and separated from each other in the distal portion. The columnar cells are axially elongated and present thick walls, conspicuous nucleus, abundant cytoplasm and developed vacuoles. The epidermal cells present thin walls, conspicuous nucleus, abundant cytoplasm and a few developed vacuome. The coléteres, of both apices, don't present cuticle. Lipids, proteins and polysaccharides were detected in the epidermal and columnar cells; phenolic compounds were only detected in the columnar cells. Abundant dictyosomes, developed smooth endoplasmic reticulum, globular mitochondria with developed ridges, polymorphic plastids with osmiophilic inclusions and vacuoles and wide periplasmic space containing electron-dense multilamellar bodies characterize the epidermal cells of the stipular colleters in the pick of the secretion. Dictyosomes little developed or being absent, smooth endoplasmic reticulum very developed, plastids surrounded by cisterns of the endoplasmic reticulum and periplasmic space filled out with substance electron-lucent, of homogeneous aspect, are characteristics of the epidermal cells of the colleters present in the reproductive apex. Granulocrine secretion was observed in the colleters of the three structures. The liberation of the secretion for the colleters surface feels through the cellular wall, that it suffers partial or total disintegration. The extracellular secretion accumulates among the structures in development in the vegetative and reproductive apices, being only extracted with the solvent diethylic ether, indicating its resinous nature. Bacterial nodules were not observed in the leaves of this species.

**Key words:** *Alibertia sessilis*, anatomy, dendroid colleters, histochemistry, Rubiaceae, secretion, ultrastructure.



## INTRODUÇÃO

Rubiaceae, pertencente à ordem Gentianales, possui distribuição cosmopolita, concentrada nos trópicos, incluindo aproximadamente 550 gêneros e 9000 espécies, sendo, portanto, uma das maiores famílias de Angiospermas (Robbrecht 1993, Judd *et al.* 1999, Joly 2002, Souza & Lorenzi 2005), juntamente com as Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (Mabberley 1997). No Brasil ocorrem cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora e ocorrendo como um importante elemento em quase todas as formações naturais (Souza & Lorenzi 2005). Para o cerrado, foram descritos 47 gêneros e 255 espécies encontrados nas diferentes fitofisionomias, desde campo sujo até cerradão, incluindo matas de galeria (Mendonça *et al.* 1998). Possuem grande representação arbórea (grande, médio ou pequeno porte), arbustiva, subarbustiva e herbácea apresentando também espécies trepadeiras (Mendonça *et al.* 1998, Souza & Lorenzi 2005). Entre os 47 gêneros de Rubiaceae listados para o cerrado, encontra-se *Alibertia* A. Rich. ex DC. com cerca de 12 espécies (Sano & Almeida 1998). Em geral, florescem o ano todo, sendo o pico de floração entre julho a abril e frutificam o ano todo, mas principalmente de fevereiro a maio (Almeida *et al.* 1998).

A presença de estípulas interpeciolares portadoras de coléteres é uma das características vegetativas mais importantes de Rubiaceae, que a distingue da maioria das outras famílias de sua ordem (Robbrecht 1988). Nesta família, os coléteres também ocorrem em pecíolos (Johansson 1987), cálice (Robbrecht 1987, Dave *et al.* 1988), brácteas, bractéolas e corola (Thomas & Dave 1989c).

Coléteres são estruturas secretoras especializadas na produção de mucilagens, gomas ou resinas (Lersten 1974b). Estas estruturas, que incluem tricomas, emergências ou glândulas, vascularizadas ou não, estão localizadas na superfície adaxial de diferentes órgãos vegetativos e/ou reprodutivos e foram primeiramente chamadas de coléteres por Hanstein (1848). Este autor definiu os coléteres como glândulas que secretam mucilagem ou resina, ou uma mistura de ambas, e que começam sua atividade secretora numa fase inicial de desenvolvimento. O termo coléter é derivado do grego “colla” significando cola, goma, referindo-se ao exsudato pegajoso produzido por estas estruturas (Dave *et al.* 1988, Thomas & Dave 1990).

A função principal dos coléteres relaciona-se com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, sendo estes lubrificados e protegidos contra dessecação, herbívoros e patógenos (Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1989a, b, Thomas 1991). No caso das espécies com nódulos bacterianos foliares, comuns em Rubiaceae, o exsudato liberado pelos coléteres contribui para a entrada das bactérias no mesófilo, via estômatos (Lersten & Horner 1967).

Morfologicamente, os coléteres podem ser classificados em seis categorias: padrão, dendróide, escova, padrão-reduzido, alado e filiforme (Thomas 1991). De acordo com Fahn (1979),

os coléteres são estruturas secretoras muito difíceis de serem classificadas, pois muitas vezes podem ser anatomicamente similares e secretar substâncias diferentes. Assim, com relação à sua classificação, secreção, fisiologia, anatomia e ultra-estrutura os coléteres possuem diversos aspectos que ainda são pouco conhecidos, portanto alvos importantes para pesquisa (Klein 2004).

*Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. conhecida como “marmelinho” ou “marmelo-do-cerrado”, é uma espécie subarbustiva de grande importância alimentícia e medicinal no cerrado (Guarim Neto 1985, Rodrigues & Carvalho 2001). Os frutos desta espécie são consumidos ao natural ou utilizados na forma de geléias e tortas pela população; suas folhas são consumidas por bovinos e junto com seus ramos são utilizados em preparações medicinais, como compressa, banho e cataplasma na cura de afecções da pele (Almeida *et al.* 1998). Verificou-se que os ápices dos ramos reprodutivos e vegetativos dessas plantas, em épocas distintas do ano, apresentam-se recobertos por um exsudato esbranquiçado e resinoso provavelmente produzido por coléteres. Em literatura, não foram encontradas referências sobre coléteres para esta espécie.

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram:

1. Caracterizar a morfologia e a anatomia da estrutura secretora do exsudato presente em ápices de ramos reprodutivos e vegetativos de *Alibertia sessilis*.
2. Identificar as principais classes de substâncias presentes na secreção.
3. Investigar os aspectos ultra-estruturais das células secretoras e os mecanismos celulares da secreção.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Coléteres

Os coléteres ocorrem em numerosas famílias de Angiospermas, estando presentes em 379 gêneros de 60 famílias de dicotiledôneas, sendo que a maior presença foi registrada na família Rubiaceae, com 140 gêneros, seguida por Apocynaceae, com 41 gêneros (Thomas 1991). A presença de coléteres é uma característica de Rubiaceae, estando presentes em estípulas (Thomas 1991), pecíolos (Johansson 1987), cálice (Robbrecht 1987, Dave *et al.* 1988), brácteas, bractéolas e corola (Thomas & Dave 1989c). Nesta família, os coléteres são encontrados quase que exclusivamente na superfície adaxial ou margem das estípulas. A ocorrência de coléteres em cálice para a família Rubiaceae foi relatada pela primeira vez em *Gardenia lucida* Roxb. por Dave *et al.* (1988).

O termo coléter é derivado do grego “colla” significando cola, goma, referindo-se ao exsudato pegajoso, composto por mucilagem, goma ou resina, produzido por estas estruturas (Lersten 1974b, Dave *et al.* 1988, Thomas & Dave 1990). Estas estruturas secretoras foram primeiramente chamadas de coléteres por Hanstein (1848) que os definiu como glândulas que secretam mucilagem ou resina, ou uma mistura de ambas, e que começam sua atividade secretora numa fase inicial de desenvolvimento.

Outras terminologias foram atribuídas a estas estruturas, tais como “glândulas” (Weddell 1849, Lawson 1854, Mitra 1948, Mia 1960), “squamellae” (Arber 1931, Woodson 1935, Ramayya & Bahadur 1968), “pêlo glandular” (Cross & Johnson 1941), “pêlos glandulares longos” (Solereder 1908, Metcalfe & Chalk 1950), “glândulas estipulares” (Patel & Zaveri 1975), “tricomas glandulares” (Williams *et al.* 1982) e “glândulas de resina” (Curtis & Lersten 1980, Subramanian *et al.* 1989). Para Dickison (2000), o coléter é um apêndice ou tricoma multicelular que produz uma secreção viscosa. Em um estudo sobre o ápice caulinar de *Nerium oleander* L., Williams *et al.* (1982) afirmaram conhecer o termo coléter, mas preferem o termo tricoma para determinar esta estrutura. O termo coléter é o mais utilizado e também foi atribuído por Foster (1949), Esau (1965), Lersten (1974a, b), Miller *et al.* (1983a), Thomas (1991), Appezzato-da-Glória & Estelita (2000), Rio *et al.* (2002) e Klein *et al.* (2004) a estruturas secretoras presentes em diferentes espécies.

Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) estudaram o desenvolvimento de coléteres em duas espécies de *Mandevilla* Lindl. (Apocynaceae). As células primordiais são distintas das adjacentes devido ao citoplasma relativamente denso. As células da protoderme dividem-se anticlinalmente para a formação das células epidérmicas, enquanto que as da subprotoderme dividem-se periclinalmente para a formação das células do eixo central. Conseqüentemente, o primórdio torna-se alongado e cresce orientado para cima, paralelo à folha de onde se originou,

dando origem ao coléter maduro com suas células colunares e epidérmicas. Apesar da confusão entre as terminologias, em vista dos aspectos peculiares mostrados pelos coléteres em seu desenvolvimento, estrutura e distribuição organográfica, Ramayya & Bahadur (1968) e Klein *et al.* (2004) estudaram a ontogenia dos coléteres presentes em *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) e *Simira glaziovii* (K. Schum.) Steyerl., *S. pikia* (K. Schum.) Steyerl. e *S. rubra* (Mart.) Steyerl. (Rubiaceae), respectivamente, e concluíram que eles representam emergências.

A semelhança estrutural entre coléteres e outras estruturas secretoras levou alguns pesquisadores a confundi-los com nectários extraflorais e glândulas de resina (Arekal & Ramakrishna 1980, Inamdar *et al.* 1985, Mohan & Inamdar 1986, Subramanian *et al.* 1989, Thomas 1991). Esta confusão é devido à semelhança superficial dos coléteres com os nectários em relação ao padrão de distribuição, desenvolvimento inicial e estrutura, como nos nectários extraflorais de *Pedilanthus* Neck. ex Poit. (Dave & Patel 1975). Mas há certas diferenças fundamentais entre coléteres e nectários, tais como:

- O exsudato do coléter é insolúvel em água e contém açúcares, mas não contém aminoácidos. O néctar é solúvel em água e contém tanto açúcares como aminoácidos (Thomas 1991);

- Testes histoquímicos indicam que o lipídeo é predominante no estágio secretor de coléter e é mais característico em glândulas que secretam resina ou óleo do que em glândulas que secretam néctar (Schnepf 1969, Rachmilevitz & Joel 1976, Inamdar *et al.* 1986, Arumugasamy *et al.* 1989);

- A resina fica localizada nas células epidérmicas do coléter (Thomas 1991);

- A natureza resinosa do exsudato do coléter foi confirmada por Subramanian *et al.* (1989) nos coléteres de Apocynaceae;

De acordo com as afirmações acima, parece essencial reconsiderar relatos prévios sobre as estruturas secretoras de *Calotropis* R. Br., *Wattakaka* (Decaisne) Hassk., *Holarrhena* R. Br. e *Plumeria* L. como sendo coléteres em vez de nectários extraflorais, como considerou Durkee *et al.* (1984) para *Passiflora* L.. O termo nectário deveria ser restrito às estruturas que produzem apenas néctar (Fahn 1979). Em conclusão, segundo Thomas (1991), parece melhor considerar os coléteres como sendo uma forma de transição entre os nectários extraflorais verdadeiros e glândulas que secretam lipídeo, com uma possível função de impedir a predação de insetos.

A função biológica da secreção do coléter envolve o aumento da proteção dos tecidos meristemáticos e de órgãos em desenvolvimento, já oferecida de forma física pelas estípulas e cálices, contra dessecação, herbívoros e patógenos (Robbrecht 1988, Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1989a, b, Thomas 1991). Diversos autores (Ramayya & Bahadur 1968, Esau 1979, Mohan & Inamdar 1986) concordam com esta hipótese de mecanismo de defesa para o exsudato produzido

pelos coléteres. Entretanto, diferentes espécies secretam diferentes produtos, como pode ser visto ao se comparar os trabalhos de Curtis & Lersten (1974, 1980) e Durkee *et al.* (1984), nos quais a secreção, nas espécies estudadas, é classificada como sendo semelhante ao látex; e os trabalhos de Horner & Lersten (1968), Dexheimer & Guenin (1981), e Miller *et al.* (1983a) sustentam que os coléteres das espécies estudadas secretam substâncias mucilaginosas.

De acordo com Solereder (1908), a morfologia dos coléteres é similar em todas as famílias estudadas. Descreveu que tais estruturas possuíam um pedúnculo multicelular de comprimento variado, de onde parte um eixo central composto por células alongadas envolvidas radialmente por células epidérmicas, sendo estas protegidas externamente por uma cutícula fina. Lersten (1974a, b) classificou tais coléteres no “tipo-padrão” e reconheceu quatro tipos adicionais em Rubiaceae com base na diversidade morfológica e anatômica: padrão-reduzido, intermediário, dendróide e tipo-escova. O coléter do tipo padrão-reduzido é alongado e estreito com células epidérmicas quase tão delgadas quanto às células do eixo central. Os coléteres do tipo dendróide são multicelulares e multisseriados e consistem de duas a quatro células espessas na região central, de onde partem cerca de 70 células secretoras ramificadas e alongadas. Os do tipo intermediário estão entre os tipos padrão e dendróide. Já os coléteres que possuem o eixo reduzido e as células epidérmicas alongadas são descritos como o tipo-escova. Em adição a estes tipos, Robbrecht (1987) observou os coléteres alados em *Tricalysia bifida* De Wild. e filiformes em *T. fenorum*, sendo estes últimos descritos como extremamente reduzidos e consistindo somente de um eixo estreito de células alongadas emergindo de uma base um pouco mais ampla, constituída de células isodiamétricas. Portanto, segundo Thomas (1991), os coléteres são enquadrados em seis categorias: padrão, dendróide, escova, padrão-reduzido, alado e filiforme.

A ausência de cutícula em coléteres dendróides foi relatada por Horner & Lersten (1968) e Fahn (1979), mas Herman *et al.* (1986) demonstraram uma cutícula muito distinta com a aplicação de Sudan Black B. Nos coléteres de *Psychotria bacteriophila* Valetton (Rubiaceae), ao contrário da maioria das plantas, falta uma cutícula nas células ramificadas secretoras; contudo, em *P. kirkii* Hiern, uma cutícula está presente na superfície das células ramificadas (Horner & Lersten 1968).

Lersten (1975) fez uma ampla pesquisa sobre coléteres em Rubiaceae e observou diferenças consideráveis no tamanho e relacionou este fato com a distribuição geográfica das plantas. A grande maioria dos coléteres, acima de 2600µm, ocorre em espécies de *Psychotria* L. na América do Sul. Coléteres com comprimento médio (783µm) também foram muito encontrados nos neotrópicos. Lersten (1974b) determinou o comprimento médio de coléteres, o qual vai diminuindo em direção oeste, passando por Oceania (735µm), Filipinas (553µm), Índias do Leste e Austrália (480µm), Ásia (410µm) e África (334µm). Miller *et al.* (1983) relatou que, em *Psychotria* L., um

coléter dendróide desenvolvido completamente possui cerca de 180µm de comprimento e 160µm de largura. Lersten (1975) pôde reconhecer coléteres de dois gêneros nos quais as células epidérmicas não eram alongadas, mas eram separadas umas das outras como em *Scyphiphora hydrophyllacea* C.F. Gaertn. e *Urophyllum corymbosum* Korth.. O autor também relatou coléteres dendróides em mais três gêneros: *Alibertia concolor* (Cham.) K. Schum., *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schun. e *Vangueria edulis* Vahl.

Jayaweera (1963a, b, 1964, 1965) e Aiello (1979) utilizaram o número e o arranjo dos coléteres como ferramenta taxonômica em seus estudos sobre Rubiaceae. Jayaweera encontrou coléteres no cálice, bem como na estípula do gênero *Mussaenda* L.. Aiello (1979) adicionou a informação de que *Portlandia* P. Browne possui várias fileiras de coléteres ao longo da base da superfície adaxial da estípula e mostrou que não há diferenças em número ou arranjo de coléteres entre cinco espécies. Em *Cigarrilla* Aiello e *Siemensia* Urb., os coléteres estão arranjados em dois grupos, cada um deles com cerca de 15 coléteres, e estão localizados na parte mais baixa das margens das estípulas. Em *Coutaportia* Urb., toda a superfície interna da estípula é coberta com coléteres. Há muita variação no número e arranjo dos coléteres nos cálices: em *Isidorea* A. Rich. ex DC. há dois por sépala, enquanto que em *Portlandia* P. Browne há quatro, e em *Cigarrilla* Aiello, seis. *Portlandia* P. Browne possui um anel contínuo de coléteres na base do cálice. Em *Coutarea* Aubl., os coléteres estão arranjados em grupos entre as sépala. *Osa* Aiello, *Cubanola* Aiello e *Thogsennia* Aiello possuem uma quantidade abundante de coléteres e estes se estendem para a face interna de cada sépala (Thomas 1991).

Lersten (1975) notou que um pequeno número de gêneros têm perdido a habilidade de produzir coléteres, uma tendência que parece principalmente ser explicada pelo aumento do hábito herbáceo (Rubiaceae) ou outras especializações (*Psychotria maxonii* Standl.). Algumas espécies dos seguintes gêneros não possuem coléteres: *Henriquezia* Spruce ex Benth. e *Platycarpum* Bonpl. (Rogers, 1984), *Arcytophyllum* Willd. ex Schult. & Schult. f., *Bouvardia* Salisb., *Manettia* Mutis ex L., *Hydnophytum* Jack, *Perama* Aubl., *Galium* L. e *Asperula* L. (Lersten 1975). Mas Majumdar & Pal (1958) observaram coléteres em estípulas interpeciolares de *Galium mollugo* L..

Os mecanismos de secreção, ou seja, a forma pela qual o exsudato deixa a estrutura secretora, são pouco conhecidos (Akers *et al.* 1978). Em geral, os coléteres começam a secretar antes da expansão da folha, à qual eles estão ligados. Neste estágio, o coléter possui coloração amarelada e o exsudato é um material pegajoso, o qual recobre completamente o ápice caulinar. Para isso, o exsudato é transportado através de numerosas vesículas do Complexo de Golgi até a membrana plasmática, as quais aparentemente fundem-se a esta. Então, uma pequena quantidade de material heterogêneo acumula-se em “bolsas” entre a membrana plasmática e a parede celular. Uma cutícula fina protege as paredes celulares e, devido à pressão do material heterogêneo secretado

sobre a parede celular, a cutícula se rompe e este material é, então, liberado para o espaço extracelular (Thomas 1991). Outros estudos sobre coléteres (Curtis & Lersten 1974, Fjell 1983, Mohan & Inamdar 1986) também mostram esse processo de rompimento da cutícula para a liberação do material secretado. Entretanto, nenhum trabalho explica a forma pela qual o exsudato do coléter passa pela parede celular e pela cutícula, quando esta está presente e não se rompe. O trabalho de Durkee *et al.* (1984) com *Passiflora foetida* L. é um exemplo do não rompimento da cutícula na glândula de resina (com estrutura similar ao coléter), no qual os autores não conseguiram estabelecer uma forma de liberação do exsudato. Poucos estudos tentam elucidar a forma pela qual o exsudato passa pela parede celular para chegar à cutícula (Oliveira & Pais 1990, Mahlberg & Kim 1992). Em geral, os trabalhos referem-se a esta etapa afirmando que o material secretado passa diretamente através da parede celular. Para os coléteres que não possuem cutícula, não foi encontrada descrição da liberação da secreção na literatura disponível.

Após cessar sua função secretora, o coléter inicia o processo de senescência. Uma característica que marca a senescência é a mudança da coloração do coléter, que deixa de ser amarelada e passa a ser marrom. A necrose inicia-se no ápice do coléter pela parede; em seguida ocorre a degeneração do citoplasma, a qual procede de maneira basipetalar no tecido do coléter (Thomas & Dave 1990, Thomas 1991, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). Geralmente, os cristais de oxalato de cálcio surgem nas células centrais de coléteres mortos, geralmente espalhados (Thomas 1991), mas em *Mitragyna* Korth., eles estão arranjados em uma fileira vertical (três a quatro) e as células que possuem os cristais têm paredes celulares intensamente coradas (Thomas & Dave 1990).

Depois da necrose, os coléteres geralmente conservam sua forma, mas em *Calotropis* R. Br., eles apresentam-se ressecados a partir do ápice (Thomas 1991). Segundo Esau (1979), os coléteres secam após sua função secretora. Já os coléteres de *Mitragyna* Korth. caem do caule juntos com a estípula, antes da abertura das folhas no nó ao qual as estípulas estão ligadas (Thomas 1991). Miller *et al.* (1984) relataram que os coléteres dendróides permanecem presentes apenas durante os estágios iniciais do desenvolvimento floral de *Psychotria* L., degenerando num estágio posterior. Mas em Apocynaceae e Asclepiadaceae, os coléteres calicínicos são persistentes sobre o cálice na base do folículo (Thomas 1991). Coléteres peciolares persistentes são encontrados com remanescentes de pecíolo no caule quando ocorre abscisão da folha num nível mais alto do que a posição dos coléteres no pecíolo (Thomas & Dave 1989a).

Nódulos bacterianos em folhas são pouco comuns, mas estes foram encontrados em aproximadamente 370 espécies de cinco gêneros nas famílias Myrsinaceae e Rubiaceae (Lersten & Horner 1967). De acordo com Humm (1944), “nódulos foliares são pequenas elevações típicas menores que 2 mm de diâmetro. Eles podem estar irregularmente espalhados sobre a superfície da

folha (característica de *Psychotria* L.), localizados somente ao longo da margem (característica de *Ardisia crenata* Sims - Myrsinaceae), ou dispostas em duas fileiras ao longo de cada lado da folha.”

Segundo Miller *et al.* (1983a), em espécies noduladas de *Psychotria* L., a mucilagem produzida pelos coléteres não providencia somente substâncias necessárias para a nutrição das bactérias endofíticas, mas também é um veículo para que estas bactérias entrem pelas folhas. Van Hove & Kagoyre (1974) relataram que “glândulas estipulares de Rubiaceae possuem um papel vital na simbiose com bactérias endofíticas, pois sua secreção provavelmente constitui o substrato de carbono para as bactérias no broto, e estão talvez na origem da associação simbiótica nestas plantas.”

Lersten (1975) investigou a associação dos coléteres dendróides ou tipo-escova com espécies noduladas e encontrou uma correlação muito forte em *Pavetta* L. e *Psychotria* L., mas fraca em *Neorosea* N. Hallé. A maioria das espécies noduladas apresenta coléteres dendróides ou do tipo-escova, mas alguns tipos padrão e intermediário também ocorrem. O padrão de ocorrência de infecção e evolução bacteriana de coléteres dendróides sugere uma relação ao acaso.



Conforme estabelecido pelo Conselho da Área de Botânica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Botânica, os resultados obtidos durante a execução deste Projeto de Mestrado foram reunidos em artigos científicos para publicação, os quais estão sendo apresentados de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica.



## *Capítulo 1*

# Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis*, uma espécie não-nodulada de Rubiaceae<sup>1</sup>

DANIELA PACHECO BARREIRO<sup>2</sup> e SILVIA RODRIGUES MACHADO<sup>2,3</sup>

**RESUMO** – (Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis*, uma espécie não-nodulada de Rubiaceae). Este trabalho descreve a distribuição, estrutura e histoquímica dos coléteres presentes em ápices vegetativo e reprodutivo de *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie de Rubiaceae nativa do cerrado brasileiro. Amostras foram preparadas segundo técnicas usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura, sendo empregada técnica especial para dissolução da secreção na superfície dos coléteres. Histoquímica foi feita em material recém coletado. Os coléteres são do tipo dendróide e ocorrem na face adaxial das estípulas, brácteas e sépalas; consistem de um eixo central multicelular e multisseriado, de natureza parenquimática, revestido por células epidérmicas digitiformes ou pontiagudas de tamanhos irregulares, unidas entre si somente na porção proximal e separadas umas das outras na porção distal. As células colunares são axialmente alongadas e possuem paredes espessas, núcleo conspícuo, citoplasma reduzido e vacúolo desenvolvido com acúmulo de lipídeos e substâncias fenólicas. As células epidérmicas possuem paredes delgadas, núcleo conspícuo, citoplasma abundante e vacuola pouco desenvolvido. Os coléteres não possuem cutícula. A secreção é mais abundante no ápice vegetativo, impregnando primórdios foliares e estípulas, formando uma capa esférica dura, brilhante e hidrofóbica. Em todas as amostras analisadas, os testes histoquímicos detectaram presença de polissacarídeos, proteínas e lipídeos no protoplasto de ambas células colunares e epidérmicas; compostos fenólicos foram detectados somente nas células colunares. A intensidade da reação foi variável entre as células epidérmicas e colunares. A natureza resinosa do exsudato foi confirmada com o uso do solvente éter dietílico para extração da secreção da superfície dos coléteres. Nódulos bacterianos foliares não foram encontrados.

Palavras-chave – *Alibertia sessilis*, anatomia, coléteres dendróides, histoquímica, Rubiaceae

**ABSTRACT** – (Dendroid colleters of *Alibertia sessilis*, a non-nodulate Rubiaceae species). This paper describes distribution, structure and histochemistry of the colleters in vegetative and reproductive apices of *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., a native Rubiaceae species of the brazilian cerrado. Samples were prepared according to usual techniques in light microscopy and scanning electron microscopy, with a special technique to dissolution of secretion in colleters surface. Histochemistry was made in fresh material. Colleters are dendroid type and occur in the adaxial surface of stipules, bracts and sepals; they consist of multicellular and multiseriate central axis, parenchymatic nature, covered by digitiform or sharp epidermal cells of irregular sizes, joined among themselves only in the proximal portion and separated from each other in the distal portion. The columnar cells are axially elongated and present thick cellular walls, prominent nucleus, reduced cytoplasm and developed vacuole with lipidic inclusions and phenolic compounds. The epidermal cells have thin cellular walls, prominent nucleus, abundant cytoplasm and a few developed vacuome. The colleters don't present cuticle. The secretion is more abundant in vegetative apex, impregnating the leaf buds and the stipules, constituting a hard spherical cap, brilliant and hydrophobic. In all samples analyzed, histochemical assays detected polysaccharides, proteins and lipids in the protoplast of both columnar and epidermal cells; phenolic compounds were detected in the columnar cells only. The intensity of the reaction was variable among epidermal and columnar cells. Resinous nature of the exudate was confirmed with the use of the diethyl ether solvent for extraction of the secretion of the colleters surface. Foliar bacterial nodules weren't found.

Key words – *Alibertia sessilis*, anatomy, dendroid colleters, histochemistry, Rubiaceae

<sup>(1)</sup> Parte da dissertação de mestrado de D.P. Barreiro, desenvolvida no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Botânica, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

<sup>(2)</sup> UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Caixa Postal 510, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>(3)</sup> Autor para correspondência: [smachado@ibb.unesp.br](mailto:smachado@ibb.unesp.br)

## INTRODUÇÃO

Coléteres são estruturas glandulares encontradas na superfície adaxial de órgãos reprodutivos e/ou vegetativos jovens de um grande número de famílias (Thomas 1991). A função principal da secreção produzida por coléteres relaciona-se com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, sendo estes lubrificados e protegidos contra dessecação, herbívoros e patógenos (Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1989a, b, Thomas 1991). O que diferencia os coléteres das demais estruturas secretoras é a composição do exsudato que pode ser constituída unicamente por mucilagem (Fahn 1979, Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990, Kronstedt-Robards & Robards 1991).

Em Rubiaceae, os coléteres ocorrem principalmente na superfície adaxial de estípulas (Solereider 1908, Horner & Lersten 1968, Van Hove 1972, Lersten 1974a, Thomas 1991), podendo ser encontrados em pecíolos (Johansson 1987), cálice (Robbrecht 1987, Dave *et al.* 1988), brácteas, bractéolas e corola (Thomas & Dave 1989c). Nesta família, foram descritos seis tipos de coléteres: padrão, padrão-reduzido, dendróide, escova, alado e filiforme (Thomas 1991), sendo que o número, a morfologia e o arranjo dessas estruturas são elementos relevantes para determinações taxonômicas e filogenéticas (Woodson & Moore 1938, Jayaweera 1963a, b, 1964, 1965, Lersten 1974a, b, 1975, Aiello 1979, Thomas & Dave 1990). Coléter dendróide, com raras exceções, tem sido associado a espécies com nódulos bacterianos foliares e está presente em vários gêneros de Rubiaceae, incluindo *Alibertia* A. Rich. ex DC. (Lersten 1975, Thomas 1991). No caso das espécies com nódulos bacterianos foliares, o exsudato liberado pelos coléteres, além de constituir fonte nutritiva, contribui para a entrada das bactérias no mesofilo, via estômatos (Lersten & Horner 1967).

*Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., conhecida como “marmelinho” ou “marmelo-do-cerrado”, é uma espécie subarbustiva de grande importância alimentícia e medicinal no cerrado (Guarim Neto 1985, Rodrigues & Carvalho 2001). Os frutos desta espécie são consumidos ao natural ou utilizados na forma de geléias e tortas pela população; suas folhas são consumidas por bovinos e junto com seus ramos são utilizados em preparações medicinais, como compressa, banho e cataplasma, na cura de afecções da pele (Almeida *et al.* 1998). Verificou-se que os ápices dos ramos vegetativos e reprodutivos dessas plantas, em épocas distintas do ano, apresentam-se recobertos por um exsudato esbranquiçado e resinoso. Em literatura, não foram encontradas referências sobre coléteres para esta espécie.

Este trabalho descreve pela primeira vez a ocorrência de coléteres dendróides em ápices reprodutivo e vegetativo de *A. sessilis*, com informações sobre sua morfologia, anatomia e histoquímica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Ápices reprodutivo e vegetativo foram coletados de exemplares de *A. sessilis* crescendo em fragmentos de cerrado na região de Botucatu (S23°02'55,5" e W48°31'26,1") e na Reserva Particular da Fazenda Palmeira da Serra, município de Pratânia (S22°48'50,2" e W48°44'35,8"), estado de São Paulo, Brasil, durante os meses de Março/2003, Fevereiro, Março, Abril e Agosto/2004 e Junho/2005. Exsicatas foram depositadas no Herbário Irina Delanova Gemtchujnicov da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

### Estudo anatômico

Para análise geral da distribuição e estrutura dos coléteres, ápices intactos e suas partes dissecadas sob microscópio estereoscópico com o auxílio de estiletos foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%; glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2; tampão fosfato 0,2 M pH 7,2) por 24 h (Karnovsky 1965), seguido por desidratação em série crescente de soluções de álcool e embebidas em historresina (Gerrits 1991). Secções (6-8 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotatório semi-automático e coradas com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964). Lâminas permanentes foram montadas em resina sintética (Gerlach 1969), observadas e documentadas em Fotomicroscópio Leica DMR.

Para detectar as principais classes de metabólitos nas células dos coléteres, secções de material recém coletado, não fixado, obtidas à mão livre com auxílio de micrótomo de Ranvier foram tratadas com: (a) Sudan IV para lipídeos em geral (Pearse 1980); (b) Ácido Periódico/Reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos neutros (Cortelazzo 1992); (c) Vermelho de Rutênio para polissacarídeos diversos (Jensen 1962); (d) Cloreto Férrico para compostos fenólicos (Johansen 1940); (e) Solução de Azul Mercúrio de Bromofenol para proteínas (Mazia *et al.* 1953); (f) Ácido Sulfúrico a 10% para cristais de oxalato de cálcio (Johansen 1940). Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula utilizando-se glicerina como meio de montagem e analisados imediatamente. Todos os testes histoquímicos foram comparados aos controles indicados pelos respectivos autores.

### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Estípulas, brácteas e sépalas foram fixadas como descrito acima, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 1 hora, desidratadas em série crescente de soluções de álcool, submetidas ao sistema de secagem em ponto crítico CPD 020 (Balzer Union) utilizando-se CO<sub>2</sub> líquido, montadas em suportes de alumínio e metalizadas com ouro. As amostras

foram observadas e documentadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips SEM 515, a 20 kV.

#### Extração do exsudato para observação ao MEV

A abundância e a consistência da secreção dificultaram as observações e a obtenção de imagens dos coléteres ao microscópio eletrônico de varredura. Assim, foram testados diferentes solventes indicados para extração de secreções (Ramayya & Bahadur 1968, Durkee *et al.* 1984, Subramanian *et al.* 1989, Thomas & Dave 1990). Amostras de ápices vegetativo e reprodutivo foram coletadas e, com a ajuda de estiletes sob estereomicroscópio, foram destacadas as estípulas, brácteas e sépalas. Em seguida, estas estruturas foram imersas em frascos de penicilina contendo os seguintes solventes: acetona, água acética 1%, água destilada, álcool etílico, benzeno e éter dietílico. Os frascos permaneceram à temperatura ambiente, em tempos variáveis de 10 segundos a 10 minutos. Frascos de penicilina contendo estípulas, brácteas e sépalas imersas em água destilada foram também levados à estufa a 60°C, durante 30 minutos. A seguir, com o auxílio de um pincel de poucas cerdas, o exsudato foi sendo cuidadosamente removido. Subseqüentemente, as amostras foram lavadas com água destilada, fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 h e processadas segundo a técnica descrita para MEV.

## RESULTADOS

#### Distribuição e Morfologia

O ápice vegetativo, no período do brotamento, é protegido por estípulas verdes intumescidas e recobertas por uma capa esférica de uma substância abundante, esbranquiçada, hidrofóbica e de aspecto perolado (figura 1). Esta substância acumula-se gradualmente na parte interna das estípulas e, quando extravasa para a superfície do ápice, torna-se vítrea e quebradiça (figuras 2-4). No período em que o ápice está dormente, as estípulas possuem aspecto ressecado, de coloração marrom escuro e não apresentam acúmulo de secreção (figura 5).

O ápice reprodutivo, no início do seu desenvolvimento, apresenta-se recoberto por secreção hialina, hidrofóbica e relativamente bem menos abundante (figura 8) em comparação com o ápice vegetativo. Em estágios posteriores do desenvolvimento, a secreção é vista na superfície de cada botão floral da inflorescência, conferindo um aspecto brilhante aos botões florais (figura 9).

Estípulas, brácteas e sépalas apresentam coléteres na superfície adaxial (figuras 6, 7, 22, 24, 26, 27). Os coléteres apresentam-se total ou parcialmente recobertos pela secreção (figuras 10-12).

Os coléteres começam a secretar antes da expansão dos primórdios foliares e florais, aos quais eles estão ligados. Neste estágio, o exsudato é um material pegajoso, o qual cobre completamente as estruturas em desenvolvimento (figura 6) e que se solidifica em contato com o ar (figuras 1-4). Coléteres possuem coloração que varia de amarelo-palha a marrom ou parda (figura 7).

Os tratamentos com álcool e benzeno, por 10 minutos, dissolveram a secreção presente na superfície das estípulas, brácteas e sépalas, mas não a extraíram da superfície dos coléteres. Com benzeno, houve colapso generalizado das células dos coléteres (figura 13). Tratamento com éter dietílico, por 30 segundos, dissolveu a secreção da superfície das estípulas e dos coléteres, sem danos às células e permitiu a observação da distribuição, estrutura e a classificação dos coléteres no tipo dendróide (figuras 17, 18).

Nas estípulas (figura 14), os coléteres estão distribuídos em várias fileiras ao redor dos primórdios foliares; são mais abundantes na base, podendo ocorrer de modo esparso por toda a superfície adaxial da estípula; atingem 700 µm de comprimento.

Nas brácteas (figura 15), os coléteres localizam-se desde a base até o seu terço médio e distribuem-se em várias camadas ao redor dos primórdios florais. Nas sépalas (figura 16), os coléteres estão concentrados na base, em camada única. Em ambas estruturas, os coléteres atingem comprimentos que variam de 650 a 680 µm.

Em todas as amostras analisadas, os coléteres são coniformes e consistem de um eixo com inúmeras células alongadas, de tamanhos variáveis, com disposição antrorsa (figuras 17, 18). As células são cilíndricas, pontiagudas (figura 17) ou digitiformes (figura 19), ocorrendo, também, células com abaulamentos pronunciados na sua base, região mediana ou no ápice (figuras 20, 21). A superfície das células é lisa ou levemente estriada, apresentando grumos ou flocos (figuras 19-21) que correspondem a restos da secreção.

#### Anatomia e histoquímica

Os coléteres são mais abundantes no ápice vegetativo, preenchendo toda a região compreendida entre a estípula e os primórdios foliares (figuras 22, 24). Consistem de um eixo central multicelular e multisseriado, com cerca de 20-50 células parenquimáticas volumosas, em secção transversal (figuras 23, 25) e 30-40 células de altura, em secção longitudinal (figura 23), revestido por cerca de 90-110 células epidérmicas dispostas em camada única (figura 25); essas células possuem tamanhos irregulares, unidas entre si apenas em sua porção proximal e separadas umas das outras em sua porção distal (figuras 23, 25, 28, 29). O número de células epidérmicas é visivelmente maior nos coléteres do ápice reprodutivo (figuras 28-29), enquanto que a secreção parece ser mais abundante no ápice vegetativo (figuras 1-4).

As células do eixo central são axialmente alongadas e possuem parede pectocelulósica espessa, núcleo volumoso e conspícuo, citoplasma reduzido e vacúolos desenvolvidos. As células epidérmicas apresentam paredes delgadas, núcleo volumoso e conspícuo e citoplasma abundante (figuras 23, 28, 29). Em todas as amostras analisadas, verificou-se que os coléteres não apresentam cutícula.

Compostos fenólicos foram observados unicamente nas células colunares (figura 30), enquanto lipídeos (figura 31), polissacarídeos (figura 32) e proteínas (figura 33) foram detectados em todas as células dos coléteres; contudo a intensidade da reação apresentou variações entre as células epidérmicas e colunares dos coléteres de estípulas, brácteas e sépalas.

Cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa foram freqüentemente observados nas células colunares, sendo sua freqüência maior nos coléteres estipulares (figura 33).

Em *A. sessilis* não foram observados nódulos bacterianos nas folhas.

## DISCUSSÃO

*A. sessilis* apresenta coléteres na superfície adaxial de estípulas, brácteas e sépalas, conforme observado em outras espécies de Rubiaceae (Robbrecht 1978, 1983, Dave *et al.* 1988). Nessas três estruturas, os coléteres se caracterizam por apresentar um eixo central multicelular alongado, de natureza parenquimática, revestido por inúmeras células epidérmicas que são parcialmente ou totalmente separadas umas das outras, deixando os coléteres com aspecto ramificado, enquadrando-se no tipo dendróide, conforme descrição de Lersten (1974a, b).

Os coléteres dendróides em *A. sessilis* possuem cerca de 700  $\mu\text{m}$  e, portanto, são considerados de tamanho médio, segundo classificação proposta por Lersten (1975). Lersten (1974b) realizou um vasto estudo sobre coléteres em Rubiaceae de diferentes procedências e observou diferenças consideráveis com relação ao tamanho dessas estruturas que provavelmente estariam associadas com a distribuição geográfica das plantas. Coléteres de tamanho médio (783  $\mu\text{m}$ ) foram encontrados nos neotrópicos, sendo que em espécies de *Psychotria* da América do Sul a maioria massiva de coléteres possui tamanho igual ou superior a 2600  $\mu\text{m}$ . Este autor relatou que o tamanho médio diminui em direção oeste a partir da Oceania (735  $\mu\text{m}$ ), Filipinas (553  $\mu\text{m}$ ), Índias do Leste e Austrália (480  $\mu\text{m}$ ), Ásia (410  $\mu\text{m}$ ) e África (334  $\mu\text{m}$ ), sendo este último com tamanho cerca de 40% do encontrado nas Américas Central e do Sul.

Os coléteres começam a secretar precocemente, antes mesmo da expansão dos primórdios foliares e florais. A solidificação da secreção, inicialmente pegajosa, quando em contato com o ar, indica sua natureza resinosa (Langenheim 2003). A mudança da coloração dos coléteres dendróides de amarelo-palha para marrom ou parda, conforme observado em *A. sessilis*, foi



igualmente relatada para diferentes espécies e está relacionada com a parada da atividade secretora e início do processo de senescência dos mesmos (Thomas & Dave 1990, Thomas 1991, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000).

Os testes histoquímicos usados neste trabalho permitiram verificar que os coléteres de estípulas, brácteas e sépalas possuem polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e lipídeos. A presença dessas substâncias, isoladamente ou em misturas complexas, foi igualmente detectada em coléteres de diferentes taxa (Horner & Lersten 1968, Thomas & Dave 1989b, Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1990, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Klein *et al.* 2004). Segundo Thomas (1991), os lipídeos são os metabólitos predominantes nas células epidérmicas dos coléteres no estágio pré-secretor. Secreção resinosa e acúmulo de lipídeo foram observados em células epidérmicas dos coléteres de *Gardenia gummifera* (Mangalan *et al.* 1990).

O exsudato presente na superfície dos coléteres de ápices vegetativo e reprodutivo de *A. sessilis* foi extraído unicamente com éter dietílico, o que, segundo alguns autores, indica a natureza resinosa da secreção (Subramanian *et al.* 1989). Embora a produção de resina em coléteres tenha sido referida para certos gêneros de Rubiaceae (Solereder 1908, Fahn 1979, Langenheim 2003), nossos dados não permitem concluir sobre a composição química do exsudato.

Segundo Langenheim (2003), resinas na superfície de estípulas (que protegem os primórdios foliares), folhas jovens, caules jovens e/ou cálice floral, em geral são constituídas por uma mistura complexa de terpenos e flavonóides lipofílicos que se solidificam a temperatura ambiente. Segundo o autor, essas substâncias são comuns em plantas crescendo em ambientes diversos; em regiões áridas e semi-áridas, têm sido associadas com proteção dos tecidos em desenvolvimento contra dessecação e predação; em ambientes tropicais úmidos, a resina protege contra a grande diversidade de insetos fitófagos, mamíferos e microorganismos patogênicos que são abundantes nesses ambientes. Krause (1909, apud Langenheim 2003) observou que nas espécies de *Gardenia* habitando ambientes áridos a resina produzida por coléteres estipulares diminuía a transpiração, enquanto espécies de ambientes úmidos não apresentavam coléteres. Resinas contendo terpenos voláteis ou compostos fenólicos também podem atrair parasitóides ou predadores dos herbívoros que atacam a planta, promovendo uma defesa indireta (Langenheim 2003). De modo similar ao observado em *A. sessilis*, em algumas espécies de *Dalechampia* as resinas são à prova d'água e produzidas regular e previsivelmente; no caso das resinas florais, tais substâncias constituem um recurso particularmente valioso para as abelhas fêmeas que as utilizam na construção do ninho. Ainda com relação a essas plantas, as resinas contêm terpenos voláteis que atraem abelhas que utilizam tais substâncias como precursoras para feromônios sexuais (Armbruster 1993).

No presente trabalho, a falta de observações das plantas no campo e o desconhecimento da composição química exata da resina não permitem tirar conclusões sobre o papel da secreção

produzida pelos coléteres dendróides nas interações planta-ambiente. Contudo, com base em literatura, é possível fazer algumas suposições. A produção de exsudato hidrofóbico nos coléteres de *A. sessilis* durante todo o período de crescimento vegetativo e de formação dos órgãos florais é particularmente significativa nas condições do cerrado e, provavelmente, desempenha papel importante na proteção do tecido meristemático em desenvolvimento contra dessecação, herbívoros, patógenos e insetos (Dell 1977, Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1990, Farrell *et al.* 1991, Thomas 1991, Zalucki *et al.* 2001; Cruz *et al.* 2002). Segundo Franco (2002), o cerrado caracteriza-se por apresentar clima sazonal com uma estação seca bem definida, com altas temperaturas e elevada intensidade luminosa, sendo que as plantas apresentam diferentes mecanismos de adaptação às condições climáticas deste ecossistema.

Embora neste trabalho a produção de exsudato não tenha sido quantificada, as diferenças visuais observadas na quantidade de material nos ápices vegetativo e reprodutivo podem estar relacionadas às condições climáticas do cerrado nas épocas de brotamento e floração, pois, segundo Langenheim (1994), fatores abióticos como intensidade luminosa e condições de umidade podem afetar a quantidade total de resina produzida pelas estruturas secretoras externas.

Em espécies de rubiáceas noduladas, a secreção mucilaginosa pode servir como via para as bactérias penetrarem as folhas ainda muito jovens (Lersten & Horner 1967, Miller *et al.* 1983), além de desempenhar papel vital na nutrição dessas bactérias simbióticas (Van Hove & Kagoyre 1974, Lersten 1975, Miller *et al.* 1983). Em *A. sessilis*, a ausência de nódulos bacterianos poderia estar associada com a natureza da secreção, a qual forma uma capa rígida e hidrofóbica em torno do ápice vegetativo.

Pesquisas adicionais enfocando o desenvolvimento de exemplares de *A. sessilis* em diferentes fisionomias do cerrado, juntamente com análises da composição química das substâncias produzidas pelos coléteres, poderão esclarecer o papel das secreções exógenas na mediação de interações.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Treinamento Técnico (Processo 02/09369-2) e Mestrado (Processo 03/11747-8) à primeira autora, e ao auxílio financeiro ao Projeto temático Processo 00/12469-3 (Programa-Biota); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 302431/2002-0) pela bolsa de produtividade em pesquisa à segunda autora e ao Centro de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biociências, UNESP, Câmpus de Botucatu, pela assistência técnica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

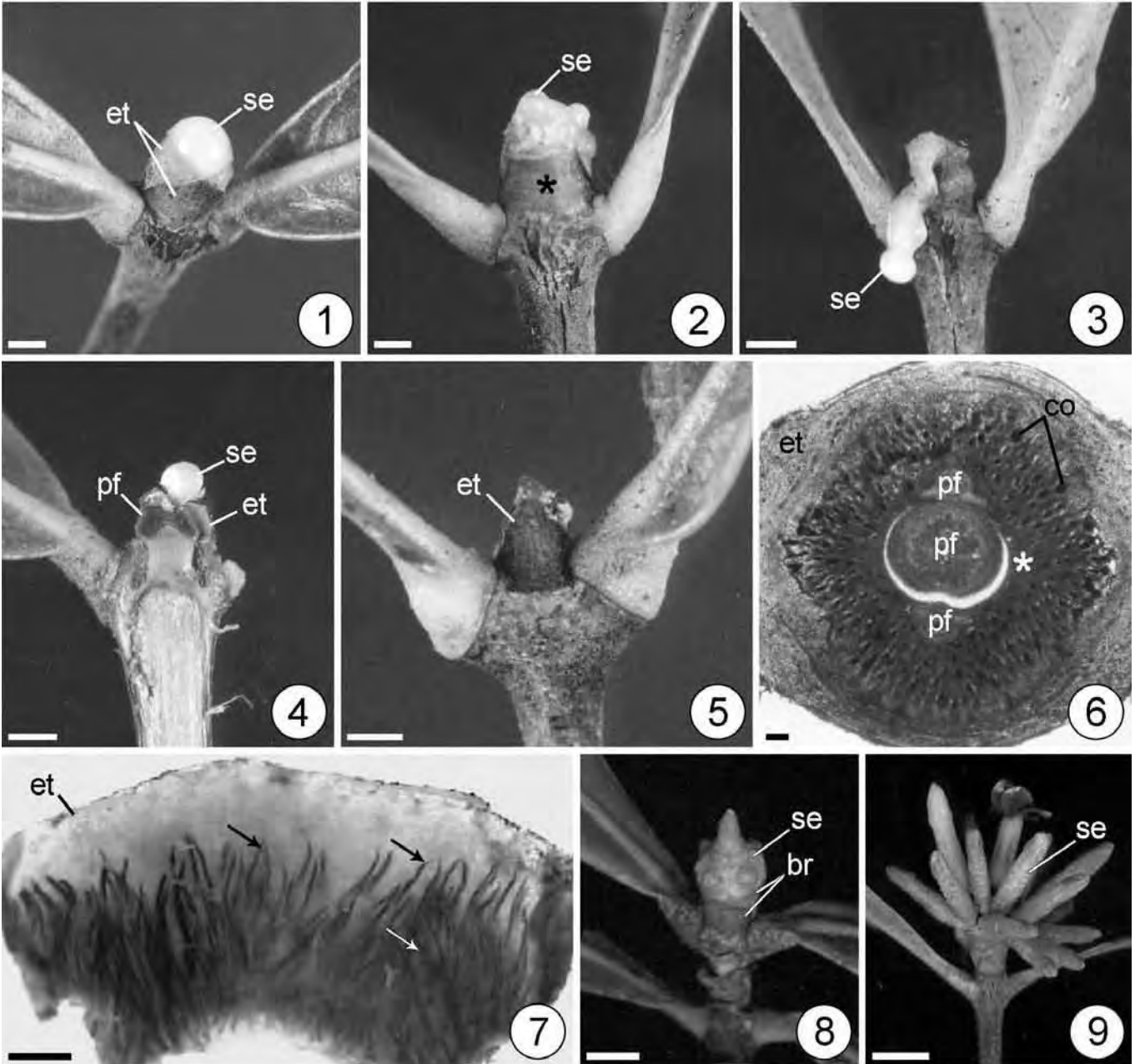
- AIELLO, A. 1979. A reexamination of *Portlandia* (Rubiaceae) and associated taxa. *Journal of Arnold Arboretum* 60:38-123.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- ARMBRUSTER, W.S. 1993. Evolution of plant pollination systems: hypotheses and tests with the Neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution* 47:1480-1505.
- APPEZZATO-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* 23:113-120.
- CORTELAZZO, A.L. 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. *Revista Brasileira de Botânica* 15:157-162.
- CRUZ, M.A.L., GOMES, V.M., MACHADO, O.L.T., FERNANDES, K.V.S. & XAVIER FILHO, J. 2002. Defense proteins of carnauba tree (*Copernicia cerifera*) Wax. Identification and partial characterization of a chitinase and a  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:11-16.
- DAVE, Y., KURIACHEN, P.M. & THOMAS, V. 1988. Development, structure and senescence of colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 57:3-7.
- DELL, B. 1977. Distribution and function of resin and glandular hairs in Western Australian Plants. *Journal of Proceedings of the Royal Society of Western Australia* 59:119-123.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W. & COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71:596-602.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc, London.
- FAHN, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FRANCO, A.C. 2002. Ecophysiology of woody plants. *In* The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York.
- GERLACH, D. 1969. Botanische mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- GERRITS, P.O. 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology. State University of Gröningen, Gröningen.
- GUARIM NETO, G. 1985. Espécies frutíferas do cerrado matogrossense. Boletim FBCN (Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza) 20:46-50.
- HORNER, H.T. & LERSTEN, N.R. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). American Journal of Botany 55:1089-1099.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1963a. The rubiaceous genus *Mussaenda*: the morphology of the Asian species. Journal of the Arnold Arboretum 44:111-126.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1963b. The rubiaceous genus *Mussaenda*: the species of India and Ceylon. Journal of the Arnold Arboretum 44:232-267.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1964. The rubiaceous genus *Mussaenda*: the species of the Philippine Islands. Journal of the Arnold Arboretum 45:101-139.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1965. The rubiaceous genus *Mussaenda*: a new species from North Burma. Journal of the Arnold Arboretum 46:366-368.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman, San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- JOHANSSON, J.T. 1987. Revision of the genus *Prismatomeris* Thw. (Rubiaceae, Morindeae). Opera Botanica 94:1-62.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137A-138A.
- 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.
- KRONSTEDT-ROBARDS, E. & ROBARDS, A. 1991. Exocytosis in gland cells. In Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants (C. Hawea, J. Coleman & D. Evans, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- LANGENHEIM, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. Journal of Chemical Ecology 20:1223-1280.
- LANGENHEIM, J.H. 2003. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Timber Press, Cambridge.
- LERSTEN, N.R. 1974a. 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.

- LERSTEN, N.R. 1974b. 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. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of Linnean Society* 71:311-319.
- LERSTEN, N.R. & HORNER, H.T. 1967. Development and structure of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *Journal of Bacteriology* 94:2027-2036.
- MANGALAN, S., KURIEN, K.P., JOHN, P. & NAIR, G.M. 1990. Development, structure and cytochemistry of resin-secreting colleters of *Gardenia gummifera* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 66: 123-132.
- MAZIA, D., BREWER, P.A. & ALFERT, M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin* 104:57-67.
- MILLER, I.M., SCOTT, A. & GARDNER, I.C. 1983. The development, structure and function of dendroid colleters in *Psychotria kirkii* Hiern (Rubiaceae). *Annals of Botany* 51:621-630.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & McCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.
- PEARSE, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. 4<sup>th</sup> ed. Longman Group. Limited.
- RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. *Current Science* 37:520-522.
- ROBBRECHT, E. 1978. *Sericanthe*, a new African genus of Rubiaceae (Coffeae). *Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie* 48:3-78.
- ROBBRECHT, E. 1983. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae) 3. *ProbletoSTEMON* revived as a section of subgenus *Tricalysia*. *Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie* 53:299-320.
- ROBBRECHT, E. 1987. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae). 4. A revision of the species of section *Tricalysia* and section *Rosea*. *Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie* 57:39-208.
- RODRIGUES, V.E.G. & CARVALHO, D.A. 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25:102-123.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- SUBRAMANIAN, R.B., MURUGAN, V., MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* 99:423-429.

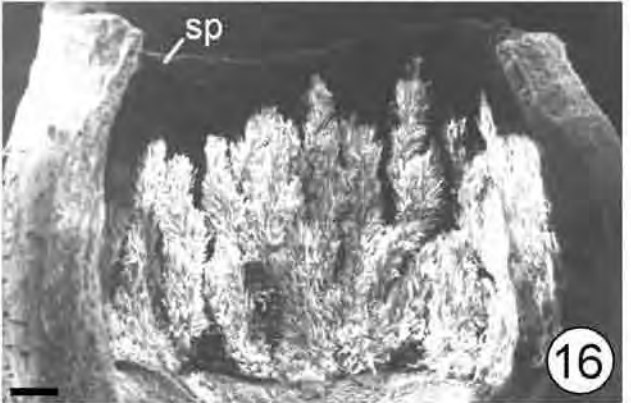
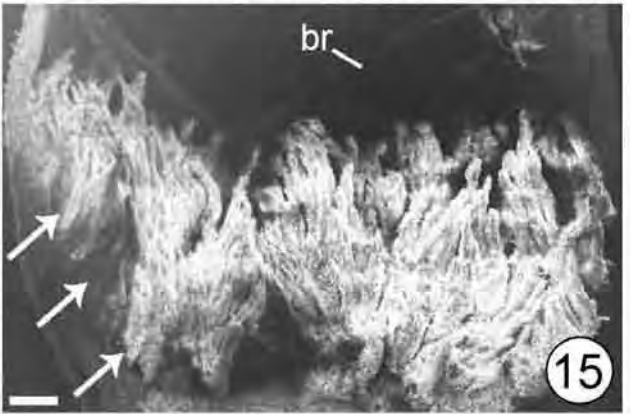
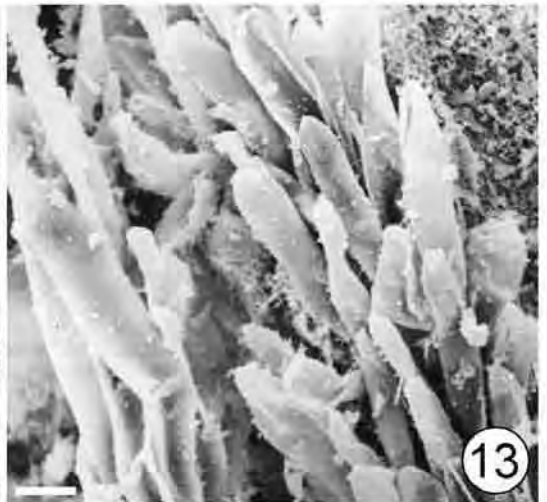
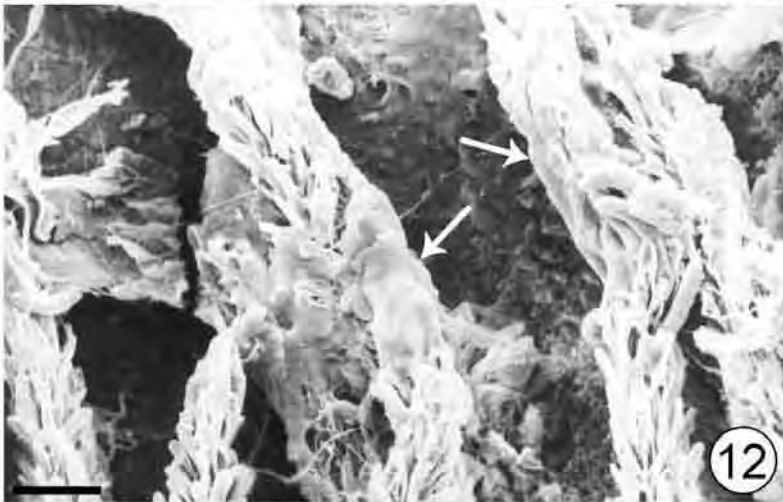
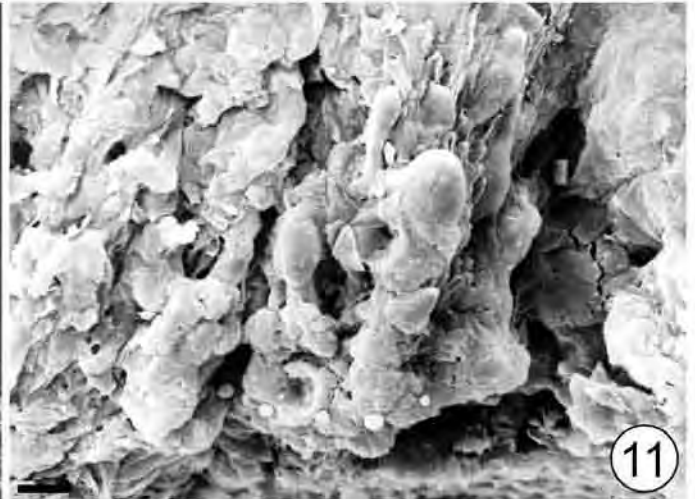
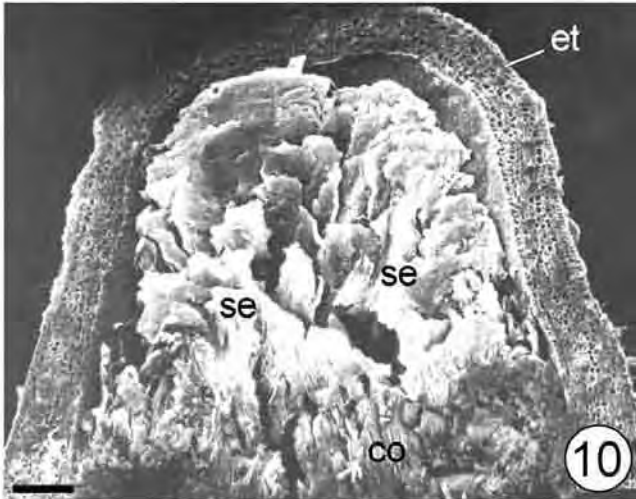
- THOMAS, V. 1991. Review Article. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Structure, origin, development and senescence of collectors in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. Histochemistry and senescence of collectors of *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. The collectors of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contact* 6:25-29.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1990. Structure and necrosis of stipular collectors in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). *Belgian Journal of Botany* 123:67-72.
- THOMAS, V., DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of collectors in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- VAN HOVE, C. 1972. Structure and initiation of nodules in the leaves of *Neorosea andongensis* (Hiern) N. Hallé. *Annals of Botany* 36:259-262.
- VAN HOVE, C. & KAGOYRE, K. 1974. A comparative study of stipular glands in nodulating and non-nodulating species of Rubiaceae. *Annals of Botany* 38:989-991.
- WOODSON, R.E. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of the Apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65:135-165.
- ZALUCKI, M.P., BROWER, L.P. & ALONSO, A. 2001. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth on first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology* 26:212-224.

Figuras 1-9. Ápices vegetativos e reprodutivos de *Alibertia sessilis*. 1. Ápice de ramo vegetativo mostrando estípulas recobertas por secreção resinosa. 2. Ápice vegetativo com uma estípula removida (\*) mostrando acúmulos de secreção pegajosa. 3. Ápice vegetativo mostrando secreção abundante. 4. Ápice vegetativo cortado longitudinalmente mostrando estípula, secreção perolada e primórdios foliares. 5. Ápice vegetativo em dormência com estípulas ressecadas, sem acúmulo de secreção. 6. Secção transversal de ápice vegetativo mostrando a disposição dos coléteres na superfície adaxial da estípula e primórdios foliares imersos na secreção (\*). 7. Estípula removida mostrando coléteres (setas) em fileiras na superfície adaxial. 8. Inflorescência em início de desenvolvimento com secreção de aspecto vítreo. 9. Secreção na superfície de botões florais. Barras = 3 cm (1, 5), 3,3 cm (2, 4), 2 cm (3), 250  $\mu$ m (6), 7 cm (7), 2,5 cm (8), 1,2 cm (9). (br = brácteas; co = coléteres; et = estípulas; pf = primórdios foliares; se = secreção).

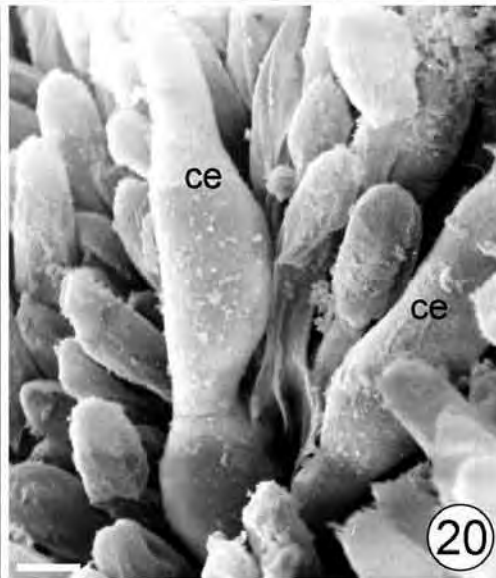
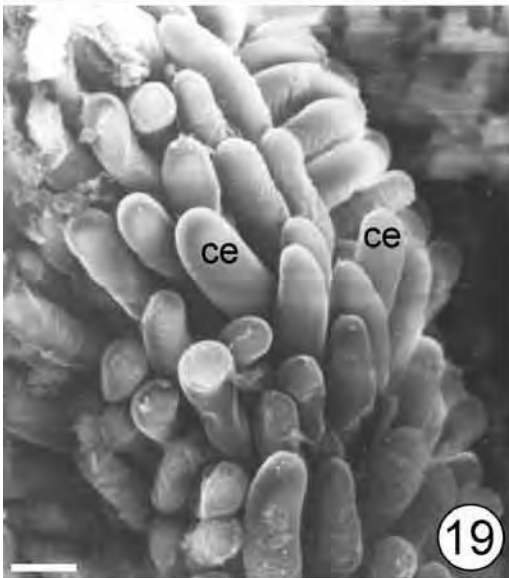
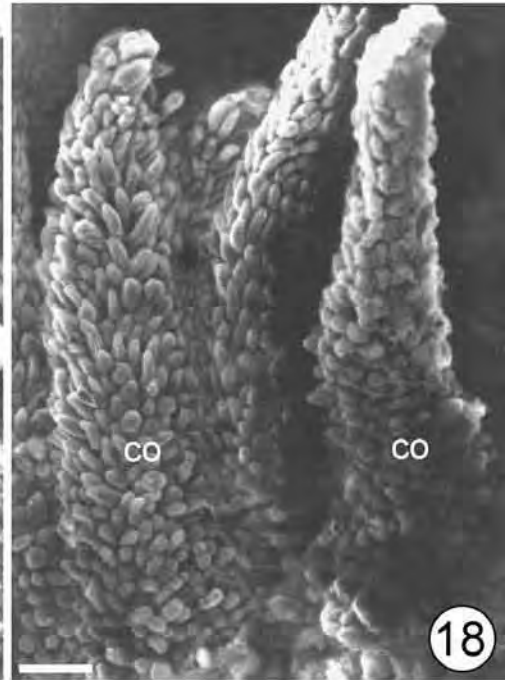
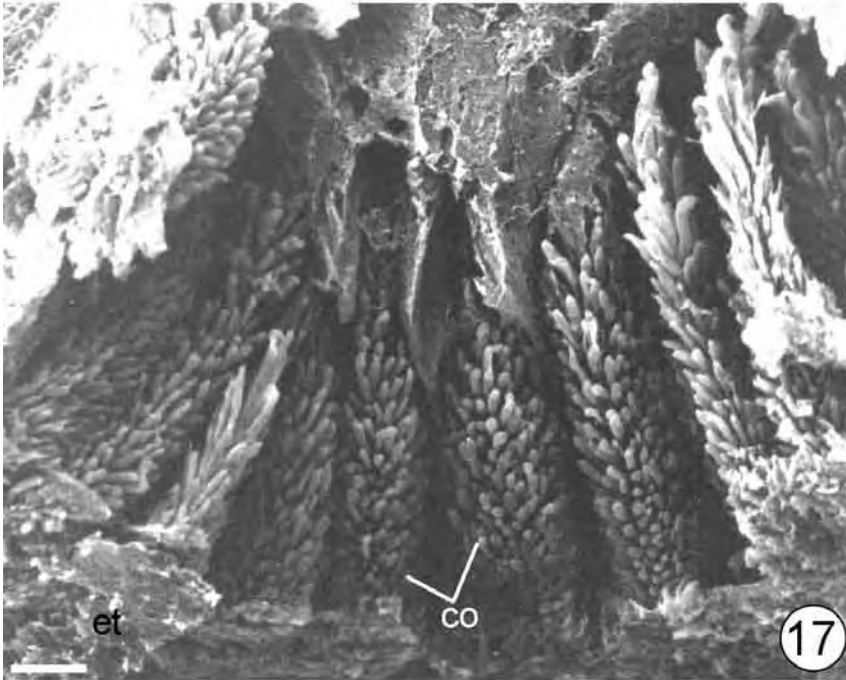




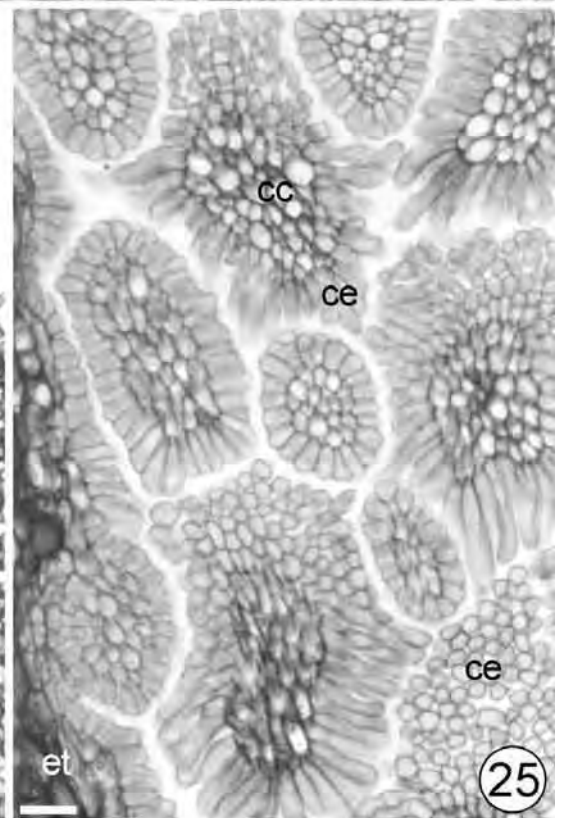
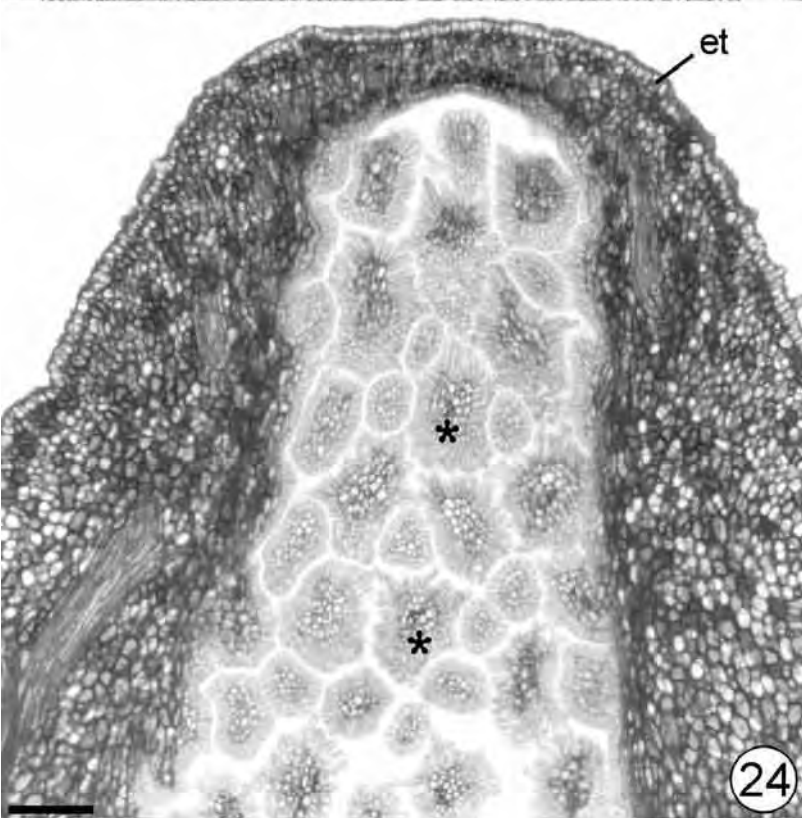
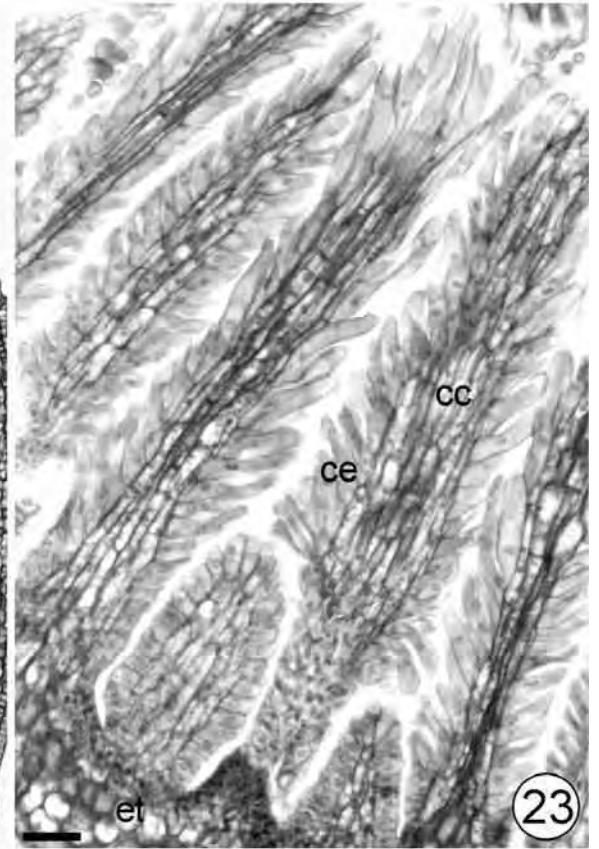
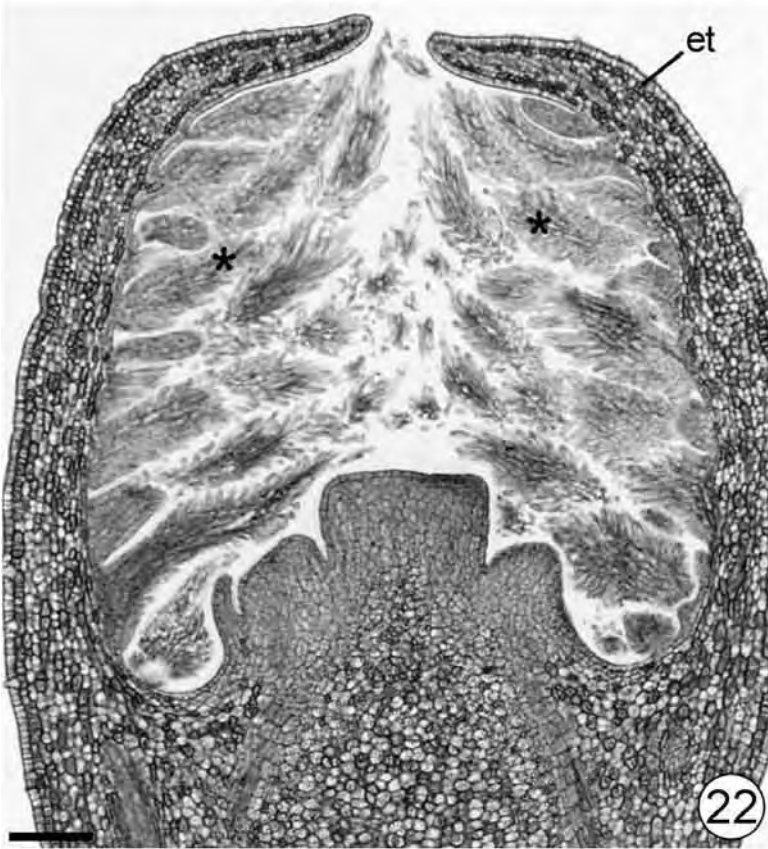
Figuras 10-16. Ápices vegetativos e reprodutivos de *Alibertia sessilis* (MEV). 10. Estípula com secreção, dificultando a observação dos coléteres. 11 e 12. Coléteres parcial ou totalmente cobertos por secreção (setas). 13. Células colapsadas devido ao tratamento com benzeno. 14. Coléteres em fileiras na base da superfície adaxial de estípula, sendo que alguns se localizam de maneira esparsa (setas). 15. Coléteres dispostos em fileiras (setas) na superfície adaxial de bráctea. 16. Coléteres localizados na base de sépala, na superfície adaxial. Barras = 135  $\mu\text{m}$  (10), 24  $\mu\text{m}$  (11), 35  $\mu\text{m}$  (12), 10  $\mu\text{m}$  (13), 195  $\mu\text{m}$  (14), 210  $\mu\text{m}$  (15), 105  $\mu\text{m}$  (16). (br = brácteas; co = coléteres; et = estípulas; se = secreção; sp = sépala).



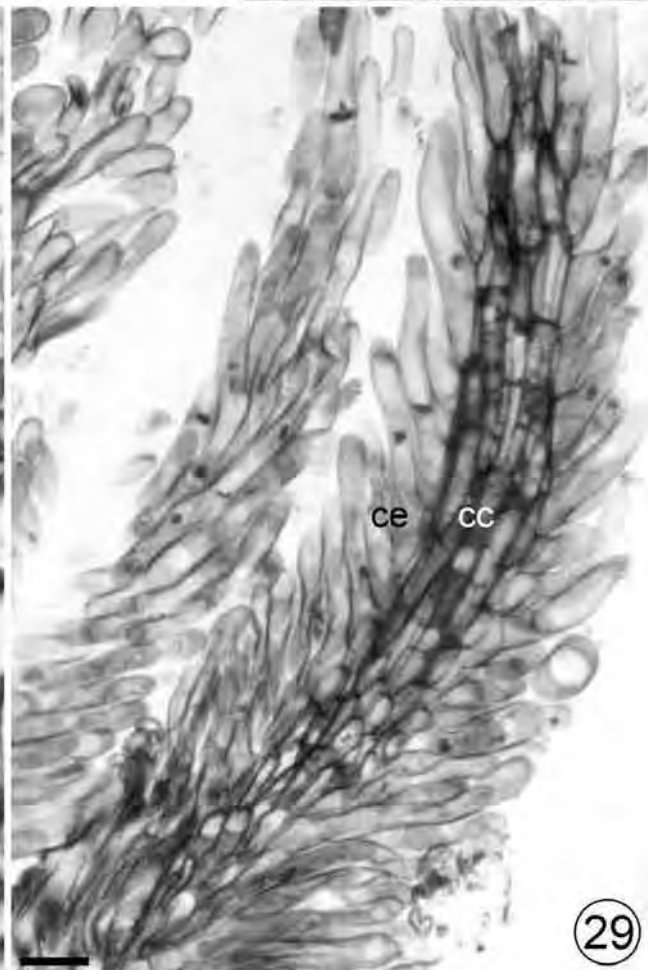
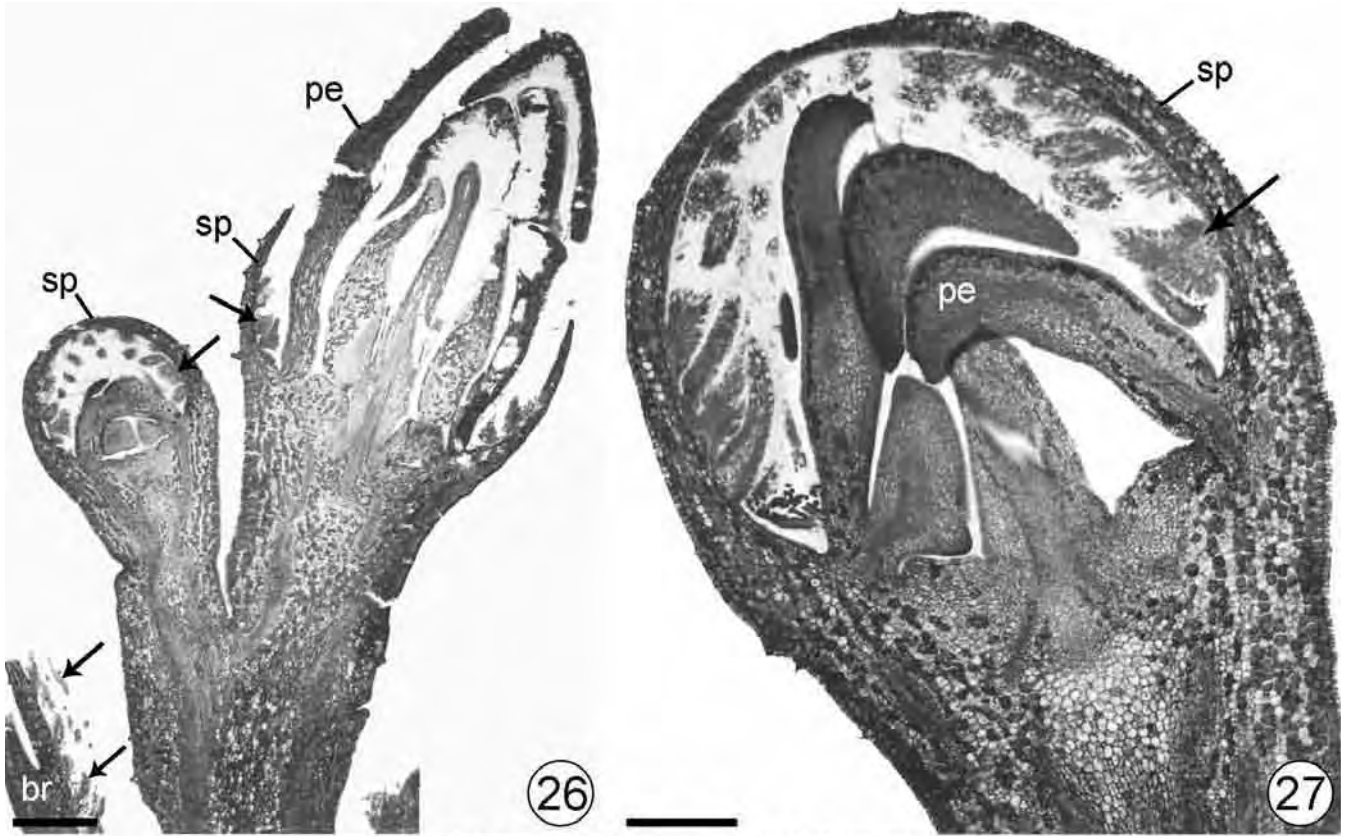
Figuras 17-21. Coléteres dendróides de *Alibertia sessilis* (MEV). 17. Estípula tratada com éter dietílico evidenciando os coléteres. 18. Coléteres dendróides em brácteas tratadas com éter dietílico. 19. Detalhe mostrando células epidérmicas cilíndricas digitiformes. 20 e 21. Células epidérmicas com abaulamentos pronunciados, mostrando grumos de secreção em sua superfície. Barras = 60  $\mu\text{m}$  (17), 40  $\mu\text{m}$  (18), 10  $\mu\text{m}$  (19), 5  $\mu\text{m}$  (20, 21). (ce = células epidérmicas; co = coléteres; et = estípulas).



Figuras 22-25. Coléteres dendróides estipulares de *Alibertia sessilis* (Microscopia de Luz). 22. Secção longitudinal do ápice vegetativo mostrando a disposição dos coléteres (\*) na superfície adaxial das estípulas. 23. Detalhe evidenciando a estrutura dos coléteres estipulares com células colunares e epidérmicas. 24. Secção transversal de ápice vegetativo mostrando a disposição e estrutura dos coléteres (\*). 25. Detalhe evidenciando coléteres com numerosas células colunares e células epidérmicas dispostas em camada única. Barras = 110  $\mu\text{m}$  (22), 25  $\mu\text{m}$  (23), 85  $\mu\text{m}$  (24), 20  $\mu\text{m}$  (25). (cc = células colunares; ce = células epidérmicas; et = estípulas).

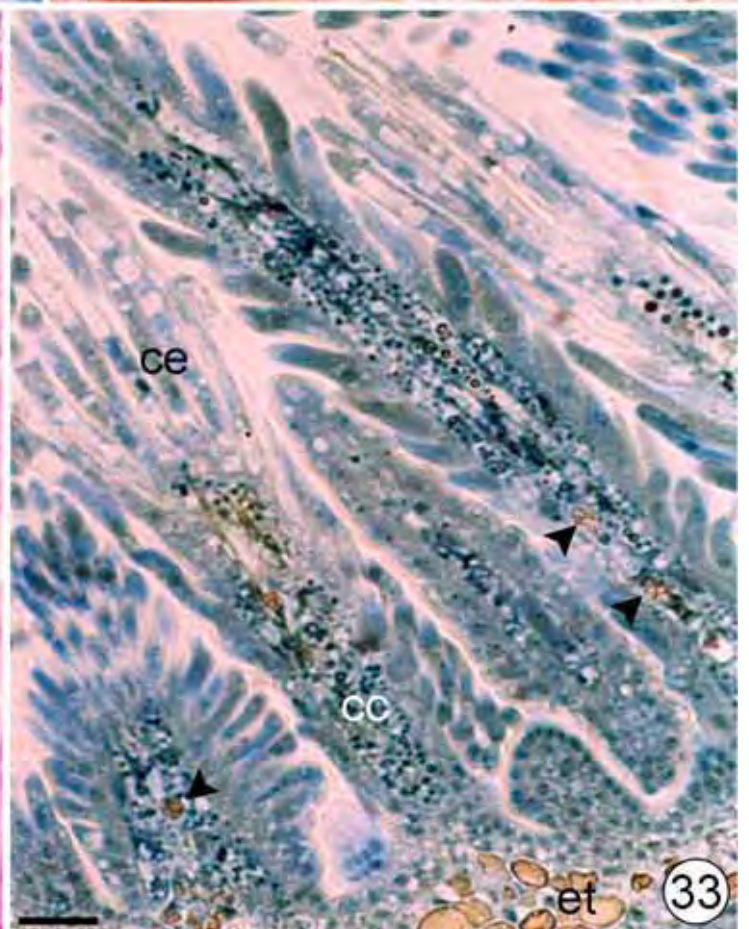
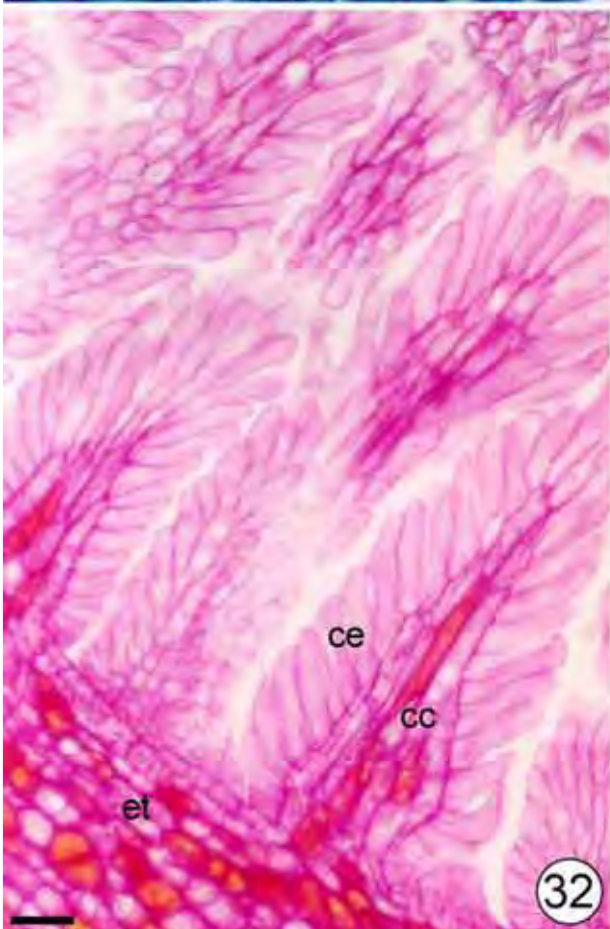
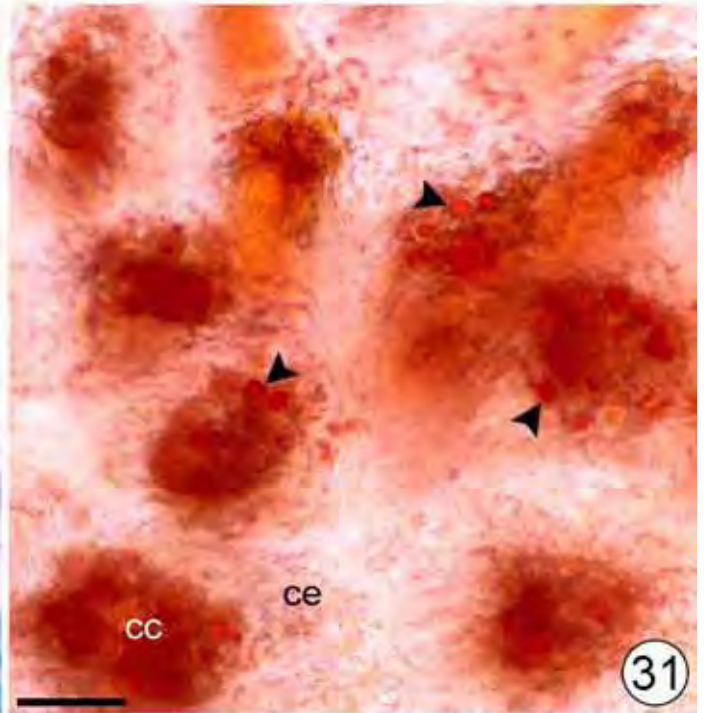
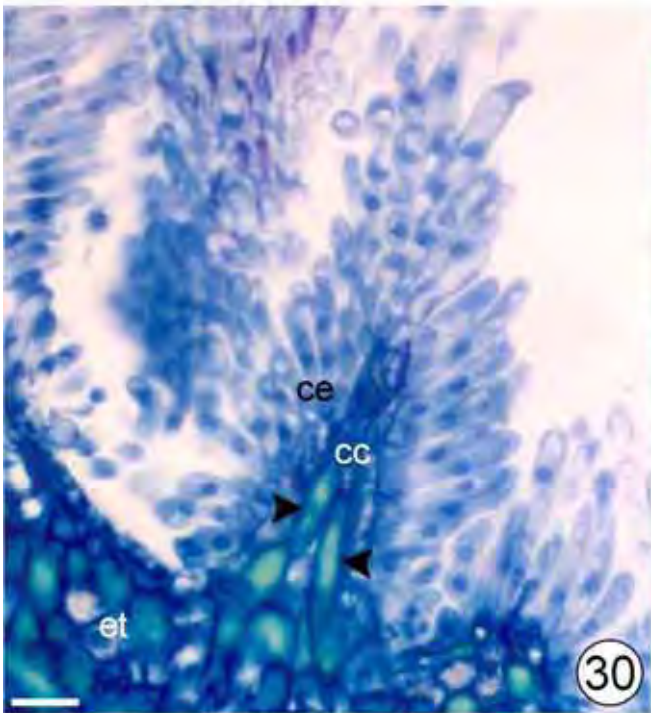


Figuras 26-29. Coléteres dendróides presentes em brácteas e sépalas de *Alibertia sessilis* (Microscopia de Luz). 26. Secção longitudinal mediana de inflorescência em início do desenvolvimento evidenciando a disposição dos coléteres (setas) nas brácteas e nas sépalas. 27. Secção longitudinal de um botão floral mostrando a disposição dos coléteres (seta) nas sépalas. 28 e 29. Coléteres dendróides de sépalas mostrando células colunares e epidérmicas. Notar a presença de cristal de oxalato de cálcio (★) em célula colunar. Barras = 200  $\mu\text{m}$  (26), 100  $\mu\text{m}$  (27), 20  $\mu\text{m}$  (28, 29). (br = brácteas; cc = células colunares; ce = células epidérmicas; pe = pétalas; sp = sépalas).





Figuras 30-33. Coléteres dendróides estipulares de *Alibertia sessilis* (Microscopia de Luz). 30. Coloração com Azul de Toluidina, evidenciando células colunares com conteúdo denso (pontas de seta) corado de verde, indicando a presença de compostos fenólicos. 31. Teste com Sudan IV revelando a presença de lipídeos (pontas de seta). 32. Teste com PAS indicando a presença de polissacarídeos. 33. Teste com Azul Mercúrio de Bromofenol mostrando a presença de proteínas visíveis como grânulos. Notar a presença de cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa (pontas de seta) nas células colunares. Barras = 20  $\mu\text{m}$  (30, 32), 35  $\mu\text{m}$  (31), 30  $\mu\text{m}$  (33). (cc = células colunares; ce = células epidérmicas; et = estípula).





## *Capítulo 2*

## Ultra-estrutura e secreção de coléteres dendróides em *Alibertia sessilis*, uma espécie de Rubiaceae não-nodulada<sup>2</sup>

DANIELA PACHECO BARREIRO<sup>2</sup> e SILVIA RODRIGUES MACHADO<sup>2,3</sup>

**RESUMO** – (Ultra-estrutura e secreção de coléteres dendróides em *Alibertia sessilis*, uma espécie de Rubiaceae não-nodulada). *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. é espécie subarbusciva de Rubiaceae comum em cerrados. Apresenta coléteres dendróides em estípulas, brácteas e sépalas cuja secreção hidrofóbica recobre totalmente o ápice de ramos vegetativo e reprodutivo. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos ultra-estruturais e o modo de secreção desses coléteres. Amostras foram preparadas segundo técnicas convencionais em microscopia eletrônica de varredura e transmissão, além do uso da técnica do ZIO. Os coléteres são formados por um eixo central multicelular e multisseriado revestido por numerosas células epidérmicas pontiagudas ou digitiformes. Os coléteres não possuem cutícula. As células colunares possuem paredes espessas com plasmodesmos, núcleo volumoso, citoplasma abundante com corpos protéicos e vacúolos com depósitos de material lipídico ou fenólico. As células epidérmicas, no estágio de secreção intensa, caracterizam-se por apresentar núcleo conspícuo, citoplasma denso e abundante, mitocôndrias volumosas, ribossomos livres, dictiossomos com muitas cisternas e vesículas adjacentes, retículo endoplasmático liso abundante, gotas de óleo dispersas e plastídeos polimórficos. Nos coléteres de brácteas e sépalas, os dictiossomos são pouco evidentes e os plastídeos são envolvidos pelo retículo endoplasmático liso. Em todos os coléteres, o mecanismo de secreção é granulócrico. A secreção acumula-se inicialmente nos vacúolos e depois no espaço periplasmático, sendo liberada para a superfície através da parede celular. Nos coléteres estipulares, a secreção é vista como corpos lamelares elétron-densos; nos coléteres de brácteas e sépalas, a secreção é elétron-lucente e de aspecto homogêneo. O ZIO marcou os dictiossomos e suas vesículas, o retículo endoplasmático liso, a membrana e as inclusões dos vacúolos.

Palavras-chave: *Alibertia sessilis*, coléteres dendróides, Rubiaceae, secreção, ultra-estrutura

**ABSTRACT** – (Ultrastructure and secretion of dendroid colleters in *Alibertia sessilis*, a non-nodulate Rubiaceae species). *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. is subshrub Rubiaceae species, common in brazilian cerrado. It presents dendroid colleters in stipules, bracts and sepals, whose hydrophobic secretion recovers the vegetative and reproductive apices. The objective of this work was to study the ultrastructural aspects of *A. sessilis* and the secretion way. Samples were prepared according to conventional techniques in scanning and transmission electron microscopy, beyond the ZIO technique. The colleters are formed by multicellular and multiseriate central axis recovered by numerous sharp or digitiform epidermal cells. The colleters do not present cuticle. The columnar cells have thick-walled with plasmodesmata, prominent nucleus and abundant cytoplasm with proteic bodies and vacuoles with deposits of lipidic or phenolic material. The epidermal cells, in the stage of intense secretion, are characterized by conspicuous nucleus, dense and abundant cytoplasm, voluminous mitochondria, free ribosomes, dictyosomes with a lot of cisterns and adjacent vesicles, abundant smooth endoplasmic reticulum, dispersed oil drops and polymorphic plastids. In the colleters of bracts and sepals, the dictyosomes are few evident and the plastids are surrounded by smooth endoplasmic reticulum. In all the colleters, the mode of secretion is granulocrin. Secretion accumulates initially inside vacuoles and after inside periplasmic space, being released through cell wall. In the stipular colleters, the secretion is seen like electron-dense lamellar bodies; in the colleters of bracts and sepals, the secretion is electron-lucent and homogenous in aspect. The ZIO marked dictyosomes and their vesicles, smooth endoplasmic reticulum, the membrane and vacuoles inclusions.

Key words: *Alibertia sessilis*, dendroid colleters, Rubiaceae, secretion, ultrastructure

<sup>(2)</sup> Parte da dissertação de mestrado de D.P. Barreiro, vinculada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Botânica, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

<sup>(2)</sup> UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Caixa Postal 510, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>(3)</sup> Autor para correspondência: [smachado@ibb.unesp.br](mailto:smachado@ibb.unesp.br)

## INTRODUÇÃO

Coléteres, estruturas multicelulares secretoras de mucilagem ou resina, são comuns na superfície adaxial de órgãos foliares em desenvolvimento em diferentes gêneros de Rubiaceae (Lersten 1974a, b, Mangalan *et al.* 1990). Com base nas características das células epidérmicas, foram descritos seis tipos de coléteres nesta família: padrão, padrão-reduzido, tipo-escova, dendróide, alado e filiforme (Lersten 1974a, b; Thomas 1991). Coléteres dendróides têm sido frequentemente associados com a presença de nódulos bacterianos nas folhas e, neste caso, a secreção mucilagínosa fornece nutrientes às bactérias simbióticas (Horner & Lersten 1968, Lersten 1975), além de possibilitar a entrada das bactérias nas folhas via estômatos (Miller *et al.* 1983).

Apesar da ampla ocorrência de coléteres em Rubiaceae, poucos são os estudos detalhados sobre os aspectos ultra-estruturais das células secretoras e o modo de secreção (Lersten & Horner 1967, Horner & Lersten 1968, Dexheimer & Guenin 1981, Miller *et al.* 1983, Thomas & Dave 1989, Mangalan *et al.* 1990, Klein *et al.* 2004). Com relação aos coléteres dendróides de Rubiaceae, as informações são restritas a poucas espécies, especialmente *Psychotria bacteriophila*, um arbusto tropical cujos coléteres mantêm uma relação simbiótica com bactérias (Lersten & Horner 1967, Horner & Lersten 1968, Lersten 1974a, Lersten 1975).

*Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., conhecida como “marmelinho”, “marmelada-preta” ou “marmelo-do-cerrado”, é uma espécie subarborescente de Rubiaceae, não-nodulada e constitui um importante componente da flora do cerrado brasileiro (Sano & Almeida 1998). Seus frutos possuem polpa de sabor agridoce e são consumidos ao natural ou na forma de geléia pela população (Almeida *et al.* 1998). Possui propriedades medicinais, sendo suas folhas e ramos utilizados na cura contra afecções da pele através do preparo de cataplasma, compressa ou banho (Rodrigues & Carvalho 2001). Uma característica desta espécie é a presença de coléteres dendróides na superfície adaxial de estípulas, brácteas e sépalas. Essas estruturas produzem uma substância resinosa que recobre totalmente os ápices de ramos vegetativo e reprodutivo formando uma capa hidrofóbica sobre as estruturas em desenvolvimento (Barreiro & Machado resultados não publicados).

Neste trabalho são descritos a ultra-estrutura e o modo de secreção de coléteres dendróides de *A. sessilis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Estípulas, brácteas e sépalas foram obtidas de exemplares adultos de *A. sessilis* nativos de fragmentos de cerrado na região de Botucatu (S23°02'55,5" e W48°31'26,1") e na Reserva Particular da Fazenda Palmeira da Serra, cidade de Pratânia (S22°48'50,2" e W48°44'35,8"), estado de São Paulo, durante os meses de Março/2003, Fevereiro, Março, Abril e Agosto/2004 e Junho/2005. Exsiccatas foram depositadas no Herbário Irina Delanova de Gemtchujnicov da Universidade Estadual Paulista (UNESP), estado de São Paulo, Brasil.

#### Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o estudo das características celulares gerais dos coléteres, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%; glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2; tampão fosfato 0,2 M pH 7,2) por 24 h em temperatura ambiente (Karnovsky 1965); pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 1 h. A seguir, as amostras foram desidratadas em série crescente de soluções de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; 1 h cada). O material foi infiltrado e embebido em resina Araldite® e polimerizadas em estufa a 60°C. Secções semifinas (0,5 µm) foram obtidas em micrótomo Leica RM 2165 e coradas com solução aquosa de azul de toluidina a 0,05%. Secções ultrafinas (50nm) foram obtidas em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, contrastadas com acetato de uranila 2% (Watson 1958) por 15 min e citrato de chumbo (Reynolds 1963) por 15 min e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, a 60 kV.

#### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Estípulas, brácteas e sépalas foram fixadas como descrito acima, desidratadas em série crescente de soluções de álcool, submetidas ao sistema de secagem em ponto crítico CPD 020 (Balzer Union) utilizando-se CO<sub>2</sub> líquido, montadas em suportes de alumínio e metalizadas com ouro. As amostras foram observadas e documentadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips SEM 515, a 20 kV.

#### Técnica do ZIO

Para melhor visualização do sistema de endomembranas, especialmente dictiossomos, foi utilizada a técnica do ZIO descrita por Reinecke & Walther (1978) e adaptada por Machado & Gregório (2001). Para isso, amostras foram fixadas por 24 h em solução Karnovsky (paraformaldeído 4%; glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2; tampão fosfato 0,2 M pH 7,2) (Karnovsky 1965) e incubadas por 22 h a 10°C em uma solução contendo Zn, I, tampão TRIS-aminometano e OsO<sub>4</sub>. A seguir, as amostras foram desidratadas e embebidas em resina Araldite® como descrito acima. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila 2% (Watson

1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Philips CM 100, a 60 kV.

## RESULTADOS

Os coléteres, em todas as amostras analisadas, consistem de um eixo central alongado multicelular e multisseriado, com número variável de células parenquimáticas, revestido por numerosas células epidérmicas unidas entre si apenas na porção proximal e separadas umas das outras na sua porção distal (figura 1). As células epidérmicas são cilíndricas, digitiformes ou pontiagudas, podendo ocorrer células com extremidade bulbosa (figura 2).

### Ultra-estrutura e secreção dos coléteres estipulares

As células do eixo são axialmente alongadas (figura 3) e apresentam paredes de espessura variável com numerosos plasmodesmos, os quais conectam essas células entre si e com a base das células epidérmicas; o núcleo é volumoso e de contorno irregular; o citoplasma é abundante onde se observam mitocôndrias, corpos protéicos com densidade variável e plastídeos com grãos de amido proeminentes (figuras 3, 4); os vacúolos contêm depósitos de material lipídico (figuras 4, 5) ou compostos fenólicos (figura 6).

Com base nas características das células epidérmicas digitiformes, foram definidos quatro estágios de secreção.

Estágio 1. As células neste estágio caracterizam-se por apresentar núcleo conspícuo com cromatina não condensada geralmente localizado no pólo distal da célula; citoplasma denso e abundante; mitocôndrias globulares; dictiossomas localizados nas adjacências da parede celular; ribossomos livres e plastídeos; os vacúolos são ausentes ou pequenos e elétrôn-lucentes ou com inclusões membranáceas (figuras 5, 7). As células epidérmicas, em sua região proximal, apresentam paredes delgadas com plasmodesmos e lamela mediana fortemente elétrôn-densa (figura 6); na região distal, as paredes são mais delgadas e sinuosas; cutícula não foi observada (figura 5). Os plastídeos são de dois tipos e apresentam certa polarização: plastídeos com grãos de amido situam-se preferencialmente no pólo proximal da célula (figuras 5, 6), enquanto que plastídeos com inclusões osmiofílicas de densidade variável são observados no pólo distal da célula (figura 5).

Estágio 2. Neste estágio, as células caracterizam-se pela presença de plastídeos polimórficos com estroma finamente granular e inclusões lipofílicas globulares; retículo endoplasmático rugoso e vacúolos com conteúdo elétrôn-denso (figura 8); os dictiossomas apresentam cisternas mais desenvolvidas e inúmeras vesículas adjacentes; as mitocôndrias globulares são volumosas e com cristas desenvolvidas (figuras 9, 10); gotas osmiofílicas são

observadas dispersas no citoplasma (figuras 8-11) ou no interior de vacúolos (figura 8); corpos multivesiculares são observados no interior de vacúolos (figuras 9, 11) ou fundindo-se com a membrana plasmática (figura 12); em alguns vacúolos, nota-se fusão entre as vesículas, originando corpos membranáceos multilamelares (figura 13). A lamela mediana apresenta-se intumescida e fortemente elétron-densa, onde se nota o aparecimento de pequenas lacunas (figura 12). No pólo proximal da célula, as paredes anticlinais mostram plasmodesmos (figura 9).

Estágio 3. As células neste estágio mostram núcleo proeminente de contorno irregular, citoplasma abundante e vacúolos com inclusões membranáceas elétron-densas (figura 14). A membrana plasmática se apresenta sinuosa; em toda a extensão da célula observa-se a formação de um espaço entre a membrana plasmática e a parede celular, constituindo o espaço periplasmático com pequenos acúmulos de material granular elétron-denso (figuras 14, 15). No citoplasma, nota-se o aparecimento de polirribossomos e retículo endoplasmático liso em abundância; parece ocorrer um aumento na população de dictiossomos, os quais são compostos de muitas cisternas com vesículas em suas extremidades e estão espalhados por todo o citoplasma (figura 16). Vesículas aparecem espalhadas por todo o citoplasma, sendo mais freqüentes na região periférica do citoplasma; vacúolos com inúmeras vesículas elétron-lucentes agrupadas no seu interior são freqüentes (figura 17); vacúolos com figuras-de-mielina (figura 18) e depósitos de material osmiofílico (figura 19) são observados com maior freqüência em relação ao estágio anterior.

Estágio 4. Este estágio é caracterizado pelo grande desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, visto como uma rede de cisternas ramificadas, algumas delas localmente dilatadas; nota-se também um maior desenvolvimento das cristas mitocondriais, sendo observadas mitocôndrias com uma constrição central, sugerindo sua divisão; vacúolos contendo uma matriz finamente granular, provavelmente de natureza hidrofílica, onde estão imersos acúmulos de material lamelar fortemente elétron-denso, vistos como figuras-de-mielina, são comuns neste estágio; imagens sugestivas de fusão de vacúolos são freqüentes. Na porção proximal das células, a lamela mediana foi parcial ou totalmente degradada dando origem a espaços intercelulares (figura 21). Imagens sugestivas de fusão dos vacúolos à membrana plasmática, com liberação do conteúdo no espaço periplasmático (figuras 22, 23) são comuns neste estágio. No espaço periplasmático, notam-se grandes massas de material multilamelar elétron-denso (figuras 20, 22, 23). As paredes celulares mostram uma diminuição na sua densidade e espessura, passando a apresentar um aspecto laxo e sinais de desintegração (figura 24). A secreção é liberada através da parede, sendo visível na forma de grumos de material elétron-denso na superfície das células (figura 25).

Células epidérmicas com extremidade bulbosa apresentam parede espessa, citoplasma reduzido a uma fina camada parietal e um grande vacúolo central preenchido com lipídeos (figura 26). Não foi possível verificar se este material foi liberado para a superfície da célula.



### Ultra-estrutura de coléteres em brácteas e sépalas

As células colunares e epidérmicas dos coléteres de brácteas e sépalas, de um modo geral, apresentam características ultra-estruturais similares às observadas nos coléteres estipulares.

As células colunares possuem paredes pectocelulósicas espessas, citoplasma abundante (figura 27) com corpos protéicos dispersos (figura 28) e vacúolos preenchidos com material lipídico (figura 29).

As células epidérmicas, no início do estágio secretor, apresentam paredes pectocelulósicas delgadas e íntegras; núcleo conspícuo e citoplasma abundante e denso, onde se nota retículo endoplasmático liso muito desenvolvido; numerosas mitocôndrias e plastídeos esféricos com grãos de amido diminutos ou ausentes. Os dictiossomos são pouco visíveis e os vacúolos são ausentes (figura 30). No pico de secreção, ocorrem plastídeos globulares com estroma elétron-denso finamente granular, muitos deles circundados pelo retículo endoplasmático; nota-se, neste estágio, a presença de espaço periplasmático desenvolvido com acúmulo de secreção elétron-lucente de aspecto homogêneo (figura 31). A secreção é liberada através da parede celular que sofre parcial (figura 32) ou total degradação (figura 33).

### Citoquímica ultra-estrutural

O método do ZIO mostrou claramente a morfologia e a distribuição de dictiossomos, vesículas e retículo endoplasmático liso (REL) nas células colunares e epidérmicas dos coléteres de estípulas, brácteas e sépalas. Os resultados aqui apresentados referem-se unicamente aos coléteres estipulares.

Os dictiossomos foram totalmente impregnados com o metal e depósitos elétron-densos dos produtos da reação foram vistos no lúmen das cisternas, nas vesículas das extremidades de tais cisternas e nas vesículas adjacentes aos dictiossomos (figuras 34, 35). Agrupamentos de vesículas com diferentes tamanhos intensamente impregnadas pelo ZIO foram observados na região periférica do citoplasma (figura 36). O REL e as vesículas adjacentes foram fortemente impregnados pela mistura do ZIO (figuras 34, 37, 40), enquanto que o retículo endoplasmático rugoso (RER) não foi impregnado pelo metal (figura 36). A membrana de alguns vacúolos foi fortemente impregnada pelo metal, sendo observados depósitos de material denso nas adjacências da membrana vacuolar e no interior dos vacúolos (figura 38). Em alguns vacúolos, a membrana vacuolar não foi impregnada, porém o ZIO marcou fortemente as membranas por ele incorporadas (figura 39).

## DISCUSSÃO

*Alibertia sessilis* apresenta coléteres na face adaxial das estípulas, brácteas e sépalas. Nessas três estruturas, os coléteres são do tipo dendróide que, segundo Lersten (1974a, b), caracterizam-se por possuir um eixo central multicelular e multisseriado de natureza parenquimática, vascularizado ou não, revestido por células epidérmicas alongadas dispostas radialmente ao eixo.

Ultra-estruturalmente, as células epidérmicas dos coléteres estipulares e daqueles presentes em brácteas e sépalas de *A. sessilis*, no estágio de intensa secreção, mostraram algumas peculiaridades indicativas de diferenças na composição química da secreção.

Nos coléteres estipulares, as células caracterizam-se pela presença de numerosos dictiossomos hiperativos com muitas vesículas adjacentes, retículo endoplasmático liso (REL) bastante desenvolvido, mitocôndrias com cristas desenvolvidas e plastídeos polimórficos com inclusões lipofílicas. Tais características têm sido descritas em diferentes glândulas secretoras de substâncias mistas, incluindo polissacarídeos e lipídeos (Horner & Lersten 1968, Werker & Fahn 1981, Dexheimer & Guenin 1981, Miller *et al.* 1983, Durkee *et al.* 1984, Mohan & Inamdar 1986, Klein *et al.* 2004). Os numerosos dictiossomos podem estar relacionados com produção dos componentes hidrofílicos da secreção, bem como podem estar envolvidos na glicolização de componentes tóxicos da secreção, especialmente de alguns óleos essenciais (Figueiredo & Pais, 1992); as vesículas oriundas dos dictiossomos estão relacionadas com o transporte da secreção (Fahn 1988). A presença de REL em abundância é relacionada com a secreção de lipídeos (Fahn 1988, Alberts *et al.* 1994). A presença de plastídeos polimórficos, às vezes com configuração amebóide, juntamente com REL proliferado nas células dos coléteres de *A. sessilis*, indica a produção de secreções lipofílicas, especialmente terpenos e resinas (Fahn 1990, Langenheim 2003; Machado *et al.* 2005).

As características das células epidérmicas dos coléteres de brácteas e sépalas de *A. sessilis* especialmente a aparente ausência de dictiossomos, retículo endoplasmático liso muito desenvolvido e a presença de plastídeos circundados por cisternas do retículo endoplasmático são comumente relatadas em glândulas secretoras de lipídeos, principalmente terpenos e resinas (Turner & Croteau 2004).

Com base nas características ultra-estruturais pode-se sugerir que a secreção produzida pelos coléteres dendróides estipulares de *A. sessilis* possui natureza mista (hidrofílica e lipofílica), enquanto que a produzida pelos coléteres de brácteas e sépalas é essencialmente lipofílica. De fato, o aspecto da secreção acumulada no espaço periplasmático difere entre os coléteres de brácteas e sépalas e aqueles das estípulas. Nas células epidérmicas dos coléteres estipulares, os depósitos

apresentam aspecto lamelar fortemente elétron-denso, enquanto nas brácteas e sépalas a secreção acumulada é elétron-lucente e de aspecto homogêneo. Contudo, a falta de análises químicas não nos permite concluir se existem diferenças quanto à natureza do exsudato produzido pelos coléteres nas diferentes estruturas estudadas.

Análises histoquímicas realizadas por Barreiro & Machado (resultados não publicados) detectaram a presença de polissacarídeos, lipídeos e proteínas no protoplasto das células epidérmicas de coléteres dendróides presentes nas estípulas, brácteas e sépalas de *A. sessilis*, sendo a intensidade das reações diferentes em cada estrutura. Polissacarídeos e substâncias lipofílicas foram igualmente detectados em coléteres de espécies de *Mandevilla* (Apezzato-da-Glória & Estelita 2000). Secreção resinosa foi relatada em coléteres de diferentes espécies, incluindo *Gardenia gummifera* (Mangalan *et al.* 1990) e *Allamanda cathartica* (Ramayya & Bahadur 1968). Subramanian *et al.* (1989) confirmaram a natureza resinosa do exsudato dos coléteres de Apocynaceae com base na sua solubilidade em solventes orgânicos quentes, na autofluorescência do exsudato em microscopia de epifluorescência sob ocorrência de raios UV e sua reação positiva com fluorocromos lipofílicos. Proteínas foram detectadas no exsudato viscoso de coléteres de três espécies de *Simira* e, segundo os autores, provavelmente estão relacionadas com defesa contra microorganismos (Klein *et al.* 2004). Embora histoquimicamente tenham sido detectados proteínas, lipídeos e polissacarídeos no protoplasto de células epidérmicas e colunares em *A. sessilis*, nossos dados não permitem concluir sobre a presença dessas substâncias no exsudato produzido pelos coléteres.

Poucos estudos relataram as mudanças ultra-estruturais que ocorrem nos coléteres durante a secreção (Klein *et al.* 2004). Neste trabalho, as análises ultra-estruturais indicaram que os grãos de amido presentes nos plastídeos são metabolizados logo no início do processo secretor. Depleção de amido dos plastídeos tem sido usualmente associada com fonte de energia para os processos metabólicos em estruturas glandulares e, provavelmente, fornecem substrato para a síntese dos precursores dos componentes hidrofílicos da secreção (Durkee *et al.* 1984; Monteiro *et al.* 1999). A formação de um espaço periplasmático amplo, onde se observam acúmulos da secreção nos coléteres de *A. sessilis*, é uma característica que tem sido descrita em diferentes glândulas, incluindo coléteres (Akers *et al.* 1978, Miller *et al.* 1983, Thomas 1991, Klein *et al.* 2004). A proliferação de cisternas do retículo endoplasmático em coléteres dendróides de *A. sessilis* coincidindo com o pico de atividade secretora é uma característica comumente reportada para diferentes glândulas lipofílicas, especialmente terpenos (Turner *et al.* 1999, Turner & Croteau 2004, Machado *et al.* 2005). Proliferação de REL e dictiossomos nos coléteres estipulares de *A. sessilis* indica que ambas organelas são as principais envolvidas no processo de secreção, tal como observado em coléteres de *Plumeria*, por Mohan & Inamdar (1986). A fusão de vesículas,

originadas tanto dos dictiossomos como do retículo endoplasmático, com a membrana plasmática e posterior liberação do conteúdo no espaço periplasmático, no pico da secreção, é um processo comum a coléteres (Horner & Lersten 1968, Dexheimer & Guenin 1981, Miller *et al.* 1983, Thomas 1991, Klein *et al.* 2004). Neste trabalho, os resultados obtidos com a aplicação da técnica do ZIO confirmaram a origem das vesículas e a participação dessas organelas no processo secretor dos coléteres dendróides. As características descritas são típicas do mecanismo granulócrico de secreção, o qual exige energia respiratória para o carregamento das vesículas portadoras de material e sua fusão à membrana plasmática (Schnepf 1963). Assim, a observação de numerosas mitocôndrias com cristas bastante desenvolvidas no pico da atividade secretora está de acordo com o mecanismo de secreção apresentado por essas células. A dissolução da lamela mediana na porção proximal das paredes celulares, a subsequente formação de espaço e a liberação da secreção para esta região são modificações exibidas pelas células epidérmicas nos coléteres dendróides de *A. sessilis*. Eventos similares aos observados neste trabalho, porém com a dissolução da lamela mediana das paredes radiais das células epiteliais e a formação de extensos canais dentro dos coléteres, foram descritos em coléteres de diferentes taxa incluindo *Plumeria* (Mohan & Inamdar 1986), *Azadirachta* (Inamdar *et al.* 1986) e *Mandevilla* (Apezato-da-Glória & Estelita 2000).

A ausência de cutícula nos coléteres de *A. sessilis* confirma observações relatadas para coléteres de padrões distintos em diferentes espécies de Rubiaceae (Horner & Lersten 1968, Thomas 1991, Klein *et al.* 2004). Este estudo mostrou claramente que a parede periclinal externa das células epidérmicas está diretamente envolvida no processo de liberação da secreção para o exterior, confirmando observações de outros autores em coléteres que não possuem cutícula (Horner & Lersten 1968, Miller *et al.* 1983, Klein *et al.* 2004).

As características ultra-estruturais das células colunares, incluindo núcleo proeminente, citoplasma abundante, vacúolos repletos de substâncias lipídicas e extensiva comunicação simplástica via plasmodesmos, entre si e com as células epidérmicas, indicam que de alguma forma, o eixo central dos coléteres dendróides participa da secreção. Esta evidência merece destaque, visto que a maioria dos trabalhos consultados faz referência unicamente ao papel das células epidérmicas no processo secretor.

A técnica do ZIO impregnou as membranas dos dictiossomos, retículo endoplasmático liso, vesículas e membrana vacuolar de células epidérmicas e colunares dos coléteres de *A. sessilis*. Reação similar também foi observada por Machado & Gregório (2001) em nectários extraflorais de *Citharexylum mirianthum* (Verbenaceae). Os resultados da técnica do ZIO confirmaram que as células colunares dos coléteres dendróides de *A. sessilis* estão envolvidas no processo de secreção. Embora a base química para a reação do ZIO ainda não seja elucidada, nossos resultados confirmaram que esta técnica facilita a observação do sistema de endomembranas, especialmente a

morfologia e a distribuição dos dictiosomos, REL e membrana vacuolar. Tem sido sugerido que com a mistura do ZIO, ou o  $Zn^{2+}$  liga-se aos sítios de  $Ca^{2+}$  para removê-lo nas membranas, ou o ósmio é reduzido para a formação de um depósito elétron-opaco de osmato de zinco (Gilloteaux & Naud 1979). Osborne & Thornhill (1974) postularam que a reação do ZIO resulta numa deposição de ósmio metálico ou possivelmente numa oxidação mais baixa do que o tetróxido nos possíveis sítios, provavelmente dependendo de algum tipo de reação de redução. Outros autores sugeriram que, depois que os tecidos são fixados com o ZIO, ou este reage com lipoproteínas, ou simplesmente com um componente lipídico (Niebauer *et al.* 1969). De acordo com Maillet (1963), a mistura do ZIO age na separação de porções de lipídeo a partir de complexos de lipoproteínas e expõe novos grupos de lipídeo que estariam disponíveis para aumentar a deposição do metal.

As propriedades da secreção dos coléteres como uma barreira físico-química defensiva têm sido sugerida para várias espécies (Ramayya & Bahadur 1968, Williams *et al.* 1982, Thomas & Dave 1990, Thomas 1991, Klein *et al.* 2004). Entre os possíveis papéis atribuídos à secreção dos coléteres, destacam-se a proteção das estruturas jovens contra a dessecação (Robbrecht 1988, Thomas & Dave 1989, 1990) e defesa contra predação por insetos fitófagos e invasão de patógenos (Farrel *et al.* 1991, Zalucki *et al.* 2001, Cruz *et al.* 2002). As resinas, uma mistura complexa constituída por terpenóides voláteis e não-voláteis e compostos fenólicos, são substâncias potencialmente relevantes em interações ecológicas bióticas e abióticas (Langenheim 2003).

A ocorrência de coléteres dendróides, de um modo geral, tem sido associada com a presença de nódulos bacterianos foliares. Segundo Lersten (1974a, b, 1975), o alongamento e a separação das células epidérmicas associados à presença de bactérias imersas na secreção produzida pelos coléteres dendróides sugerem a ocorrência de simbiose bacteriana, sendo tal associação uma característica em espécies noduladas de Rubiaceae. Segundo este autor, a partir do momento em que as bactérias passam a viver sobre o ápice caulinar, a secreção produzida pelos coléteres fornece substâncias nutritivas aos simbiotes antes de estes invadirem as folhas em desenvolvimento. Além disso, o fluido mucilaginoso auxilia a entrada das bactérias via estômatos, as quais instalam-se na câmara subestomática e dão início ao desenvolvimento do nódulo. No presente trabalho, a ausência de nódulos bacterianos nas folhas, bem como de bactérias na secreção produzida pelos coléteres dendróides, não corrobora com a hipótese de tais coléteres estarem correlacionados com simbiose bacteriana. Contudo, nossas observações concordam com Van Hove & Kagoyre (1974), que concluíram que a estrutura dendróide não é um pré-requisito para a realização de simbiose, pelo menos em algumas espécies de Rubiaceae, com base na ocorrência de coléteres de tipo compacto em espécies noduladas de *Psychotria* e a presença de glândulas compacta e dendróide em *Tricalysia*, uma espécie não-nodulada.

Trabalhos mais detalhados envolvendo observações de campo e análises químicas são necessários para avaliar o papel biológico dos coléteres dendróides de *A. sessilis*. São também necessários estudos a fim de estabelecer se as células bulbosas, as quais apresentam características peculiares, participam efetivamente da produção e liberação de secreção.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Treinamento Técnico (Processo 02/09369-2) e Mestrado (Processo 03/11747-8) à primeira autora, e ao auxílio financeiro ao Projeto temático Processo 00/12469-3 (Programa-Biota); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 302431/2002-0) pela bolsa de produtividade em pesquisa à segunda autora e ao Centro de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biociências, UNESP, Câmpus de Botucatu, pela assistência técnica.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERS, C.P., WEYBREW, J.A. & LONG, R.C. 1978. Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L., cv. xanthi. *American Journal of Botany* 65:282-292.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RALF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- APPEZZATO-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* 23:113-120.
- CRUZ, M.A.L., GOMES, V.M., MACHADO, O.L.T., FERNANDES, K.V.S. & XAVIER FILHO, J. 2002. Defense proteins of carnauba tree (*Copernicia cerifera*) Wax. Identification and partial characterization of a chitinase and a  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:11-16.
- DEXHEIMER, J. & GUENIN, F. 1981. Étude des modalités de la sécrétion de mucilage par les trichomes stipulaires de *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *Cytologia* 46:731-747.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W. & COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71:596-602.
- FAHN, A. 1988. *Tansley Review n° 14*. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108:229-257.

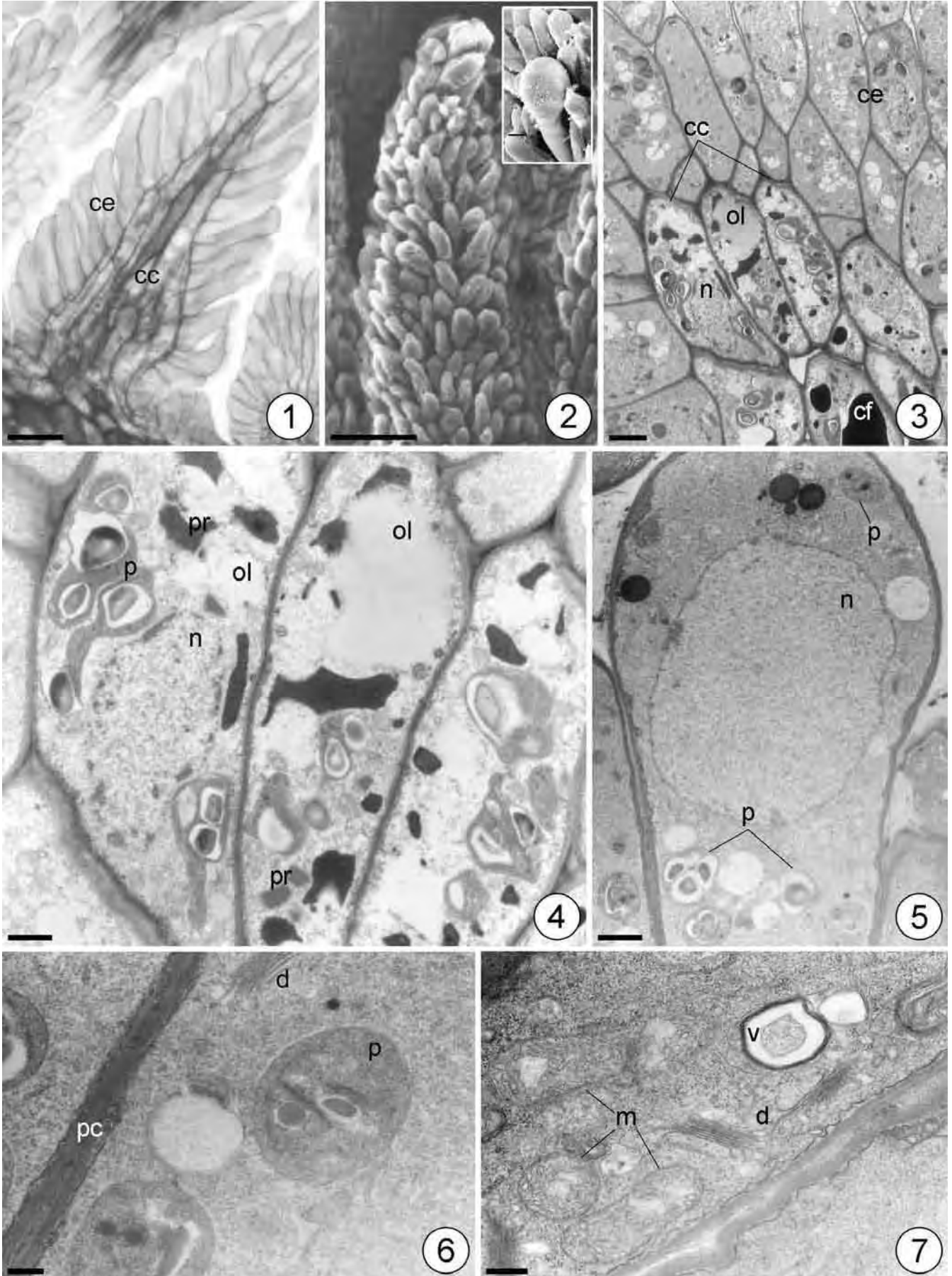
- FAHN, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FIGUEIREDO, A.C.S. & PAIS, M.S. 1992. Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 70:325-331.
- GILLOTEAUX, J. & NAUD, J. 1979. The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of Maillet. *Histochemistry* 63:227-243.
- HORNER, H.T. & LERSTEN, N.R. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55:1089-1099.
- INAMDAR, J.A., SUBRAMANIAN, R.B. & MOHAN, J.S.S. 1986. Studies on resin glands of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *Annals of Botany* 58:425-429.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137A-138A.
- 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.
- LANGENHEIM, J.H. 2003. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Timber Press, Cambridge.
- LERSTEN, N.R. 1974a. 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.
- LERSTEN, N.R. 1974b. 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. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of Linnean Society* 71:311-319.
- LERSTEN, N.R. & HORNER, H.T. 1967. Development and structure of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *Journal of Bacteriology* 94:2027-2036.
- MACHADO, S.R. & GREGÓRIO, E.A. 2001. Zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reactive sites in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae). *Tissue & Cell* 33:72-77.
- MACHADO, S.R., GREGÓRIO, E.A. & GUIMARÃES, E. 2005. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/mcj042v1> (acesso em 07/02/2006).

- MAILLET, M. 1963. Le reactif au tetraoxyde d'osmium-iodure du zinc. Zeitschrift fuer Mikroskopisch-Anatomische Forschung 70:397-406.
- MANGALAN, S., KURIEN, K.P., JOHN, P. & NAIR, G.M. 1990. Development, structure and cytochemistry of resin-secreting collectors of *Gardenia gummifera* (Rubiaceae). Annals of Botany 66: 123-132.
- MILLER, I.M., SCOTT, A. & GARDNER, I.C. 1983. The development, structure and function of dendroid collectors in *Psychotria kirkii* Hiern (Rubiaceae). Annals of Botany 51:621-630.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion de extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- MONTEIRO, W.R., FAHN, A., CALDEIRA, W. & CASTRO, M.M. 1999. Ultrastructural observations on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae). Flora 194:113-126.
- NIEBAUER, G., KRAWCZYK, W.S., KIDD, R.L. & WILGRAM, G.F. 1969. Osmium zinc iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cells. The Journal of Cell Biology 43:80-89.
- OSBORNE, M.P. & THORNHILL, R.A. 1974. The zinc-iodide-osmium reactive sites in the sensory epithelia of the frog labyrinth. Journal of Neurocytology 3:459-470.
- RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science 37:520-522.
- REINECKE, M. & WALTHER, C. 1978. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as reveled by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. Journal of Cell Biology 21:839-855.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17:208-212.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. Opera Botanica Belgica 1:1-271.
- RODRIGUES, V.E.G. & CARVALHO, D.A. 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia 25:102-123.
- SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P. 1998. Cerrado: ambiente e flora. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- SCHNEPF, E. 1963. Zur Cytology und Physiologie pflanzlicher Drüsen. III. Teil. Cytologische verändererungen in den Drüsen von *Drosophyllum* während der verdauung. Planta 59:351-379.
- SUBRAMANIAN, R.B., MURUGAN, V., MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences) 99:423-429.

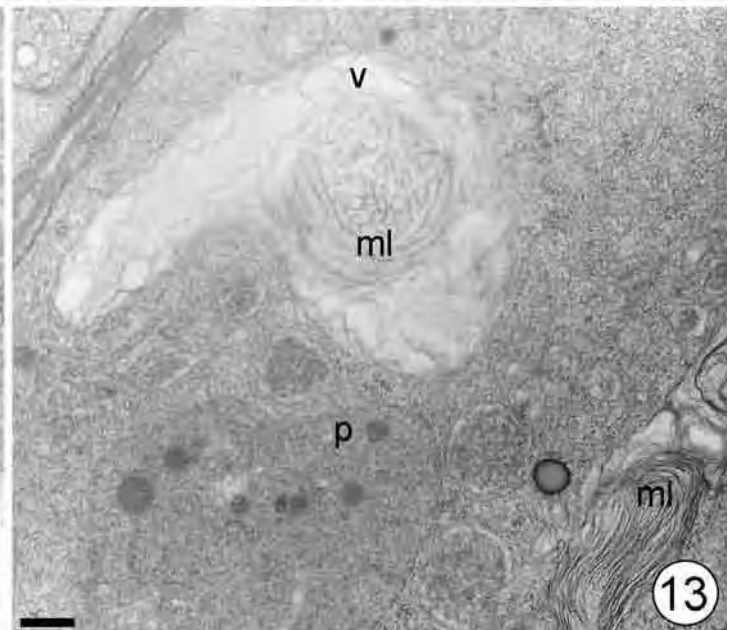
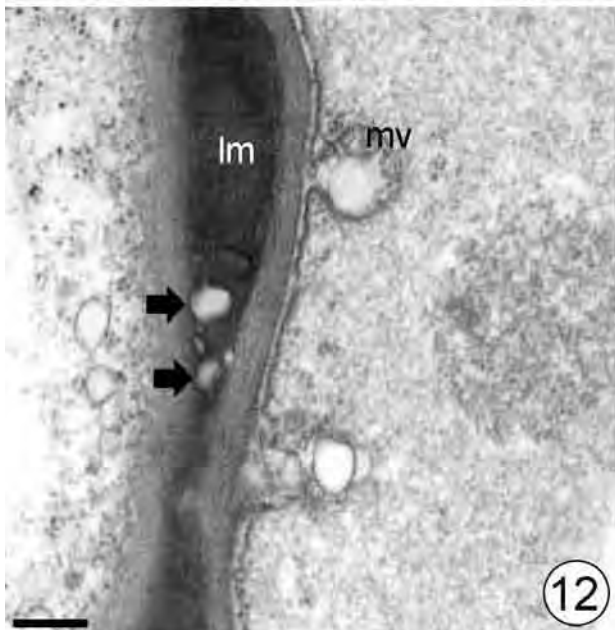
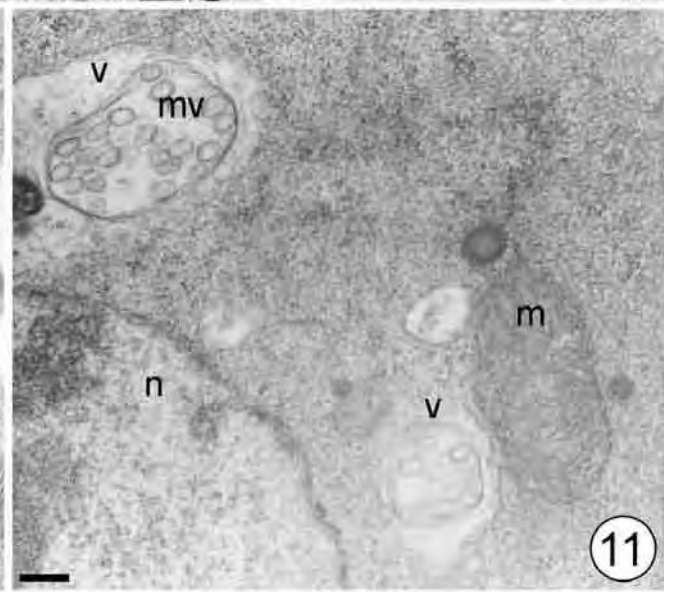
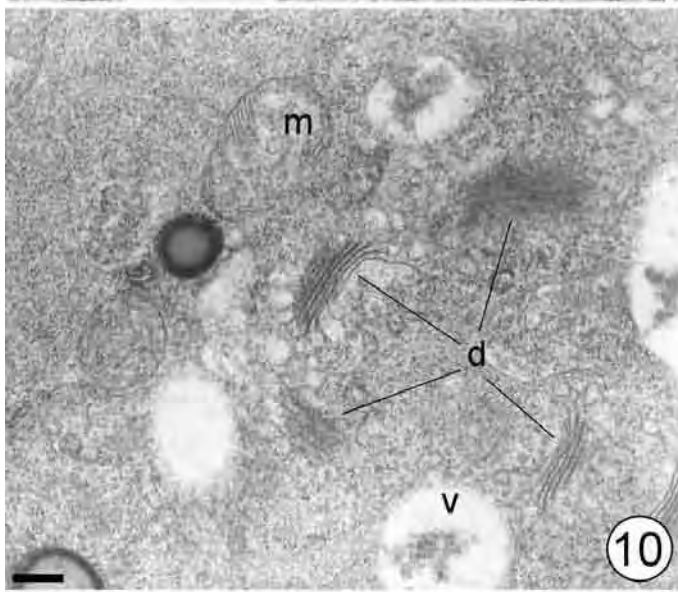
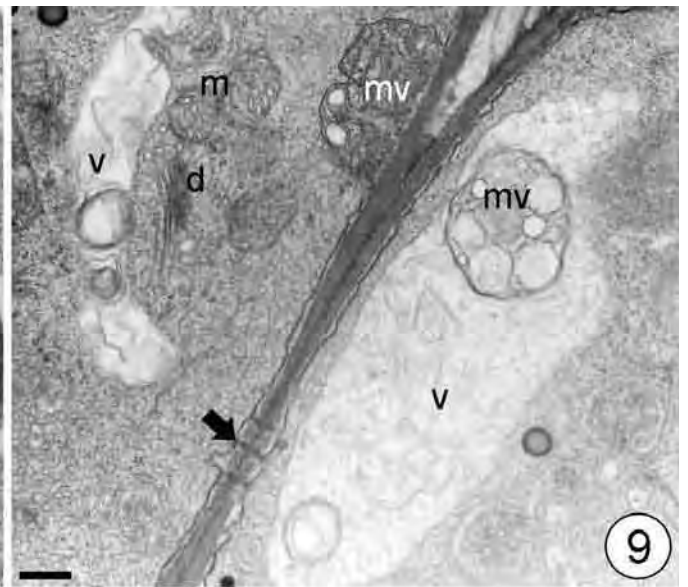
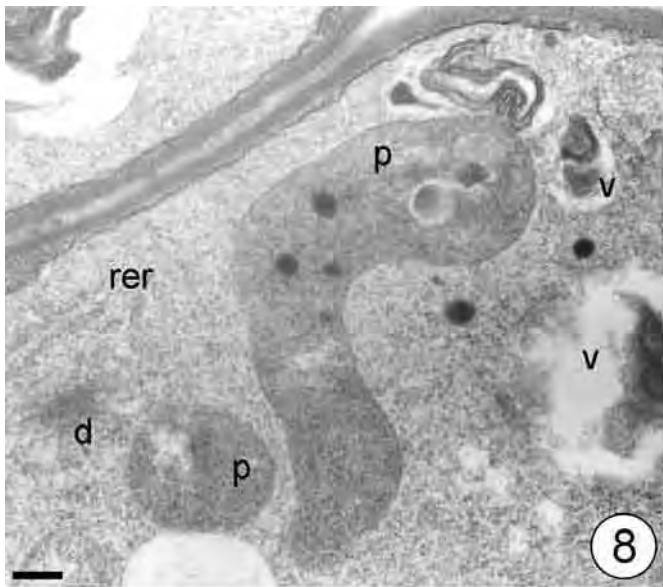


- THOMAS, V. 1991. Review Article. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1990. Structure and necrosis of stipular colleters in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). *Belgian Journal of Botany* 123:67-72.
- TURNER, G.W. & CROTEAU, R. 2004. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiology* 136:4215-4227.
- TURNER, G., GERSHENZON, J., NIELSON, E.E., FROEHLICH, J.E. & CROTEAU, R.B. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized on oil gland secretory cells. *Plant Physiology* 120:879-886.
- VAN HOVE, C. & KAGOYRE, K. 1974. A comparative study of stipular glands in nodulating and non-nodulating species of Rubiaceae. *Annals of Botany* 38:989-991.
- WATSON, M.L. 1958. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4:475.
- WERKER, E. & FAHN, A. 1981. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. – Development, ultrastructure and secretion. *Botanical Gazette* 142:461-476.
- WILLIAMS, R.F., METCALF R.A. & GUST, L.W. 1982. The genesis of form in oleander (*Nerium oleander* L.). *Australian Journal of Botany* 30:677-687.
- ZALUCKI, M.P., BROWER, L.P. & ALONSO, A. 2001. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth on first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology* 26:212-224.

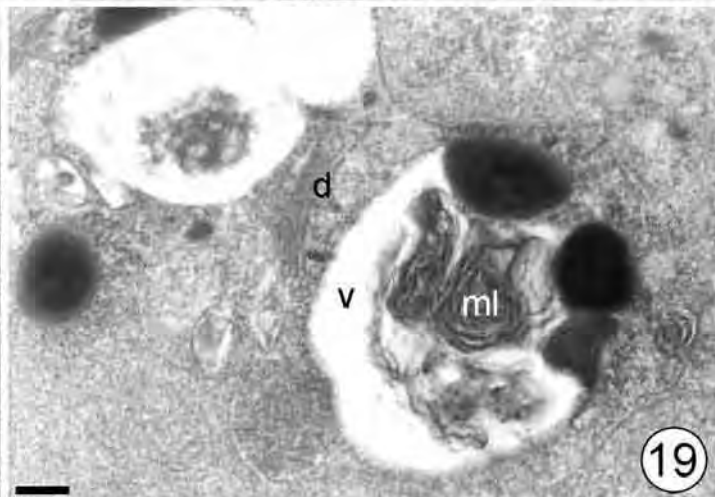
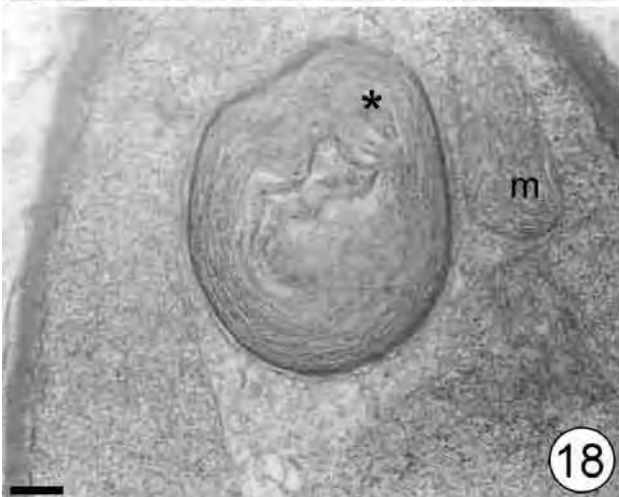
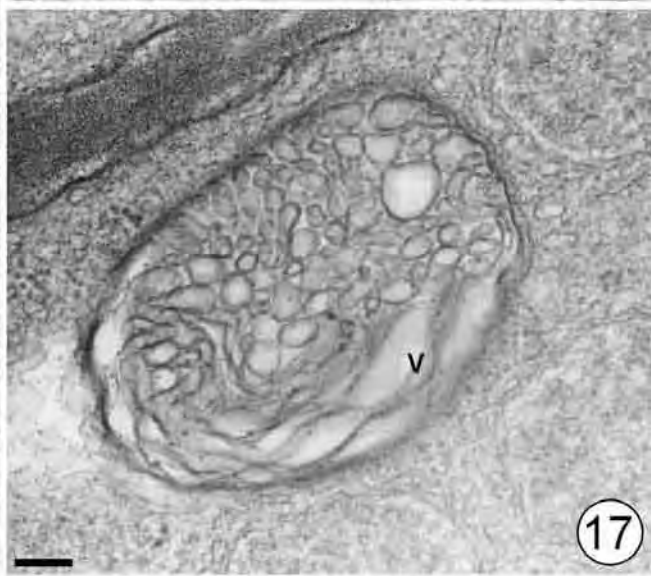
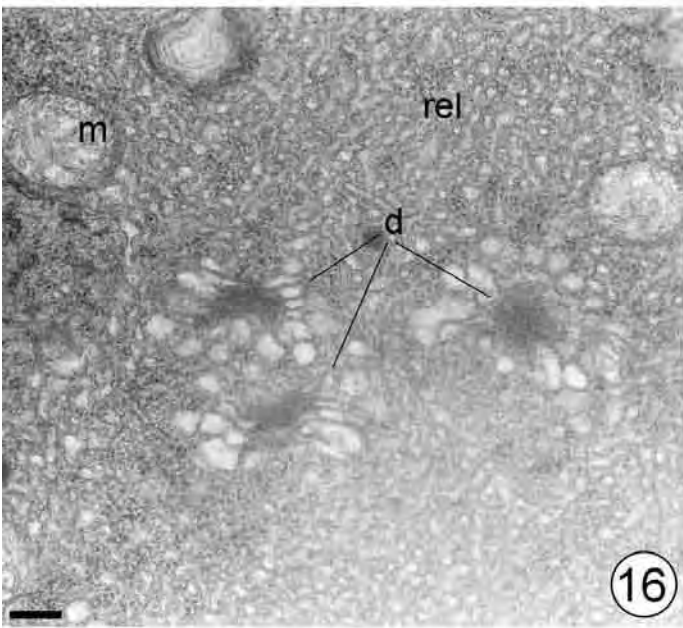
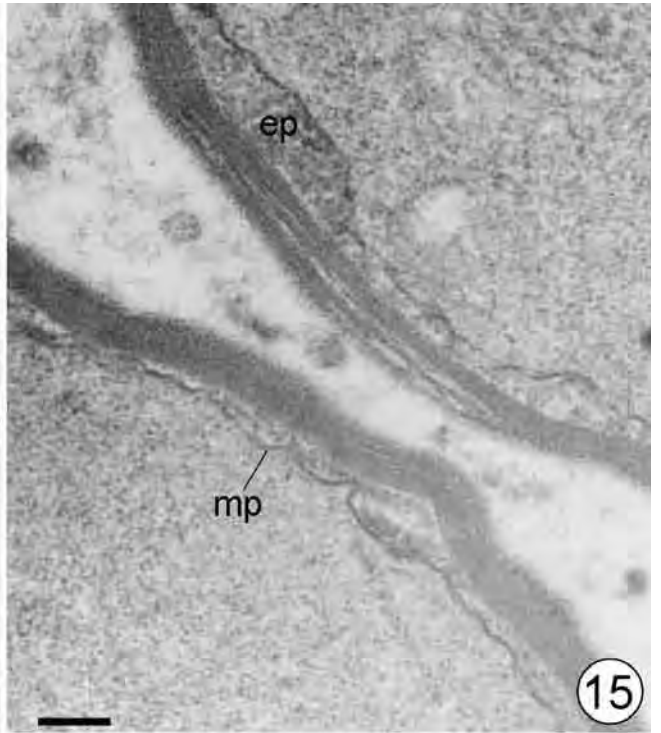
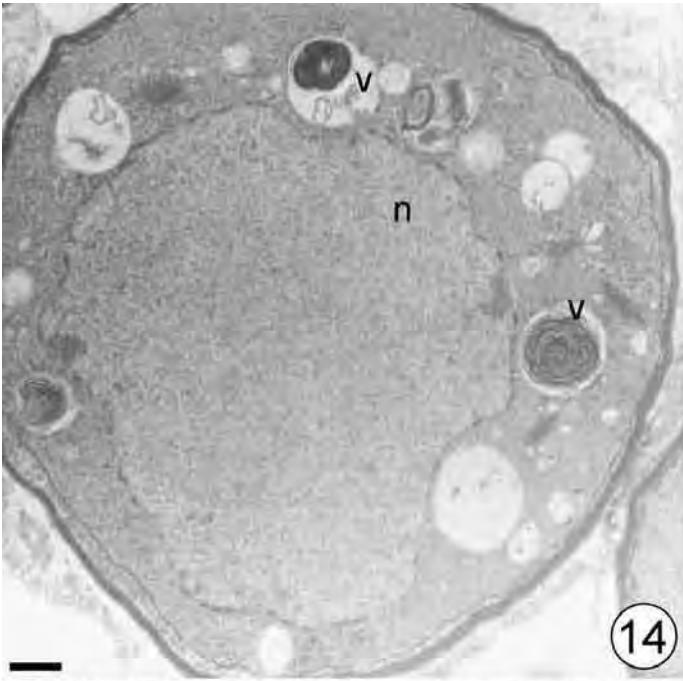
Figuras 1-7. Coléteres dendróides em estípulas de *Alibertia sessilis*. 1. Secção longitudinal do coléter ao microscópio de luz mostrando eixo central formado por células colunares revestido por células epidérmicas. 2. Coléter observado ao MEV mostrando células epidérmicas cilíndricas digitiformes ou pontiagudas. No detalhe, célula epidérmica com extremidade bulbosa. 3-7. MET. 3. Aspecto geral mostrando células colunares axialmente alongadas com paredes relativamente espessas, núcleo volumoso de contorno irregular, citoplasma abundante e vacúolos com conteúdo lipídico ou compostos fenólicos. Notar que as células epidérmicas apresentam paredes mais delgadas e citoplasma mais denso que as colunares. 4. Detalhe das células colunares mostrando núcleo, plastídeos com grãos de amido, corpos protéicos no citoplasma e vacúolo preenchido com lipídeo. 5-7. Aspectos de células epidérmicas no estágio secretor 1. 5. Secção longitudinal de uma célula epidérmica mostrando parede celular pectocelulósica delgada, núcleo conspícuo e citoplasma denso e abundante com plastídeos portadores de grãos de amido no pólo proximal e plastídeos com inclusões osmiofílicas no pólo distal. 6. Parte de duas células epidérmicas, em sua região proximal, mostrando parede celular elétron-densa, dictiossomo no citoplasma periférico e plastídeos com grãos de amido diminutos. 7. Parte de célula epidérmica na região distal, mostrando mitocôndrias globulares, dictiossomos e vacúolo com material membranáceo. Barras = 20  $\mu\text{m}$  (1), 40  $\mu\text{m}$  (2), 3  $\mu\text{m}$  (3), 1  $\mu\text{m}$  (4, 5), 0,2  $\mu\text{m}$  (6), 0,3  $\mu\text{m}$  (7). (cc = células colunares; ce = células epidérmicas; cf = compostos fenólicos; d = dictiossomo; m = mitocôndria; n = núcleo; ol = óleo; p = plastídeo; pc = parede celular; pr = proteína; v = vacúolo).



Figuras 8-13. Células epidérmicas de coléteres dendróides em estípulas de *Alibertia sessilis* no estágio 2 (MET). 8. Região distal da célula mostrando plastídeo polimórfico com estroma finamente granular e inclusões lipofílicas, retículo endoplasmático rugoso, dictiossomo e vacúolo com material osmiofílico. 9. Região proximal da célula mostrando plasmodesmos (seta) nas paredes anticlinais, mitocôndrias com cristas desenvolvidas, dictiossomo com vesículas adjacentes e vacúolos com inclusões membranosas. Corpos multivesiculares ocorrem dentro de vacúolos ou entre a membrana plasmática e a parede celular. 10. Citoplasma abundante com polirribossomos, dictiossomos hiperativos e mitocôndrias globulares. 11. Região distal de célula mostrando parte do núcleo, polirribossomos, mitocôndria proeminente e vacúolos com corpos multivesiculares. 12. Parte de duas células, em sua região proximal, mostrando lamela mediana elétron-densa espessada com pequenas lacunas (setas) e fusão de corpos multivesiculares à membrana plasmática. 13. Plastídeo amebóide e vacúolo com material membranáceo lamelar (ml). Barras = 0,2  $\mu\text{m}$  (8, 10, 11, 12), 0,3  $\mu\text{m}$  (9, 13). (d = dictiossomo; lm = lamela mediana; m = mitocôndria; ml = material membranáceo lamelar; mv = corpos multivesiculares; n = núcleo; p = plastídeo; rer = retículo endoplasmático rugoso; v = vacúolo).



Figuras 14-19. Células epidérmicas de coléteres dendróides em estípulas de *Alibertia sessilis* no estágio 3 (MET). 14. Aspecto geral de uma célula, seccionada transversalmente em sua região distal, mostrando núcleo proeminente, citoplasma abundante e pequenos vacúolos com conteúdo lamelar. 15. Detalhe de parte de duas células mostrando membrana plasmática sinuosa e início de formação do espaço periplasmático. 16. Citoplasma apresentando proliferação de retículo endoplasmático liso, ribossomos, mitocôndrias e aumento na população de dictiossomos e suas vesículas. 17. Detalhe de vacúolo preenchido com vesículas elétron-lucentes. 18. Vacúolo preenchido com material lamelar (\*) elétron-denso. 19. Vacúolos contendo material membranáceo lamelar e inclusões osmiofílicas. Barras = 0,6  $\mu\text{m}$  (14), 0,2  $\mu\text{m}$  (15, 16, 18, 19), 0,1  $\mu\text{m}$  (17). (d = dictiossomo; ep = espaço periplasmático; m = mitocôndria; ml = material membranáceo lamelar; mp = membrana plasmática; n = núcleo; rel = retículo endoplasmático liso; v = vacúolo).

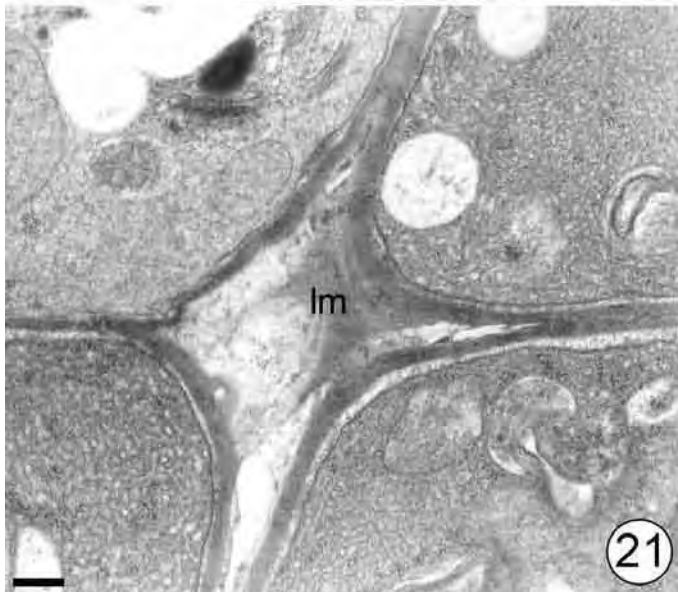


Figuras 20-22. Células epidérmicas de coléteres dendróides em estípulas de *Alibertia sessilis* no estágio 4 (MET). 20. Aspecto geral de célula, seccionada transversalmente em sua região distal, mostrando abundância de retículo endoplasmático liso, dictiossomos hiperativos e mitocôndrias com cristas desenvolvidas; material multilamelar elétron-denso pode ser observado no interior de vacúolos e no espaço periplasmático (seta). Observar mitocôndria com constrição central (\*). 21. Limite entre quatro células epidérmicas, mostrando a dissolução da lamela mediana, dando origem a um amplo espaço intercelular. 22. Parte de três células mostrando diferentes graus de desenvolvimento do espaço periplasmático. Material membranáceo multilamelar pode ser observado no citoplasma periférico, nas adjacências da membrana plasmática (setas) ou já incorporado no espaço periplasmático. Barras = 0,6  $\mu\text{m}$  (20), 0,3  $\mu\text{m}$  (21, 22). (d = dictiossomo; lm = lamela mediana; m = mitocôndria; ml = material membranáceo multilamelar; v = vacúolo).

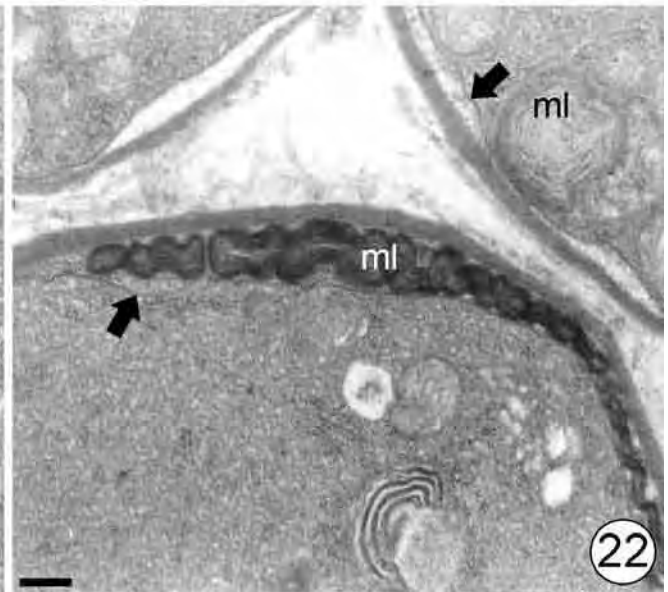




20

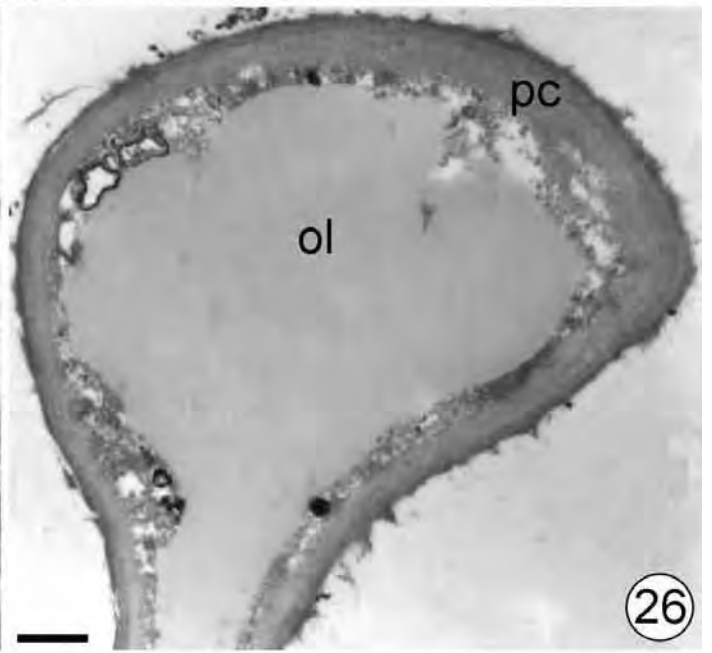
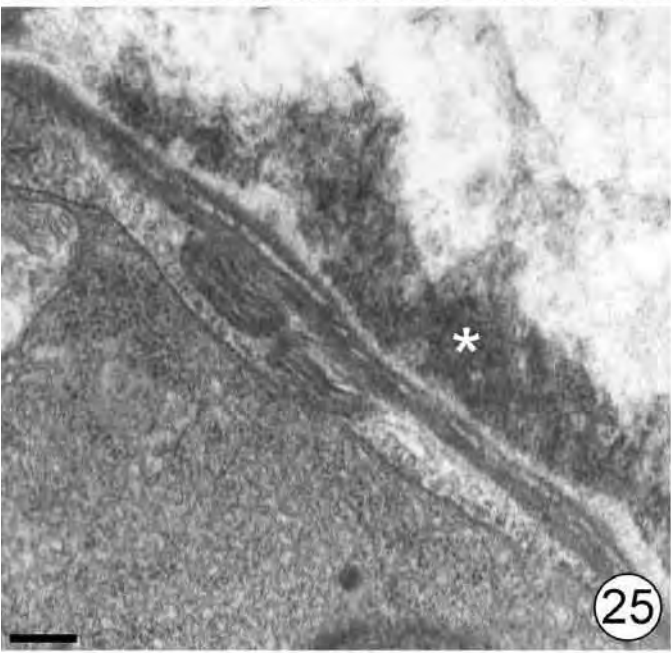
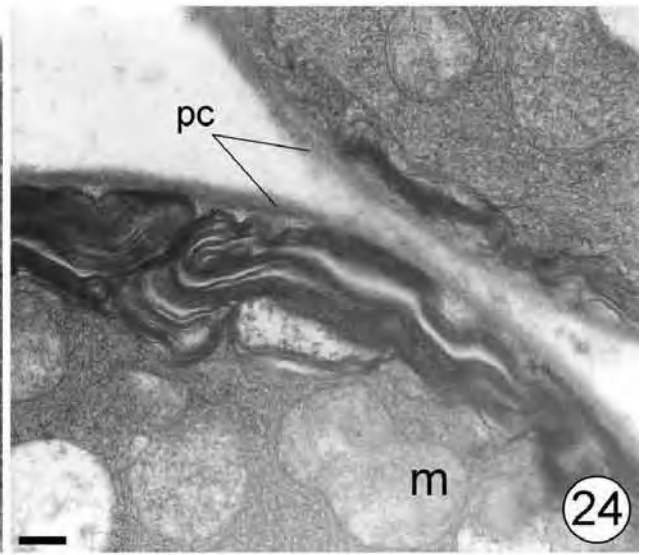
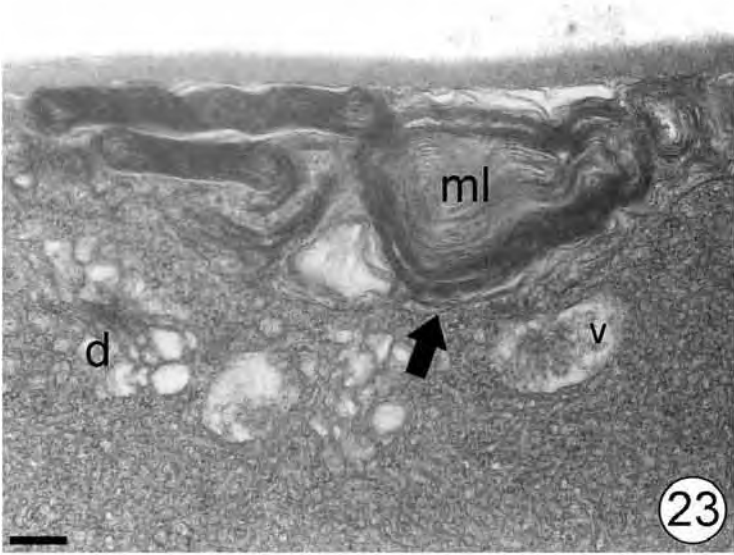


21

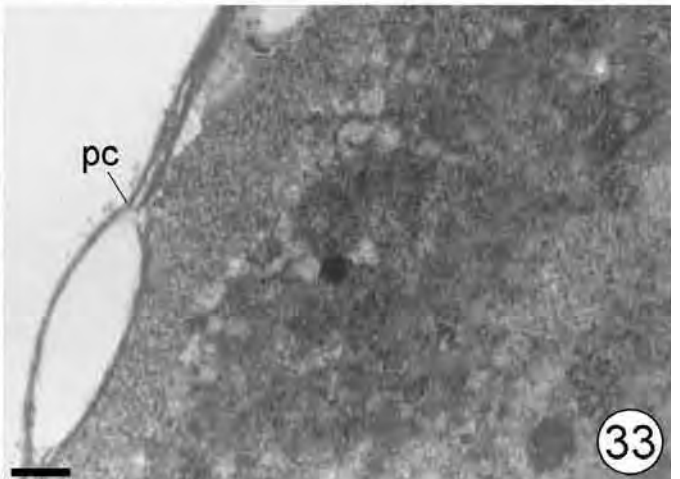
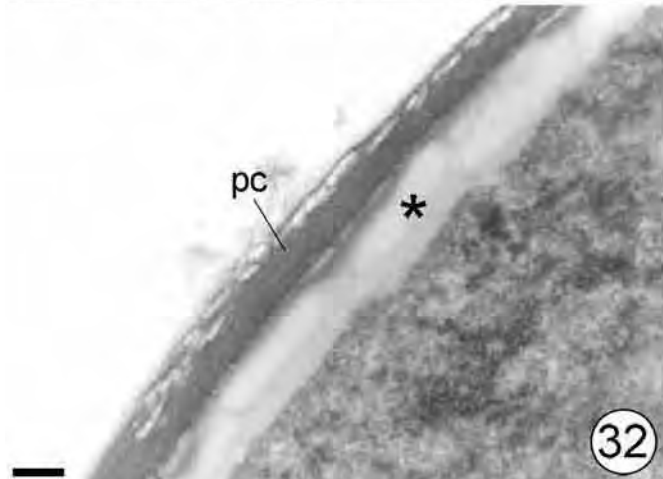
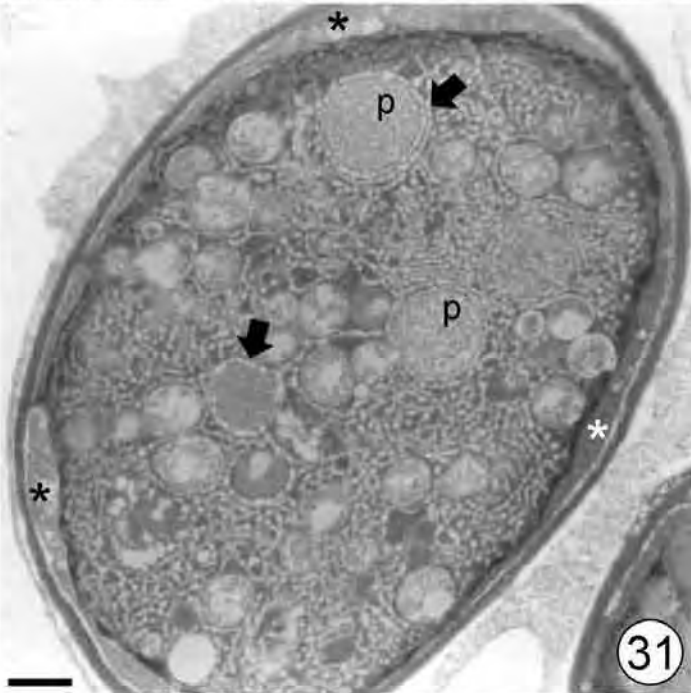
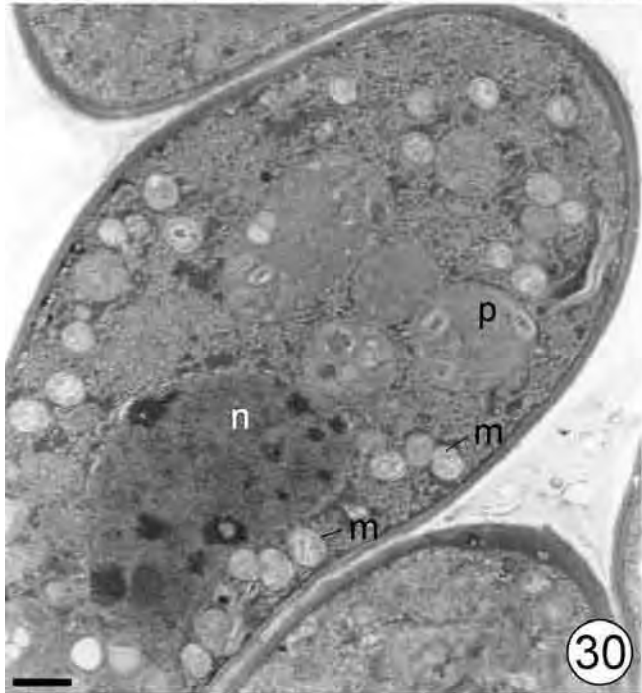
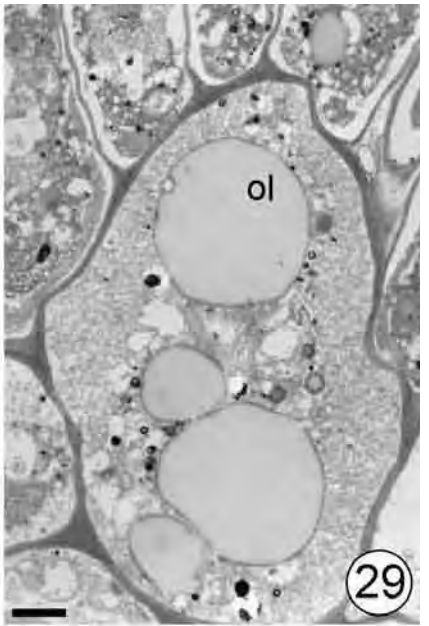
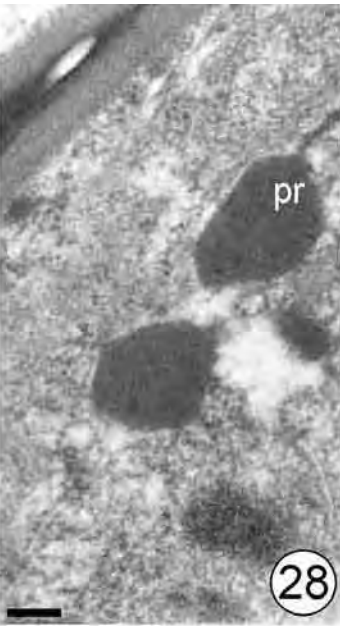


22

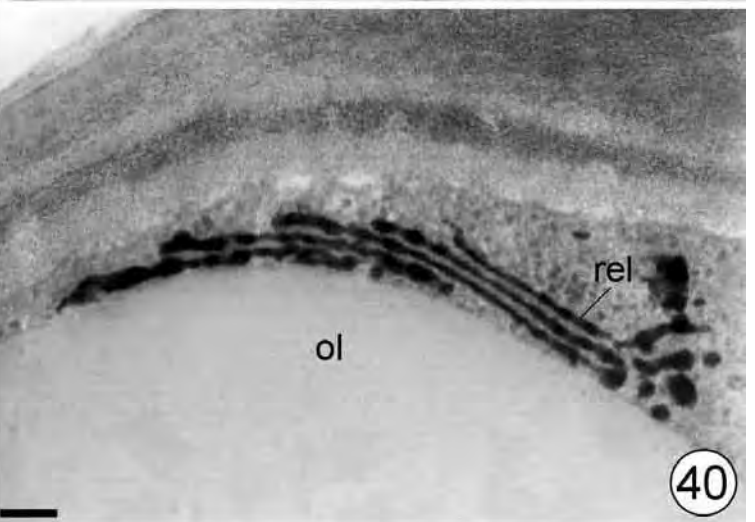
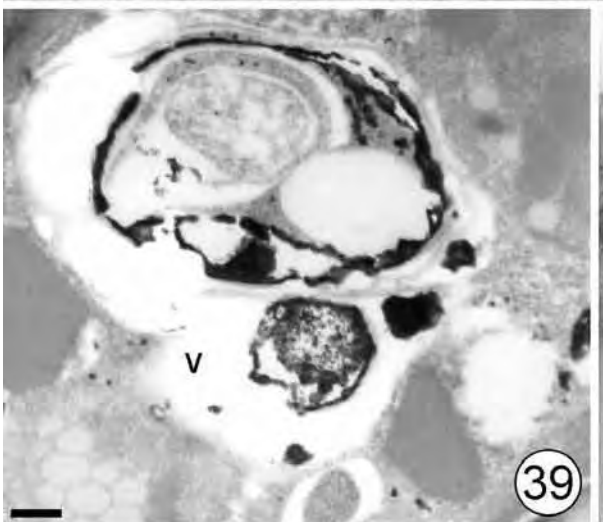
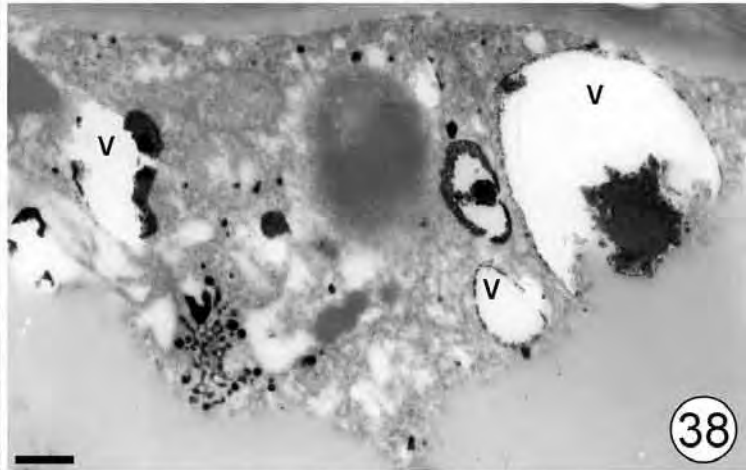
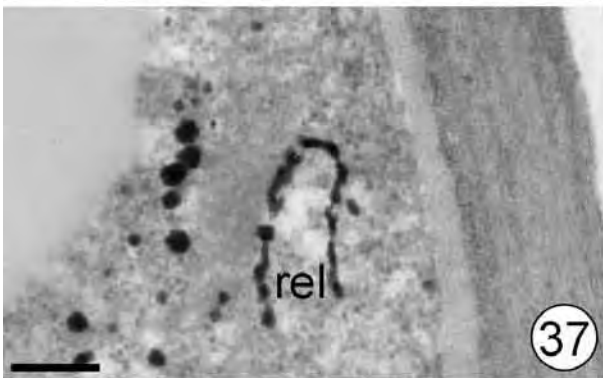
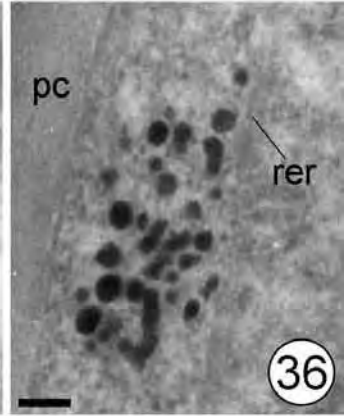
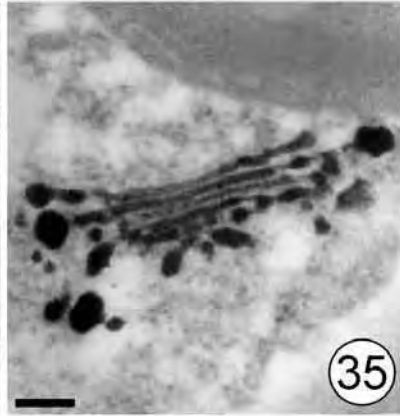
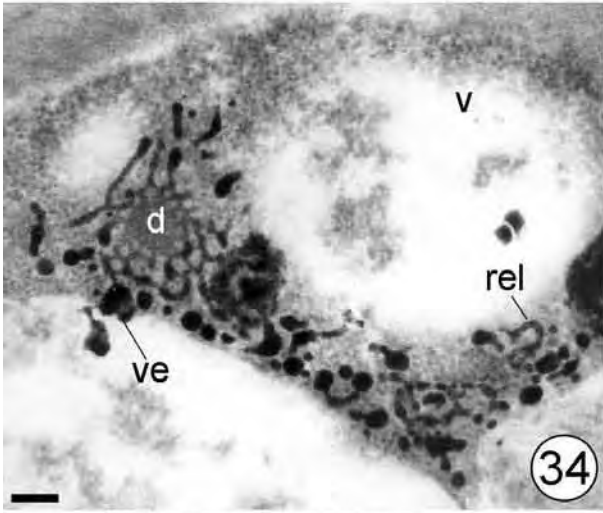
Figuras 23-26. Células epidérmicas de coléteres dendróides em estípulas de *Alibertia sessilis* no estágio 4 (MET). 23. Acúmulos de material multilamelar elétron-denso no espaço periplasmático. No citoplasma, observar a presença de retículo endoplasmático liso e dictiossomos com vesículas adjacentes. A seta indica a membrana plasmática sinuosa. 24. Parede celular com aspecto laxo, em processo de desintegração. 25. Detalhe mostrando material lamelar no espaço periplasmático e secreção (\*) na superfície da célula em forma de grumos elétron-densos. 26. Extremidade de célula epidérmica bulbosa mostrando parede celular espessa, citoplasma reduzido e vacúolo central desenvolvido e preenchido com substância lipídica. Barras = 0,2  $\mu\text{m}$  (23, 24, 25), 0,6  $\mu\text{m}$  (26). (d = dictiossomo; ml = material multilamelar; ol = óleo; pc = parede celular; v = vacúolo).



Figuras 27-33. Coléteres dendróides em brácteas de *Alibertia sessilis* (MET). 27-30. Início de secreção. 27. Secção longitudinal mostrando um aspecto geral do coléter. Notar a diferença na densidade citoplasmática entre as células colunares e epidérmicas. 28. Detalhe do citoplasma de célula colunar mostrando corpos protéicos elétron-densos. 29. Célula colunar mostrando citoplasma abundante e vacúolos preenchidos com substância lipídica. 30. Célula epidérmica, em secção longitudinal, em estágio inicial de secreção mostrando paredes pectocelulósicas delgadas, núcleo conspícuo com formato irregular, citoplasma denso e abundante com retículo endoplasmático liso desenvolvido, mitocôndrias globulares em abundância e plastídeos com grãos de amido diminutos ou ausentes. Notar ausência de espaço periplasmático. 31 -33. Pico de secreção. 31. Célula epidérmica em secção transversal, no estágio de secreção intensa, mostrando retículo endoplasmático liso extensivo e plastídeos com retículo periplastidial (setas). Notar espaço periplasmático amplo, em toda a extensão da célula, com acúmulo de secreção (\*). 32. Detalhe de célula epidérmica mostrando espaço periplasmático com secreção (\*) e parede celular mostrando sinais de desintegração. 33. Célula epidérmica com parede desintegrada. Barras = 7,5  $\mu\text{m}$  (27), 1,5  $\mu\text{m}$  (28), 1  $\mu\text{m}$  (29), 0,7  $\mu\text{m}$  (30), 0,6  $\mu\text{m}$  (31), 0,2  $\mu\text{m}$  (32), 0,3  $\mu\text{m}$  (33). (cc = células colunares; ce = células epidérmicas; m = mitocôndria; n = núcleo; ol = óleo; p = plastídeo; pc = parede celular; pr = proteína).



Figuras 34-40. Coléteres dendróides estipulares de *Alibertia sessilis* tratados com ZIO. 34. Dictiossomo proeminente, retículo endoplasmático liso e vesículas impregnados com ZIO. Notar que as organelas circundam os vacúolos. 35. Dictiossomo proeminente e vesículas preenchidas com conteúdo denso. 36. Agrupamento de vesículas localizadas na periferia do citoplasma próximas à parede celular com conteúdo denso fortemente impregnado com o metal. Notar que o retículo endoplasmático rugoso não foi impregnado pelo ZIO. 37. Retículo endoplasmático liso e vesículas impregnados pela reação com o ZIO. 38. Membrana vacuolar marcada com o ZIO, aparentemente incorporando material denso ao vacúolo. 39. Material membranáceo multilamelar, no interior de vacúolos impregnado pelo ZIO. 40. Retículo endoplasmático liso liberando vesículas com conteúdo fortemente impregnado pelo metal, circundando vacúolo preenchido com substância lipídica. Barras = 0,2  $\mu\text{m}$  (34, 37), 0,1  $\mu\text{m}$  (35, 36, 40), 0,4  $\mu\text{m}$  (38), 0,3  $\mu\text{m}$  (39). (d = dictiossomo; ol = óleo; pc = parede celular; rel = retículo endoplasmático liso; rer = retículo endoplasmático rugoso; v = vacúolo; ve = vesículas).



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho trouxe novas informações sobre coléteres em Rubiaceae, complementando as poucas informações existentes em literatura, principalmente quanto aos aspectos ultra-estruturais e mecanismo de secreção.

Constatou-se que embora os coléteres presentes nos ápices vegetativo e reprodutivo de *Alibertia sessilis* possuam o mesmo padrão morfológico – dendróide, o estudo ultra-estrutural revelou que possuem características celulares distintas que sugerem diferenças na composição química da secreção. Análises químicas são necessárias para determinar o papel biológico da secreção nas interações desta planta com o ambiente biótico e abiótico.

Embora faltem dados experimentais, pode-se sugerir que diferenças na composição da secreção contribuam com a proteção das estruturas vegetativas e reprodutivas nas diferentes épocas do ano. A secreção mista (polissacarídeos e lipídeos) produzida pelos coléteres estipulares pode estar relacionada com as condições climáticas no período do brotamento, que nesta espécie se dá entre os meses de abril a junho, período este que se caracteriza por temperatura e umidade relativa do ar mais baixas. Neste caso, a secreção mantém as estruturas jovens hidratadas, além de proteger os primórdios foliares contra predação. O início do desenvolvimento dos ápices reprodutivos inicia-se no mês de outubro, época em que as temperaturas e a umidade relativa do ar são mais elevadas. Assim, supõe-se que a secreção predominantemente lipofílica produzida pelos coléteres presentes nos órgãos reprodutivos proteja as estruturas florais em desenvolvimento contra a dessecação e predação.

Um outro aspecto importante deste trabalho foi constatar que as células do eixo central dos coléteres dendróides possuem características indicativas de secreção, sendo este aspecto geralmente negligenciado na maioria dos trabalhos consultados.

Finalmente, este trabalho mostrou que a ocorrência de coléteres dendróides em Rubiaceae não é necessariamente associada com simbiose bacteriana.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIELLO, A. 1979. A reexamination of *Portlandia* (Rubiaceae) and associated taxa. *Journal of Arnold Arboretum* 60:38-123.
- AKERS, C.P, WEYBREW, J.A. & LONG, R.C. 1978. Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L., cv. xanthi. *American Journal of Botany* 65:282-292.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RALF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO,S.M. & RIBEIRO, J.F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- APPEZZATO-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* 23:113-120.
- ARBER, A. 1931. Studies in floral morphology. I. On some structural features of the Cruciferous flower. *The New Phytologist* 30:11-41.
- AREKAL, G.D. & RAMAKRISHNA, T.M. 1980. Extrafloral nectaries of *Calotropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. *Phytomorphology* 30:303-306.
- ARUMUGASAMY, K., INAMDAR, J.A. & SUBRAMANIAN, R.B. 1989. Structure, ontogeny and secretion of oil secreting glands in *Hiptage accuminata* Wall. *Current Science* 58:260-261.
- AZARKAN, M., EL MOUSSAOUI, A., VAN WUYTSWINKEL, D., DEHON, G. & LOOZE, Y. 2003. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 790:229-238.
- CORTELAZZO, A.L. 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. *Revista Brasileira de Botânica* 15:157-162.
- CROSS, G.L. & JOHNSON, T.J. 1941. Structural features of the shoot apices of diploid and colchicine-induced, tetraploid strains of *Vinca rosea* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 68:618-635.
- CRUZ, M.A.L., GOMES, V.M., MACHADO, O.L.T., FERNANDES, K.V.S. & XAVIER FILHO, J. 2002. Defense proteins of carnauba tree (*Copernicia cerifera*) Wax. Identification and partial characterization of a chitinase and a  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:11-16.

- CURTIS, J. D. & LERSTEN, N. R. 1974. Morphology, seasonal variation and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 61:835-845.
- CURTIS, J.D. & LERSTEN, N.R. 1980. Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 67:1289-1296.
- DAVE, Y., KURIACHEN, P.M. & THOMAS, V. 1988. Development, structure and senescence of colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 57:3-7.
- DAVE, Y. & PATEL, N.D. 1975. A developmental study of extrafloral nectarines in slipper spurge (*Pedilanthus tithymaloides*, Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 62:808-812.
- DELL, B. 1977. Distribution and function of resin and glandular hairs in Western Australian Plants. *Journal of Proceedings of the Royal Society of Western Australia* 59:119-123.
- DEXHEIMER, J. & GUENIN, F. 1981. Étude des modalités de la sécrétion de mucilage par les trichomes stipulaires de *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *Cytologia* 46:731-747.
- DICKISON, W.C. 2000. Integrative plant anatomy. Harcourt Academic Press, San Diego.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W. & COHEN, P.F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71:596-602.
- ESAU, K. 1965. Plant anatomy. Wiley and Sons, New York.
- ESAU, K. 1979. Anatomy of seed plants. B. Bhattacharya for Wiley Eastern Ltd, New Delhi.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc, London.
- FAHN, A. 1988. Tansley Review n° 14. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108:229-257.
- FAHN, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FARRELL, B.D., DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FIGUEIREDO, A.C.S. & PAIS, M.S. 1992. Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 70:325-331.
- FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3:383-392.
- FOSTER, A.S. 1949. Practical Plant Anatomy. Von Nostrand, New York.
- FRANCO, A.C. 2002. Ecophysiology of woody plants. In *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna* (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York.
- GERLACH, D. 1969. Botanische mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- GERRITS, P.O. 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology. State University of Gröningen, Gröningen.
- GILLOTEAUX, J. & NAUD, J. 1979. The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of Maillet. *Histochemistry* 63:227-243.
- GUARIM NETO, G. 1985. Espécies frutíferas do cerrado matogrossense. *Boletim FBCN (Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza)* 20:46-50.
- HANSTEIN, J. 1848. Ueber die Organe der Harz- und Schleim- Absonderung in den Laubknospen. *Botanische Zeitung* 26:697-713, 721-735, 745-761, 769-787.
- HERMAN, P.P.J., ROBBERTSE, P.J. & GROBBELAAR, N. 1986. The morphology of the vegetative shoot apex and stem of some Southern African *Pavetta* species. *South African Journal of Botany* 52:212-220.
- HORNER, H.T. & LERSTEN, N.R. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55:1089-1099.
- HUMM, H.J. 1944. Bacterial leaf nodules. *Journal of New York Botanical Garden* 45:193-199.
- INAMDAR, J.A., MOHAN, J.S.S. & SUBRAMANIAN, R.B. 1985. Extrafloral nectaries of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall ex G. Don. Development, ultrastructure and secretion. *Trends in Plant Research* 137-148.
- INAMDAR, J.A., SUBRAMANIAN, R.B. & MOHAN, J.S.S. 1986. Studies on resin glands of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *Annals of Botany* 58:425-429.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1963a. The rubiaceous genus *Mussaenda*: the morphology of the Asian species. *Journal of the Arnold Arboretum* 44:111-126.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1963b. The rubiaceous genus *Mussaenda*: the species of India and Ceylon. *Journal of the Arnold Arboretum* 44:232-267.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1964. The rubiaceous genus *Mussaenda*: the species of the Philippine Islands. *Journal of the Arnold Arboretum* 45:101-139.
- JAYAWEERA, D.M.A. 1965. The rubiaceous genus *Mussaenda*: a new species from North Burma. *Journal of the Arnold Arboretum* 46:366-368.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W.H. Freeman, San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- JOHANSSON, J.T. 1987. Revision of the genus *Prismatomeris* Thw. (Rubiaceae, Morindeae). *Opera Botanica* 94:1-62.

- JOLY, A.B. 2002. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc, Sunderland.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137A-138A.
- KLEIN, D.E. 2004. Aspectos estruturais e bioquímicos de coléteres para o gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.
- 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.
- KRONESTEDT-ROBARDS, E. & ROBARDS, A. 1991. Exocytosis in gland cells. *In* Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants (C. Hawea, J. Coleman & D. Evans, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- LANGENHEIM, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20:1223-1280.
- LANGENHEIM, J.H. 2003. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Timber Press, Cambridge.
- LAWSON, G. 1854. On the occurrence of “cinchonaceous glands” in Galiaceae and on the relations of that order to Cinchonaceae. *Annals and Magazine of Natural History* 81:161-168.
- LERSTEN, N.R. 1974a. 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.
- LERSTEN, N.R. 1974b. 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. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of Linnean Society* 71:311-319.
- LERSTEN, N.R. & HORNER, H.T. 1967. Development and structure of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *Journal of Bacteriology* 94:2027-2036.
- MABBERLEY, D.J. 1997. The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- MACHADO, S.R. & GREGÓRIO, E.A. 2001. Zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reactive sites in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae). *Tissue & Cell* 33:72-77.

- MACHADO, S.R., GREGÓRIO, E.A. & GUIMARÃES, E. 2005. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/mcj042v1> (acesso em 07/02/2006).
- MAHLBERG, P.G. & KIM, E.S. 1992. Secretory vesicles formation in glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 79:166-173.
- MAILLET, M. 1963. Le reactif au tetraoxyde d'osmium-iodure du zinc. *Zeitschrift fuer Mikroskopisch-Anatomische Forschung* 70:397-406.
- MAJUMDAR, G.P. & PAL, P. 1958. The stipules of the Rubiaceae – A review. *Transactions Bose Research Institute (Calcutá)* 22:57-68.
- MANGALAN, S., KURIEN, K.P., JOHN, P. & NAIR, G.M. 1990. Development, structure and cytochemistry of resin-secreting colleters of *Gardenia gummifera* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 66: 123-132.
- MAZIA, D., BREWER, P.A. & ALFERT, M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin* 104:57-67.
- MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA JÚNIOR, M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E. 1998. Flora vascular do bioma Cerrado. *In Cerrado: ambiente e flora* (S.M. Sano & S.P. Almeida, eds.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- MIA, A.J. 1960. Structure of the shoot apex of *Rauwolfia vomitoria*. *Botanical Gazette* 122:121-124.
- MILLER, I.M., SCOTT, A. & GARDNER, I.C. 1983a. The development, structure and function of dendroid colleters in *Psychotria kirkii* Hiern (Rubiaceae). *Annals of Botany* 51:621-630.
- MILLER, I.M., SCOTT, A. & GARDNER, I.C. 1984. The occurrence of calyx nodules in *Psychotria* spp. (Rubiaceae). *Protoplasma* 121:199-208.
- MITRA, G.C. 1948. Developmental studies on stipules (Rubiaceae) with special reference to *Paederia* and *Ixora*. *Journal of the Indian Botanical Society* 27:150-166.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57:389-401.
- MONTEIRO, W.R., FAHN, A., CALDEIRA, W. & CASTRO, M.M. 1999. Ultrastructural observations on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae). *Flora* 194:113-126.
- NIEBAUER, G., KRAWCZYK, W.S., KIDD, R.L. & WILGRAM, G.F. 1969. Osmium zinc iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cells. *The Journal of Cell Biology* 43:80-89.

- 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, M.M. & PAIS, M.S. 1990. Glandular trichomes of *Humulus lupulus* var. Brewer's gold (hops): ultrastructural aspects of peltate trichomes. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 22:241-248.
- OSBORNE, M.P. & THORNHILL, R.A. 1974. The zinc-iodide-osmium reactive sites in the sensory epithelia of the frog labyrinth. *Journal of Neurocytology* 3:459-470.
- PATEL, J.D. & ZAVERI, M. 1975. Development of leaf and stipular glands in *Coffea arabica*. *Flora* 164:11-18.
- PEARSE, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. 4<sup>th</sup> ed. Longman Group. Limited.
- RACHMILEVITZ, T. & JOEL, D.M. 1976. Ultrastructure of the calyx glands of *Plumbago capensis* Thunb. in relation to the process of secretion. *Israel Journal of Botany* 25:127-139.
- RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. *Current Science* 37:520-522.
- REINECKE, M. & WALTHER, C. 1978. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. *Journal of Cell Biology* 21:839-855.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-212.
- 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* 25:339-349.
- ROBBRECHT, E. 1978. *Sericanthe*, a new African genus of Rubiaceae (Coffeeae). *Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie* 48:3-78.
- ROBBRECHT, E. 1983. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae) 3. *ProbletoSTEMON* revived as a section of subgenus *Tricalysia*. *Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie* 53:299-320.
- ROBBRECHT, E. 1987. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae). 4. A revision of the species of section *Tricalysia* and section *Rosea*. *Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie* 57:39-208.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica* 1:1-271.
- ROBBRECHT, E. 1993. Introduction to advances in Rubiaceae macrosystematics. *Opera Botanica Belgica* 6:7-18.

- RODRIGUES, V.E.G. & CARVALHO, D.A. 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25:102-123.
- ROGERS, G.K. 1984. *Gleasonia, Henriquezia* and *Platycarpum* (Rubiaceae). *Flora Neotropica Monographs* n° 39.
- SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P. 1998. Cerrado: ambiente e flora. EMBRAPA – CPAC, Planaltina.
- SCHNEPF, E. 1963. Zur Cytology und Physiologie pflanzlicher Drüsen. III. Teil. Cytologische veränderungen in den Drüsen von *Drosophyllum* während der verdauung. *Planta* 59:351-379.
- SCHNEPF, E. 1969. Üeber den feinbau von oldrusen. I. Die drusenhaare von *Arctium lappa*. *Protoplasma* 67:185-194.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic Anatomy of the Dicotyledons*. 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*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- SUBRAMANIAN, R.B., MURUGAN, V., MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* 99:423-429.
- THOMAS, V. 1991. Review Article. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contact* 6:25-29.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1990. Structure and necrosis of stipular colleters in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). *Belgian Journal of Botany* 123:67-72.
- THOMAS, V., DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- TURNER, G., GERSHENZON, J., NIELSON, E.E., FROEHLICH, J.E. & CROTEAU, R.B. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized on oil gland secretory cells. *Plant Physiology* 120:879-886.

- TURNER, G. & CROTEAU, R. 2004. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiology* 136:4215-4227.
- VAN HOVE, C. 1972. Structure and initiation of nodules in the leaves of *Neorosea andongensis* (Hiern) N. Hallé. *Annals of Botany* 36:259-262.
- VAN HOVE, C. & KAGOYRE, K. 1974. A comparative study of stipular glands in nodulating and non-nodulating species of Rubiaceae. *Annals of Botany* 38:989-991.
- WARMING, E. 1883. Tropische Fragmente. II. *Rhizophora mangle* L. *Botanische Jahrbucher* 4:519-548.
- WATSON, M.L. 1958. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4:475.
- WEDDELL, M.H.A. 1849. Histoire Naturelle des Quinquinas, une Monographie et de Quelques Autres Plantes de la Même Tribu. Victor Masson, Paris.
- WERKER, E. & FAHN, A. 1981. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. – Development, ultrastructure and secretion. *Botanical Gazette* 142:461-476.
- WILLIAMS, R.F., METCALF, R.A. & GUST, L.W. 1982. The genesis of form in Oleander (*Nerium oleander* L.). *Australian Journal of Botany* 30:677-687.
- WOODSON, R.E. 1935. Observations on the inflorescence of Apocynaceae (with special reference to the American genera of Echioideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 22:1-48.
- WOODSON, R.E. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of the Apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65:135-165.
- ZALUCKI, M.P., BROWER, L.P. & ALONSO, A. 2001. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth on first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology* 26:212-224.