

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ANATOMIA E ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DE PULVINOS DE
LEGUMINOSAS DE CERRADO**

TATIANE MARIA RODRIGUES

PROF^a DR^a 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 e Diversidade Vegetal

**BOTUCATU - SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Rodrigues, Tatiane Maria.

Anatomia e aspectos ultra-estruturais de pulvinos de leguminosas de cerrado / Tatiane Maria Rodrigues. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2006.

Orientadora: Silvia Rodrigues Machado

Assunto CAPES: 20302002

1. Anatomia vegetal 2. Morfologia vegetal

CDD 581.4

Palavras-chave: Anatomia; Leguminosas; Movimento foliar; Pulvino; Ultra-estrutura

Dedicatória

Dedico este trabalho, com todas as lutas e conquistas, à minha família: aos meus irmãos Cíntia e Victor, que estão sempre ao meu lado torcendo por mim; ao meu noivo Fábio, que sempre me incentiva em tudo o que faço e compreende e compartilha todos meus momentos de alegrias e decepções; e, em especial, aos meus pais José e Sueli, que são exemplos de integridade, amor e dedicação e que muitas vezes renunciaram a seus sonhos para que eu tivesse a chance de realizar os meus. Amo vocês!!!

Agradecimentos

À **Deus**, pela graça de ter alcançado mais essa vitória.

À **Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado**, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade conquistada ao longo destes anos. Sua confiança e apoio foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores do Departamento de Botânica, IBB, UNESP, pela participação fundamental em minha formação e pela colaboração direta ou indireta na realização deste trabalho.

Aos professores **Dra Denise M. T. de Oliveira e Dr. Élder A. S. e Paiva** pela participação na banca de examinadores na defesa desta dissertação.

Ao Sr. **Clemente José Campos** pelo auxílio e companheirismo nas coletas de campo.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Morfologia Vegetal, **Kléber Alexandre Campos**, pela ajuda no processamento de material.

À **equipe do Centro de Microscopia Eletrônica, IBB, UNESP**, pela assistência no preparo de amostras.

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela bolsa concedida (MS 03/11050-7) e auxílio financeiro através do Programa Biota (00/12469-3).

Aos meus amigos sempre presentes **Daniela, Suzana, Laura, Joel, Juliana, Camilla, Shyrlaine e Alexandre** pelo convívio, companheirismo e apoio recebido ao longo do mestrado.

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

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Revisão bibliográfica	8
Capítulo 1	18
Resumo.....	19
Abstract.....	19
Introdução	21
Material e métodos.....	22
Resultados.....	23
Discussão.....	27
Referências bibliográficas	31
Ilustrações.....	38
Legenda das figuras.....	42
Capítulo 2	45
Resumo.....	46
Abstract.....	46
Introdução	48
Material e métodos.....	49
Resultados.....	51
Discussão.....	53
Referências bibliográficas	57

Ilustrações.....	62
Legenda das figuras.....	65
Capítulo 3	68
Resumo.....	69
Abstract.....	69
Introdução	71
Material e métodos.....	72
Resultados.....	74
Discussão.....	80
Referências bibliográficas	85
Ilustrações.....	91
Legenda das figuras.....	98
Considerações finais	103
Referências bibliográficas	104

RODRIGUES, T.M. ANATOMIA E ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DE PULVINOS DE LEGUMINOSAS DE CERRADO. 2006. 108P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - Os ajustes no posicionamento foliar em leguminosas, causados pelos pulvinos, representam um mecanismo eficiente que permite a maximização da fotossíntese em condições adversas. De um modo geral, os pulvinos de diferentes leguminosas apresentam um padrão estrutural que propicia grande flexibilidade a esta região da folha, incluindo córtex parenquimático desenvolvido com endoderme típica, sistema vascular central, reduzida lignificação de tecidos e extensiva conexão simplástica. Além disso, o conteúdo celular da endoderme parece determinar a velocidade do movimento foliar. Tradicionalmente, considera-se que a curvatura do pulvino é causada principalmente pela mudança de turgor das células corticais, as chamadas células motoras; entretanto, alguns estudos sugerem que o sistema vascular do pulvino também participa do seu funcionamento. Contudo, a maior parte das informações em literatura sobre anatomia e ultra-estrutura dos pulvinos refere-se a poucas espécies de leguminosas, sendo *Mimosa pudica* a mais estudada e caracterizada por movimentos foliares seismonásticos rápidos. Este trabalho descreve a estrutura do pulvino primário de nove espécies de leguminosas nativas de cerrado, com ênfase nas características celulares da endoderme e do sistema vascular, utilizando técnicas usuais em anatomia vegetal e microscopia eletrônica de transmissão. Foram selecionadas espécies com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar: movimentos nictinástico e heliotrópico lentos (*Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa* - Caesalpinioideae; *Andira humilis* e *Dalbergia miscolobium* - Faboideae; *Stryphnodendron polyphyllum* - Mimosoideae), movimento heliotrópico lento (*Zornia diphylla* - Faboideae) e movimentos seismonástico rápido e nictinástico e heliotrópico lentos (*Mimosa rixosa* e *Mimosa flexuosa* - Mimosoideae). Os pulvinos das espécies estudadas apresentam um padrão estrutural similar independente da subfamília a qual pertencem e do tipo e velocidade de movimento. Apresentam epiderme unisseriada, córtex parenquimático com duas regiões distintas (córtex externo e córtex interno) sendo a endoderme bem delimitada, sistema vascular central e medula reduzida ou ausente. O córtex externo se caracteriza por células com vacúolos repletos de conteúdo fenólico, o qual está ausente nas células do córtex interno. A análise das células endodérmicas comprovou a existência de uma relação entre seu conteúdo e o tipo e velocidade de movimento foliar. Em espécies com movimentos seismonásticos rápidos, a endoderme apresenta somente grãos de amido; em espécies que exibem somente movimentos nictinásticos e heliotrópicos lentos, além de grãos de amido, a endoderme possui cristais de oxalato de cálcio; em *Zornia diphylla*, espécie que apresenta somente movimentos heliotrópicos lentos, as células do córtex externo não possuem substâncias fenólicas e a endoderme possui unicamente grãos de amido semelhante às espécies com movimentos seismonásticos rápidos. Assim, o conteúdo da endoderme possui relação somente com os movimentos násticos. O sistema vascular dos pulvinos é limitado externamente por uma bainha de fibras septadas vivas, contrariando a maior parte da literatura, que descreve esta região como sendo formada por uma bainha de colênquima ou parênquima colenquimatoso. A ausência de fibras e esclereides, presença de idioblastos fenólicos e a abundância e diversidade morfológica de inclusões protéicas nos elementos de tubo crivado caracterizam o floema; o xilema caracteriza-se pela presença de elementos fibriformes com protoplasto vivo e células parenquimáticas com sistema de endomembrana desenvolvido com numerosos campos de pontuação primários com plasmodesmos. A escassez de lignificação, ausência de barreiras apoplásticas (lignina e suberina) e a extensiva continuidade simplástica garantida pela ocorrência generalizada de plasmodesmos são características fundamentais para a rápida redistribuição de íons e estímulos que ocorre durante os movimentos foliares, corroborando assim, a hipótese da participação do sistema vascular no funcionamento do pulvino das leguminosas.

Palavras-chave: anatomia, endoderme, fibras septadas, leguminosas, pulvino, ultra-estrutura

RODRIGUES, T.M. ANATOMY AND ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF LEGUMINOUS SPECIES PULVINI FROM BRAZILIAN CERRADO. 2006. 108P. MS THESIS – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT - Leaf position adjustment in leguminous species, occasioned by pulvini, represent an efficient mechanism that allows the photosynthesis maximization in adverse conditions. The pulvini of different leguminous species show a structural pattern that gives large flexibility to this leaf region, including developed parenchymatous cortex with typical endodermis, central vascular system, reduced tissue lignifications and extensive symplastic connections. Furthermore, the endodermis cell content seems to determine the leaf movement velocity. Traditionally, the pulvinus curvature is considered to be caused by turgor changes of the cortical cells, called motor cells; however, some studies suggest that the vascular system also participate in the pulvinus functioning. Nevertheless, the majority of literature information about pulvinus anatomy and ultrastructure refers to few leguminous species, being the most studied *Mimosa pudica*, specie characterized by fast seismonastic leaf movements. This work describes the primary pulvinus structure of nine leguminous species native from Brazilian cerrado, with emphasis on endodermis and vascular system cell features, using common vegetal anatomy and transmission electronic microscopy techniques. Species with different kinds and velocity of leaf movement were selected: slow nyctinastic and heliotropic movements (*Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa* - Caesalpinioideae; *Andira humilis* and *Dalbergia miscolobium* - Faboideae; *Stryphnodendron polyphyllum* - Mimosoideae), slow heliotropic movement (*Zornia diphylla* - Faboideae) and fast seismonastic and slow nyctinastic and heliotropic movements (*Mimosa rixosa* and *Mimosa flexuosa* - Mimosoideae). The pulvini of the studied species show a similar structural pattern, independent on the subfamily to that they belong and on the movement kind and velocity. They have uniseriate epidermis, parenchymatous cortex with two distinct regions (outer and inner cortex) being the endodermis well delimited, central vascular system and reduced or absent pith. The outer cortex is featured by cells with phenolic vacuoles, what are absent in the inner cortex. The endodermic cells analysis confirmed the existence of a relation between their content and the leaf movement kind and velocity. In the species with fast seismonastic movement, the endodermis show only starch grains; in the species with slow nyctinastic and heliotropic movements, besides the starch grains, the endodermic cells have calcium oxalate prismatic crystals; in *Zornia diphylla*, species that have only slow heliotropic movements, the outer cortex cells do not have phenolic compounds and the endodermis show only starch grains, similar to the seismonastic species. So, the endodermic cell content is related only to nastic movements. The pulvinus vascular system is outside limited by a sheath of living septate fibers, instead of the collenchyma or collenchymatous parenchyma sheath described in the literature. The absence of fibers and sclereids, presence of phenolic idioblasts and the abundance and morphological diversity of proteic inclusions in the sieve tube members characterize the phloem; the xylem is featured by the presence of fibriform elements with living protoplast and parenchyma cells with developed inner membrane system with numerous primary pit-fields with plasmodesmata. The scarcity of lignifications, lacking of apoplastic barriers (lignin and suberin) and the extensive symplastic continuity ensured by the generalized occurrence of plasmodesmata are very important features to the fast ions and stimulus redistribution that occur during the leaf movements, what corroborate the hypothesis of the vascular system participation in the leguminous species pulvinus functioning.

Key words: anatomy, endodermis, septate fibers, legumes, pulvinus, ultrastructure

Introdução

Dentre os movimentos no reino vegetal, os de curvatura são os mais freqüentes nos vegetais superiores e podem ser distribuídos em dois grupos: tropismos e/ou nastias (Accorsi 1952). Os movimentos trópicos são aqueles que ocorrem na direção do estímulo, como por exemplo, um caule crescendo em direção a uma fonte de luz; já, os movimentos násticos são aqueles nos quais o estímulo não determina a direção do movimento como, por exemplo, movimentos diários de folhas ou a abertura e fechamento de estômatos. Ambos os tipos de movimentos podem ser reversíveis ou irreversíveis (Salisbury & Ross 1992).

A orientação de caules e folhas em direção aos raios de luz é o que se conhece por fototropismo. Heliotropismo é termo utilizado para descrever o fenômeno no qual as folhas e folíolos ajustam sua posição em relação à radiação solar (Koller 1990, Caldas *et al.* 1997). O fenômeno pelo qual a lâmina foliar se dispõe perpendicularmente aos raios solares, maximizando a quantidade de radiação absorvida, é conhecido como dia-heliotropismo; ao contrário, no para-heliotropismo, a lâmina foliar encontra-se paralela aos raios solares incidentes, diminuindo a área superficial exposta à radiação (Caldas *et al.* 1997). Heliotropismo é relatado em muitas famílias, incluindo Araceae, Asteraceae, Begoniaceae, Capparidaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae (=Leguminosae), Malvaceae, Oxalidaceae e muitas espécies de Poaceae (Caldas *et al.* 1997).

O heliotropismo pode levar à maximização da absorção da radiação em situações onde a luz é um fator limitante ou o período de crescimento é curto, devido ao posicionamento perpendicular das folhas em relação aos raios solares incidentes. Por outro lado, o posicionamento das folhas paralelamente aos raios solares pode reduzir a taxa de radiação sobre a folha, levando à redução da transpiração, da temperatura foliar e da fotoinibição (Ehleringer & Forseth 1980, Koller 1990, Caldas *et al.* 1997). Segundo Caldas *et al.* (1997), as plantas nativas do cerrado estão sujeitas ao estresse por alta radiação solar, além de limitações impostas pelos seis meses de estação seca, o que torna o ajuste foliar um importante mecanismo de adaptação às condições do ambiente, permitindo a maximização da fotossíntese em condições adversas, tais como intensidades luminosas e temperaturas elevadas, déficit hídrico, entre outras.

Folhas e folíolos das leguminosas exibem freqüentemente movimentos násticos causados por pulvinos (Salisbury & Ross 1992). Em muitas espécies, as folhas posicionam-se horizontalmente durante o dia e verticalmente à noite. Este tipo de nastia, denominado nictinastia, é um processo rítmico controlado pelas interações entre o ambiente externo e o

relógio biológico da planta. Em espécies nictinásticas como *Albizzia julibrissin* (Satter & Galston 1981), *Samanea saman* (Satter *et al.* 1988) e *Mimosa pudica* (Toriyama 1955) as folhas exibem movimentos de “dormir”. À noite, os folíolos se dobram (fecham) e as extremidades de folíolos opostos se encontram (Salisbury & Ross 1992). Outro exemplo de nastia são os movimentos seismonásticos, resultantes do toque, comuns principalmente entre algumas espécies de Mimosoideae (Accorse 1952, Salisbury & Ross 1992). O exemplo mais notável é o de *Mimosa pudica*, a planta sensitiva ou dormideira. Quando a planta é tocada ou recebe algum estímulo elétrico os folíolos rapidamente se fecham (Accorse 1952, Salisbury & Ross 1992). Quando somente um folíolo é estimulado, o estímulo se espalha pela planta, colapsando os outros folíolos (Salisbury & Ross 1992). Uma das hipóteses que explicam a vantagem desse movimento é a de que o dobramento dos folíolos afugentaria insetos antes que eles começassem a predar as folhas (Salisbury & Ross 1992).

De um modo geral, os movimentos foliares têm sido associados com proteção, economia de água e maximização da fotossíntese em condições adversas. Segundo Salisbury & Ross (1992), “uma folha em posição horizontal está apta para receber a luz do sol durante o dia, mas durante a noite pode radiar mais calor para o meio externo, estando assim, propícia ao congelamento em noites frias; folhas em posição vertical podem radiar calor de uma para outra, mantendo-se aquecidas”. Segundo Mauseth (1988) e Wilkinson (1971), a transpiração pode ser bastante reduzida em folhas que se dobram (por exemplo, *Albizzia*, *Mimosa*, *Samanea*), visto que, quando as folhas estão completamente dobradas, nenhum estômato está exposto; todos estão protegidos.

Fabaceae (=Leguminosae) pertencente à ordem Fabales, é uma das maiores famílias de angiospermas com cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies (Polhill *et al.* 1981, Judd *et al.* 1999, Souza & Lorenzi 2005), sendo que no Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1500 espécies. Possui distribuição cosmopolita e abrange exemplares herbáceos, arbustivos, arbóreos e lianas sendo uma das principais famílias do ponto de vista econômico (Souza & Lorenzi 2005). Segundo Souza & Lorenzi (2005), as leguminosas estão bem representadas na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros. Na Amazônia, por exemplo, Fabaceae representa a família com maior número de espécies arbóreas, com destaque para os gêneros *Parkia* e *Swartzia*; nas florestas do interior do Brasil, destacam-se a envira-de-sapo (*Lonchocarpus* spp.), o bico-de-pato (*Machaerium aculeatum*) e o jacarandá-paulista (*Machaerium villosum*); na Mata Atlântica, muitas são as espécies nativas, como o paucigarra (*Senna multijuga*) e o guapuruvu (*Schizolobium parahyba*); nas matas ciliares merece destaque o *Inga* spp. No cerrado, é a família mais representativa em número de espécies, com

cerca de 777 espécies distribuídas em aproximadamente 101 gêneros (Ratter *et al.* 1997, Mendonça *et al.* 1998).

De acordo com Judd *et al.* (1999), uma das principais características que segregam Fabaceae das demais famílias da ordem Fabales é a ocorrência de folhas geralmente compostas com estípulas e pulvinos bem-desenvolvidos.

O pulvino é um espessamento da base foliar e foliolar, semelhante a uma articulação (Esau 1974). Na base do pecíolo encontra-se o pulvino primário; o pulvino secundário é encontrado na base de cada folíolo, enquanto que o pulvino terciário ou pulvínulo é aquele localizado na base de cada foliólulo (Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978). Funcionalmente, os pulvinos são as estruturas responsáveis pelos movimentos foliares, rápidos ou lentos, em resposta a estímulos externos ou endógenos (Campbell & Thomson 1977, Campbell *et al.* 1979, Satter *et al.* 1982, Moysset & Simón 1991, Grignon *et al.* 1992).

Os eventos fisiológicos responsáveis pelos movimentos foliares em algumas espécies de leguminosas são bem conhecidos e têm sido correlacionados com características estruturais do pulvino (Satter *et al.* 1970, Morse & Satter 1979, Campbell & Garber 1980, Fleurat-Lessard 1981, Satter & Galston 1981, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Fleurat-Lessard & Satter 1985, Moysset & Simón 1991, Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado 2004). Entre as características comumente reportadas para o pulvino das leguminosas, destacam-se córtex desenvolvido constituído por células parenquimáticas ricas em taninos, denominadas células motoras por Toriyama (1953) e endoderme bem delimitada com grãos de amido, sistema vascular em posição central, ausência ou redução de medula e de tecidos lignificados (Toriyama 1955, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Campbell *et al.* 1979, Campbell & Garber 1980, Fleurat-Lessard 1981, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Satter *et al.* 1982, Fleurat-Lessard & Millet 1984, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991, Rodrigues & Machado 2004, Machado & Rodrigues 2004). Essas peculiaridades estruturais têm sido relacionadas com a maior flexibilidade do pulvino em relação às demais regiões foliares, como pecíolo e raque que conferem maior rigidez à folha (Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Rodrigues & Machado 2004).

Tradicionalmente, considera-se que a deformação do pulvino é causada pela diferença de pressão de turgor entre as células motoras (Toriyama 1953, 1955, Satter & Galston 1981, Fleurat-Lessard & Millet 1984, Moysset & Simón 1991). As paredes dessas células apresentam dobras, que lhes conferem elasticidade, além de campos de pontoação primários amplos com numerosos plasmodesmos ramificados que favorecem as trocas simplásticas (Fleurat-Lessard 1988, Fleurat-Lessard & Millet 1984, Machado & Rodrigues 2004). As

células motoras podem sofrer rápida reversão vacuolar, se apresentando uni ou multivacuoladas. Essa reorganização rápida do compartimento vacuolar está relacionada com a redistribuição de íons potássio, cloreto e de água, o que leva à mudanças de volume das células motoras e, conseqüentemente, à deformação do pulvino (Campbell & Thomson 1977, Campbell *et al.* 1979, Campbell & Garber 1980, Satter & Galston 1981, Satter *et al.* 1982, Mayer *et al.* 1985, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991).

Pesquisas recentes baseadas em técnicas moleculares indicam que, além das mudanças de turgor das células motoras, os movimentos do pulvino são devidos a mudanças na conformação do citoesqueleto, especialmente dos microfilamentos de actina (Fleurat-Lessard *et al.* 1988, Kameyama *et al.* 2000, Yamashiro *et al.* 2001, Hewitson 2001). Recentemente, foi isolada em *Mimosa pudica* L., uma proteína cálcio-dependente que entra na constituição dos filamentos de actina, a qual pode estar envolvida no controle da atividade destes componentes do citoesqueleto (Yamashiro *et al.* 2001).

Alguns autores sugeriram uma possível relação entre o conteúdo da endoderme dos pulvinos com a velocidade dos movimentos foliares: em pulvinos com movimentos rápidos, como os de *Mimosa pudica* a endoderme contém unicamente grãos de amido (Moysset & Simón 1991); em pulvinos com movimentos lentos, a endoderme possui, além de grãos de amido, cristais de oxalato de cálcio (Fleurat-Lessard 1988). Contudo, o número de espécies estudadas é pouco representativo em face à riqueza e diversidade da família Fabaceae.

Um aspecto histológico que merece destaque é a ocorrência de uma bainha de células vivas ao redor do floema do pulvino, a qual foi descrita como sendo formada por colênquima ou parênquima colenquimatoso em todas as espécies de leguminosas estudadas (Esau 1970, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Moysset & Simón 1991). Contudo, em *Pterodon pubescens* uma leguminosa nativa do cerrado com movimentos foliares lentos, Machado & Rodrigues (2004) constataram que esta bainha é constituída por fibras septadas com protoplasto vivo, de origem pericíclica.

Uma possível participação do sistema vascular do pulvino na redistribuição de íons e na transmissão de estímulos durante os movimentos foliares tem sido sugerida por diferentes autores (Pfeffer 1907, Toriyama 1953, Satter & Galston 1981, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Moysset & Simón 1991). Contudo, informações detalhadas sobre estes tecidos são escassas.

A análise da literatura disponível revela que a maior parte das informações sobre anatomia, ultra-estrutura e funcionamento do pulvino de leguminosas refere-se a poucas espécies de Mimosoideae, sendo *Mimosa pudica* a espécie mais estudada e caracterizada por

apresentar movimentos foliares rápidos (Toriyama 1953, 1954, 1955, 1957, 1967, Toriyama & Komada 1971, Toriyama & Satô 1968, Campbell & Thomson 1977, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Campbell *et al.* 1979, Fleurat-Lessard 1981, 1988, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Fleurat-Lessard & Millet 1984). Para as espécies que apresentam somente movimentos foliares lentos, as informações são escassas. Com relação às leguminosas nativas do cerrado, onde as plantas estão sujeitas a condições de intensa luminosidade e altas temperaturas, estudos detalhados sobre pulvino são ainda mais escassos, sendo restritos a *Pterodon pubescens* (Caldas *et al.* 1997, Rodrigues & Machado 2004, Machado & Rodrigues 2004).

Tendo em vista a importância dos ajustes foliares como um mecanismo de adaptação às condições do ambiente e considerando a carência de estudos que relacionem a estrutura ao funcionamento de pulvinos de leguminosas nativas do cerrado, os objetivos deste trabalho foram:

1. analisar comparativamente a anatomia do pulvino primário de leguminosas do cerrado com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar, buscando identificar padrões e apontar peculiaridades estruturais;
2. identificar o conteúdo da endoderme do pulvino primário dessas espécies e verificar sua possível relação com o tipo e a velocidade do movimento foliar;
3. investigar a anatomia e a ultra-estrutura do sistema vascular do pulvino primário, com ênfase na natureza da bainha de células ao redor do floema, buscando evidências estruturais da participação do sistema vascular no funcionamento do pulvino.

Revisão de Bibliografia

Desde muito tempo, diversos pesquisadores têm se interessado pelo estudo da anatomia dos pulvinos como base para a compreensão do mecanismo fisiológico dos movimentos foliares. Hooke, em 1685, foi o primeiro pesquisador a estudar a estrutura anatômica do pulvino em uma planta sensitiva sem se referir à espécie, provavelmente *Mimosa pudica* (*apud* Fleurat-Lessard 1988). Posteriormente, a anatomia do pulvino de diversas plantas foi descrita por Dutrochet (1824), Burnett & Mayo (1827), Gardiner (1882), Burdon-Sanderson (1882), Haberlandt (1890), Heald de Forest (1894), Brown (1912), Steckbeck (1919) e Bose & Das (1925). Da análise desses trabalhos, nota-se que os pulvinos possuem um padrão estrutural sendo, de um modo geral, composto por epiderme unisseriada, córtex parenquimático desenvolvido e sistema vascular central (*apud* Fleurat-Lessard 1988).

A partir da segunda metade do século XX, tiveram início investigações sobre a histocitologia de pulvinos e, na década de 50, os estudos passaram a enfatizar as células parenquimáticas corticais dos pulvinos. Toriyama foi um dos pesquisadores que mais colaborou com o entendimento da estrutura e funcionamento dos pulvinos das leguminosas, principalmente das células corticais. Em 1953, num estudo sobre a estrutura do córtex do pulvino de *Mimosa pudica*, este autor denominou as células corticais de células motoras. Tais células eram caracterizadas pelo formato isodiamétrico, presença de parede espessa com numerosos plasmodesmos e pela ocorrência de uma camada de citoplasma ao redor de um grande vacúolo, além de núcleo conspícuo. O autor confirmou a existência de dois tipos de vacúolos nas células motoras: os vacúolos taníferos, pouco volumosos e um vacúolo central, maior, sem conteúdo tanífero.

No ano de 1955, Toriyama escreveu sobre a origem e o desenvolvimento dos vacúolos taníferos nas células motoras dos pulvinos de *Mimosa pudica* e *Robinia pseudoacacia*. O autor descreveu que um vacúolo tanífero pequeno aparecia nas células motoras, dentro do vacúolo central maior, e aumentava de tamanho conforme a planta se desenvolvia, passando a ocupar todo o vacúolo central. Antes da curvatura do pulvino, as células motoras apresentavam um único e grande vacúolo tanífero; durante o movimento, este vacúolo se fragmentava e pequenos vacúolos taníferos apareciam nas células motoras, indicando a propriedade contrátil dos vacúolos taníferos. O autor concluiu que a presença de tanino nas células motoras possui significado fisiológico na regulação ou manutenção do turgor das células motoras, embora não exerça papel relevante na sensibilidade dessas células em plântulas jovens.

Em 1957, Datta questionou a ocorrência de vacúolos taníferos dentro de vacúolos maiores como proposto por Toriyama (1955). O autor descreveu que o conteúdo das células motoras de *Mimosa pudica* consistia de uma massa densa que era dissolvida por solventes de tanino, tais como éter, clorofórmio e acetona.

Dutt (1957) verificou que além dos vacúolos taníferos, outros vacúolos menores, sem conteúdo tanífero presentes nas células motoras de *Mimosa pudica* apresentavam propriedades contráteis. O autor descreveu que quando a célula estava túrgida, apresentava um grande vacúolo tanífero contrátil, além de muitos outros menores. Sob estímulo, esses vacúolos menores desapareciam completamente, o vacúolo tanífero se tornava menor e um líquido contendo sais de potássio passava a ser encontrado no espaço intercelular. Entretanto, durante o processo de recuperação da célula, os vacúolos pequenos reapareciam, o vacúolo tanífero voltava ao tamanho normal e nenhum líquido era encontrado no espaço intercelular. O autor concluiu que esse líquido foi expelido fora da célula a partir dos vacúolos pequenos e que durante o processo de recuperação da célula o líquido era reabsorvido nos vacúolos.

Toriyama & Komada (1971) também relataram mudanças na forma e no tamanho dos vacúolos taníferos durante os movimentos foliares. Segundo os autores, os vacúolos taníferos semicirculares ficavam comprimidos em um lado da célula motora logo após a estimulação. Em cortes embebidos em água, por 15 a 20 minutos, esses vacúolos progressivamente tornavam-se esféricos e aumentavam gradualmente de tamanho. Quando os cortes eram imersos em solução de sacarose, as células sofriam plasmólise e o vacúolo tanífero se tornava menor. Neste caso, a recuperação do vacúolo tanífero era evidenciada pelo aumento de seu volume e da área superficial. Segundo os autores, esse fato sugeria que a concentração osmótica do vacúolo tanífero é maior do que aquela do vacúolo central.

Toriyama & Jaffe (1972) detectaram a presença de cálcio no vacúolo tanífero das células motoras do pulvino primário de *Mimosa pudica* e demonstraram quantitativamente a maior abundância de Ca^{2+} no pulvino estimulado em comparação com pulvinos que não sofreram estímulo. Os autores sugeriram que os vacúolos taníferos funcionam como sítios de estocagem de cálcio nas células motoras dos pulvinos de *Mimosa*.

Campbell *et al.* (1979) estudaram a localização dos íons cálcio e potássio nas células motoras do pulvino de *Mimosa pudica*. Os autores relataram que o córtex do pulvino desta espécie possuía duas regiões: região cortical externa rica em tanino como descrita anteriormente por diversos autores e, região cortical interna formada pelas células parenquimáticas mais próximas do sistema vascular, as quais não apresentavam conteúdo tanífero. As análises da região cortical externa mostraram que os vacúolos taníferos, os

plastídios e as paredes celulares são ricos em potássio e cálcio. Entretanto, na região cortical interna, o cálcio era mais abundante nas paredes celulares, mas escasso dentro do protoplasto; contrariamente, o potássio estava ausente nas paredes, mas era abundante no vacúolo central. Os autores afirmaram que a ausência de tanino nas células do córtex interno poderia significar uma diferença funcional entre as duas regiões corticais do pulvino. A observação de que os vacúolos com tanino eram ricos em cálcio corroborou os dados de Toriyama & Jaffe (1972). Considerando a localização e a abundância de potássio, os autores sugeriram que as células corticais internas poderiam ser as reguladoras do turgor das células corticais externas.

Satter *et al.* (1970) descreveram a anatomia do pulvínulo de *Albizzia julibrissin* e a ultra-estrutura das células corticais; estudaram também o controle do movimento nictinástico realizado por fitocromos nos pulvínulos desta espécie. Os autores relataram que os fitocromos controlavam o fechamento dos folíolos através da regulação das mudanças de turgor das células motoras dos pulvinos. Quando as células motoras da face dorsal do pulvino se expandiam, as células da face ventral perdiam turgor e os folíolos se fechavam. Os autores denominaram as células da face adaxial do pulvino, as quais sofriam aumento de volume durante o movimento de abertura do pulvino, de células extensoras; já, as células da face abaxial que se expandiam durante o fechamento do pulvino foram denominadas células flexoras. Segundo os autores, um dos aspectos mais relevantes encontrados foi a ocorrência de células motoras multivacuoladas no pulvino de *Albizzia julibrissin*. No entanto, não apresentaram qualquer nota a respeito da reversibilidade desta condição.

Em 1980, Campbell & Garber descreveram o caráter reversível da organização vacuolar nas células motoras do pulvino terciário de *Albizzia julibrissin* durante o movimento foliar. Relataram que as mudanças que ocorriam na forma e tamanho das células motoras eram mais proeminentes nas células corticais mais externas. Os autores afirmaram que as mudanças de volume das células motoras estavam intimamente associadas com a reorganização reversível do compartimento vacuolar. Descreveram, ainda, que as células motoras possuíam um único e grande vacúolo central quando expandidas, mas tornavam-se multivacuoladas durante a perda de volume; o vacúolo central se restabelecia pela fusão dos vacúolos menores durante a re-expansão das células motoras. Nesta espécie, enquanto os folíolos estavam abertos, as células motoras da zona extensora se mostravam com um único e grande vacúolo central e as células da zona flexora estavam multivacuoladas. Durante o fechamento do pulvino, as células da zona extensora se tornavam multivacuoladas, enquanto que na zona extensora as células passavam a ser univacuoladas. Segundo os autores, a

reorganização vacuolar das células motoras indicava que mudanças reversíveis do tonoplasto poderiam regular o movimento foliar.

Fleurat-Lessard (1988) estudou a estrutura e ultra-estrutura das células corticais dos órgãos motores de *Mimosa pudica* e concordou com os demais autores citados anteriormente sobre o papel atribuído às células motoras dos pulvinos como as principais responsáveis pelos movimentos foliares. Destacou, ainda, que a mudança de forma que ocorria nessas células depois da curvatura do pulvino era evidente e estava provavelmente associada à mudanças nos vacúolos. O autor afirmou que as células motoras eram capazes de traduzir os estímulos recebidos em diferentes partes da planta incapazes de se movimentar. Segundo Fleurat-Lessard, as células motoras seriam altamente diferenciadas e incapazes de se desdiferenciar. Este autor foi um dos primeiros a sugerir a ocorrência de proteínas contráteis nas células motoras de pulvinos. Concluiu que as células motoras de plantas seismonásticas e não-seismonásticas apresentavam características similares e que as diferenças funcionais dependiam de peculiaridades ao nível molecular.

Fleurat-Lessard & Millet (1984) compararam os aspectos ultra-estruturais das células motoras dos filetes dos estames de *Berberis canadensis* e do pulvino terciário de *Mimosa pudica*. Esse estudo mostrou muitos aspectos em comum entre as células parenquimáticas corticais dessas duas estruturas. Em ambas, as células motoras possuíam parede com contorno sinuoso com numerosos plasmodesmos, conteúdo tanífero armazenado em vacúolos ou em plastídios localizados próximos ao núcleo, além da presença de microfilamentos e microfibrilas nos vacúolos taníferos. Entretanto, no pulvino de *Mimosa pudica* as células motoras da face abaxial do órgão possuíam paredes mais espessas do que as células da face adaxial, enquanto nos filetes dos estames ocorre o inverso. A existência de espaços intercelulares, particularmente mais numerosos no córtex dos pulvinos, facilitaria a deformação celular durante o movimento. Os espessamentos de parede das células adaxiais dos filetes resultam da expansão da lamela mediana, enquanto que o espessamento das células abaxiais nos pulvinos seria resultado de um aumento de deposição de celulose. Os autores verificaram que a ocorrência de numerosos plasmodesmos ramificados era comum em células motoras e garantia as trocas simplásticas. Os autores sugeriram algum tipo de associação entre o metabolismo do amido e do tanino, visto que nos filetes de estames maduros pouco amido estava presente naqueles plastídios que continham tanino; já, em filetes de estames mais velhos que continham tanino somente nos vacúolos, o amido era abundante nos plastídios. Nos pulvinos, o tanino se acumulava nas células motoras do córtex externo onde o conteúdo de amido era baixo, enquanto que as células endodérmicas eram livres de tanino e possuíam

conteúdo amilífero em abundância. As similaridades entre as células corticais das regiões estudadas sugeriram que essas regiões possuíam analogias em seu mecanismo funcional.

Na década de 80, tiveram início pesquisas sobre o possível envolvimento do citoesqueleto no funcionamento do pulvino. Fleurat-Lessard *et al.* (1988) estudaram o movimento foliar em exemplares de *Mimosa pudica* tratados com diversos inibidores do citoesqueleto. O tratamento com colchicina não afetou o movimento seismonástico das folhas, mas rompeu os microtúbulos das células motoras. O fornecimento de Vinblastina às plantas fez com que os microtúbulos das células motoras se rompessem parcialmente, mas o movimento seismonástico não foi afetado. Essas drogas não alteraram as fibrilas citoplasmáticas e vacuolares. Por outro lado, o tratamento com citocalasina B e faloidina alterou o movimento seismonástico das folhas de *M. pudica*. Esses reagentes modificaram o arranjo e a estrutura das fibrilas, sem afetar os microtúbulos. Os dados de Fleurat-Lessard sugeriram que os microtúbulos não estariam diretamente envolvidos nos movimentos seismonásticos, enquanto que as fibrilas formadas por filamentos delgados, semelhantes à actina, poderiam estar envolvidas nessa reação. Este trabalho evidenciou que os movimentos seismonásticos, além de mudanças de turgor das células motoras, envolviam mecanismos de contração.

Em 2000, Kameyama *et al.* propuseram que a curvatura do pecíolo de *Mimosa pudica* estaria relacionada com mudanças no nível de fosforilação da actina, mais especificamente a fosforilação do aminoácido tirosina, sugerindo que proteínas contráteis poderiam estar envolvidas nos movimentos das plantas. Os autores verificaram que os filamentos de actina nas células motoras da face abaxial do pulvino se tornavam mais periféricos depois da curvatura, embora desconhecemos os mecanismos reguladores dessas mudanças. Os dados obtidos neste estudo mostraram que 80% das moléculas de actina do pulvino sofriam fosforilação da tirosina antes do movimento. Depois do movimento, a quantidade total de actina não se alterava, mas a fosforilação da tirosina diminuía, até que a actina fosforilada desaparecia completamente. Em caules que não sofreram movimento, as moléculas de actina sofreram fosforilação da tirosina, e o nível de fosforilação não mudou durante os movimentos. Quando os autores utilizaram inibidor de desfosforilação, o ângulo de curvatura do pecíolo foi bem menor que no controle. Assim, os autores concluíram que a curvatura de *M. pudica* estava correlacionada com a redução da fosforilação da actina no pulvino.

Segundo Morillon *et al.* (2001), um mecanismo similar àquele da contração muscular poderia explicar os movimentos foliares rápidos. Segundo os autores, somente as proteínas contráteis que modificam a forma da célula (comprimento, diâmetro), sem a necessidade de

mudanças de volume, estariam envolvidas. Os autores comentaram que os movimentos que levam menos de um segundo não eram condizentes com a teoria tradicional do fluxo de água por osmose. Tais movimentos rápidos requeriam a atuação de co-transportadores de água e soluto através da membrana, ou um mecanismo de mudança de forma celular em volume constante.

A possível participação das camadas corticais internas de pulvinos na percepção da gravidade foi inicialmente estudada em cereais, merecendo destaque o trabalho de Dayanandan *et al.* (1977). Os autores relataram que as camadas corticais mais internas dos pulvinos eram especializadas na percepção da gravidade pelo fato de possuírem estatolitos (amiloplastos). Esses autores analisaram os pulvinos de diversas espécies de gramíneas, onde a gravi-percepção foi extensivamente estudada. Segundo os mesmos, há duas regiões gravi-sensitivas nesse grupo de plantas. Uma é o pulvino da bainha foliar localizado perto da base da folha e a outra é o pulvino internodal localizado na base do entrenó, um pouco acima da junção nodal. Os autores observaram espécies que apresentavam somente o pulvino da bainha foliar, outras que possuíam somente o pulvino internodal e espécies que possuíam ambos os pulvinos. Os autores relataram que os pulvinos acumulam pouca ou nenhuma sílica em comparação com as regiões imediatamente acima e abaixo do pulvino. Lignina foi encontrada somente nos elementos de vaso do xilema. A bainha de células ao redor dos feixes vasculares era composta por células de paredes pécticas e descritas como colenquimáticas. Em resposta a posição horizontal de um caule, o lado inferior do pulvino crescia somente por alongamento celular, e as células da bainha colenquimática se esticavam, o que levou a observação de regiões espessas e regiões mais delgadas nas paredes das células.

Song *et al.* (1988), para determinar se os estatolitos presentes nas células localizadas externamente aos feixes vasculares dos pulvinos de gramíneas de fato atuavam na gravi-percepção, removeram o amido destas organelas, deixando-as no escuro. A resposta gravitrópica foi reduzida a zero nos pulvinos cujo amido foi degradado. Entretanto, quando foi fornecida sacarose à essas plantas, o amido ressurgiu nos amiloplastos dos pulvinos e as plantas foram capazes de se curvar em resposta à gravidade. Song *et al.* (1988) relataram que para que ocorresse a curvatura do pulvino em resposta a gravidade, o amido devia se acumular nos plastídios em quantidade suficiente para causar a sedimentação dessas organelas. Porém, se os plastídios continham quantidade insuficiente de amido, eles não sedimentavam e os pulvinos não manifestavam curvatura. Os autores concluíram que os estatolitos repletos de amido atuavam como gravisensores em caules de cereais.

Chang *et al.* (2001) relataram mudanças no conteúdo de amido no pulvino de *Avena sativa* durante a resposta gravitrópica. Os autores examinaram os efeitos de inibidores de fosfatases e quinases e bloqueadores de canais de cálcio sobre a curvatura gravitrópica e os níveis de amido no pulvino nodal de aveia. Dentre os compostos testados, o OA (inibidor de fosfatase) e o LaCl_3 (bloqueador de canal de cálcio) mostraram os efeitos inibidores mais fortes sobre a resposta de curvatura gravitrópica. Ao mesmo tempo, causaram uma rápida perda de amido no pulvino. Esses dois compostos agiram inicialmente bloqueando o aumento de amido que ocorre durante os primeiros estágios na graviresposta do pulvino. Como resultado, os níveis de amido diminuíram em caules tratados com OA e o LaCl_3 . Os autores sugeriram que a desfosforilação protéica e o cálcio desempenhavam um papel no metabolismo do amido no pulvino de aveia em resposta aos sinais da gravi-estimulação. Seus resultados indicaram que a quantidade de amido presente nos plastídios gravisensores no pulvino de aveia determinava a taxa de curvatura em resposta à gravidade.

Em um dos raros estudos sobre gravi-percepção em folhas de dicotiledôneas completamente expandidas, Fleurat-Lessard (1981) afirmou que as folhas de *Mimosa pudica* eram capazes de responder à força da gravidade de modo semelhante ao das folhas das gramíneas. O autor estudou as características ultra-estruturais das células da endoderme do pulvino primário de *Mimosa pudica* depois da gravi-estimulação. No pulvino primário, essas células eram caracterizadas por uma polaridade estrutural induzida pela localização do núcleo no pólo apical da célula e dos amiloplastos no pólo basal. As células amilíferas apresentavam plasmodesmos amplos, retículo endoplasmático pouco desenvolvido e ausência de tanino nos vacúolos. Depois da gravi-estimulação, os amiloplastos migraram para a região celular onde está o núcleo, levando ao deslocamento do citoplasma ao seu redor. O núcleo passou a demonstrar um contorno sinuoso e a membrana nuclear se tornava contígua com os amiloplastos e a membrana plasmática. As mitocôndrias também sofreram deslocamento, seguindo o fluxo dos amiloplastos. As modificações observadas foram similares às dos pulvinos das gramíneas.

Moysset & Simon (1991), estudaram o pulvino secundário de *Robinia pseudoacacia*, uma espécie com movimentos nictinásticos lentos, e sugeriram uma relação entre o conteúdo das células corticais com o funcionamento do pulvino. As células corticais externas continham vacúolos sem tanino, que sofriam mudanças em número e tamanho durante o movimento foliar e vacúolos taníferos, podendo agir como reservatório de íons. As células endodérmicas possuíam numerosos grãos de amido e cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Ressaltaram que a presença de cristais na endoderme do pulvino era típica de plantas com

movimentos lentos e que plantas com movimentos foliares rápidos possuíam somente grãos de amido na endoderme.

A possível participação do sistema vascular no funcionamento do pulvino foi primeiramente relatada por Pfeffer (1907- *apud* Moysset & Simón 1991), quando observou que a excisão do cilindro vascular de sensitiva (provavelmente *Mimosa pudica*) fazia com que não ocorresse o movimento dos folíolos. A partir da década de 70 essas informações foram recuperadas e diversos autores passaram a investigar este aspecto. Fleurat-Lessard & Bonnemain em 1978, estudando a estrutura do sistema vascular do pulvino de *Mimosa pudica* relataram a ocorrência de elementos fibriformes vivos no xilema e a presença de células de transferência no xilema e floema. Segundo os autores, as células vasculares (células companheiras, elementos fibriformes do xilema e células parenquimáticas do protoxilema) eram caracterizadas pela redução do vacuoma e presença de sistema de membranas bem desenvolvido. Segundo os autores, essas evidências corroboravam a hipótese de Pfeffer (1907).

Grignon *et al.* (1992) descreveram o sistema vascular do pulvino de soja (*Glycine max*), mostrando a existência de um floema interno. A ocorrência de grupos de cordões de floema interno na medula do pulvino foi confirmada pela observação de placas crivadas e inclusões de proteína-P cristalinas, típicas de elementos de tubo crivado de leguminosas. Cortes seriados mostraram que uma reorientação espacial dos tecidos vasculares no pulvino resultava na formação de cordões internos de floema, que eram contíguos com os feixes de floema externos de regiões acima e abaixo do pulvino. Usando marcadores fluorescentes, os autores mostraram que o floema interno do pulvino de soja era ativo. Os autores não fizeram nenhuma menção direta sobre a participação do sistema vascular no funcionamento do pulvino.

No estudo de Moysset & Simón (1991), o sistema vascular do pulvino secundário de *Robinia pseudoacacia* é descrito como sendo formado por um cilindro central delimitado externamente por uma bainha de células colenquimáticas. Segundo os autores, as células colenquimáticas externas ao floema continham inúmeros plasmodesmos, através dos quais as células parenquimáticas do floema e as células do córtex interno eram conectadas. Vacúolos com tanino e cristais de oxalato de cálcio eram comuns no parênquima do floema. O arranjo dos tecidos e a ocorrência de pontoações com plasmodesmos nas células do cilindro central forneceram evidências da continuidade simplástica através do cilindro vascular entre os lados opostos do órgão e da participação do sistema vascular na redistribuição de íons. Segundo os

autores, a maior amplitude de movimento dos folíolos de *Robinia* poderia estar relacionada com a extensão das regiões flexora e extensora e a escassez de lignificação do pulvino.

Machado & Rodrigues (2004) descreveram os aspectos anatômicos e ultra-estruturais do pulvino primário de *Pterodon pubescens*, uma leguminosa arbórea de cerrado, com movimentos foliares lentos. Este trabalho relatou pela primeira vez a ocorrência de fibras septadas, de origem pericíclica, ao redor do floema do pulvino. A ausência de células esclerificadas no floema, a presença de elementos fibriformes com protoplasto vivo e células parenquimáticas com sistema de endomembrana desenvolvido, paredes celulares com numerosos campos de pontuação primários e plasmodesmos amplos no xilema confirmaram as observações de Moysset & Simón (1991) e reforçaram a hipótese da participação do sistema vascular do pulvino nos movimentos foliares.

Com relação à caracterização histológica das diferentes regiões foliares em comparação ao pulvino da mesma espécie, os estudos são escassos. Fleurat-Lessard & Roblin (1982) estudaram o pecíolo e o pulvino principal de *Mimosa pudica*. Segundo os autores, nesta espécie o pulvino apresenta a região cortical bem mais desenvolvida que o pecíolo, floema delimitado externamente por uma bainha de células colenquimáticas e células companheiras com invaginações de parede, medula reduzida e formada por elementos fibriformes semelhantes aos do xilema. O pecíolo apresenta córtex reduzido, sistema vascular rodeado por fibras lignificadas e medula parenquimática ampla. As características observadas no pulvino são evidências da maior flexibilidade deste órgão. Devido ao fato que o rápido movimento do pulvino envolve ampla redistribuição de materiais e rápida variação no metabolismo, os autores sugeriram que as características descritas facilitariam as trocas através das diferentes áreas do pulvino.

Rodrigues & Machado (2004) fizeram um estudo comparativo da anatomia do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* e observaram que os pulvinos primário e secundário apresentavam peculiaridades estruturais em relação ao pecíolo e raque. Estas peculiaridades incluíam cutícula mais espessa, córtex mais desenvolvido formado por células parenquimáticas de formas variáveis, sistema vascular em posição central, floema circundado por fibras septadas não lignificadas e medula parenquimática reduzida ou ausente. Pecíolo e raque apresentaram córtex reduzido constituído por células parenquimáticas isodiamétricas, sistema vascular periférico, floema envolvido por calota de fibras gelatinosas e medula ampla. Compostos fenólicos foram detectados no vacúolo das células corticais dos pulvinos, enquanto que no córtex e medula do pecíolo e raque foram observados amiloplastos em abundância e ausência de compostos fenólicos. Os autores concluíram que, de modo geral, as

características estruturais do pulvino de *P. pubescens* eram comuns aos pulvinos das demais espécies de Fabaceae e estariam relacionadas com a intensificação de trocas laterais de íons e água entre células do córtex e sistema vascular, além de proporcionar maior flexibilidade e capacidade de movimento desta região. Já, as características do pecíolo e raque confeririam maior rigidez a estas estruturas foliares.

A análise da literatura aponta que a maior parte dos estudos estruturais com pulvinos é superficial e visa à elucidação do funcionamento desta região foliar. Estes estudos, em sua grande maioria, são restritos às células corticais motoras. Poucos estudos fazem referência às características celulares da endoderme e do sistema vascular do pulvino, consideradas pelos diferentes autores, de grande importância nos movimentos foliares. Além disso, as informações encontradas referem-se a poucas espécies de leguminosas, sendo *Mimosa pudica* considerada planta modelo para tais estudos. Assim, tornam-se necessários estudos envolvendo maior número de espécies com diferentes tipos e velocidades de movimento a fim de verificar se as informações obtidas com este pequeno número de espécies podem ser extensivas às demais leguminosas.

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

**Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes
velocidades de movimento foliar ¹**

TATIANE MARIA RODRIGUES^{2,3} e SILVIA RODRIGUES MACHADO²

¹ Parte de Dissertação de Mestrado da primeira autora, vinculada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas/Botânica, Área de Concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

² Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Câmpus de Botucatu. Caixa Postal 510, CEP 18618-000. Botucatu, SP, Brasil.

³ Autor para correspondência: tmr@saloonet.com.br

ABSTRACT - (Primary pulvinus comparative anatomy of leguminous species with different leaf movement velocity). The pulvinus, structure responsible for slow or fast leaf movements answering to outside or endogenous stimulus, constitutes a remarkable feature of leguminous species. The leaf position adjustments represent an efficient mechanism that allows the photosynthesis maximization under adverse conditions. In the available literature, the majority of the information about pulvinus structure refers to few leguminous species, especially those with fast movements. It is evident the necessity of studies about more species of this family to verify if the structural peculiarities described in the literature are extensive to other species. In this work the primary pulvinus anatomy of nine leguminous species from Brazilian cerrado with different kinds and velocity of leaf movement is described, attempting to identify patterns and to point structural peculiarities. For this, vegetal anatomy usual techniques were employed. The primary pulvinus of the studied species show uniseriate epidermis recovered by thick cuticle, developed parenchymatous cortex, central vascular system and reduced or absent pith. The outer cortex cells are wider and show phenolic compounds, except in *Zornia diphylla*; in the inner cortex, the cells are juxtaposed and do not have phenolic content. The collateral vascular bundles are surrounding by a septate fibers sheath. The general anatomy organization pattern is common to the pulvini of the studied species, independently on the subfamily to that they belong. The observed peculiarities are possible related to the kind and velocity of leaf movement.

Key words - anatomy, Fabaceae, leaf movement, pulvinus

RESUMO - (Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar). Os pulvinos, estruturas responsáveis por movimentos foliares, rápidos ou lentos, em resposta a estímulos externos ou endógenos, constituem uma característica marcante das leguminosas. Os ajustes no posicionamento foliar representam um

mecanismo eficiente que permite a maximização da fotossíntese em condições adversas. Na literatura disponível, a maioria das informações sobre a estrutura de pulvinos refere-se a poucas espécies de leguminosas, especialmente aquelas que apresentam movimentos rápidos. É evidente a necessidade de estudos do pulvino de um maior número de espécies da família para verificar se as peculiaridades estruturais relatadas em literatura são extensivas às demais. Neste trabalho é descrita a anatomia do pulvino primário de nove espécies de leguminosas nativas do cerrado com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar, buscando identificar padrões e apontar peculiaridades estruturais. Para isso foram utilizadas técnicas usuais em anatomia vegetal. O pulvino primário das espécies estudadas apresenta epiderme unisseriada recoberta por cutícula espessa, córtex parenquimático desenvolvido, sistema vascular central e medula reduzida ou ausente. As células do córtex externo são maiores e apresentam conteúdo fenólico, exceto em *Zornia diphylla*; no córtex interno, as células são justapostas e não possuem conteúdo fenólico. Os feixes vasculares colaterais são circundados por uma bainha de fibras septadas. O padrão geral de organização anatômica é comum ao pulvino das espécies estudadas, independentemente da subfamília a qual pertencem. As peculiaridades observadas estão possivelmente relacionadas com o tipo e velocidade do movimento foliar.

Palavras-chave- anatomia, Fabaceae, movimento foliar, pulvino

Introdução

Fabaceae (=Leguminosae) pertencente à ordem Fabales, é uma das maiores famílias de angiospermas com cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies (Polhill *et al.* 1981, Judd *et al.* 1999, Souza & Lorenzi 2005), sendo que no Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1500 espécies. Possui distribuição cosmopolita e abrange exemplares herbáceos, arbustivos, arbóreos e lianas sendo uma das principais famílias do ponto de vista econômico (Souza & Lorenzi 2005). Segundo Souza & Lorenzi (2005), as leguminosas estão bem representadas na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros. No cerrado, é a família mais representativa em número de espécies, com cerca de 777 espécies distribuídas em aproximadamente 101 gêneros (Ratter *et al.* 1997, Mendonça *et al.* 1998).

Uma das principais características que segregam Fabaceae das demais famílias da ordem Fabales é a ocorrência de folhas compostas com pulvinos bem desenvolvidos (Judd *et al.* 1999). Os pulvinos, espessamento da base foliar, são responsáveis pelos movimentos foliares, rápidos ou lentos, em resposta a estímulos externos ou endógenos (Campbell & Thomson 1977, Campbell *et al.* 1979, Satter *et al.* 1982, Moysset & Simón 1991, Grignon *et al.* 1992).

Os eventos fisiológicos responsáveis pelos movimentos foliares em algumas espécies de leguminosas têm sido correlacionados com as características estruturais do pulvino, que lhes conferem grande flexibilidade. Entre as características comumente reportadas, destacam-se córtex desenvolvido constituído por células parenquimáticas, denominadas células motoras por Toriyama (1953), sistema vascular em posição central, ausência ou redução de tecidos lignificados e medula reduzida ou ausente. Entretanto, de maneira geral, a maior parte dessas informações refere-se ao pulvino de poucas espécies de Mimosoideae, tais como *Samanea saman* (Jacq.) Merr. (Satter *et al.* 1982), *Robinia pseudoacacia* L. (Moysset & Simón 1991), *Albizia julibrissin* Durass. (Satter *et al.* 1970, Campbell & Garber 1980) e *Mimosa pudica* L.,

sendo esta a mais estudada e caracterizada por movimentos foliares rápidos (Toriyama 1953, 1954, 1955, 1957, 1967, Toriyama & Komada 1971, Toriyama & Satô 1968, Campbell & Thomson 1977, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Campbell *et al.* 1979, Fleurat-Lessard 1981, 1988, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Fleurat-Lessard & Millet 1984).

No cerrado, onde as plantas estão sujeitas às limitações impostas pela alta radiação, temperaturas elevadas e períodos de seca bem delimitados, o ajuste foliar torna-se um importante mecanismo de adaptação às condições do ambiente relacionada com economia de água e maximização da fotossíntese (Caldas *et al.* 1997). Contudo, para as leguminosas nativas de cerrado, as informações sobre a estrutura e funcionamento de pulvinos são escassas e restritas à *Pterodon pubescens*, uma leguminosa arbórea com movimentos foliares lentos (Caldas *et al.* 1997, Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado 2004). É evidente a necessidade de estudos estruturais do pulvino de um número mais representativo de espécies da família Fabaceae com diferentes tipos e velocidades de movimento, para verificar se as peculiaridades estruturais relatadas em literatura são extensivas às demais espécies.

Neste trabalho é descrita a anatomia do pulvino primário de nove espécies de leguminosas nativas do cerrado com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar, buscando identificar padrões e apontar peculiaridades estruturais.

Material e métodos

Foram estudadas nove espécies de leguminosas com diferentes tipos de movimentos foliares, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae (quadro 1), segundo classificação de Polhill *et al.* (1981). Amostras da região mediana do pulvino primário foram retiradas de folhas completamente expandidas, coletadas de exemplares vegetando em cerrado no município de Pratânia-SP (S 22°48'50.2''e W 48°44'35.8'').

As amostras foram fixadas em FAA 50 por 48 horas (Johansen 1940). A seguir, parte foi desidratada em série etílica, incluída em resina metacrilato e seccionada em micrótomo rotativo semi-automático; os cortes, com 6 µm a 8 µm de espessura, foram corados com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montados entre lâmina e lamínula com Permout. Outra parte das amostras foi estocada em álcool 70%, e posteriormente seccionada à mão-livre com auxílio de lâminas de barbear ou com micrótomo de Ranvier; os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio a 20%, lavados em água acética 1%, corados com Safrablau (Bukatsch 1972, Burger & Richter 1991) e montados entre lâmina e lamínula com glicerina. Para os testes histoquímicos, cortes de material recém coletado, não fixado, foram tratados com Sudan IV para detecção de substâncias lipídicas (Johansen 1940); solução de Vermelho de Rutênio a 0,02% para substâncias pécnicas (Jensen 1962); reagente de Lugol para amido (Johansen 1940); solução de cloreto férrico a 10% para substâncias fenólicas (Johansen 1940); floroglucina acidificada para lignina (Sass 1951) e ácido clorídrico a 10% para cristais de oxalato de cálcio (Johansen 1940). Os aspectos relevantes foram fotografados em fotomicroscópio Zeiss[®], utilizando filme Kodak[®] Asa 100 e T-Max Asa 100.

O comprimento e o diâmetro do pulvino (n= 10) de cada espécie foram mensurados com auxílio de paquímetro digital.

Resultados

O comprimento e o diâmetro do pulvino primário variam bastante entre as espécies, conforme mostrado no quadro 2. *Mimosa flexuosa* foi a espécie que apresentou pulvino primário com menor comprimento (1,60 mm) e menor diâmetro (1,00 mm), enquanto que *Dalbergia miscolobium* foi a espécie com pulvino primário com maiores dimensões (4,48 mm de comprimento e 4,36 mm de diâmetro).

Os pulvinos primários das nove espécies estudadas, em secção transversal, apresentam formato circular (figuras 1, 3, 5, 7, 9) ou discretamente dorsi-ventral (figuras 2, 4, 6, 8). A superfície dos pulvinos pode ser regular (figuras 3, 5, 7, 9) ou apresentar reentrâncias e protuberâncias (figuras 1, 2, 4, 6, 8). Em todas as espécies os pulvinos primários apresentam epiderme unisseriada, córtex parenquimático desenvolvido, sistema vascular central e medula bastante reduzida (figuras 1-6, 9) ou ausente (figuras 7, 8).

Tricomas tectores ocorrem na superfície do pulvino de *Copaifera langsdorffii* (figura 2), *Dalbergia miscolobium*, *Zornia diphylla* e *Mimosa flexuosa*, sendo mais abundantes em *Bauhinia rufa* (figuras 1, 11) e *Senna rugosa*; nas demais espécies, não foram observados tricomas. Cutícula espessa lisa recobre as células epidérmicas dos pulvinos de *Bauhinia rufa* (figura 11), *Copaifera langsdorffii* (figura 13), *Senna rugosa*, *Andira humilis* (figuras 15, 17), *Dalbergia miscolobium* e *Stryphnodendron polyphyllum*. Em *Zornia diphylla* (figura 14), *Mimosa rixosa* e *Mimosa flexuosa*, a cutícula se apresenta mais delgada.

Em *Mimosa flexuosa*, protuberâncias formadas por cerca de seis camadas de células justapostas com paredes espessas e lignificadas são observadas em toda a superfície do pulvino primário (figura 8). Essas protuberâncias são revestidas pela epiderme do pulvino, que também sofre lignificação nesta região (figura 10).

A epiderme é formada por células papiliformes em *Bauhinia rufa* (figura 11), *Senna rugosa* e *Dalbergia miscolobium*. Em *Zornia diphylla* (figura 14), *Mimosa rixosa*, *Mimosa flexuosa* e *Stryphnodendron polyphyllum*, *Copaifera langsdorffii* (figura 13) e *Andira humilis* (figura 17) as células epidérmicas apresentam formato retangular. Em *Dalbergia miscolobium* e nas espécies de Caesalpinioideae (figuras 11, 12, 13) e de Mimosoideae foi detectada a presença de conteúdo fenólico nos vacúolos das células epidérmicas. Estômatos não foram observados no pulvino de nenhuma das espécies estudadas.

O córtex do pulvino (figuras 1-9, 15) é amplo, variando de 20 a 30 camadas de células parenquimáticas em todas as espécies estudadas, com exceção de *Zornia diphylla* (figura 6) onde o córtex é mais reduzido, com cerca de 15 camadas celulares. As células corticais apresentam tamanho e formatos variáveis, paredes pecto-celulósicas delgadas (figuras 10-17) com campos de pontuação primários (figura 16), além de núcleo proeminente (figuras 12, 14, 16). De acordo com o tamanho e a disposição das células e o conteúdo celular, distinguem-se no córtex do pulvino das espécies estudadas, duas regiões: região cortical externa e região cortical interna (figura 15).

Na região cortical externa, as células parenquimáticas são mais volumosas (figura 15), apresentam núcleo conspícuo (figuras 12, 14, 16) e vacuoma desenvolvido (figuras 10-12, 15). Possuem formato poliédrico e paredes delgadas sinuosas (figura 14) com campos de pontuação primários conspícuos (figura 16). Espaços intercelulares são comuns nesta região (figura 10). A maioria das células do córtex externo apresenta vacúolo central preenchido com conteúdo denso que apresentou reação fortemente positiva ao cloreto férrico, indicando tratar-se de compostos fenólicos (figuras 11, 12, 15). Células com vacúolos translúcidos cuja reação ao cloreto férrico foi negativa ocorrem entremeadas às células com conteúdo fenólico (figura 15). A diferença entre essas células, com relação ao conteúdo dos vacúolos, é facilmente visualizada pela afinidade do vacuoma ao Azul de Toluidina, o qual se cora de verde intenso indicando a presença de compostos fenólicos. Em *Zornia diphylla* as células parenquimáticas corticais não apresentam conteúdo fenólico (figuras 6, 14, 16). Em *Bauhinia rufa* (figuras 1, 11, 12), *Copaifera langsdorffii* (figura 2), *Dalbergia miscolobium* (figura 5), *Mimosa rixosa* (figura 7) e *Mimosa flexuosa* (figura 8) o conteúdo fenólico mostrou-se mais abundante. Cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas também foram observados em algumas células do córtex externo de *Bauhinia rufa* (figura 12); em *Copaifera langsdorffii* (figura 13), *Mimosa rixosa* e *Stryphnodendron polyphyllum* (figura 9) ocorrem cristais prismáticos. Em

Andira humilis esclereídes esparsas foram observadas na região cortical externa (figura 17). Espaços secretores delimitados por epitélio unisseriado foram observados em *Copaifera langsdorffii* (figuras 2, 13); em corte longitudinal, tais espaços apresentam-se alongados, o que os caracteriza como canais secretores. Divisões periclinais e anticlinais foram observadas nas camadas celulares subepidérmicas em *Bauhinia rufa* (figura 12), *Senna rugosa*, *Andira humilis*, *Dalbergia miscolobium*, *Mimosa rixosa*, *Mimosa flexuosa* e *Stryphnodendron polyphyllum*.

A região cortical interna dos pulvinos é formada por cerca de três ou quatro camadas de células parenquimáticas que se caracterizam pelo menor tamanho, disposição compacta e ausência de conteúdo fenólico (figuras 15, 18-20). Esta região não possui espaços intercelulares. A última camada cortical é constituída por células repletas de grãos de amido (figuras 18, 19). As camadas corticais adjacentes à interna também podem apresentar grãos de amido esparsos. Em *Bauhinia rufa* (figura 19), *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa*, *Andira humilis* (figura 23), *Dalbergia miscolobium* e *Stryphnodendron polyphyllum* além de grãos de amido, as células da camada cortical interna apresentam cristais prismáticos de oxalato de cálcio.

O sistema vascular do pulvino primário das espécies estudadas, em secção transversal, localiza-se centralmente (figuras 1-9); os feixes vasculares podem se apresentar organizados em um anel (figuras 1-3, 5, 7-9) ou em ferradura (figuras 4, 6); externamente são delimitados por um número variável de camadas de células pequenas com paredes pecto-celulósicas espessadas (figuras 1-9; 20). Em secção longitudinal (figura 23), essas células são fusiformes, apresentam vários septos, além de campos de pontoação primários bastante conspícuos, o que as caracteriza como fibras septadas.

O floema é constituído por elementos de tubo crivado, células companheiras e células de parênquima axial, além de células de parênquima radial (figuras 20, 22). Em todas as

espécies estudadas, não foram observadas fibras ou esclereides no floema. Em *Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Andira humilis* (figura 20), *Dalbergia miscolobium*, *Mimosa rixosa*, *Mimosa flexuosa* e *Stryphnodendron polyphyllum* idioblastos fenólicos conspícuos são observados no floema. Idioblastos com cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram observados no floema de *Bauhinia rufa*, *Senna rugosa* e *Andira humilis*. Em *Mimosa rixosa* (figura 22) foram observados idioblastos com conteúdo mucilaginoso que se cora de rosa intenso com o Azul de Toluidina.

No xilema foram observados elementos de vaso associados às células parenquimáticas e fibras com paredes espessas não-lignificadas. Raios parenquimáticos atravessam o xilema e o floema e atingem as fibras pericíclicas (figura 20). Nas espécies de Mimosoideae (figuras 7-9), os raios parenquimáticos são pouco nítidos. Em *Bauhinia rufa* e *Andira humilis* (figura 20), conteúdo fenólico foi detectado nos raios do xilema.

A região medular do pulvino é reduzida (figuras 1-7, 9) estando ausente nas espécies de *Mimosa* (figuras 7, 8). É constituída por células parenquimáticas que podem apresentar conteúdo fenólico como em *Bauhinia rufa*, *Senna rugosa*, *Andira humilis* (figura 4), *Dalbergia miscolobium* e *Zornia diphylla* (figuras 6, 21).

Discussão

A organização anatômica dos pulvinos das diferentes espécies estudadas é típica de pulvino de leguminosas, como descrito em literatura (Toriyama 1953, 1954, 1955, 1957, 1967, Toriyama & Satô 1968, Toriyama & Komada 1971, Satter *et al.* 1970, Campbell & Thomson 1977, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Campbell *et al.* 1979, Fleurat-Lessard 1981, 1988, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Fleurat-Lessard & Millet 1984, Moysset & Simón 1991, Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado 2004).

Os pulvinos estudados apresentam dimensões bastante variáveis, o que provavelmente está relacionado ao porte da espécie em questão e, principalmente com o tamanho foliar.

A presença de reentrâncias e protuberâncias na superfície do pulvino é uma das características que o diferencia do pecíolo e raque e está diretamente relacionada com a maior capacidade de movimentação dessa região foliar, como descrito em *Mimosa pudica* (Toriyama 1953). A ocorrência de divisões periclinais e anticlinais na região subepidérmica é comum em pulvinos e está relacionada com a formação de tais protuberâncias (Rodrigues & Machado 2004).

A ausência de estômatos e a presença de cutícula espessa revestindo a epiderme do pulvino, assim como a ocorrência de tricomas tectores em algumas espécies, pode ter significado importante na defesa contra a perda de água em condições atmosféricas desfavoráveis (Kummerow & Alexander 1978, Kolattukudy 1984, Larcher 2000). Tais características têm especial significado no cerrado, onde as plantas estão sujeitas a um período de seca prolongado, altas intensidades luminosas e temperaturas elevadas, como referido por Caldas *et al.* (1997).

A ocorrência de córtex parenquimático amplo é uma das características que diferenciam o pulvino das demais regiões foliares, especialmente do pecíolo e raque (Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Rodrigues & Machado 2004). As características histológicas gerais do córtex do pulvino primário das nove espécies em estudo são similares às descritas para *Mimosa pudica* (Toriyama 1953, 1954, Fleurat-Lessard & Millet 1984, Fleurat-Lessard 1988), *Samanea saman* (Satter *et al.* 1982), *Robinia pseudoacacia* (Moysset & Simón 1991) e *Pterodon pubescens* (Machado & Rodrigues 2004), espécies com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar.

A análise do córtex do pulvino primário das espécies estudadas, com exceção de *Zornia diphylla*, revelou que o mesmo pode ser dividido de forma semelhante ao proposto

para o pulvino secundário de *Robinia pseudoacacia* por Moysset & Simón (1991). Nesta espécie, os autores relatam a ocorrência de uma região cortical externa, onde estão as células apresentam conteúdo fenólico e uma região interna que abrange a endoderme e as camadas corticais adjacentes, que não apresentam conteúdo fenólico.

As células parenquimáticas do córtex externo, denominadas motoras por Toriyama (1953), são consideradas as principais responsáveis pelos movimentos foliares. Suas paredes sinuosas ou dobradas são evidências de modificações no compartimento apoplástico (Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991). A ocorrência de espaços intercelulares, como observado nas espécies estudadas, pode facilitar as mudanças na forma e tamanho celular durante a curvatura do pulvino (Fleurat-Lessard & Millet 1984). A presença numerosos campos de pontuação primários nas células motoras indica a existência de intensas trocas simplásticas (Fleurat-Lessard 1988, Fleurat-Lessard & Millet 1984, Machado & Rodrigues 2004).

A presença de compostos fenólicos, particularmente abundantes no córtex de *Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Dalbergia miscolobium*, *Mimosa rixosa* e *M. flexuosa*, confirma a importância dessas substâncias, especialmente os taninos, nos movimentos násticos (Toriyama 1953, 1955, Moysset & Simón 1991). No pulvino de *Zornia diphylla*, espécie que exhibe somente discretos movimentos heliotrópicos lentos, a coloração com Azul de Toluidina, bem como o teste com cloreto férrico não detectaram compostos fenólicos nas células motoras.

A ocorrência de vacúolos com conteúdo fenólico nas células epidérmicas do pulvino de *Dalbergia miscolobium* e das espécies de Caesalpinioideae e Mimosoideae pode estar relacionada com a manutenção da estrutura e integridade de células e tecidos, além da proteção contra a radiação solar elevada (Larcher 2000, Machado & Rodrigues 2004), condição típica do cerrado. Além disso, compostos fenólicos podem fornecer proteção contra

herbivoria (Langenheim *et al.* 1982). Toriyama & Jaffe (1972) observaram mudanças na forma e tamanho dos vacúolos taníferos das células corticais durante o movimento seismonástico em *Mimosa pudica*. Segundo diversos autores, os compostos fenólicos, especialmente os taninos presentes nos vacúolos das células motoras intervêm na estocagem e liberação de íons, especialmente do potássio (Toriyama & Komada 1971, Campbell *et al.* 1979, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991) e do cálcio, o qual está envolvido na agregação dos componentes do citoesqueleto, particularmente dos microfilamentos de actina (Fleurat-Lessard & Millet 1984, Fleurat-Lessard *et al.* 1988, Kameyama *et al.* 2000, Yamashiro *et al.* 2001).

A presença de uma camada cortical interna bem delimitada em todas as espécies analisadas concorda com o relatado por diferentes autores, que a consideram como sendo uma endoderme típica (Fleurat-Lessard 1981, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991). A presença de cristais prismáticos de oxalato de cálcio, além dos grãos de amido, nas células endodérmicas das espécies com movimentos heliotrópico e nictinástico lentos e de somente grãos de amido naquelas com movimentos foliares násticos rápidos confirma a existência de uma relação entre o conteúdo da endoderme e a velocidade do movimento (Morse & Satter 1979).

A ocorrência de uma bainha de fibras septadas ao redor do floema do pulvino primário das espécies estudadas confirma as observações de Machado & Rodrigues (2004) para o pulvino primário de *Pterodon pubescens*. O fato das fibras septadas possuírem paredes pecto-celulósicas com numerosos campos de pontoação primários é uma evidência da ocorrência de continuidade simplástica entre o córtex e o cilindro vascular.

A ausência de fibras e esclereides no floema e a presença de elementos fibriformes vivos no xilema, associados à ocorrência de córtex parenquimático amplo nas espécies estudadas são características que asseguram a flexibilidade do pulvino, conforme já relatado

em literatura (Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Moysset & Simón 1991, Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado 2004). A falta de barreiras apoplásticas (lignificação parietal) juntamente com a ocorrência generalizada de campos de pontoação primários favorece a continuidade apoplástica e simplástica, respectivamente, desde a epiderme até o cilindro vascular do pulvino. Tal continuidade é fundamental para a rápida redistribuição de íons que se dá durante os movimentos foliares e constitui uma característica diferencial do pulvino em relação a outras regiões da folha (Rodrigues & Machado 2004).

Em conclusão, pode-se afirmar que existe um padrão geral de organização anatômica comum ao pulvino das diferentes espécies estudadas, independentemente da subfamília a qual pertencem, do porte e do tipo e velocidade do movimento foliar. Contudo, algumas peculiaridades, incluindo a presença e abundância de compostos fenólicos no córtex externo e o conteúdo das células endodérmicas do pulvino, estão possivelmente relacionadas com o tipo e velocidade do movimento foliar apresentado.

Agradecimentos

À FAPESP pela concessão de Bolsa de Mestrado à T. M. Rodrigues (MS 03/11050-7) e apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho (Programa Biota 00/12469-3) e ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa à S. R. Machado.

Referências Bibliográficas

- BUKATSCH, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61 (8): 255.
- BURGER, L.M. & RICHTER, H.G. 1991. *Anatomia da Madeira*. Livraria Nobel: São Paulo.

- CALDAS, L.S.L, LÜTTGE, U., FRANCO, A.C. & HARIDASAN, M. 1997. Leaf heliotropism in *Pterodon pubescens*, a woody legume from the brazilian cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia vegetal* 9: 1-7.
- CAMPBELL, N.A. & THOMSON, W.W. 1977. Multivacuolate motor cells in *Mimosa pudica* L.. *Annals of Botany* 41: 1361-1362.
- CAMPBELL, N.A., STIKA, K.M. & MORRISON, G.H. 1979. Calcium and potassium in the motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscope. *Science* 204: 185-187.
- CAMPBELL, N.A. & GARBER, R.C. 1980. Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizia* during leaf movement. *Planta* 148: 251-255.
- FLEURAT-LESSARD, P. 1981. Ultrastructural features of the starch sheat cells of the primary pulvinus after gravistimulation of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). *Protoplasma* 105: 177-184.
- FLEURAT-LESSARD, P. 1988. Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. *Biological Review* 63: 1-22.
- FLEURAT-LESSARD, P. & BONNEMAIN, J-L. 1978. Structural and ultrastrucutral characteristics of the vascular apparatus of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). *Protoplasma* 94: 127-143.
- FLEURAT-LESSARD, P. & ROBLIN, G. 1982. Comparative histocitology of the petiole and the main pulvinus in *Mimosa pudica* L.. *Annals of Botany* 50: 83-92.
- FLEURAT-LESSARD, P. & MILLET, B. 1984. Ultrastructural features of cortical parenchyma cells ("motor cells") instamen of *Berberis canadensis* Mill. and terciary pulvini of *Mimosa pudica* L.. *Journal of Experimental Botany* 35:1332-1341.
- FLEURAT-LESSARD, P., ROBLIN, G., BONMORT, J. & BESSE, C. 1988. Effects of colchicine, vinblastine, cytochalasin B and phalloidin on the seismonastic movement of

- Mimosa pudica* leaf and on motor cell ultrastructure. *Journal of Experimental Botany* 39: 209-221.
- GRIGNON, N., TOURAINE, B. & GRIGNON, C. 1992. Internal phloem in the pulvinus of Soybean plants. *American Journal of Botany* 50: 83-92.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W. H. Freeman: San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill: New York.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates: Massachusetts.
- KAMEYAMA, K., KISHI, Y., YOSHIMURA, M., KANZAWA, N., SAMESHIMA, M. & TSUCHIYA, T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37.
- KOLATTUKUDY, P.E. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany* 62: 2918-2933.
- KUMMERON, J. & ALEXANDER, J.V. 1978. Chaparral plants under water stress. *Environment southwest* 483: 3-7.
- LANGENHEIM, J.H., LINCOLN, D.E., STUBBLEBINE, W.H. & GABRIELLI, A.C. 1982. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* 69 (4): 595-607.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.
- MACHADO, S.R. & RODRIGUES, T.M. 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27 (1): 135-147.
- MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA, M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, A.V. & NOGUEIRA, P.E. 1998. Flora vascular do bioma Cerrado. *In*

- Cerrado: ambiente e flora (S.M. SANO & S.P. ALMEIDA, eds). EMBRAPA-CPAC: Planaltina.
- MORSE, M.J. & SATTER, R.L. 1979. Relationship between motor cell ultrastructure and leaf movements in *Samanea saman*. *Physiology Plantarum* 46: 338-346.
- MOYSSET, L. & SIMÓN, E. 1991. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *American Journal of Botany* 78:1467-1486
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & McCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- POLHILL, R.M. 1981. *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230.
- RODRIGUES, T.M. & MACHADO, S.R. 2004. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Botanica Brasilica* 18 (2): 381-390.
- SASS, J.E. 1951. *Botanical microtechnique*. 2.ed. Iowa State University Press: Ames.
- SATTER, R.L., SABNIS, D.D. & GALSTON, A.W. 1970. Phytochrome controlled nyctinasty in *Albizzia julibrissin*. I. Anatomy and fine structure of the pulvinule. *American Journal of Botany* 57: 374-381.
- SATTER, R.L., GARBER, R.C., KHAIRALLAH, L. & CHENG, Y-S. 1982. Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. *The Journal of Cell Biology* 95: 893-902.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Plantarum: Nova Odessa.

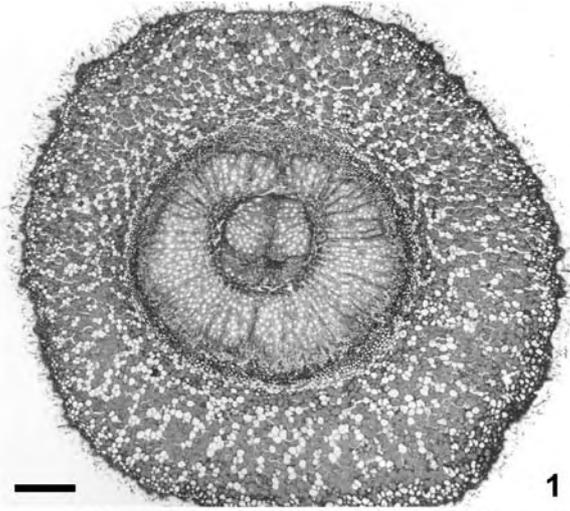
- TORIYAMA, H. 1953. Observational and experimental studies of sensitive plants I: The structure of parenchymatous cells of pulvinus. *Cytology* 18: 283-292.
- TORIYAMA, H. 1954. Observational and experimental studies of sensitive plants. II. On the changes in motor cells of diurnal and nocturnal condition. *Cytologia* 19: 29-40.
- TORIYAMA, H. 1955. Observational and experimental studies of sensitive plants. V. The development of the tannin vacuole in the motor cell of the pulvinus. *Botanical Magazine* 68: 203-208.
- TORIYAMA, H. 1957. Observational and experimental studies of sensitive plants. VII. The migration of colloidal substance in the primary pulvinus. *Cytologia* 22: 184-192.
- TORIYAMA, H. 1967. A comparison of the *Mimosa* motor cells before and after stimulation. *Proceedings of the Japan Academy* 43 (6): 541-546.
- TORIYAMA, H. & SATÔ, S. 1968. Electron microscopic observations of the motor cells of *Mimosa pudica* L. I. A comparison of the motor cells before and after stimulation. *Proceedings of the Japan Academy* 44 (7): 702-706.
- TORIYAMA, H. & KOMADA, Y. 1971. The recovery process of the tannin vacuole in the motor cell of *Mimosa pudica* L.. *Cytologia* 36: 690-697.
- TORIYAMA, H. & JAFFE, M.J. 1972. Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiology* 49: 72-81.
- YAMASHIRO, S., KAMEYAMA, K., KANZAWA, N., TAMIYA, T., MABUCHI, I. & TSUCHIYA, T. 2001. The gelsolin/fragminfamily protein identified in the higher plant *Mimosa pudica*. *Journal of Biochemistry* 130 (2): 243-249.

Quadro 1. Espécies estudadas e suas principais características.

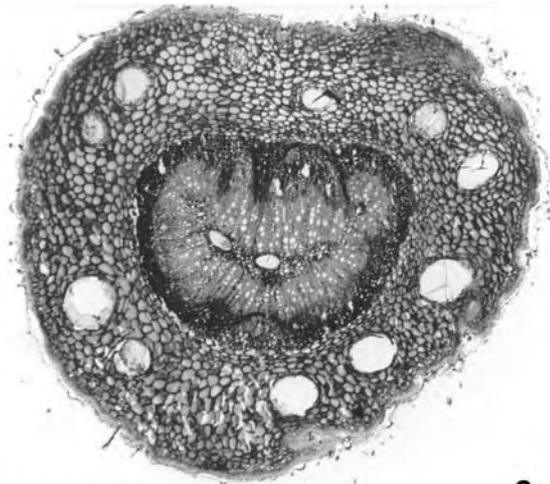
Sub-família	Espécie	Porte	Características foliares	Movimento foliar
Caesalpinioideae	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	arbustivo	bifoliolada; folhas alternas	heliotrópico e nictinástico lentos
	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	arbóreo	folhas compostas pinadas com cerca de 3 pares de folíolos	heliotrópico e nictinástico lentos
	<i>Senna rugosa</i> (G. Don.) H.S. Irwin & Barneby	arbustivo	folhas compostas pinadas com cerca de 5 folíolos	heliotrópico e nictinástico lentos
Faboideae	<i>Andira humilis</i> Mart. Ex Benth.	arbustivo	folhas compostas com 6-8 pares de folíolos e um terminal solitário	heliotrópico e nictinástico lentos
	<i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.	arbóreo	folhas compostas pinadas com cerca de 12 folíolos	heliotrópico e nictinástico lentos
	<i>Zornia diphylla</i> Pers.	herbáceo	folhas alternas com 2 folíolos assimétricos; folíolos opostos curto-peciolados	heliotrópico lento
Mimosoideae	<i>Mimosa rixosa</i> Mart.	rasteiro	folhas compostas com 4 folíolos	heliotrópico e nictinástico lentos; seismonástico rápido
	<i>Mimosa flexuosa</i> Mart.	herbáceo	folhas compostas pinadas com cerca de 20 pares de folíolos	heliotrópico e nictinástico lentos; seismonástico rápido
	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart.	arbóreo	folhas compostas bipinadas com cerca de 12 pares de folíolos	heliotrópico e nictinástico lentos

Quadro 2. Dados médios do comprimento e diâmetro do pulvino primário das espécies estudadas.

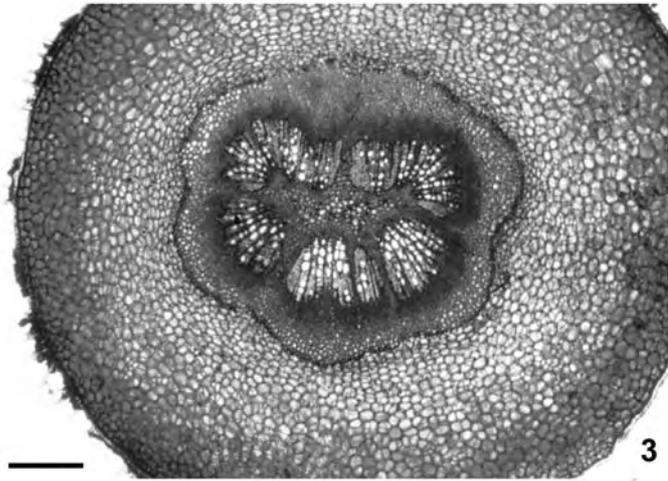
Espécie	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	3,98	2,99
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	1,91	1,83
<i>Senna rugosa</i> (G. Don.) H.S. Irwin & Barneby	3,95	3,08
<i>Andira humilis</i> Mart. Ex Benth.	4,21	3,00
<i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.	4,48	4,36
<i>Zornia diphylla</i> Pers.	2,10	1,14
<i>Mimosa rixosa</i> Mart.	2,08	1,20
<i>Mimosa flexuosa</i> Mart.	1,60	1,00
<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart.	4,24	3,15



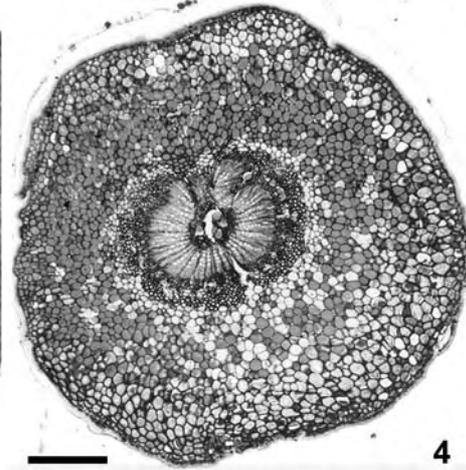
1



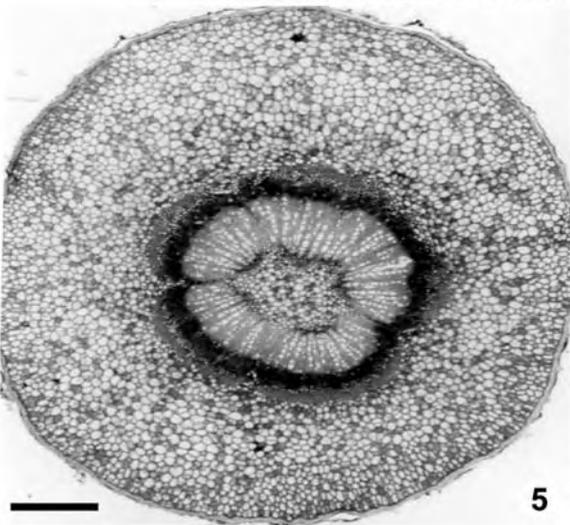
2



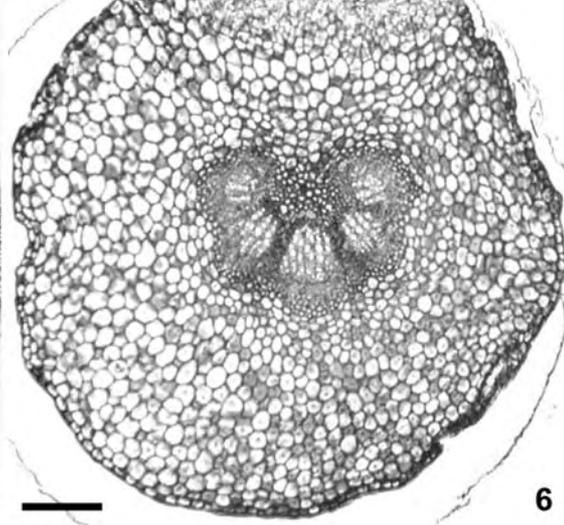
3



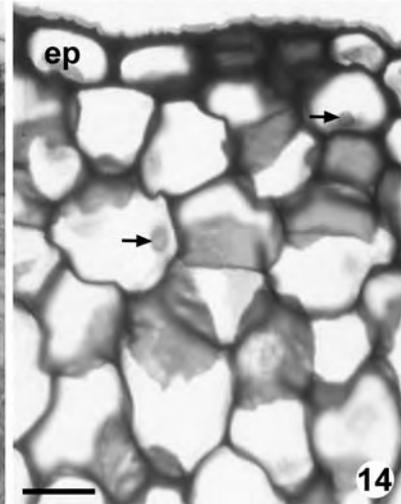
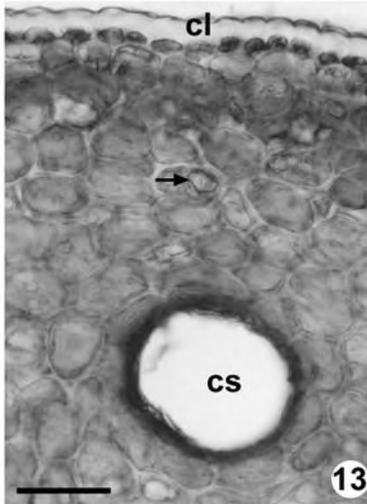
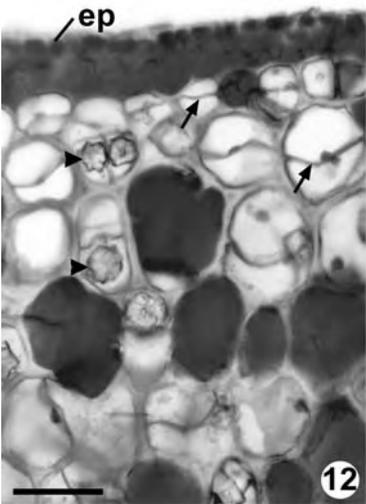
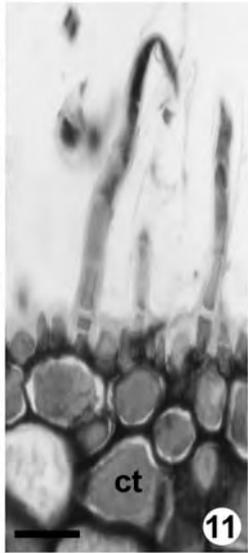
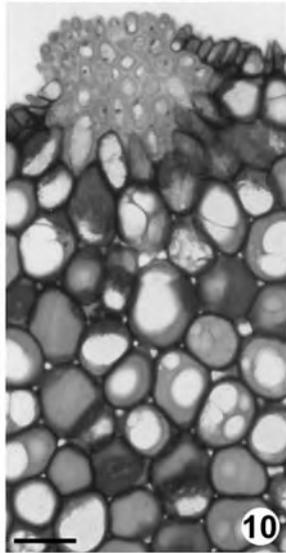
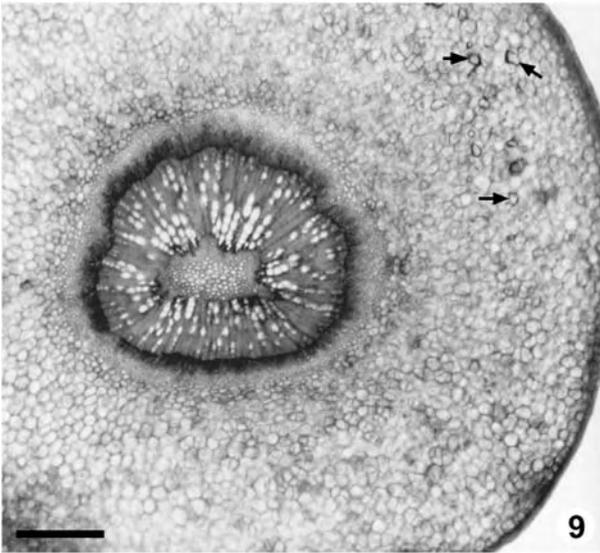
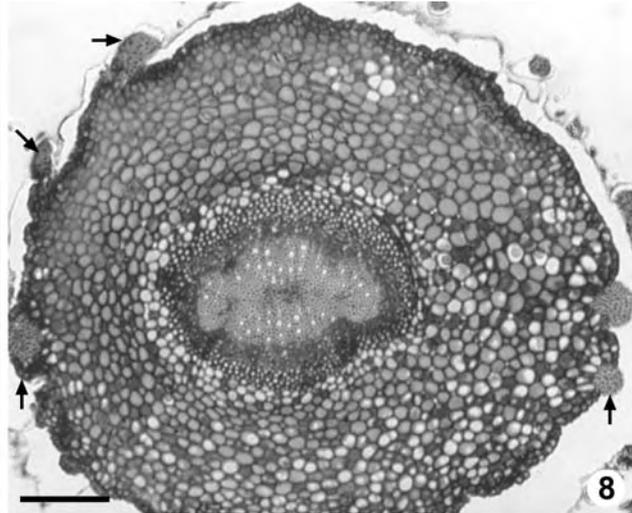
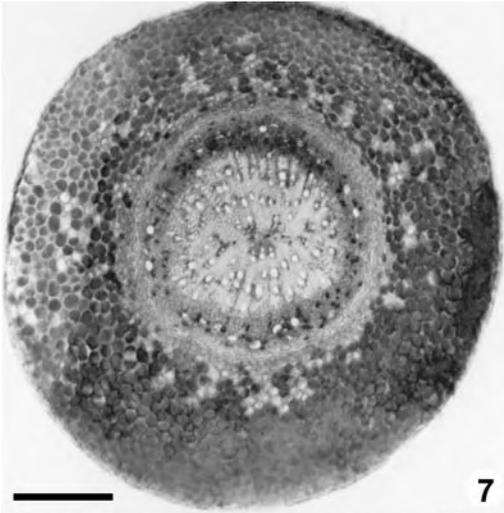
4

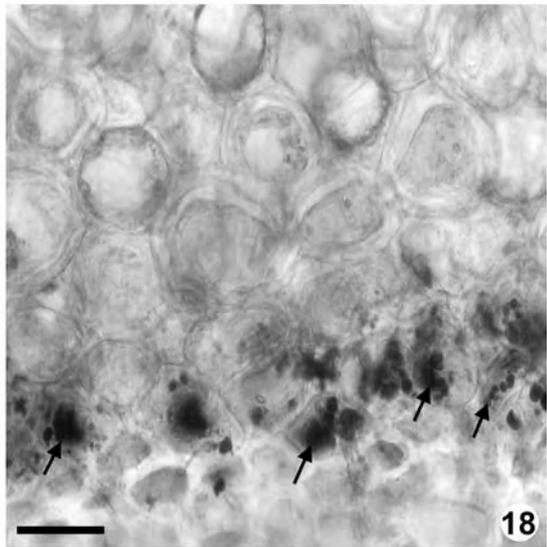
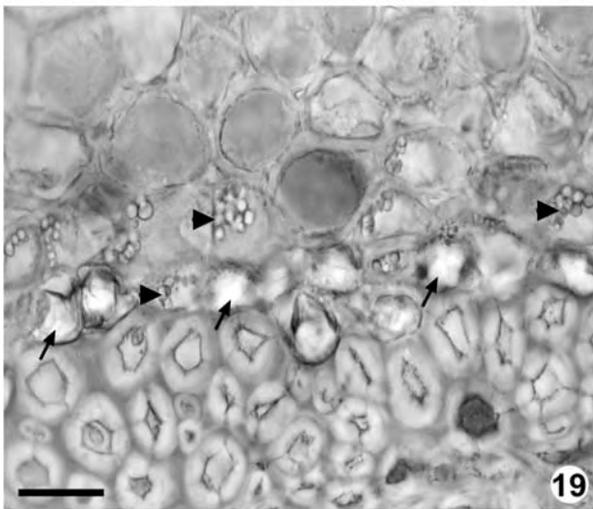
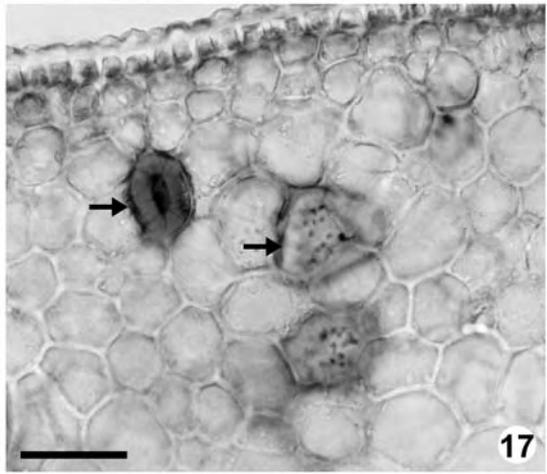
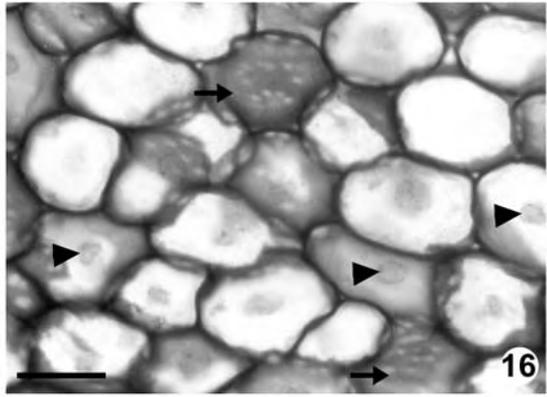
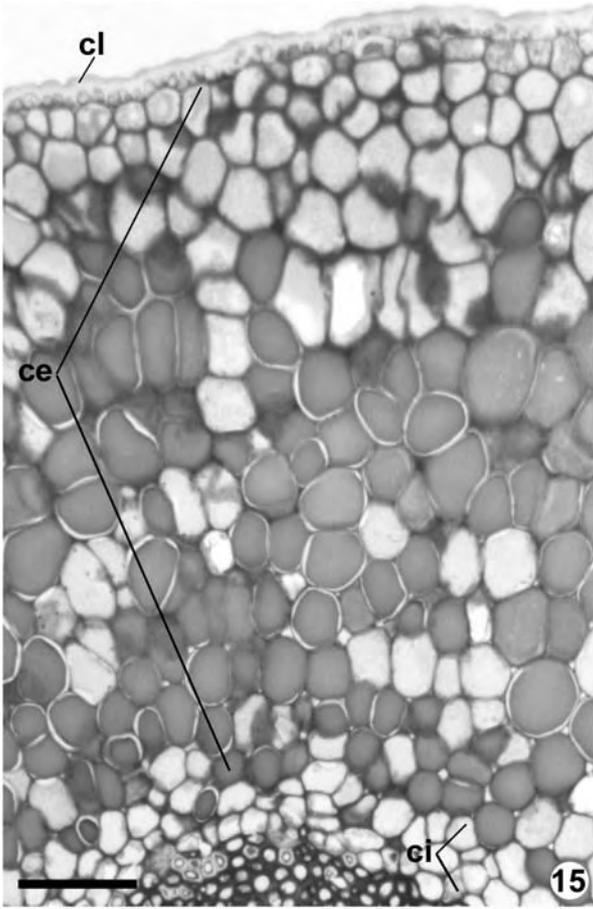


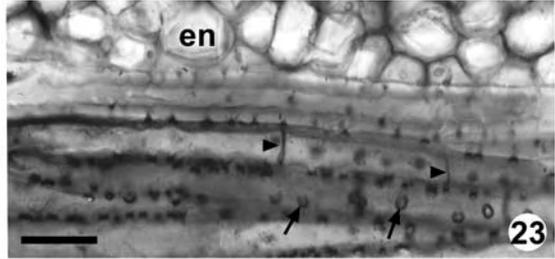
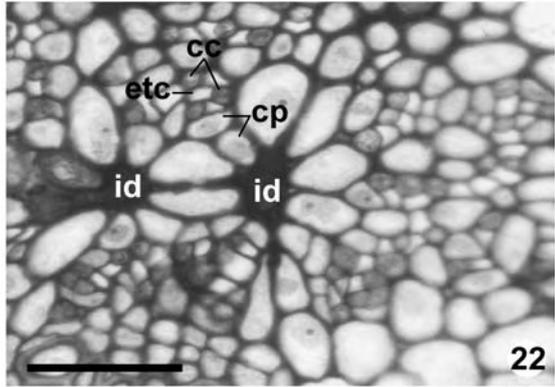
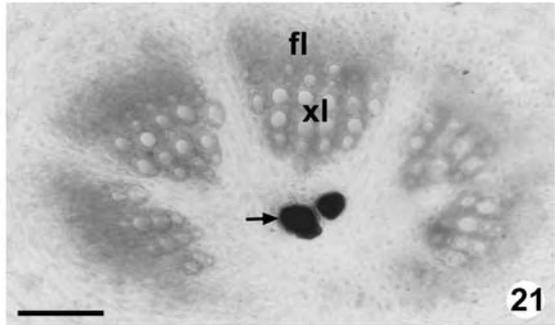
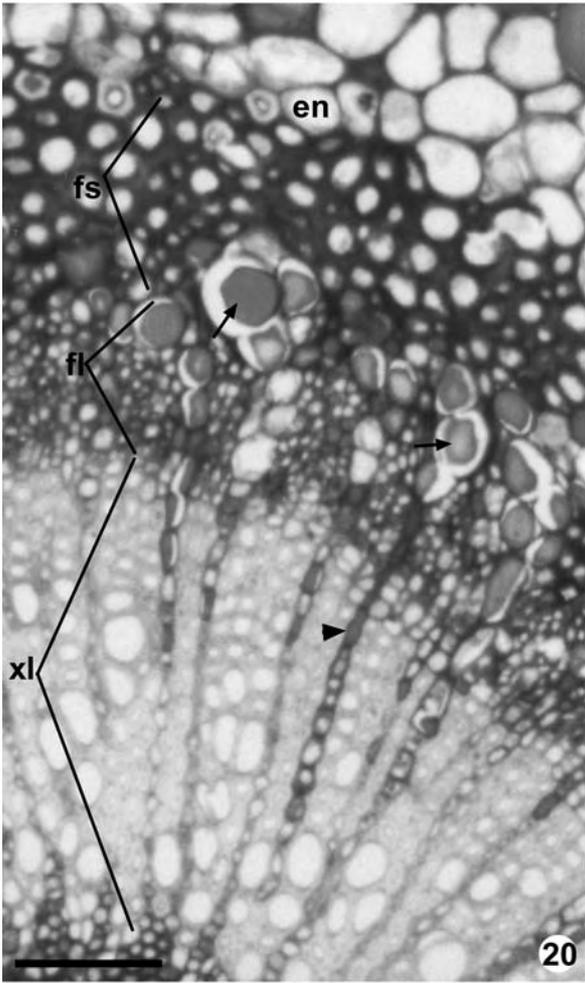
5



6







Legenda das Figuras

Figuras 1-6. Secções transversais do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 1-6. Aspecto geral mostrando epiderme unisseriada, córtex parenquimático desenvolvido, sistema vascular central e medula reduzida. Observar o conteúdo denso (compostos fenólicos) das células corticais nas figuras 1-5. 1. *Bauhinia rufa* (Barra= 350 μm). 2. *Copaifera langsdorffii* (Barra= 350 μm). 3. *Senna rugosa* (Barra= 350 μm). 4. *Andira humilis* (Barra= 350 μm). 5. *Dalbergia miscolobium* (Barra= 350 μm). 6. *Zornia diphylla* (Barra= 180 μm).

Figuras 7-14. Secções transversais do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 7-9. Aspecto geral mostrando epiderme unisseriada, córtex parenquimático desenvolvido, sistema vascular central e medula ausente ou reduzida. 7. *Mimosa rixosa*. Observar o conteúdo denso (compostos fenólicos) das células corticais (Barra= 250 μm). 8. *Mimosa flexuosa*. Notar a ocorrência de protuberâncias lignificadas (setas) na superfície do pulvino e o conteúdo denso (compostos fenólicos) das células corticais (Barra= 160 μm). 9. *Stryphnodendron polyphyllum*. Observar cristais prismáticos de oxalato de cálcio (setas) no córtex (Barra= 250 μm). 10. Detalhe da figura 8 mostrando protuberância formada por células lignificadas na superfície do pulvino. Notar a presença de vacuoma desenvolvido nas células corticais externas e a ocorrência de espaços intercelulares (Barra= 30 μm). 11. *Bauhinia rufa* com tricomas tectores, epiderme unisseriada formada por células papilosas com conteúdo fenólico revestidas por cutícula espessa e células corticais (ct) subepidérmicas com conteúdo fenólico (Barra= 30 μm). 12. *Bauhinia rufa*, em secção transversal, mostrando epiderme (ep) repleta de conteúdo fenólico e células corticais subepidérmicas em divisão periciclinal (setas) e anticlinal. Notar a presença de compostos fenólicos e de cristais em formato de drusa (pontas de seta) nas células corticais (Barra= 50 μm). 13. *Copaifera langsdorffii* mostrando epiderme

unisseriada recoberta por cutícula (cl) espessa e canal secretor (cs) no córtex. A seta indica cristal prismático de oxalato de cálcio no córtex externo (Barra= 50 μm). 14. *Zornia diphylla* mostrando células epidérmicas (ep) retangulares recobertas por cutícula delgada e córtex parenquimático com células de volumosas, paredes delgadas sinuosas, núcleo conspícuo (setas) e ausência de conteúdo fenólico (Barra= 30 μm).

Figuras 15-19. Secções transversais do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 15. Pulvino de *Andira humilis* mostrando epiderme unisseriada recoberta por cutícula (cl) espessa e córtex parenquimático desenvolvido dividido em região cortical externa (ce), onde são observadas células volumosas com conteúdo fenólico, e córtex interno (ci), onde ocorrem células menos volumosas que não apresentam conteúdo fenólico (Barra= 100 μm). 16. Córtex externo do pulvino de *Zornia diphylla* mostrando células volumosas e isodiamétricas, de paredes sinuosas com campos de pontoação primários (setas) e núcleo conspícuo (pontas de seta) (Barra= 30 μm). 17. Secção do pulvino de *Andira humilis* tratada com floroglucina acidificada mostrando epiderme unisseriada revestida por cutícula espessa e a presença de esclereides (setas) no córtex externo (Barra= 50 μm). 18. Secção tratada com lugol evidenciando presença de grãos de amido (setas) na endoderme do pulvino de *Mimosa rixosa* (Barra= 30 μm). 19. Pulvino de *Bauhinia rufa* mostrando cristais prismáticos de oxalato de cálcio (setas) e grãos de amido (pontas de seta) na endoderme e camadas adjacentes (Barra= 25 μm).

Figuras 20-23. Secções do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 20. Detalhe do pulvino de *Andira humilis* em secção transversal mostrando endoderme (en), fibras septadas (fs), floema (fl) com idioblastos fenólicos (setas) e xilema (xl) com raios parenquimáticos contendo células repletas de tanino (ponta de seta) (Barra= 100 μm). 21. Secção transversal

do pulvino de *Zornia diphylla* mostrando aspecto geral do sistema vascular, onde se nota o floema (fl), xilema (xl) e medula reduzida com idioblastos fenólicos (seta) (Barra= 50 μm).

22. Secção transversal mostrando floema do pulvino de *Mimosa flexuosa* onde são observados elementos de tubo crivado (etc), células companheiras (cc), células parenquimáticas (cp) e idioblastos (id) mucilaginoso (Barra= 30 μm). 23. Secção longitudinal do pulvino de *Andira humilis* mostrando endoderme (en) com cristais de oxalato de cálcio e fibras septadas com paredes espessas com campos de pontuação primários (setas) e septos (pontas de seta) evidentes (Barra= 30 μm).

Capítulo 2

Endoderme do pulvino primário de leguminosas: estrutura e conteúdo ³

TATIANE MARIA RODRIGUES ² e SILVIA RODRIGUES MACHADO ^{2,3}

³ Parte de Dissertação de Mestrado da primeira autora, vinculada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas/Botânica, Área de Concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

² Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Câmpus de Botucatu. Caixa Postal 510, CEP 18618-000. Botucatu, SP, Brasil.

³ Autor para correspondência: smachado@ibb.unesp.br

ABSTRACT – (Endodermis of leguminous species primary pulvinus: structure and content).

The pulvini, structures responsible for leguminous species leaf movements, have an inner cortical layer well delimited that is considered a typical endodermis. Its content is variable and has been associated to the leaf movement velocity and kind: pulvini with fast nastic movements show a large amount of starch grains in the endodermis; pulvini with slow nastic movements have calcium oxalate crystals beside the starch grains. However, such studies were carried out with few leguminous species. To verify if this pulvinus structure-functioning relation is consistent and extensive to other legumes, in this work we investigated the structure and content of the pulvinus endodermic cells of nine leguminous species from Brazilian cerrado, with different leaf movement kinds and velocity. For this, samples of primary pulvinus median region were prepared following vegetal anatomy and ultrastructure usual techniques. The endodermis in all species is easily discerned and feature by absence of phenolic compounds and presence of starch grains. In the species with only slow nastic and heliotropic movements, besides the starch grains, the endodermic cells have calcium oxalate prismatic crystals. In *Zornia diphylla*, species with only heliotropic movements, the cell features are similar to those species with fast nastic movements. The abundance of starch grains and crystals vary according to the movement kind and velocity. The relation between endodermic cell content and the nastic leaf movement velocity was confirmed in this study.

Key words- starch grains, crystals, endodermis, gravity, pulvinus, leaf movement

RESUMO – (Endoderme do pulvino primário de leguminosas: estrutura e conteúdo). Os pulvinos, estruturas responsáveis pelos movimentos foliares nas leguminosas, apresentam a camada cortical interna bem delimitada, sendo considerada uma endoderme típica. Seu conteúdo é variável e tem sido associado com a velocidade e o tipo de movimento foliar:

pulvinos com movimentos násticos rápidos apresentam grande quantidade de grãos de amido na endoderme; já, pulvinos com movimentos násticos lentos possuem cristais de oxalato de cálcio, além dos grãos de amido. Entretanto, tais estudos foram conduzidos em poucas espécies de leguminosas. Para verificar se tal relação estrutura-funcionamento do pulvino é consistente e extensiva às demais leguminosas, neste trabalho foram investigados a estrutura e o conteúdo das células endodérmicas do pulvino primário de nove espécies de leguminosas nativas do cerrado, com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar. Para isso, amostras da região mediana do pulvino primário foram processadas utilizando-se técnicas usuais para estudos em anatomia e ultra-estrutura vegetal. A endoderme em todas as espécies é facilmente distinguível e se caracteriza pela ausência de compostos fenólicos e presença de grãos de amido. Nas espécies que apresentam somente movimento foliar nástico e heliotrópico lentos, além dos grãos de amido, as células endodérmicas possuem cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Em *Zornia diphylla*, espécie que apresentam somente movimentos heliotrópicos, as características celulares são similares à das espécies que apresentam movimentos násticos rápidos. A abundância de grãos de amido e de cristais varia de acordo com o tipo e a velocidade do movimento. A relação entre conteúdo celular da endoderme do pulvino e a velocidade de movimento foliar de nastia foi comprovada neste estudo.

Palavras-chave- amido, cristais de oxalato de cálcio, endoderme, gravidade, movimento foliar, pulvino

Introdução

Muitas espécies de angiospermas são capazes de realizar movimentos do tipo nictinásticos, seismonásticos, heliotrópicos ou gravitrópicos, entre outros, levando a alterações no posicionamento de órgãos vegetais.

A gravidade é um dos fatores que servem como guia para o crescimento de órgãos vegetais, sendo os movimentos gravitrópicos responsáveis pelo posicionamento apropriado das folhas que garante a eficiência fotossintética e trocas gasosas (Chen *et al.* 1999). Entretanto, existem poucos estudos sobre os processos de movimentação de folhas de dicotiledôneas em resposta à gravidade, especialmente no que se refere ao papel dos pulvinos (Fleurat-Lessard 1981). A maior parte dos trabalhos relata o papel dos pulvinos na gravi-resposta em caules e folhas de cereais (Dayanandan *et al.* 1977, Kaufman *et al.* 1987, Song *et al.* 1988, Chang *et al.* 2001).

Nas leguminosas, o posicionamento foliar adequado é assegurado pelo funcionamento dos pulvinos localizados na base das folhas e folíolos. Histologicamente, o pulvino é caracterizado por apresentar córtex parenquimático amplo, sistema vascular em posição central com escassez de lignificação e medula reduzida ou ausente (Campbell & Garber 1980, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991, Rodrigues & Machado 2004, Machado & Rodrigues 2004). A camada cortical mais interna dos pulvinos constitui-se numa endoderme, conforme diferentes autores (Toriyama 1954, Fleurat-Lessard 1981, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991, Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado 2004) e tem sido considerada a responsável pela percepção da gravidade em folhas devido à presença de amiloplastos (Fleurat-Lessard 1981, Fleurat-Lessard 1988).

Em literatura encontram-se referências esparsas sobre uma possível relação entre o conteúdo celular da endoderme dos pulvinos das leguminosas e o tipo de movimento foliar apresentado. Assim, pulvinos responsáveis por movimentos foliares násticos rápidos

apresentam somente grãos de amido na endoderme (Fleurat-Lessard 1988), enquanto que pulvinos de folhas com movimentos násticos lentos, além dos grãos de amido possuem cristais de oxalato de cálcio nas células endodérmicas (Morse & Satter 1979). Entretanto, grande parte dos trabalhos refere-se a poucas espécies de leguminosas como *Robinia pseudoacacia* L. (Moysset & Simón 1991), *Albizzia julibrissin* Durass. (Campbell & Garber 1980) e *Mimosa pudica* L. (Fleurat-Lessard 1988), sendo esta a espécie mais estudada e caracterizada por movimentos foliares rápidos. Assim, torna-se necessário o estudo de um número maior de espécies, com diferentes tipos e velocidades de movimentos foliares, a fim de verificar se tal associação é consistente e de ocorrência geral entre as leguminosas. Neste trabalho, são apresentados a estrutura e o conteúdo das células endodérmicas do pulvino primário de nove espécies de leguminosas nativas do cerrado, com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar.

Material e métodos

Foram selecionadas espécies com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar: movimentos nictinástico e heliotrópico lentos (*Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa* - Caesalpinioideae; *Andira humilis* e *Dalbergia miscolobium* - Faboideae; *Stryphnodendron polyphyllum* - Mimosoideae), movimento heliotrópico lento (*Zornia diphylla* - Faboideae) e movimentos seismonástico rápido e nictinástico e heliotrópico lentos (*Mimosa rixosa* e *Mimosa flexuosa* - Mimosoideae). As espécies estudadas foram agrupadas em três subfamílias segundo classificação de Polhill *et al.* (1981). Amostras da região mediana do pulvino primário foram retiradas de folhas completamente expandidas, coletadas de exemplares vegetando em cerrado no município de Pratânia-SP (S 22°48'50.2" e W 48°44'35.8"). Exsicatas foram depositadas no Herbário BOTU, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.

Estudo anatômico

As amostras foram fixadas em FAA 50 por 48 horas (Johansen 1940). A seguir, parte foi desidratada em série etílica, incluída em resina metacrilato e seccionada em micrótomo rotativo semi-automático; os cortes, com 6µm a 8µm de espessura, foram corados com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montados entre lâmina e lamínula com Permunt. Outra parte das amostras foi estocada em álcool 70%, e posteriormente seccionada com auxílio de micrótomo de Ranvier; os cortes com 14µm de espessura foram clarificados em hipoclorito de sódio a 20%, lavados em água acética 1%, corados com Safrablau (Bukatsch 1972; Burger & Richter 1991) e montados entre lâmina e lamínula com glicerina. Para os testes histoquímicos, cortes de material recém coletado, não fixado, foram tratados com Sudan IV para detecção de substâncias lipídicas (Johansen 1940); solução de Vermelho de Rutênio a 0,02% para substâncias pécicas (Jensen 1962); cloreto de zinco iodado para detecção de amido (Jensen 1962); solução de cloreto férrico a 10% para substâncias fenólicas (Johansen 1940); floroglucina acidificada para lignina (Sass 1951) e ácido clorídrico a 10% para cristais de oxalato de cálcio (Johansen 1940). Os aspectos relevantes foram fotografados em fotomicroscópio Zeiss[®], utilizando filme Kodak[®] Asa 100 e T-Max Asa 100.

Estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para o estudo das características subcelulares, amostras da região mediana de pulvinos foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 1 hora, desidratadas em série cetônica e embebidas em Araldite[®] (Machado & Rodrigues 2004). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila (Watson 1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963), e então, examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips[®] EM 301.

Resultados

O pulvino em todas as espécies estudadas apresenta córtex parenquimático bastante desenvolvido, onde se distinguem o córtex externo formado por várias camadas de células volumosas repletas de conteúdo fenólico, e o córtex interno constituído por duas ou três camadas de células menores sem conteúdo fenólico como revelou a coloração com Azul de Toluidina (figura 1), confirmado pelo teste com o cloreto férrico. A última camada cortical é facilmente distinguível das demais pelo formato alongado ou ovóide e disposição compacta das células (figuras 1-5, 8, 9), parede periclinal interna relativamente mais espessada (figuras 2, 4, 5), citoplasma denso e presença de grãos de amido (figuras 5, 9) que reagem positivamente ao cloreto de zinco iodado (figuras 6-8, 10). Testes com Sudan IV produziram resultados negativos, não sendo visualizadas estrias de Caspary nestas células. Em *Copaifera langsdorffii* (figura 11), *Andira humilis* (figura 12), *Bauhinia rufa* (figura 13), *Senna rugosa* e *Stryphnodendron polyphyllum* as paredes anticlinais e periclinal interna das células endodérmicas mostram um espessamento em formato de “U” discretamente lignificado evidenciado pelo tratamento com floroglucina acidificada.

Em *Zornia diphylla* (figura 7), *Mimosa rixosa* (figuras 6, 9, 10) e *M. flexuosa* os grãos de amido são mais abundantes e volumosos que nas demais espécies (figuras 5, 8). As células parenquimáticas do córtex interno, adjacentes à endoderme, apresentam grãos de amido esparsos e menores (figuras 8-10). Em *Bauhinia rufa* (figura 4), *Copaifera langsdorffii* (figura 5), *Senna rugosa* (figura 2) e *Andira humilis* (figuras 3, 12) as células endodérmicas apresentam, além de grãos de amido, cristais prismáticos de oxalato de cálcio que sofrem dissolução sob tratamento com ácido clorídrico a 10%. Na endoderme de *Dalbergia miscolobium* e *Stryphnodendron polyphyllum* esses cristais são menos abundantes. Em *Zornia diphylla*, *Mimosa rixosa* e *M. flexuosa* não foram observados cristais prismáticos de oxalato

de cálcio nas células endodérmicas. O conteúdo das células endodérmicas das espécies estudadas está apresentado no quadro 1.

Ultra-estruturalmente, as células endodérmicas de modo geral apresentam paredes elétron-densas (figuras 14 -17) com campos de pontuação primários (figura 15) e plasmodesmos amplos que conectam as células endodérmicas entre si (figuras 15, 20) e com as células das camadas adjacentes (figuras 15, 17). Espaços intercelulares são pequenos (figura 15) ou estão ausentes (figura 14). O núcleo pode ser conspícuo com nucléolo evidente, esférico de contorno variável (figura 16), ou alongado e reduzido (figura 21) e caracteristicamente situa-se no pólo apical da célula (figura 16); os vacúolos são de tamanho e posição variáveis (figuras 14-16, 19, 21); no citoplasma são observados polirribossomos, mitocôndrias (figuras 17 - 19, 21), dictiossomos pouco desenvolvidos (figuras 18), retículo endoplasmático (figuras 20, 21) e amiloplastos (figuras 14-18). O retículo endoplasmático liso pode ser observado nas adjacências da membrana plasmática, especialmente mais abundantes nas regiões dos campos de pontuação primários (figura 20) ou na forma de túbulos longos extensivos pelo citoplasma (figura 21).

Os amiloplastos são caracterizados pelo formato ovóide a esférico e cada um apresenta grãos de amido elipsóides em número e tamanhos variáveis (figuras 14-18); são mais abundantes nas duas espécies de *Mimosa* e em *Zornia diphylla* (figura 18). A distribuição dos amiloplastos nas células endodérmicas apresenta certo grau de polaridade, visto que ocorrem em aglomerados na face periclinal interna (figura 14) ou na externa (figura 15). O contorno do núcleo varia conforme a posição dos amiloplastos, sendo irregular (figura 16) ou profundamente lobado quando os amiloplastos estão próximos a ele, no pólo apical da célula endodérmica. Quando os amiloplastos estão na face oposta, o núcleo apresenta formato esférico, de contorno regular.

As células endodérmicas que possuem cristais prismáticos de oxalato de cálcio, em geral apresentam as paredes periclinal interna e a porção inferior das paredes anticlinais mais espessadas e elétron-densas (figura 22). Em *Stryphnodendron polyphyllum* os cristais prismáticos de oxalato de cálcio ocupam a maior parte do protoplasto da célula endodérmica e aparecem envolvidos por uma parede celulósica não-lignificada, de espessura irregular (figuras 23-26), ficando o núcleo e o citoplasma com suas organelas confinados a uma pequena porção periférica da célula (figuras 23-25). No citoplasma são observadas mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático liso e numerosas gotas de óleo de diversos tamanho (figuras 23-24). Nas adjacências da uma parede delgada que envolve um cristal (figura 26), o citoplasma é mais abundante que em outras regiões da célula e apresenta retículo endoplasmático extensivo e dictiossomos hiperativos com numerosas vesículas adjacentes, muitas delas em contato com a membrana plasmática (figura 27), o que indica síntese e deposição de material parietal.

Discussão

A relação entre o conteúdo celular da endoderme do pulvino e a velocidade de movimento foliar sugerida em literatura (Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991) foi comprovada neste estudo. As células da endoderme do pulvino das espécies com movimentos foliares násticos rápidos, como *Mimosa rixosa* e *M. flexuosa*, apresentaram somente grãos de amido, enquanto que nas espécies que apresentam movimentos nictinásticos lentos, além dos grãos de amido foram encontrados cristais prismáticos de oxalato de cálcio. *Zornia diphylla*, espécie que apresenta somente movimentos heliotrópicos lentos, não possui cristais de oxalato de cálcio na endoderme, o que sugere que a relação entre o conteúdo dessas células e a velocidade de movimento apresentada é válida somente para espécies que apresentam movimentos násticos.

A presença de uma endoderme com características peculiares no pulvino primário de todas as espécies estudadas está de acordo com o descrito para pulvinos de outras leguminosas (Toriyama 1954, Fleurat-Lessard 1981, Fleurat-Lessard 1988, Moysset & Simón 1991, Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado 2004). Ocorrência de endoderme com ou sem estrias de Caspary, estrias e amido ou somente amido, em folhas e caules aéreos é uma característica comum em angiospermas (Lersten 1997) e indica a continuidade estrutural e funcional dos tecidos através da raiz, caule e folha (Menezes *et al.* 2005). Van Fleet (1950, 1961) demonstrou que as denominadas “células limitantes” ou “bainha amilífera” ou “bainha dos feixes vasculares” que circundam o sistema vascular em caules e folhas possuem características histoquímicas como as de uma endoderme típica de raiz e que elas podem se desenvolver como tal. Segundo Van Fleet (1961), uma endoderme pode permanecer em seu estágio primário, isto é, apenas com as estrias de Caspary, sofrer deposição de suberina nas paredes ou ainda, deposição adicional de uma parede secundária sobre o depósito de suberina. Esse espessamento pode ser simétrico (em forma de “O”) ou assimétrico (em forma de “U”), o qual pode sofrer lignificação como observado no pulvino das espécies de Caesalpinioideae aqui estudadas. A função dessas deposições parietais nas células endodérmicas permanece desconhecida em órgãos aéreos (Lersten 1997); entretanto, pode-se considerar que da mesma forma que na raiz, sua função seja delimitar e direcionar o fluxo de substâncias entre o córtex e o cilindro vascular do pulvino.

No presente estudo, constatou-se que a distribuição das organelas nas células endodérmicas dos pulvinos segue o relatado por Chen *et al.* (1999) para as raízes. Este autor descreve os estatocitos como células altamente polarizadas que contêm retículo endoplasmático em posição periférica, núcleo posicionado no meio ou no pólo apical e amiloplastos densos sedimentados “no fundo” da célula. Segundo Fleurat-Lessard (1981, 1988) e Chang *et al.* (2001), a polaridade exibida pelas células endodérmicas está relacionada

ao papel principal dessa camada celular, que é a percepção da gravidade. Segundo Fleurat-Lessard (1981), nas folhas em posição normal, os amiloplastos estão localizados na face interna da célula endodérmica, enquanto o núcleo está situado no pólo apical. Após a inversão de posicionamento da planta, os amiloplastos se movem para o pólo da célula onde está o núcleo, que caracteristicamente se localiza no pólo apical da célula. Embora no presente estudo não tenham sido realizados estudos experimentais, as diferenças na posição dos amiloplastos nas células endodérmicas possivelmente estão associadas com o posicionamento foliar.

As espécies que apresentam movimentos násticos rápidos e somente heliotrópicos lentos evidenciaram grãos de amido em maior abundância e mais volumosos que nas demais espécies estudadas. Esses resultados sugerem que existe uma relação entre a quantidade e o volume dos grãos de amido com o tipo e velocidade do movimento foliar, conforme relatado em literatura (Chang *et al.* 2001, Song *et al.* 1988). Song *et al.* (1988) relataram que quando o amido se acumula nos plastídios em quantidade suficiente para causar a sedimentação dessas organelas, ocorre a curvatura do pulvino em resposta a gravidade. Porém, se os plastídios contêm quantidade insuficiente de amido eles não sedimentam e os pulvinos não manifestam curvatura.

O papel dos amiloplastos na curvatura do pulvino é bem estabelecido. De acordo com Chang *et al.* (2001), durante a sedimentação dos amiloplastos, o contato destas organelas com o retículo endoplasmático ocasionaria a abertura de canais de cálcio nesta membrana, levando a uma rápida distribuição de íons no citosol e mudanças na fosforilação de proteínas contráteis, principalmente da actina. Segundo Sievers *et al.* (1991), a ação gerada pela sedimentação dos amiloplastos poderia alterar a membrana plasmática ou a membrana do retículo, levando a ativação de canais mecano-sensitivos. A abertura desses canais poderia, então, permitir um aumento no fluxo de cálcio citoplasmático, desencadeando a transdução do

sinal e levando a produção de sinais fisiológicos. O envolvimento do cálcio citosólico como segundo mensageiro na transdução dos sinais da gravidade nos estatocitos tem sido hipotetizado por Chen *et al.* (1999). O gravitropismo é afetado por bloqueadores dos canais ativados resultantes de estiramento das membranas, por inibidores de calmodulina ou por atividade da cálcio-ATPase (Sievers & Busch 1992). Além disso, altas concentrações de cálcio foram encontradas nos estatocitos (Chandra *et al.* 1982). A distribuição do retículo endoplasmático nas células endodérmicas corrobora essa teoria.

Cristais de oxalato de cálcio ocorrem em muitas espécies de plantas na maioria dos órgãos e tecidos, mas pouco se sabe sobre sua função nas células. Segundo Franceschi & Horner (1980), há evidências de que a síntese de oxalato está relacionada ao balanço iônico; assim, os cristais seriam a manifestação de um esforço para manter o equilíbrio iônico. Além disso, conforme observado por Paiva & Machado (2005) no floema de folhas de *Peltodon radicans* a formação de cristais de cálcio na bainha do feixe vascular seria um mecanismo regulador dos níveis de cálcio no elemento de tubo crivado. Com relação à presença de cristais nas células endodérmicas do pulvino não foram encontradas explicações em literatura; contudo, fica evidente que exercem algum tipo de influência sobre o movimento foliar, uma vez que, estão presentes somente em espécies com movimentos foliares lentos. Uma possível explicação seria o fato de que o cálcio imobilizado na forma de cristais não poderia atuar na produção de sinais fisiológicos, o que impediria a resposta rápida dos tecidos do pulvino a um estímulo. Já nos pulvinos com movimentos rápidos, o cálcio se apresenta na forma livre, estando assim disponível para as reações cálcio-dependentes.

Segundo Metcalfe & Chalk (1950) a ocorrência de cristais solitários envoltos por espessamentos das paredes celulares no córtex primário, como observado na endoderme de *Stryphnodendron polyphyllum*, é comum em leguminosas e caracteriza o que se conhece por células cristárquicas. Embora não tenham sido estudadas ontogeneticamente, os dados

indicam que a compartimentalização dessas células se dá após a formação do cristal. A observação de retículo endoplasmático e de dictiossomos hiperativos com numerosas vesículas nas adjacências da membrana plasmática das células endodérmicas de *Stryphnodendron polyphyllum* portadoras de cristais prismáticos indicam intensa síntese de material de parede.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que o conteúdo celular da endoderme dos pulvinos das leguminosas tem relação direta com a velocidade do movimento nástico que as folhas apresentam.

Agradecimentos

À FAPESP pela concessão de Bolsa de Mestrado à T.M. Rodrigues (MS 03/11050-7) e apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho (Programa Biota 00/12469-3), ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa a S.R. Machado e à equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu pelo apoio no preparo das amostras.

Referências Bibliográficas

- BUKATSCH, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 61 (8): 255.
- BURGER, L.M. & RICHTER, H.G. 1991. Anatomia da Madeira. Livraria Nobel: São Paulo.
- CAMPBELL, N.A. & GARBER, R.C. 1980. Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizzia* during leaf movement. Planta 148: 251-255.
- CHANDRA, S., CHABOT, J.F., MORISSON, G.H. & LEOPOLD, A.C. 1982. Localization of Ca²⁺ in amyloplasts of root cap cells using ion microscopy. Science 216: 1221-1223,

- CHANG, S-C., CHO, M.H., KANG, B.G. & KAUFMAN, P.B. 2001. Changes in starch content in oat (*Avena sativa*) shoot pulvini during the gravitropic response. *Journal of Experimental Botany* 52: 1029-1040.
- CHEN, R., ROSEN, E. & MASSON, P.H. 1999. Gravitropism in higher plants. *Plant Physiology* 120: 343-350.
- DAYANANDAN, P., HEBARD, F.V., BALDWIN, V.D. & KAUFMAN, P.B. 1977. Structure of gravity-sensitive sheath and internodal pulvini in grass shoots. *American Journal of Botany* 64 (10): 1189-1199.
- FRANCHESCHI, V.R. & HORNER, H.T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* 46 (4): 361-427.
- FLEURAT-LESSARD, P. 1981. Ultrastructural features of the starch sheath cells of the primary pulvinus after gravistimulation of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). *Protoplasma* 105: 177-184.
- FLEURAT-LESSARD, P. 1988. Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. *Biological Review* 63: 1-22.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principle and practice*. W.H. Freeman, San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- KAUFMAN, P.B., BROCK, T.G. & SONG, I. 1987. How cereal grass shoots perceive and respond to gravity. *American Journal of Botany* 74 (9): 1446-1457.
- LERSTEN, N.R. 1997. Occurrence of endodermis with a Casparian strip in stem and leaf. *The Botanical Review* 63 (3): 265-272.
- MACHADO, S.R. & RODRIGUES, T.M. 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27 (1): 135-147.

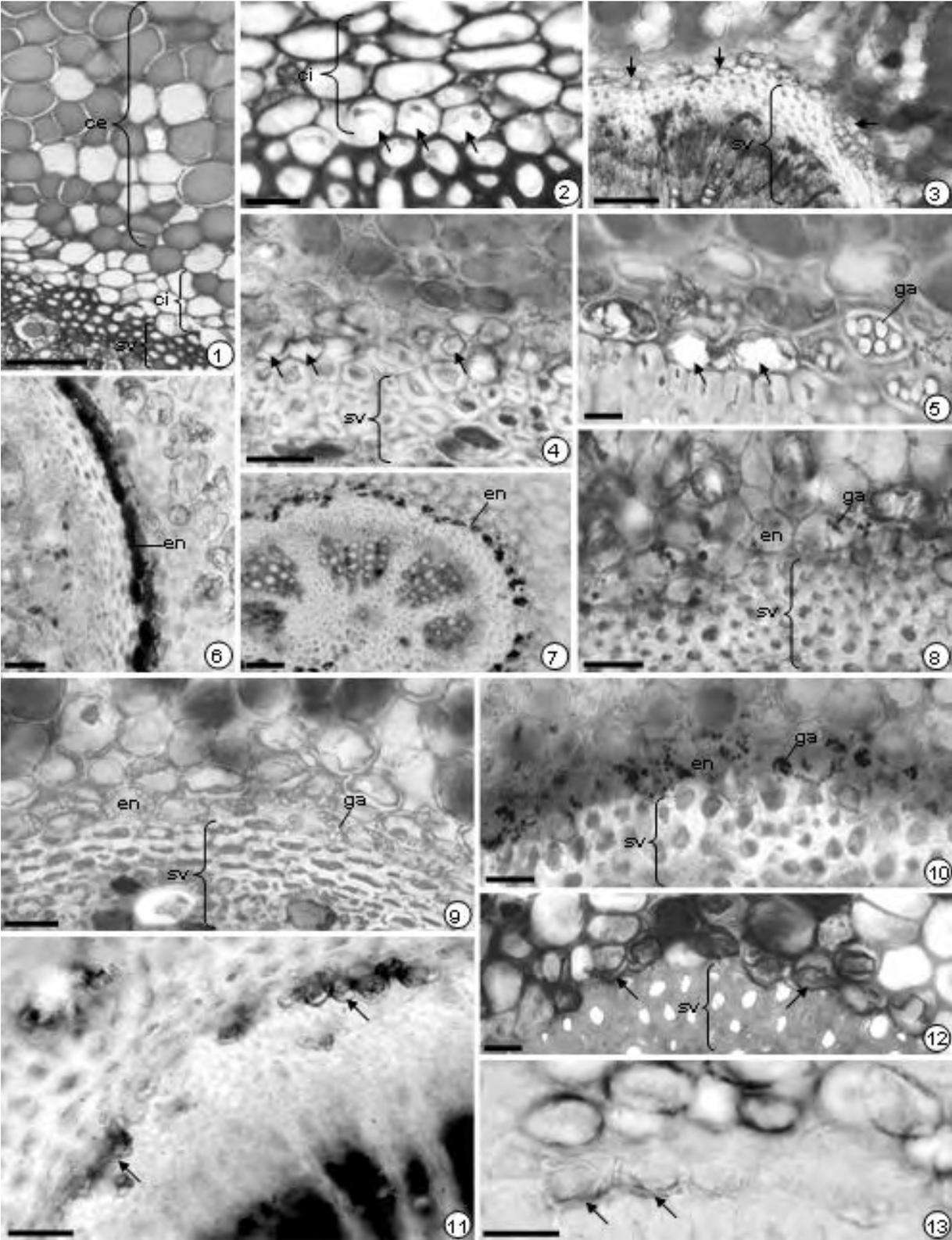
- MENEZES, N.L., SILVA, D.C., ARRUDA, R.C.O., MELO-DE-PINA, G.F., CARDOSO, V.A., CASTRO, N.M., SCATENA, V.L. & SCREMIN-DIAS, E. 2005. Meristematic activity of the endodermis and the pericycle in the primary thickening in monocotyledons. Considerations on the "PTM". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77 (2): 259-274.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. VI. Clarendon Press, Oxford.
- MORSE, M.J. & SATTER, R.L. 1979. Relationship between motor cell ultrastructure and leaf movements in *Samanea saman*. *Physiology Plantarum* 46: 338-346.
- MOYSSET, L. & SIMÓN, E. 1991. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *American Journal of Botany* 78:1467-1486.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & McCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.
- PAIVA, E.A.S. & MACHADO, S.R. 2005. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (1): 147-153.
- POLHILL, R.M. 1981. *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate and high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-212.
- RODRIGUES, T.M. & MACHADO, S.R. 2004. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Botanica Brasilica* 18 (2): 381-390.
- SASS, J.E. 1951. *Botanical microtechnique*. 2.ed. Iowa State University Press, Ames.

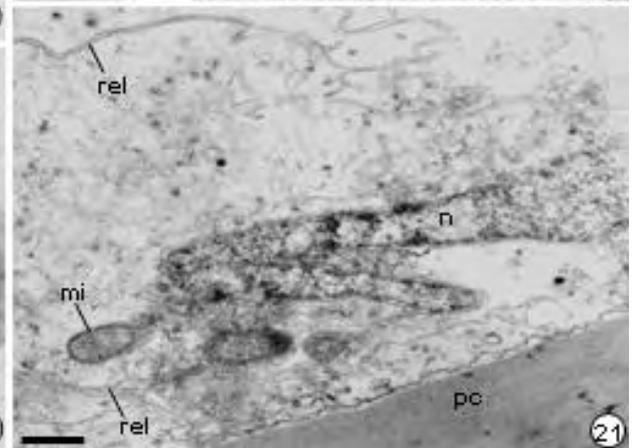
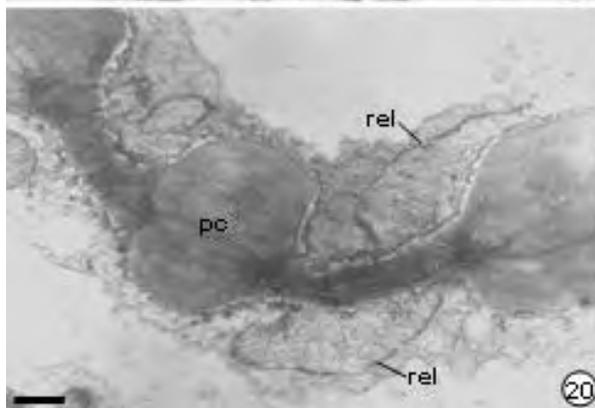
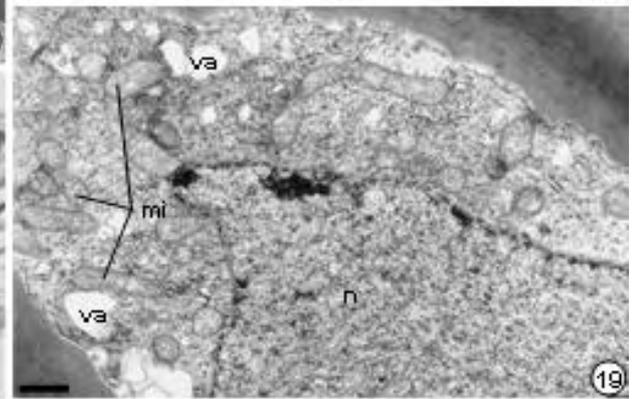
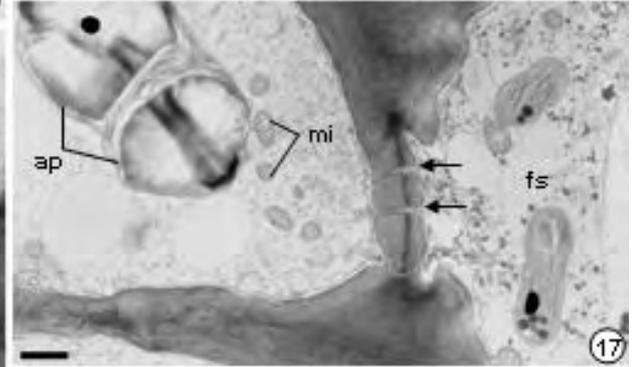
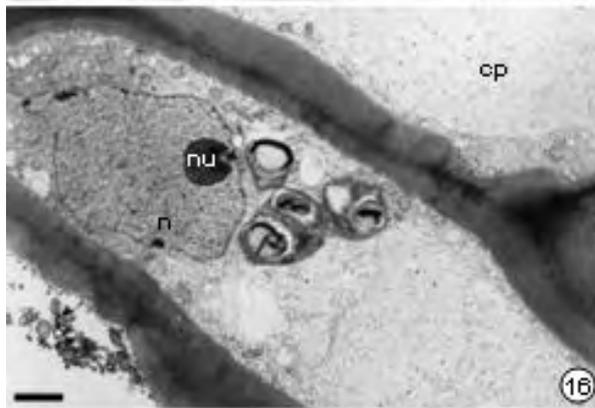
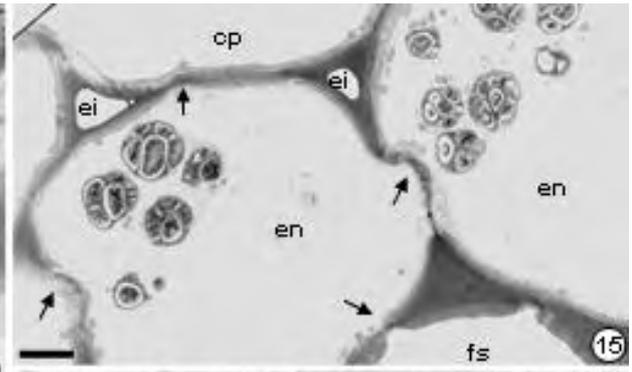
- SIEVERS, A., BUCHEN, B., VOLKMANN, D. & HEJNOWICZ, Z. 1991. Role of the cytoskeleton in gravity perception. In *The cytoskeleton basis of plant growth and form* (C.W. LLOYD, ed.). Academic Press, London, pp 169-182.
- SIEVERS, A. & BUSCH, M.B. 1992. An inhibitor of the Ca²⁺-ATPases in the sarcoplasmic reticula inhibits transduction of the gravity stimulus in cress roots. *Planta* 188: 619-622.
- SONG, I., LU, C.R., BROCK, T.G. & KAUFMAN, P.B. 1988. Do Starch statoliths act as gravisensors in cereal grass pulvini? *Plant Physiology* 86: 1155-1162.
- TORIYAMA, H. 1954. Observational and experimental studies of sensitive plants. II. On the changes in motor cells of diurnal and nocturnal condition. *Cytologia* 19: 29-40.
- VAN FLEET, D.S. 1950. The cell forms, and their common substance reactions, in the parenchyma-vascular boundary. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 77 (5): 340-353
- VAN FLEET, D.S. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *The Botanical Review* 27: 165-221.
- WATSON, M.L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4: 475.

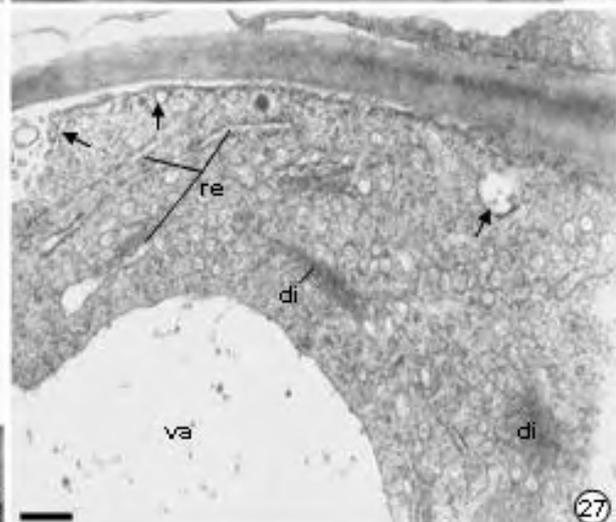
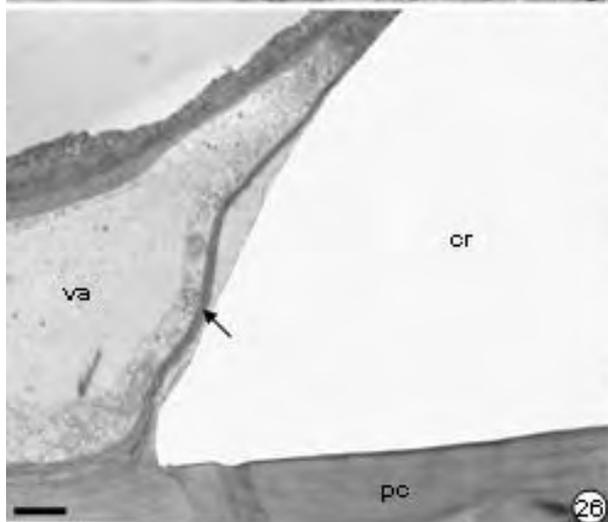
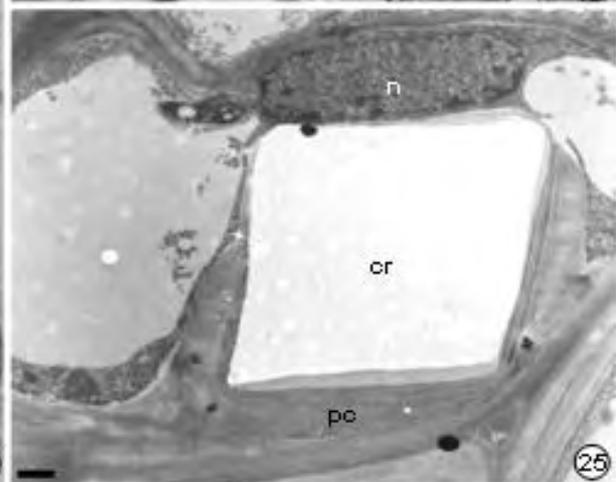
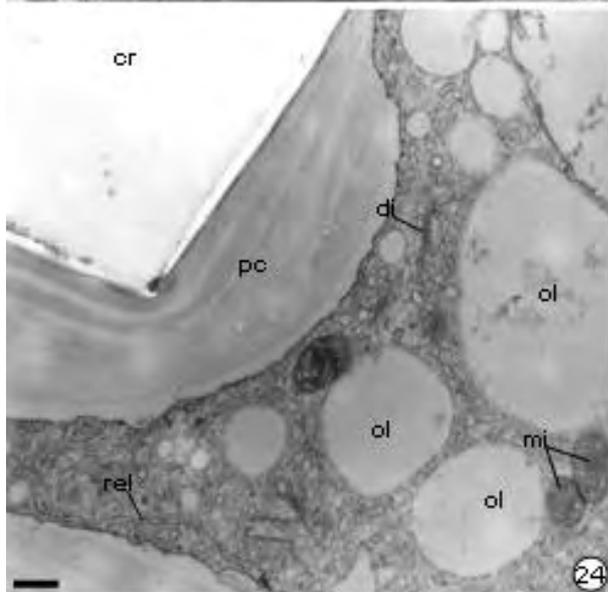
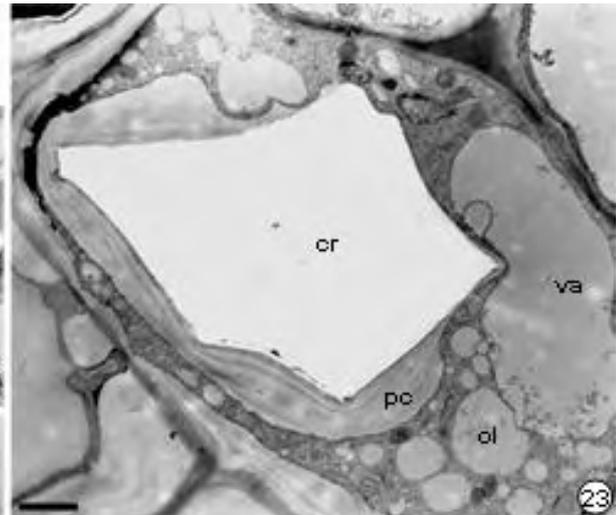
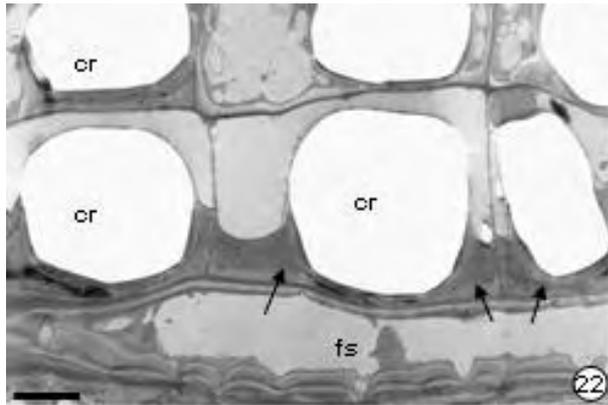
Quadro 1: Tipo de movimento foliar e conteúdo celular da endoderme do pulvino primário das espécies estudadas.

Subfamília	Espécie	Movimento foliar	Grãos de amido na endoderme	Cristais na endoderme
Caesalpinioideae	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	Nictinástico e heliotrópico lentos	+	+
	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Nictinástico e heliotrópico lentos	+	+
	<i>Senna rugosa</i> (G. Don.) H.S. Irwin & Barneby	Nictinástico e heliotrópico lentos	+	+
Faboideae	<i>Andira humilis</i> Mart. Ex Benth.	Nictinástico e heliotrópico lentos	+	+
	<i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.	Nictinástico e heliotrópico lentos	+	+
	<i>Zornia diphylla</i> Pers.	Heliotrópico lento	+	-
Mimosoideae	<i>Mimosa rixosa</i> Mart.	Seismonástico rápido; nictinástico e heliotrópico lentos	+	-
	<i>Mimosa flexuosa</i> Mart.	Seismonástico rápido; nictinástico e heliotrópico lentos	+	-
	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart.	Nictinástico e heliotrópico lentos	+	+

Reação indicada como: -, negativo; +, positivo.







Legenda das Figuras

Figuras 1-13. Secções transversais do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 1. Pulvino de *Andira humilis* mostrando células corticais externas (ce) ricas em compostos fenólicos e células corticais internas (ci) menos volumosas e translúcidas ao redor do sistema vascular (sv) (Barra= 65 µm). 2. *Senna rugosa* mostrando córtex interno (ci) com células endodérmicas justapostas, com cristais prismáticos de oxalato de cálcio (setas) e núcleo conspícuo na face periclinal externa (Barra= 20 µm). 3. Pulvino de *Andira humilis* mostrando células endodérmicas com menor volume e cristais prismáticos de oxalato de cálcio (setas). sv= sistema vascular (Barra= 65 µm). 4. Pulvino de *Bauhinia rufa*, onde se observam células endodérmicas com cristais prismáticos de oxalato de cálcio (setas) e ausência de conteúdo fenólico. sv= sistema vascular (Barra= 35 µm). 5. Pulvino de *Copaifera langsdorffii* sob luz polarizada mostrando cristais prismáticos de oxalato de cálcio (setas) e grãos de amido (ga) (Barra= 16 µm). 6. Secção do pulvino de *Mimosa rixosa* tratada com cloreto de zinco iodado evidenciando grãos de amido em abundância na endoderme (en) (Barra= 40 µm). 7. Secção do pulvino de *Zornia diphylla* tratada com cloreto de zinco iodado mostrando abundância de grãos de amido na endoderme (en) (Barra= 65 µm). 8. Secção do pulvino de *Andira humilis* tratada com cloreto de zinco iodado mostrando poucos grãos de amido (ga) na endoderme (en). sv= sistema vascular. (Barra= 27 µm). 9. Pulvino de *Mimosa rixosa* mostrando numerosos grãos de amido (ga) na endoderme (en). sv= sistema vascular (Barra= 16 µm). 10. Secção do pulvino de *Mimosa rixosa* tratada com cloreto de zinco iodado onde se observam numerosos grãos de amido (ga) na endoderme (en) e camadas adjacentes. sv= sistema vascular (Barra= 20 µm). 11. Secção do pulvino de *Copaifera langsdorffii* tratada com floroglucina acidificada mostrando espessamentos lignificados (setas) na parede periclinal interna das células endodérmicas (Barra= 65 µm). 12. Secção do pulvino de *Andira humilis*

mostrando espessamentos (setas) nas paredes anticlinais e periclinal interna das células endodérmicas. sv= sistema vascular (Barra= 35 μm). 13. Secção do pulvino de *Bauhinia rufa* tratada com floroglucina acidificada mostrando espessamentos de parede em formato de “U” (setas) nas células endodérmicas (Barra= 35 μm).

Figuras 14-21. Eletronmicrografias das células endodérmicas do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 14. *Andira humilis* mostrando amiloplastos agrupados na face periclinal interna da célula endodérmica (en), que se encontra justaposta à célula de parênquima (cp) e à fibra septada (fs) (Barra= 4 μm). 15. *Zornia diphylla* mostrando amiloplastos aglomerados na face periclinal externa das células endodérmicas (en). As setas indicam campos de pontoação que conectam as células endodérmicas entre si e com as células adjacentes. Pequenos espaços intercelulares (ei) são observados. cp= célula parenquimática; fs= fibra septada (Barra= 4 μm). 16. Célula endodérmica do pulvino de *Mimosa rixosa* mostrando citoplasma abundante, vacuoma pouco desenvolvido e amiloplastos próximos ao núcleo (n), o qual apresenta nucléolo (nu) evidente e contorno irregular. cp= célula parenquimática (Barra= 1,5 μm). 17. Região de comunicação entre célula endodérmica e fibra septada (fs) no pulvino de *Mimosa rixosa*. Na célula endodérmica observa-se amiloplasto (ap) e numerosas mitocôndrias (mi). Nas fibras septadas observam-se cloroplastos elipsóides. As setas indicam plasmodesmos (Barra= 1 μm). 18. Célula endodérmica do pulvino de *Zornia diphylla* com amiloplastos circundados por citoplasma. di= dictiossomos; mi= mitocôndria (Barra= 1 μm). 19. Detalhe do pólo apical da célula endodérmica mostrada na figura 16, onde se observam numerosas mitocôndrias (mi), polirribossomos e pequenos vacúolos (va). n= núcleo. (Barra= 0,6 μm) 20. Campo de pontoação primário entre duas células endodérmicas no pulvino de *Zornia diphylla*. Observar a ocorrência de retículo endoplasmático liso (rel) nas proximidades da membrana plasmática. pc= parede celular (Barra= 0,4 μm). 21. *Mimosa*

rixosa mostrando núcleo (n) alongado, mitocôndrias (mi) e retículo endoplasmático liso (rel) disperso no citoplasma e nas proximidades da membrana plasmática. pc= parede celular (Barra= 0,4 μm).

Figuras 22-27. Eletronmicrografias das células endodérmicas do pulvino primário de *Stryphnodendron polyphyllum*. 22. Cristais (cr) prismáticos de oxalato de cálcio nas células endodérmicas e na camada cortical adjacente. As setas indicam espessamentos da parede periclinal interna e da porção basal das paredes anticlinais das células endodérmicas. fs= fibra septada (Barra= 5 μm). 23. Célula endodérmica com cristal (cr) prismático de oxalato de cálcio envolto por parede celular (pc) de espessura variável. Observar a presença de numerosas gotas de óleo (ol) e vacúolo (va) (Barra= 1,3 μm). 24. Detalhe da figura anterior mostrando parede celular (pc) espessa ao redor do cristal (cr) e citoplasma denso com dictiossomos (di), mitocôndrias (mi), retículo endoplasmático liso (rel) e gotas de óleo (ol) volumosas (Barra= 0,4 μm). 25. Célula endodérmica mostrando cristal (cr) prismático de oxalato de cálcio compartimentalizado pela parede celular (pc). n= núcleo (Barra= 1,3 μm). 26. Detalhe mostrando célula endodérmica dividida por parede delgada (seta). cr= cristal; pc= parede celular; va= vacúolo (Barra= 1 μm). 27. Detalhe da figura anterior mostrando citoplasma próximo à parede delgada que delimita o cristal. Observar a ocorrência de retículo endoplasmático (re), dictiossomos (di) e numerosas vesículas. As setas indicam fusão de vesículas com a membrana plasmática. va= vacúolo (Barra= 0,25 μm).

Capítulo 3

Sistema vascular do pulvino primário de leguminosas do cerrado ⁴

TATIANE MARIA RODRIGUES ² e SILVIA RODRIGUES MACHADO ^{2, 3}

⁴ Parte de Dissertação de Mestrado da primeira autora, vinculada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas/Botânica, Área de Concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

² Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Câmpus de Botucatu. Caixa Postal 510, CEP 18618-000. Botucatu, SP, Brasil.

³ Autor para correspondência: smachado@ibb.unesp.br

ABSTRACT - (Primary pulvinus vascular system of leguminous species from Brazilian cerrado). The pulvinus functioning is mainly based on turgor and shape changes of cortical parenchyma cells, called motor cells. Some evidences suggest that the pulvinus vascular system plays an important role in the ions redistribution and stimulus transmission during the leaf movements. However, studies about pulvinus structure are mainly restricted to cortical cells analysis. In this work, the vascular system anatomy and ultrastructure of primary pulvinus of leguminous species from Brazilian cerrado were studied, looking for evidences that point its participation in the pulvinus functioning. Samples were excised from pulvinus medium region of *Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa*, *Andira humilis*, *Dalbergia miscolobium*, *Zornia diphylla*, *Mimosa rixosa*, *Mimosa flexuosa* e *Stryphnodendron polyphyllum* and prepared following usual vegetal anatomy and ultrastructure techniques. In all the studied species, the vascular system occupies central position and is constituted of phloem, xylem, being delimited by a living septate fibers sheath. The absence of fibers and sclereids, presence of phenolic idioblasts and abundance and diversity of protein inclusions in the sieve tube members, are remarkable features of the phloem. The xylem is characterized by pit vessels, parenchyma cells with poorly developed vacuome and living fibriform elements. The lack of apoplastic barriers (lignin and suberin) and the extensive simplastoc continuity are features of the studied pulvini and corroborate the hypothesis of the vascular system participation in their functioning.

Key words - anatomy, Fabaceae, pulvinus, vascular system, ultrastructure.

RESUMO - (Sistema vascular do pulvino primário de leguminosas do cerrado). O funcionamento de pulvinos é baseado, principalmente, em mudanças de forma e tamanho das células parenquimáticas corticais, denominadas células motoras. Algumas evidências sugerem

que o sistema vascular do pulvino exerce um importante papel na redistribuição de íons e na transmissão de estímulos durante os movimentos foliares. No entanto, os estudos sobre a estrutura de pulvinos se restringem, em sua maioria, à análise das células corticais. Nesse trabalho, foram investigadas a anatomia e a ultra-estrutura do sistema vascular do pulvino primário de espécies de leguminosas nativas do cerrado, buscando evidências que indiquem sua participação no funcionamento do pulvino. Amostras foram obtidas da região mediana do pulvino de *Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa*, *Andira humilis*, *Dalbergia miscolobium*, *Zornia diphylla*, *Mimosa rixosa*, *Mimosa flexuosa* e *Stryphnodendron polyphyllum* e processadas segundo técnicas usuais em anatomia e ultra-estrutura vegetal. Em todas as espécies analisadas, o sistema vascular ocupa posição central, constitui-se de floema e xilema, sendo limitado externamente por uma bainha de fibras vivas septadas. Ausência de fibras e esclereídes, presença de idioblastos fenólicos e abundância e diversidade de inclusões proteicas nos elementos de tubo crivado, são características marcantes do floema. O xilema é caracterizado pela presença de elementos de vaso pontoados, células parenquimáticas com vacuoma pouco desenvolvido e elementos fibriformes com protoplasto vivo. Escassez de barreiras apoplásticas (lignina e suberina) e extensiva continuidade simplástica são características dos pulvinos estudados e corroboram a hipótese da participação do sistema vascular no funcionamento deste órgão.

Palavras-chave- anatomia, Fabaceae, pulvino, sistema vascular, ultra-estrutura

Introdução

A presença de pulvinos bem desenvolvidos na base de folhas e folíolos é uma característica típica das leguminosas (Judd *et al.* 1999). O pulvino é uma região de grande flexibilidade responsável pelos movimentos foliares em resposta a estímulos externos e internos, tais como estresse hídrico ou intensidade luminosa elevada (Grignon *et al.* 1992). As vantagens dos movimentos causados pelos pulvinos incluem de um lado, a maximização da radiação absorvida em situações onde a luz é um fator limitante, ou, então, a redução do estresse pela alta radiação, quando a fotossíntese pode ser limitada, reduzindo assim a transpiração, a temperatura foliar e a fotoinibição (Ehleringer & Forseth 1980, Koller 1990, Caldas *et al.* 1997).

Os movimentos dos pulvinos são baseados principalmente em mudanças na forma e tamanho das células corticais parenquimáticas, denominadas células motoras, causadas por variações no turgor devido ao fluxo de K^+ e Cl^- , além de outros íons juntamente com a água (Satter & Galston 1981, Moran *et al.* 1990). Algumas evidências sugerem que o sistema vascular, além das células motoras, também participa na redistribuição de íons e na transmissão de estímulos durante os movimentos foliares. Pfeffer (1907) foi quem primeiro observou que a excisão do cilindro vascular do pulvino fazia com que não ocorresse o movimento dos folíolos. Desde então, diferentes autores (Toriyama 1953, 1954, Satter & Galston 1981, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Moysset & Simón 1991) têm buscado evidências que corroborem esta hipótese.

Entre as peculiaridades relatadas para o sistema vascular do pulvino das diferentes leguminosas destaca-se uma extensiva continuidade apoplástica e simplástica entre os tecidos, garantida pela ausência de lignificação e suberização dos tecidos e ocorrência generalizada de plasmodesmos, respectivamente (Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Moysset & Simón 1991). Chama a atenção em todos os pulvinos estudados, a ocorrência de uma bainha de

células vivas ao redor do floema, interpretada como sendo um colênquima (Esau 1970, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Moysset & Simón 1991). Em *Pterodon pubescens* Benth., Machado & Rodrigues (2004) observaram que esta bainha é constituída por fibras septadas com protoplasto vivo, de origem pericíclica.

As informações disponíveis sobre a ultra-estrutura dos tecidos vasculares dos pulvinos de leguminosas são escassas, sendo as espécies mais estudadas aquelas pertencentes a subfamília Mimosoideae, especialmente *Mimosa pudica* que se caracteriza por movimentos foliares rápidos. Para as leguminosas nativas de cerrado, as informações detalhadas sobre o sistema vascular de pulvinos são restritas a *Pterodon pubescens* (Machado & Rodrigues 2004, Rodrigues & Machado), uma leguminosa arbórea com movimentos heliotrópicos lentos. Assim, tornam-se necessários estudos mais abrangentes, envolvendo um maior número de espécies com movimentos foliares distintos, a fim de verificar se as evidências estruturais da participação do sistema vascular nos movimentos foliares são extensivas às demais leguminosas, além de esclarecer a natureza das células que circundam o floema.

Nesse estudo, são apresentadas informações sobre a estrutura e os aspectos celulares do sistema vascular do pulvino primário de espécies de leguminosas do cerrado, que apresentam velocidades e tipos distintos de movimento foliar.

Material e métodos

Material botânico

Foram estudadas nove espécies de leguminosas com diferentes tipos de movimentos foliares, distribuídas nas subfamílias Caesalpinoideae, Faboideae e Mimosoideae (quadro 1), segundo classificação de Polhill (1981). Amostras da região mediana do pulvino primário foram retiradas de folhas completamente expandidas, coletadas de exemplares vegetando em

cerrado no município de Pratânia-SP (S 22°48'50.2''e W 48°44'35.8''). O comprimento e o diâmetro do pulvino (n= 10) de cada espécie foram mensurados com auxílio de paquímetro digital.

Estudo anatômico

As amostras foram fixadas em FAA 50 por 48 horas (Johansen 1940). A seguir, parte foi desidratada em série etílica, incluída em resina metacrilato e seccionada em micrótomo rotativo semi-automático; os cortes, com 6µm a 8µm de espessura, foram corados com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) e montados entre lâmina e lamínula com Permunt. Outra parte das amostras foi estocada em álcool 70%, e posteriormente seccionada à mão-livre com auxílio de lâminas de barbear ou com micrótomo de Ranvier; os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio a 20%, lavados em água acética 1%, corados com Safrablau (Bukatsch 1972; Burger & Richter 1991) e montados entre lâmina e lamínula com glicerina. Para os testes histoquímicos, cortes de material recém coletado, não fixado, foram tratados com Sudan IV para detecção de substâncias lipídicas (Johansen 1940); solução de Vermelho de Rutênio a 0,02% para substâncias pécticas (Jensen 1962); reagente de Lugol para amido (Johansen 1940); solução de cloreto férrico a 10% para substâncias fenólicas (Johansen 1940); floroglucina acidificada para lignina (Sass 1951) e ácido clorídrico a 10% para cristais de oxalato de cálcio (Johansen 1940). Os aspectos relevantes foram fotografados em fotomicroscópio Zeiss®, utilizando filme Kodak® Asa 100 e T-Max Asa 100.

Estudo ultra-estrutural

Para as análises ultra-estruturais em microscopia eletrônica de transmissão, amostras foram primariamente fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por uma

hora, desidratadas em série cetônica e embebidas em Araldite® (Machado & Rodrigues 2004). As secções ultra-finas foram contrastadas com acetato de uranila (Watson 1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963), e então, examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips® EM 301.

Resultados

Anatomia do sistema vascular

O pulvino primário das espécies estudadas, em secção transversal, apresenta epiderme unisserida revestida por cutícula de espessura variável, córtex parenquimático desenvolvido e sistema vascular central (figura 1). Em *Senna rugosa* (figura 1), *Copaifera langsdorffii* (figura 3) e *Dalbergia miscolobium* (figura 5) o sistema vascular é constituído por feixes colaterais justapostos organizados em um anel, sem a ocorrência de feixes medulares. Em *Bauhinia rufa* (figura 2), o sistema vascular é formado por uma porção externa em formato de anel aberto com as extremidades justapostas e dois feixes colaterais acessórios em posição medular. Em *Andira humilis* (figura 4) o sistema vascular se apresenta na forma de arco com as extremidades livres e curvadas para o exterior. Em *Zornia diphylla* (figura 6), cinco feixes vasculares separados por parênquima interfascicular, organizam-se em um semi-arco. Em *Mimosa rixosa* (figura 7), *M. flexuosa* (figura 8) e *Stryphnodendron polyphyllum* (figura 9) os tecidos vasculares se apresentam organizados em um cilindro contínuo.

A porção mais externa do sistema vascular, nas espécies investigadas, é formada por uma bainha de cerca de cinco a sete camadas de células pequenas, com parede primária de natureza pecto-celulósica fortemente espessada não-lignificada (figuras 10, 12, 17). Essas células apresentam citoplasma denso e núcleo volumoso com nucléolo evidente, e podem se dividir periclinalmente originando septos (figuras 12, 17). As secções longitudinais (figura 13) e os elementos dissociados (figura 14) mostraram que estas células apresentam formato

alongado com as extremidades afiladas, paredes com campos de pontoação primários conspícuos e possuem três ou mais septos cada uma, caracterizando-se, portanto, como fibras septadas. Em *Mimosa rixosa*, *M. flexuosa* e *Zornia diphylla* a parede celular e os septos são mais delgados, o que torna mais difícil a visualização dos septos tanto em secções longitudinais quanto na análise dos dissociados. As fibras septadas substituem as fibras com paredes espessas lignificadas que envolvem o floema na região distal do pulvino e pecíolo (figura 11) da mesma espécie.

O floema do pulvino primário, em todas as espécies estudadas, é composto por elementos de tubo crivado, células companheiras e células parenquimáticas (figuras 15-17). Fibras e esclereídes não foram observadas no floema de nenhuma das espécies estudadas. Com exceção de *Zornia diphylla*, o floema apresenta idioblastos com conteúdo fenólico (figura 10). Em *Bauhinia rufa* (figura 10), *Andira humilis*, *Dalbergia miscolobium* e *Mimosa rixosa* esses idioblastos fenólicos são mais abundantes e volumosos. Em *Bauhinia rufa*, *Senna rugosa* (figura 15) e *Andira humilis* o floema apresenta idioblastos contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Em *M. rixosa* ocorrem idioblastos de mucilagem que se coram de rosa intenso com o Azul de Toluidina (figura 16).

No xilema do pulvino, elementos de vaso com lúmen de contorno e tamanho variáveis estão associados a células parenquimáticas volumosas e fibras de paredes não-lignificadas, aqui denominadas elementos fibriformes (figura 17). Em *Dalbergia miscolobium* foram observadas células parenquimáticas contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Idioblastos fenólicos foram observados nos raios parenquimáticos do xilema de *Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii* (figura 17), *Andira humilis* e *Dalbergia miscolobium*. Esses raios atravessam o xilema e o floema e alcançam a bainha de fibras septadas (figura 17). Em *Mimosa rixosa*, (figura 7) *M. flexuosa* (figura 8) e *Stryphnodendron polyphyllum* (figura 9) os raios parenquimáticos são pouco visíveis.

A medula é bastante reduzida (figuras 1-9), estando praticamente ausente em *Mimosa rixosa* (figura 7) e *M. flexuosa* (figura 8). De maneira geral, é constituída por células parenquimáticas menos volumosas quando comparadas com as células parenquimáticas corticais. Em *Bauhinia rufa*, *Copaifera langsdorffii*, *Andira humilis*, *Zornia diphylla*, *Mimosa rixosa* e *M. flexuosa*, as células parenquimáticas apresentam parede mais espessa e lúmen estreito. Células com conteúdo fenólico foram observadas em *Bauhinia rufa*, *Andira humilis* (figura 4), *Zornia diphylla* e *Mimosa flexuosa* sendo mais numerosas em *Dalbergia miscolobium*. Em *Andira humilis* (figura 4) e *Zornia diphylla* essas células destacam-se pelo maior volume.

Ultra-estrutura do sistema vascular

O sistema vascular do pulvino primário de *Copaifera langsdorffii*, *Senna rugosa*, *Andira humilis*, *Dalbergia miscolobium*, *Zornia diphylla*, *Mimosa rixosa* e *Stryphnodendron polyphyllum* foi estudado ao microscópio eletrônico de transmissão.

Fibras septadas

As fibras septadas mostram paredes desde muito espessas com contorno irregular, fibrilas com aspecto laxo e aspecto multi-lamelado como em *Copaifera langsdorffii* (figuras 18, 19) até paredes menos espessas como em *Stryphnodendron polyphyllum* (figura 22). Campos de pontoação primários (figura 19) com plasmodesmos (figura 20) conectam as fibras septadas entre si e com as células dos tecidos adjacentes. Possuem núcleo conspícuo de formato irregular com nucléolo evidente (figura 18), citoplasma denso com ribossomos livres, polirribossomos, mitocôndrias volumosas com cristas desenvolvidas (figuras 18, 20, 21), dictiossomos com numerosas cisternas e vesículas adjacentes, plastídios com grana estruturado, estroma elétron-denso e inclusões osmiofílicas (figura 21), retículo

endoplasmático (figura 21) e gotas de óleo dispersas ou no interior de vacúolos (figura 21). Os vacúolos são elétron-lucentes e podem ser pequenos como em *Copaifera langsdorffii* (figuras 18, 21) e *Mimosa rixosa* ou ocupar quase todo o lúmen celular como observado em *Stryphnodendron polyphyllum* (figura 22). Na região do septo, o citoplasma é mais abundante e denso (figura 23). Cada septo é constituído por lamela mediana com numerosos plasmodesmos e duas porções de parede celular primária (figura 23).

Floema

O floema é composto por elementos de tubo crivado e células companheiras, além de células parenquimáticas com vacuoma desenvolvido e conteúdo elétron-lucente (figuras 24-27) e idioblastos fenólicos (figura 24). Fibras e esclereides não foram observadas no floema de nenhuma das espécies estudadas.

Os elementos de tubo crivado caracterizam-se pela presença de paredes pecto-celulósicas eletron-lucentes de espessura variável e contorno interno irregular ligeiramente eletron-denso (figuras 24-27). Em *Zornia diphylla* (figuras 26, 27) os elementos de tubo crivado mostram paredes nacaradas identificadas pela grande espessura, contorno irregular e aspecto laxo, podendo se apresentar parcial ou totalmente obliterados. Os elementos de tubo crivado caracterizam-se ainda pela presença de placa crivada, plastídios-P (figura 28) e material protéico disperso (figuras 35-37). Acúmulos de calose de tamanhos variáveis foram observados ao redor dos poros das placas crivadas (figuras 28, 29) em todas as espécies estudadas. Em *Dalbergia miscolobium* (figura 29) numerosos plasmodesmos foram observados atravessando os depósitos de calose na placa crivada dos elementos de tubo crivado.

O retículo do elemento de tubo crivado, em todas as amostras analisadas, é representado por uma rede de membranas tubulares, com grau de desenvolvimento variável,

arranjadas perpendicularmente à superfície interna da parede celular (figuras 28, 30, 31) podendo ou não se apresentar em toda a extensão da parede. Mitocôndrias globulares foram observadas nas proximidades da membrana plasmática dos elementos de tubo crivado e podem estar totalmente ou parcialmente envoltas pelo retículo do tubo crivado (figuras 32, 33). Os plastídios intactos são circulares (figuras 28, 33-35) e contêm unicamente inclusões protéicas, o que os caracteriza como plastídios-P. Foram observados plastídios com inclusões protéicas na forma de corpos cristalinos e proteínas fibrilares (figuras 28, 33, 35) e plastídios com corpos cristalinos, proteínas fibrilares e tubulares (figura 34).

No protoplasto dos elementos de tubo crivado das espécies estudadas, foi observada abundância e diversidade morfológica de material protéico vistas sob a forma de fibrilas dispersas (figuras 35, 36) ou agrupadas em grumos (figura 36), filamentos proteicos (figura 35), proteínas tubulares (figura 37) e corpos cristalinos (figuras 27, 30, 37).

As células companheiras possuem paredes delgadas, núcleo volumoso e citoplasma denso (figuras 24-27) onde são visíveis ribossomos, mitocôndrias volumosas e retículo endoplasmático (figuras 38, 39); vacúolos e vesículas são pequenos ou ausentes. Células companheiras com paredes labirínticas digitiformes foram observadas em *Zornia diphylla* (figuras 26, 27) e *Mimosa rixosa* (figura 39).

As células parenquimáticas (figuras 24-27), comuns mostram paredes com espessura e eletron-densidade variável com campos de pontoação primários, citoplasma abundante onde são visíveis cloroplastos elipsóides (figura 26) e vacuoma desenvolvido que pode se apresentar elétron-lucente. Em *Mimosa rixosa*, o citoplasma é denso e apresenta muitos ribossomos livres, mitocôndrias globulares com cristas proeminentes, retículo endoplasmático rugoso e plastídios com vesículas e plastoglóbulos (figura 40).

Os idioblastos fenólicos são volumosos, possuem paredes delgadas, citoplasma e núcleo periféricos e vacúolo central desenvolvido preenchido por conteúdo fortemente

eletron-denso, podendo apresentar também vacúolos menores preenchidos por substâncias lipídicas (figura 24).

Xilema

O xilema é composto por elementos de vaso pontoados rodeados por células parenquimáticas e elementos fibriformes com protoplasto vivo (figura 41). Pontoações simples (figura 41) conectam os elementos de vaso entre si e com as células parenquimáticas e elementos fibriformes na maioria das espécies estudadas. Em *Copaifera langsdorffii* e *Stryphnodendron polyphyllum* (figura 42) os elementos de vaso apresentam pontoações guarnecidas.

As células parenquimáticas comuns possuem paredes delgadas com numerosos campos de pontoação primários mostrando plasmodesmos amplos que conectam essas células entre si e com os elementos fibriformes; apresentam citoplasma abundante com mitocôndrias volumosas com sistema de membrana desenvolvido, cloroplastos com grãos de amido e pequenos vacúolos (figura 43). Os plastídios apresentam grana desenvolvido, grãos de amido elipsóides e glóbulos osmiofílicos em *Dalbergia miscolobium* e *Zornia diphylla* (figura 43).

Em *Copaifera langsdorffii* (figura 44), *Stryphnodendron polyphyllum* e *Mimosa rixosa* (figura 45) ocorrem células de transferência caracterizadas pela presença de paredes labirínticas na face que tangencia as pontoações do vaso. Essas células apresentam núcleo conspícuo e citoplasma denso e abundante com polirribossomos, numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático, plastídios com grana desenvolvido e vacúolos de tamanhos variáveis (figuras 44, 45). Em *Mimosa rixosa* (figura 45), as mitocôndrias são relativamente maiores e os plastídios têm inclusões osmiofílicas.

Os elementos fibriformes mostram paredes bastante espessas multilameladas sendo a camada parietal mais interna fortemente eletron-densa (figuras 41, 46); apresentam núcleo

conspícuo com nucléolo evidente e vacuoma pouco desenvolvido; citoplasma denso e abundante, onde são observados polirribossomos, mitocôndrias (figura 46) e retículo endoplasmático. Campos de pontoação primários conectam os elementos fibriformes às células parenquimáticas adjacentes (figura 46).

Discussão

A localização central e a composição do sistema vascular do pulvino primário nas espécies estudadas concordam, de um modo geral, com as descrições para o pulvino de outras leguminosas (Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Moysset & Simón 1991), exceto a presença de uma bainha formada por fibras septadas ao redor do floema. Essa região periférica do sistema vascular dos pulvinos tem sido descrita como uma bainha de colênquima ou parênquima colenquimatoso, que ocorre em substituição às fibras floemáticas (Esau 1970, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Moysset & Simón 1991, Grignon *et al.* 1992). Estudando *Pterodon pubescens*, uma leguminosa arbórea de cerrado com movimentos foliares heliotrópicos, Machado e Rodrigues (2004) observaram que a região periférica do sistema vascular do pulvino primário é constituída por fibras septadas originadas do periciclo. A presença dessas células no pulvino das nove espécies estudadas foi confirmada pela análise de material dissociado que mostrou fibras intactas com vários septos cada uma.

Segundo Fahn (1974), fibras septadas podem ter origem procambial ou pericíclica. No presente trabalho não foram realizados estudos ontogenéticos para elucidar a origem dessas fibras, mas considerando que constituem uma região bem delimitada entre a endoderme e o floema pode-se sugerir que sejam originadas do periciclo. A presença de um periciclo, parenquimático ou na forma de fibras, situado internamente e contíguo com a endoderme em folhas foi mencionada por diferentes autores (Melo-de-Pinna & Menezes

2003, Menezes *et al.* 2005). A análise dessas fibras ao microscópio eletrônico de transmissão mostrou a presença de protoplasto vivo com evidências de metabolismo ativo, além de seu envolvimento na síntese e estocagem de lipídeos. A função de reserva é tida como uma das principais funções das fibras septadas (Fahn 1974). Além disso, devido à elasticidade de suas paredes não-lignificadas, provavelmente colaboram com o funcionamento do pulvino (Machado & Rodrigues 2004). A ausência de barreiras apoplásticas e a presença de plasmodesmos nas paredes dessas células aumentam as possibilidades de trocas laterais entre o córtex e o cilindro vascular, como sugerido para outras espécies (Morse & Satter 1979, Campbell *et al.* 1979, Satter *et al.* 1982, Moysset & Simón 1991).

A composição celular do floema do pulvino das espécies analisadas concorda com o padrão observado em *Pterodon pubescens* (Machado & Rodrigues 2004), contudo difere daquela descrita para *Mimosa pudica* (Esau 1970, 1971, 1973) devido à ausência de fibras e esclereides e o maior diâmetro dos elementos de tubo crivado. A presença de idioblastos fenólicos no floema é uma característica comum em leguminosas (Metcalf & Chalk 1983). No pulvino de *Mimosa pudica* tais idioblastos foram denominados “células secretoras” (Haberlandt 1928, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978), ou “células tubulares” (Kundu & Saha 1968), sendo sua função obscura. De acordo com Haberlandt (1928), essas células podem constituir um sistema contínuo no qual variações de pressão são transmitidas a longas distâncias. De acordo com Sibaoka (1953), tais células estão envolvidas na propagação das “ondas-m”. Contudo, não existe suporte experimental que confirme essas prováveis funções.

No presente estudo, os plastídios do tubo crivado contêm unicamente inclusões protéicas de tipos morfológicos distintos (corpos cristalinos, proteínas fibrilares e tubulares) e enquadram-se no tipo PIIcf, segundo a classificação morfológica de Behnke (1981 *apud* Eleftheriou 1990). Esta observação não concorda com a descrição do tipo de plastídio típico

para as espécies de Fabaceae (Judd *et al.* 1999), os quais contêm corpos protéicos cristalinos e, geralmente, grãos de amido.

A morfologia e localização do retículo do elemento de tubo crivado no pulvino das diferentes espécies analisadas são similares ao descrito para o floema de angiospermas (Behnke 1981 *apud* Eleftheriou 1990). Entre as funções comumente atribuídas ao retículo do tubo crivado, estão a participação no processo de translocação do floema, incluindo canalização do ATP das mitocôndrias intimamente associadas à porções de retículo endoplasmático para as bombas de prótons presentes na membrana plasmática; o aumento da superfície para entrada de substâncias no lúmen dos elementos do tubo crivado, além de funcionar como um sítio de acúmulo de cálcio (Sjolund & Shih 1983, Evert 1990). Com base nessas considerações, é possível supor que em pulvinos o retículo do tubo crivado poderia intervir na estocagem e liberação de íons, em particular o Ca^{2+} e K^+ que ocorre durante os movimentos foliares.

No presente trabalho, a abundância e diversidade morfológica de material protéico específico do floema (proteína-P) constituem um aspecto marcante dos elementos de tubo crivado e concordam com as observações feitas no floema de *Pterodon pubescens* (Machado & Rodrigues 2004). Embora não tenham sido realizados testes citoquímicos, as inclusões observadas nos elementos de tubo crivado do pulvino são similares, quanto ao aspecto e elétrons- densidade às proteínas-P descritas por Evert (1990) e Cronshaw & Sabnis (1990). Os corpos de proteína-P dispersos ou acumulados na extremidade dos elementos de tubo crivado ou nas proximidades da placa crivada aparentemente servem para selar os poros da placa crivada de elementos de tubo crivado que sofreram injúrias, prevenindo a perda de assimilados (Eschirich 1975).

No presente trabalho, a observação de proteína-P como uma rede de fibrilas e filamentos ocupando todo o protoplasto do elemento de tubo crivado, pode ser considerada

uma evidência de boa preservação dessas células, mostrando pouco ou nenhum efeito de técnica (Cronshaw & Anderson 1971, Behnke & Kiritsis 1983, Behnke 1986, Evert 1990).

Uma peculiaridade marcante do xilema do pulvino em todas as espécies aqui estudadas foi a observação de elementos fibriformes com protoplasto vivo. Este tipo de célula foi igualmente observado no xilema do pulvino primário de *Pterodon pubescens* (Rodrigues & Machado 2004) substituindo as fibras com paredes lignificadas e pontoações simples observadas no xilema do pecíolo e raque desta mesma espécie.

Pontoações guarnecidas são interpretadas como um mecanismo que reduz a vulnerabilidade das plantas à cavitação induzida por estresse hídrico ao prevenir a deflexão e aspiração da membrana da pontoação durante a falta de água em espécies que habitam ambientes com secas periódicas (Jansen *et al.* 2004). A ocorrência de pontoações guarnecidas nos elementos de vaso de *Copaifera langsdorffii* e *Stryphnodendron polyphyllum* indica a presença de um sistema hidráulico eficiente no pulvino dessas espécies.

As características ultra-estruturais das células parenquimáticas com paredes labirínticas no floema e no xilema, como núcleo volumoso, citoplasma abundante com ribossomos, retículo endoplasmático, numerosas mitocôndrias volumosas com sistema de membranas desenvolvido e vacuoma pouco desenvolvido são evidências da intensa atividade metabólica, incluindo síntese e intenso transporte lateral de íons e outras substâncias (Taiz & Zeiger 1998). Aspectos similares do parênquima vascular também foram relatados para o pulvino de *Mimosa pudica* (Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978).

As peculiaridades do cilindro vascular do pulvino de todas as espécies analisadas, incluindo ausência de fibras e esclereides no floema; reduzida lignificação dos tecidos xilemáticos, exceto dos vasos do xilema; a ampla ocorrência de plasmodesmos conectando a camada cortical mais interna às fibras septadas e estas ao parênquima do floema, xilema e medula, associados a presença de fibras com protoplasto vivo asseguram o fluxo simplástico e

apoplástico de íons durante os movimentos foliares, aumentando as possibilidades de trocas laterais em todo o sistema vascular. Segundo Fleurat-Lessard & Bonnemain (1978), a continuidade simplástica do cilindro vascular dos pulvinos com o parênquima cortical possibilitaria, também, a passagem da informação propagada (ondas-m e ondas-s de Sibaoka (1953)), não somente no floema, mas também nas células vivas do xilema.

Em conclusão, os aspectos estruturais do sistema vascular do pulvino primário das espécies de leguminosas estudadas confirmam a hipótese sobre a participação do sistema vascular no funcionamento do pulvino.

Agradecimentos

À FAPESP pela concessão de Bolsa de Mestrado à T. M. Rodrigues (MS 03/11050-7) e apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho (Programa Biota 00/12469-3), ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa à S. R. Machado e à equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, pelo auxílio no preparo das amostras.

Referências bibliográficas

- BEHNKE, H-D. & KIRITSIS, U. 1983. Ultrastructure and differentiation of sieve elements in primitive angiosperms. I. Winteraceae. *Protoplasma* 118: 148-156.
- BEHNKE, H-D. 1986. Sieve element characters and the systematic position of *Austrobaileya*, *Austrobaileyaceae*-with comments to the distinction of sieve cells and sieve-tube members. *Plant Systematic and Evolution* 152: 101-121.
- BUKATSCH, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61 (8): 255.

- BURGER, L.M. & RICHTER, H.G. 1991. Anatomia da Madeira. Livraria Nobel: São Paulo.
- CALDAS, L.S., LÜTTGE U., FRANCO, A.C. & HARIDANSAN, M. 1997. Leaf heliotropism in *Pterodon pubescens*, a woody legume from the brazilian cerrado. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 9:1-7.
- CAMBPELL, N.A., STIKA, K.M. & MORRISON, G.H. 1979. Calcium and potassium in motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscope. Science 204:185-187.
- CRONSHAW, J. & ANDERSON, R. 1971. Phloem differentiation in tabaco pith culture. Journal of Ultrastructural Research 34: 244-259.
- CRONSHAW, J. & SABNIS, D.D. 1990. Phloem proteins. In Sieve elements: Comparative structure, induction and development (H-D. Behnke & R.D. Sjolund, eds). Springer-Verlag, Berlin. pp 139-159.
- EHLERINGER, J. & FORSETH, I. 1980. Solar tracking by plants. Science 210: 1094-1098.
- ELEFTHERIOU, E.P. 1990. Monocotyledons. In Sieve elements: Comparative structure, induction and development (H-D. Behnke & R.D. Sjolund, eds). Springer-Verlag, pp 139-159.
- ESAU, K. 1970. On the phloem of *Mimosa pudica* L. Annals of Botany 34:505-515.
- ESAU, K. 1971. Development of P-protein in sieve elements of *Mimosa pudica*. Protoplasma 73: 225-238.
- ESAU, K. 1973 Comparative structure of companion cells and phloem parenchyma cells in *Mimosa pudica* L. Annals of Botany 37: 625-632.
- ESCHRICH, W. 1975. Sealing systems in phloem. In Transport in plants. I. Phloem transport. Encyclopedia of plant physiology, NS vol 1. (M.H. ZIMMERMAN & J.A. MILBURN, eds) Springer, New York, pp 39-56.
- EVERT, R. 1990. Dicotyledons. In Sieve elements: Comparative structure, induction and development (H-D. Behnke & R.D. Sjolund, eds). Springer-Verlag, Berlin. pp 103-137.

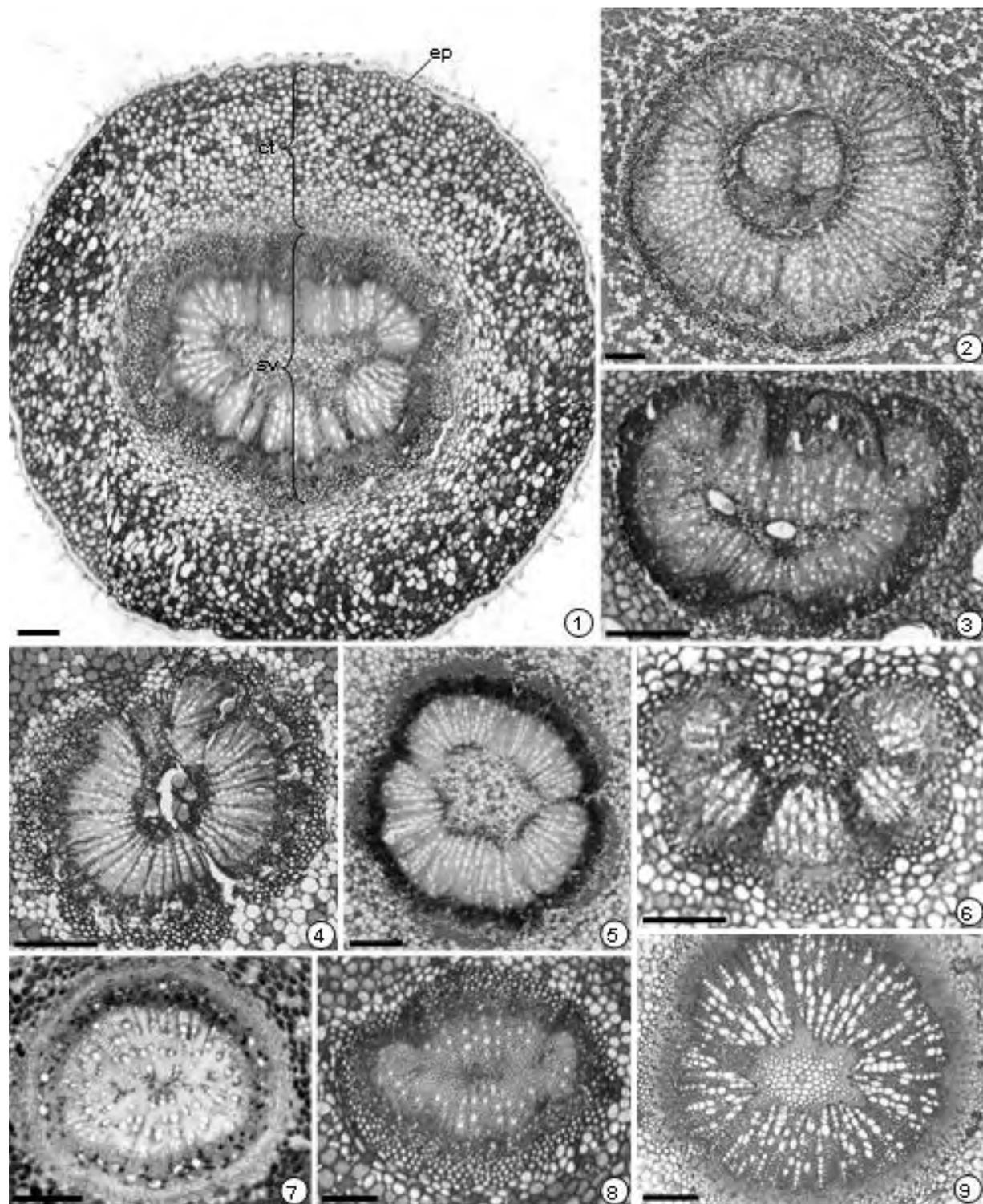
- FAHN, A. 1974. Plant Anatomy. 2 ed. Pergamon Press, Oxford.
- FLEURAT-LESSARD, P. & BONNEMAIN, J-L. 1978. Structural and ultrastructural characteristics of the vascular apparatus of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). *Protoplasma* 94:127-143.
- FLEURAT-LESSARD, P. & ROBLIN, G. 1982. Comparative histocytology of the petiole and the main pulvinus in *Mimosa pudica* L. *Annals of Botany* 50:83-92.
- GRIGNON, N. TOURAINE, B. & GRIGNON, C. 1992. Internal phloem in the pulvinus of Soybean plants. *American Journal of Botany* 79 (3):265-274.
- HABERLANDT, G. 1928. Physiological plant anatomy. Maxmillan and Co, London.
- JANSEN, S., BAAS, P. GASSON, P., LENS, F. & SMETS, E. 2004. Variation in xylem structure from tropics to tundra: Evidence from vestured pits. *PNAS* 101: 8833-8837
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principle and practice. W.H. Freeman, San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts
- KOLLER, D. 1990. Light-driven leaf movements. *Plant Cell and Environment* 13: 615-632.
- KUNDU, B.C. & SAHA, B. 1968. Observation on the phloem of three species of *Mimosa*. *Experimentia* 24: 287-288.
- MACHADO, S.R. & RODRIGUES, T.M. 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27 (1):135-147.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A. & MENEZES, N.L. 2003. Meristematic endodermis and secretory structures in adventitious roots of *Richtera kuntze* (Mutisieae- Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 1-10.

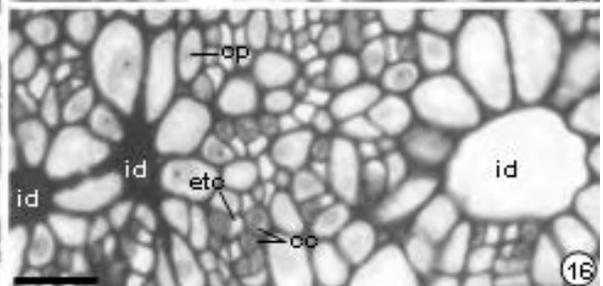
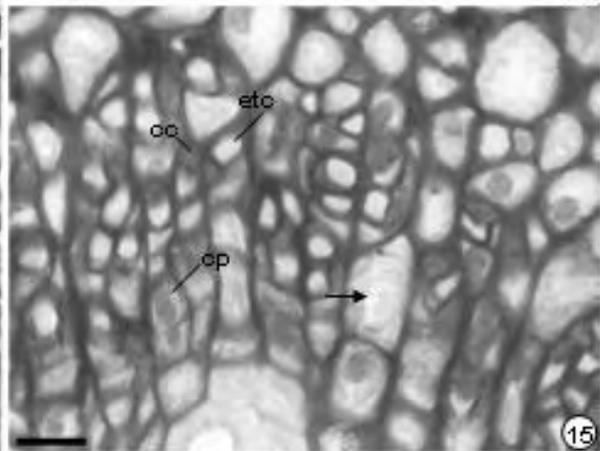
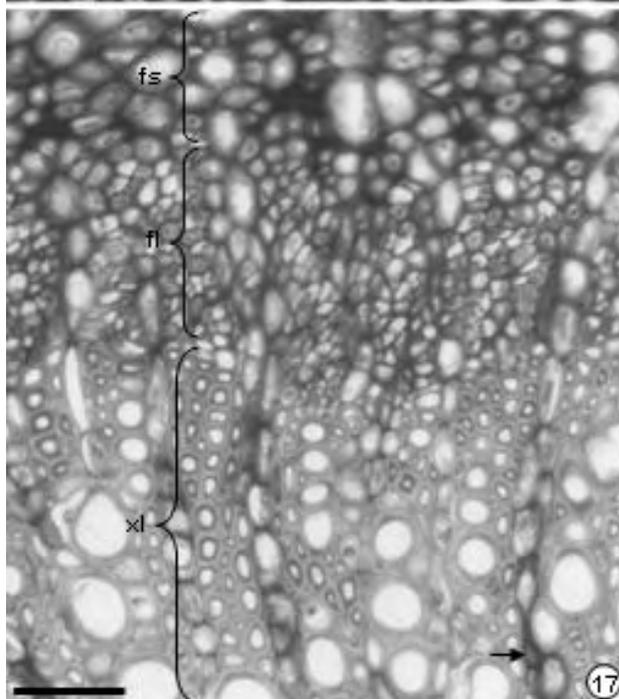
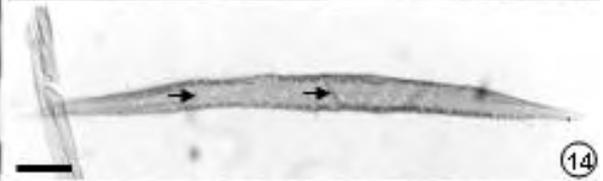
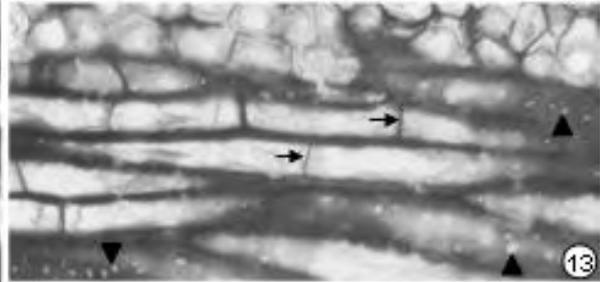
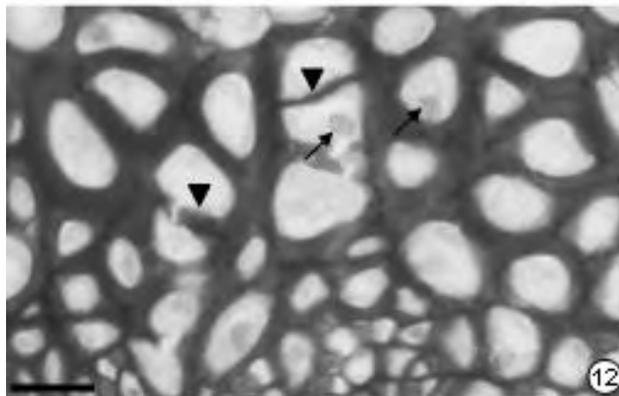
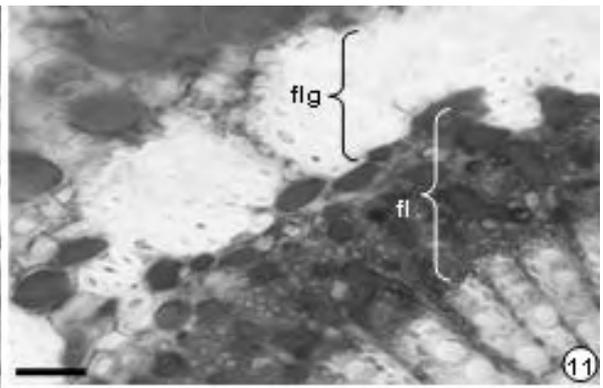
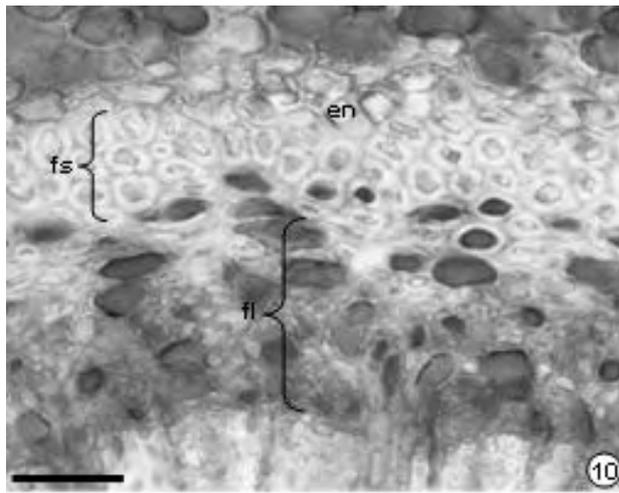
- MENEZES, N.L., SILVA, D.C., ARRUDA, R.C.O., MELO-DE-PINA, G.F., CARDOSO, V.A., CASTRO, N.M., SCATENA, V.L. & SCREMIN-DIAS, E. 2005. Meristematic activity of the endodermis and the pericycle in the primary thickening in monocotyledons. Considerations on the "PTM". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77 (2): 259-274.
- METCALF, C.R. & CHALK, L. 1983. *Anatomy of the dicotyledons*, vol 2. Oxford University Press, Oxford.
- MORAN, N., FOX, D. & SATTER, R.L. 1990. Interaction of the depolarization-activated K⁺ channel of *Samanea saman* with inorganic ions: a patch-clamp study. *Plant Physiology* 94: 424-431.
- MORSE, M.J. & SATTER, R.L. 1979. Relationships between motor cell ultrastructure and leaf movements in *Samanea saman*. *Plant Physiology* 46: 338-346
- MOYSSET, L. & SIMÓN, E. 1991. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *American Journal of Botany* 78:1467-1486.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & McCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.
- PFEFFER, W. 1907. *The physiology of plants*, vol3. Translated by A. J. Ewart. Clarendon Press, Oxford.
- POLHILL, R.M. 1981. *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- REYNOLDS. E.S. 1963. The use of lead citrate and high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-212.

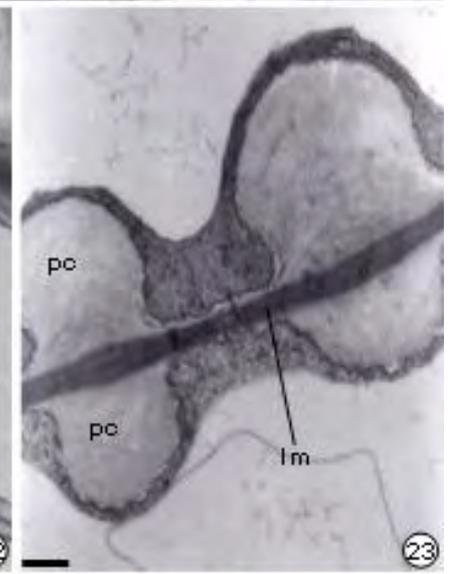
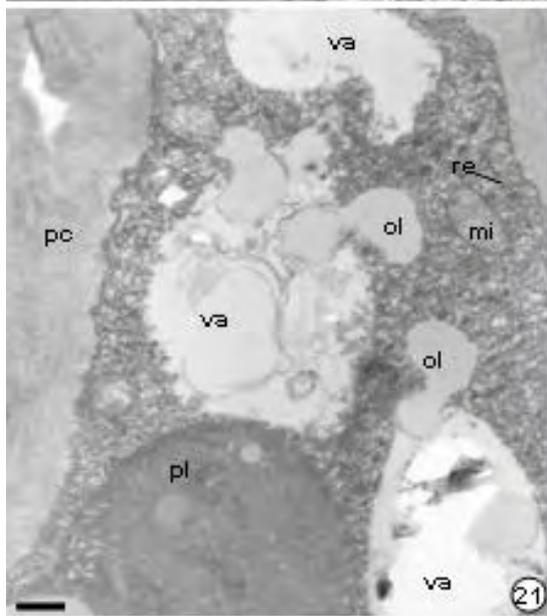
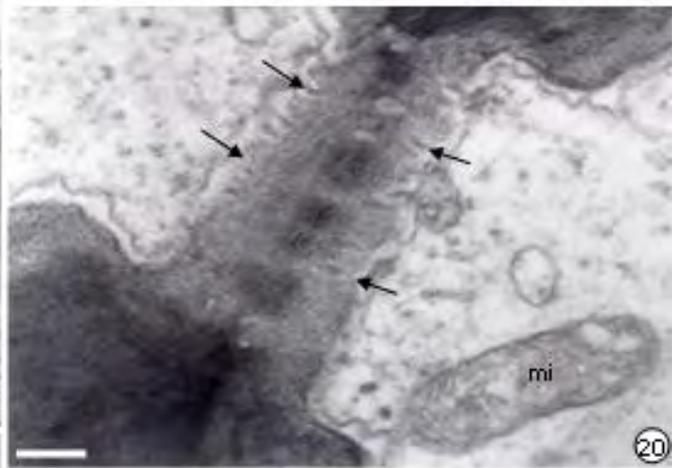
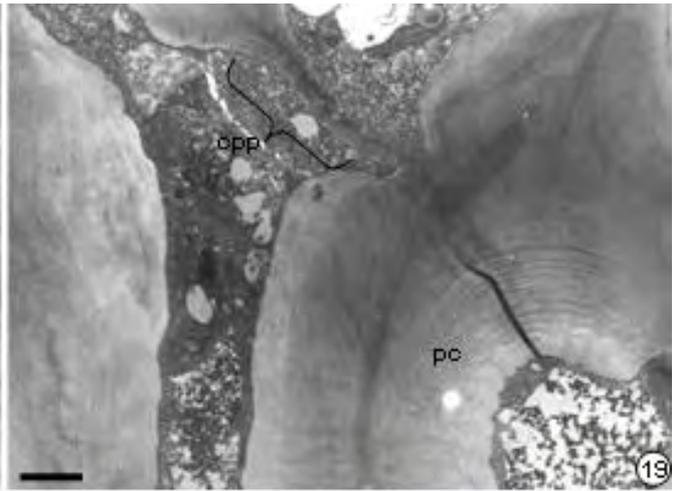
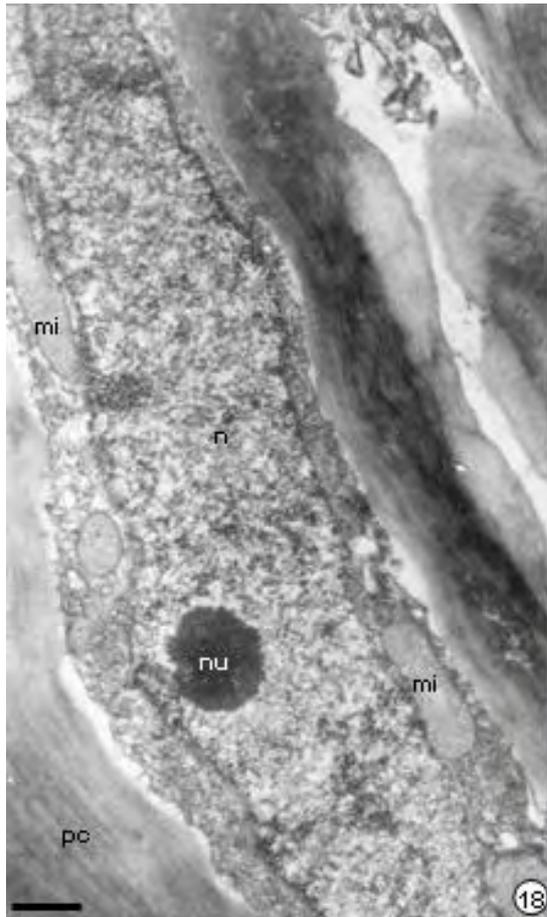
- RODRIGUES, T.M. & MACHADO, S.R. 2004. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Botanica Brasilica* 18 (2):381-390.
- SASS, J.E. 1951. *Botanical microtechnique*. 2.ed. Iowa State University Press: Ames.
- SATTER, R.L. & GALSTON, A.W. 1981. Mechanisms of control of leaf movements. *Annual Review of Plant Physiology* 32:83-110.
- SATTER, R.L., GARBER, R.C. KHAIRALLAH, L. & CHENG, Y-S. 1982. Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. *Journal of Cell Biology* 95: 893-902.
- SIBAOKA, T. 1953. Some aspects on the slow conduction of stimuli in the leaf of *Mimosa pudica*. *Science Reports of the Tohoku University* 20: 72-88.
- SJOLUND, R.D. & SHIH, C.Y. 1983. Freeze-fracture analysis of phloem structure in plant tissue cultures. I. The sieve element reticulum. *Journal of Ultrastructural Research* 82: 111-121.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- TORIYAMA, H. 1953. Observational and experimental studies of sensitive plants. I. The structure of parenchymatous cells of pulvinus. *Cytologia* 18: 283-292.
- TORIYAMA, H. 1954. Observational and experimental studies of sensitive plants. II. On the changes in motor cells of diurnal and nocturnal condition. *Cytologia* 19: 29-40.
- WATSON, M.L. 1958 Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Citology* 4: 475.

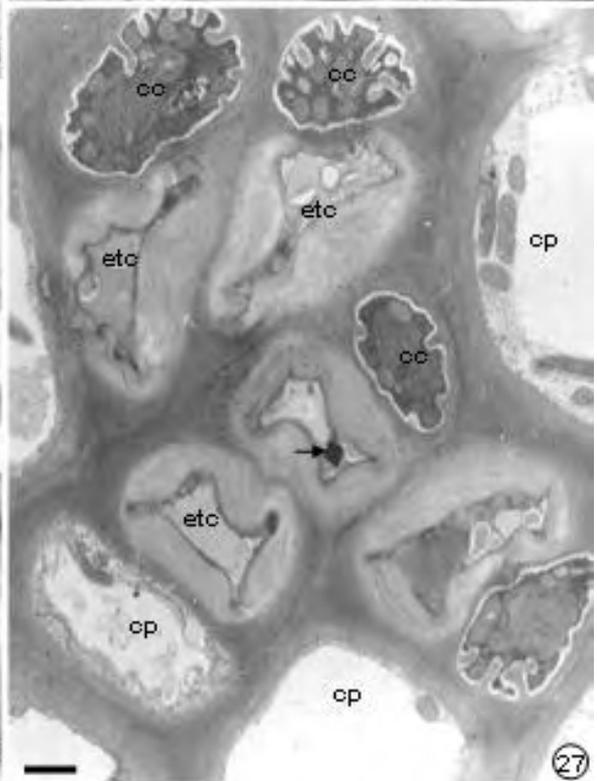
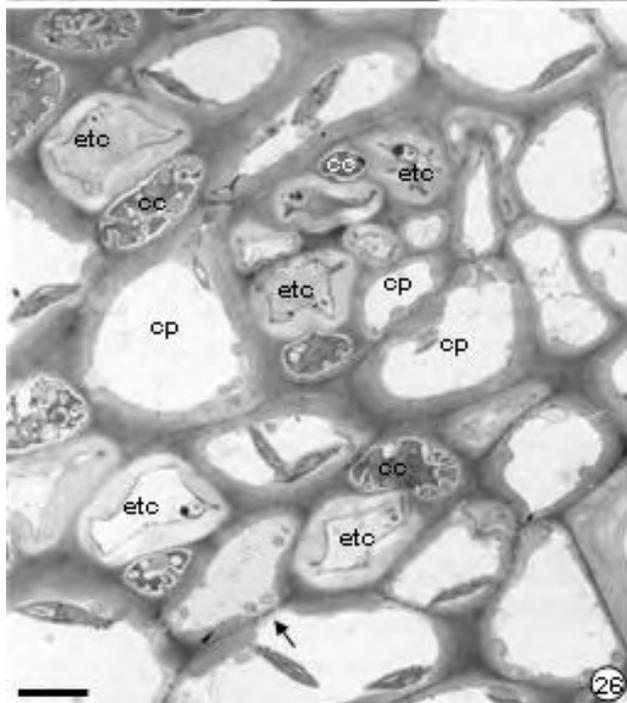
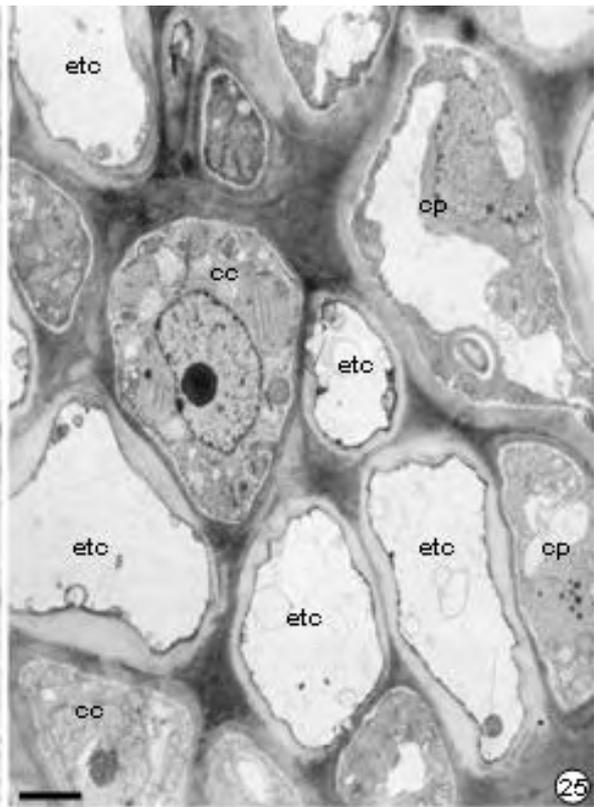
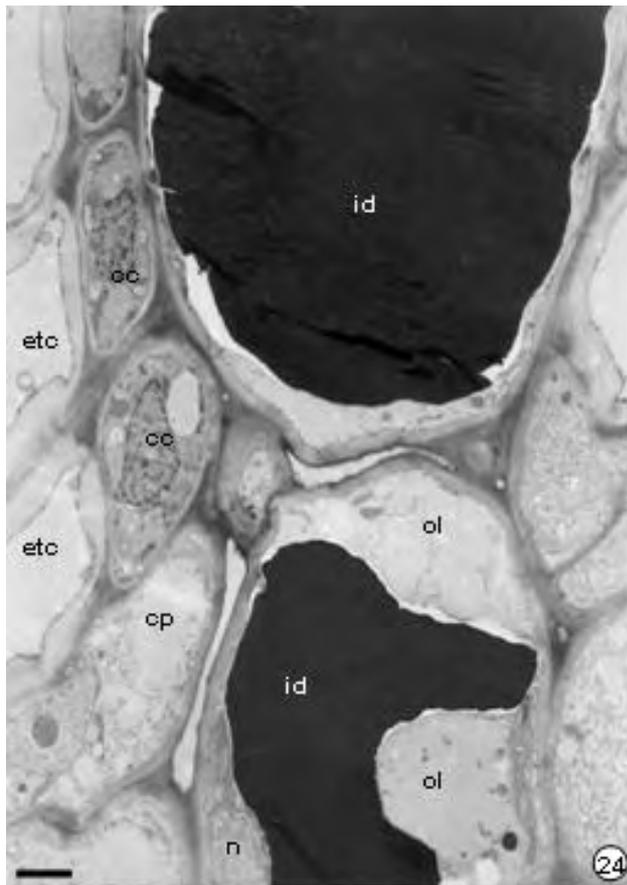
Quadro 1. Espécies estudadas com seus respectivos hábitos, distribuídas dentro das três subfamílias de leguminosas.

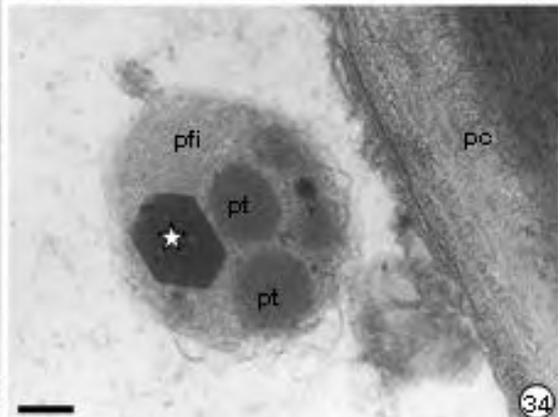
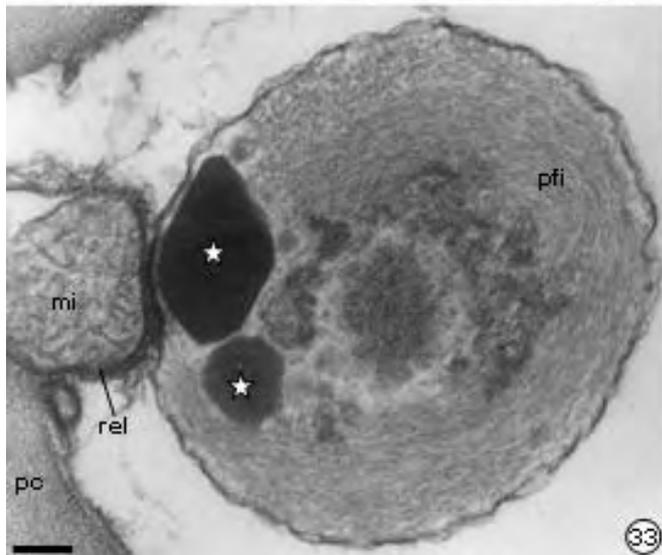
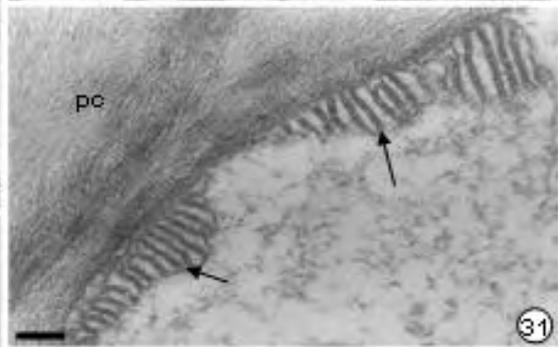
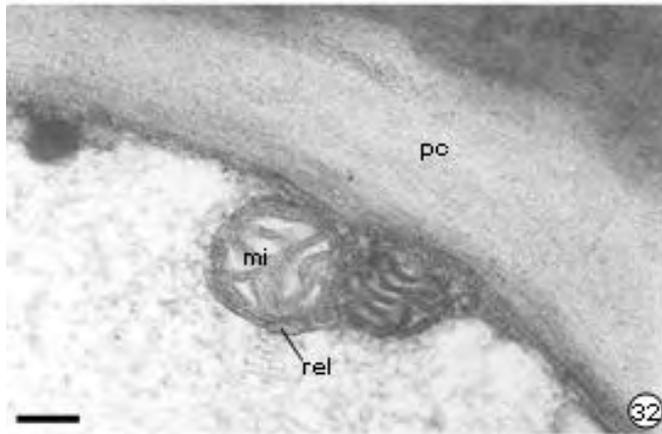
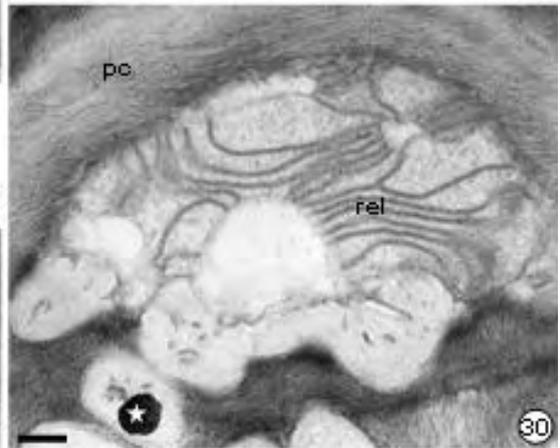
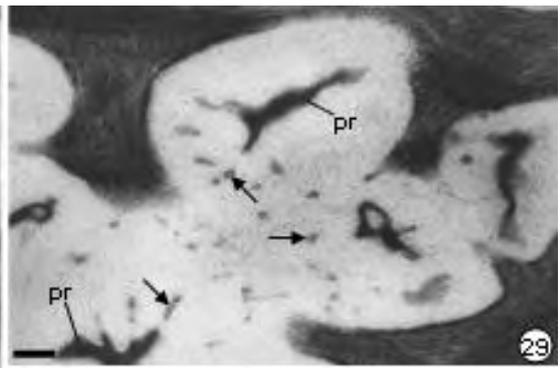
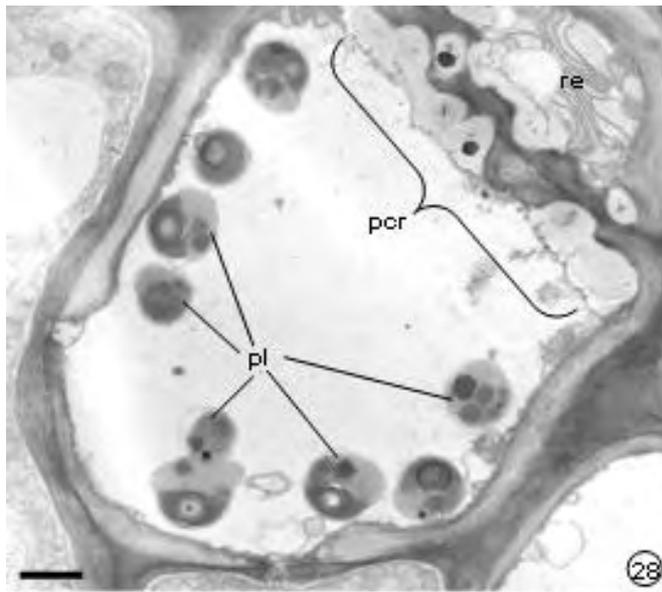
Subfamília	Espécie	Hábito
Caesalpinioideae	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud	arbustivo
	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	arbóreo
	<i>Senna rugosa</i> (G. Don.) H. S. Irwin & Barneby	arbustivo
Faboideae	<i>Andira humilis</i> Mart. Ex Benth.	arbustivo
	<i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.	arbóreo
	<i>Zornia diphylla</i> Pers.	herbáceo
Mimosoideae	<i>Mimosa rixosa</i> Mart.	rasteiro
	<i>Mimosa flexuosa</i> Mart.	herbáceo
	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart.	arbóreo

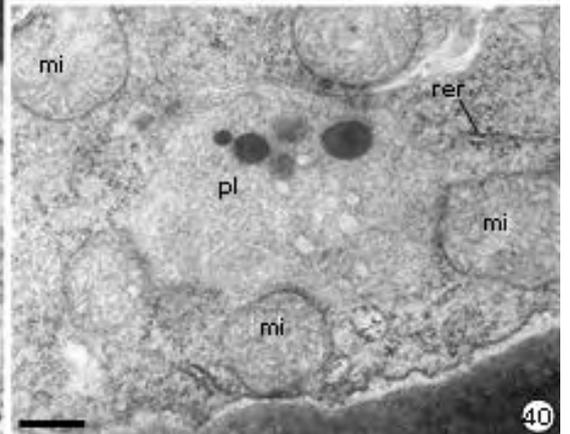
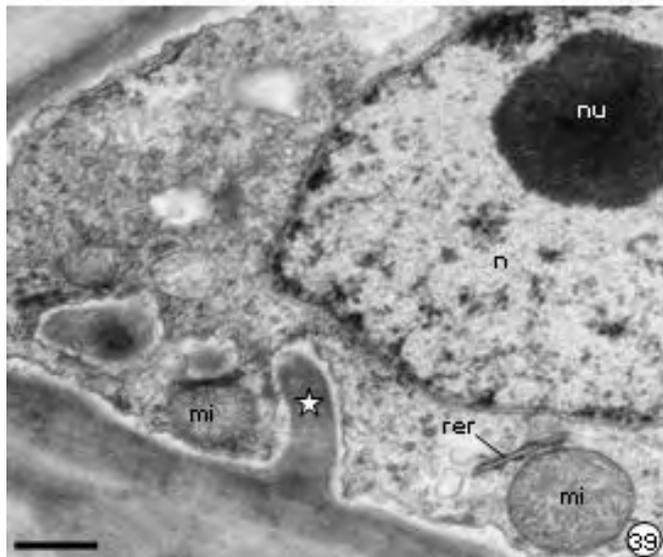
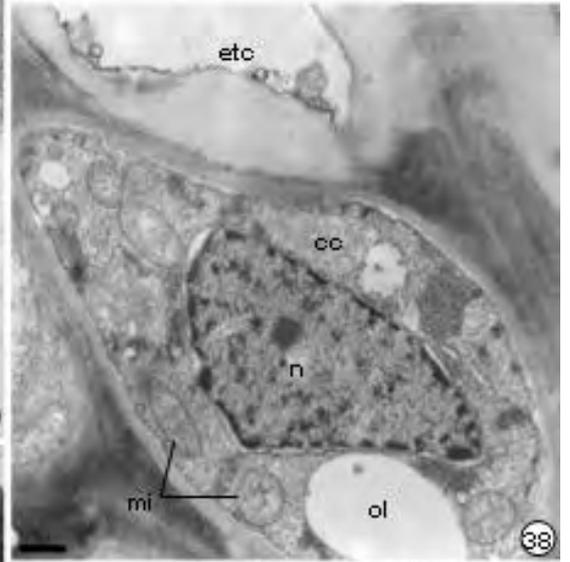
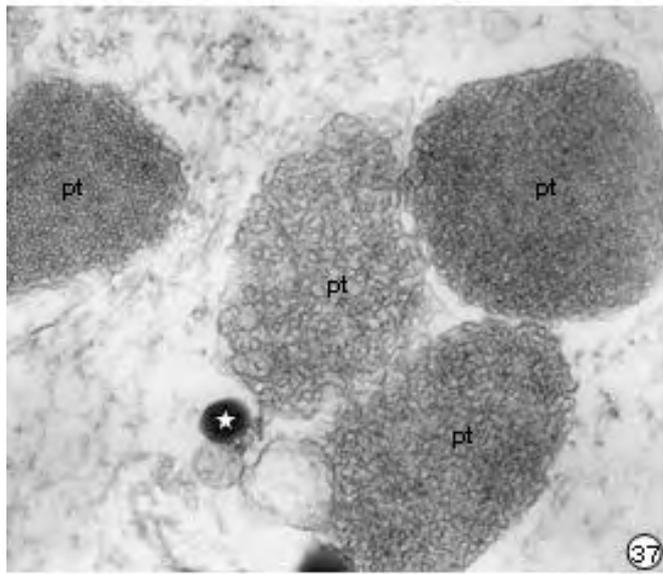
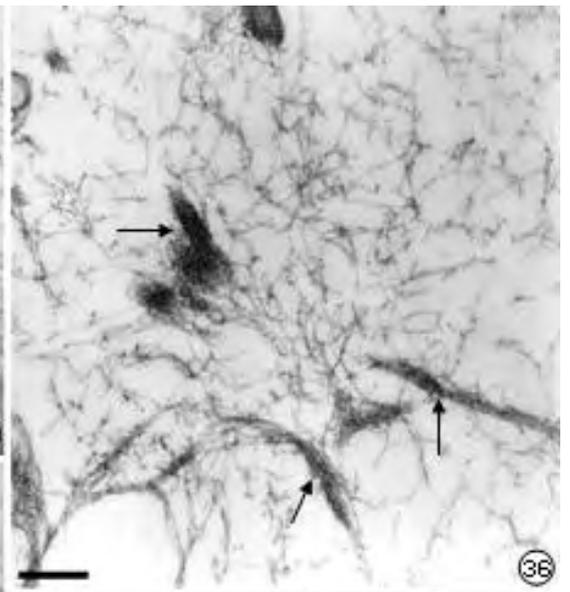
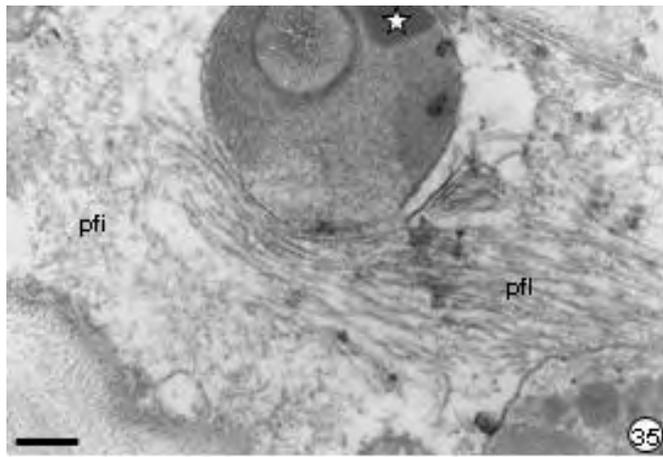


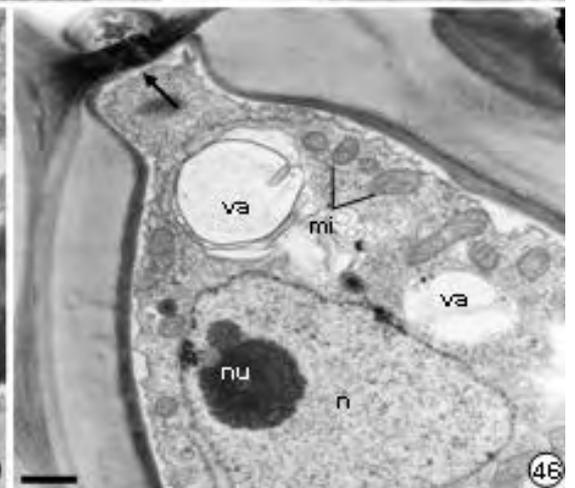
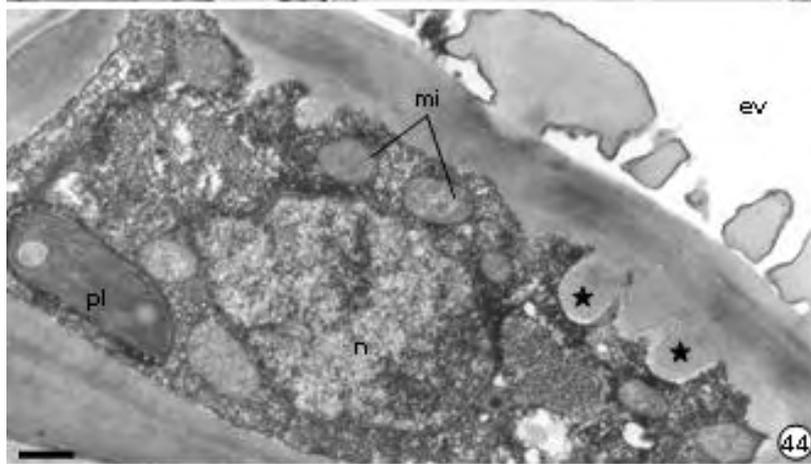
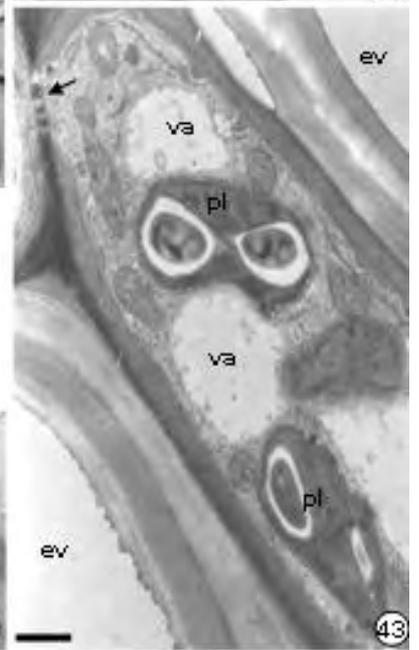
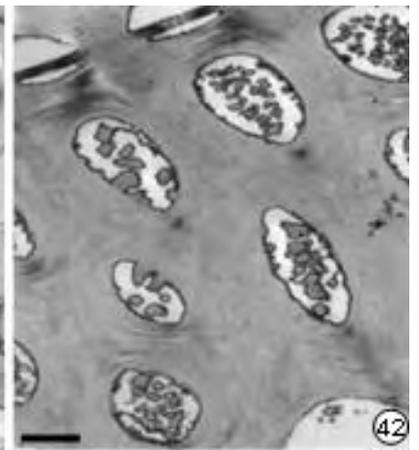
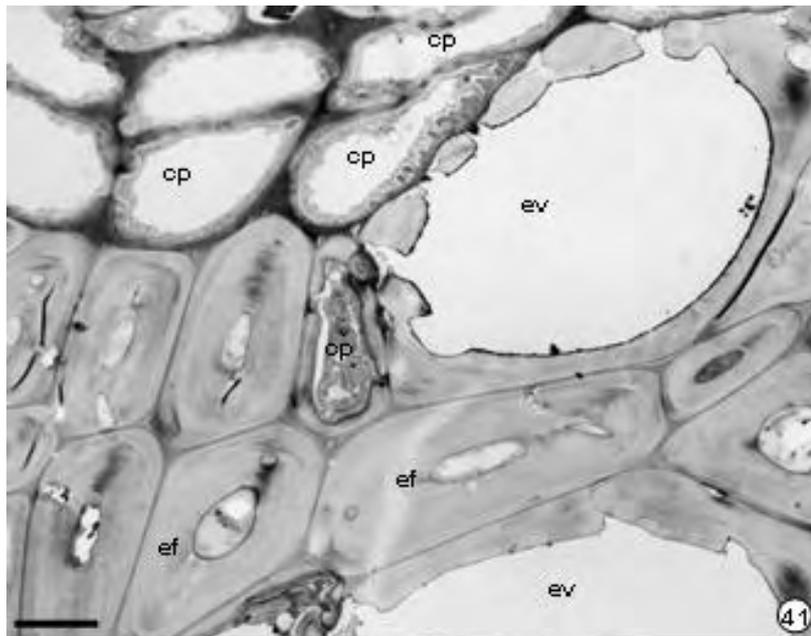












Legenda das Figuras

Figuras 1-9. Fotomicrografias do pulvino primário de leguminosas do cerrado em secção transversal. 1. Aspecto geral do pulvino de *Senna rugosa* onde se observa epiderme (ep) unisseriada, córtex (ct) parenquimático desenvolvido e sistema vascular (sv) central em forma de um anel (Barra= 200 μm). 2-9. Aspecto geral do sistema vascular dos pulvinos. 2. *Bauhinia rufa*. Sistema vascular em anel e dois feixes colaterais acessórios em posição medular (Barra= 250 μm). 3. *Copaifera langsdorffii*. Sistema vascular em formato de anel (Barra= 250 μm). 4. *Andira humilis*. Sistema vascular na forma de um arco com as extremidades livres e curvadas para o exterior (Barra= 250 μm). 5. *Dalbergia miscolobium*. Sistema vascular em formato de anel (Barra= 250 μm). 6. *Zornia diphylla*. Sistema vascular na forma de semi-arco, formado por cinco feixes colaterais separados por parênquima interfascicular (Barra= 125 μm). 7. *Mimosa rixosa*. Sistema vascular em formato de anel (Barra= 160 μm). 8. *Mimosa flexuosa*. Sistema vascular em formato de anel (Barra= 110 μm). 9. *Stryphnodendron polyphyllum*. Sistema vascular em formato de anel (Barra= 160 μm).

Figuras 10-17. Fotomicrografias do sistema vascular do pulvino primário de leguminosas do cerrado. 10. Secção transversal mostrando bainha de fibras septadas (fs) entre a endoderme (en) e o floema (fl) do pulvino de *Bauhinia rufa*. Notar a ocorrência de idioblastos fenólicos bastante volumosos no floema (Barra= 30 μm). 11. Secção transversal do pecíolo de *Bauhinia rufa* mostrando bainha de fibras lignificadas (flg) ao redor do floema (fl) (Barra= 30 μm). 12. Detalhe das fibras septadas de *Senna rugosa* em secção transversal, onde se observa núcleo (setas) conspícuo e divisões periclinais (pontas de seta) (Barra= 20 μm). 13. Secção longitudinal do pulvino de *Senna rugosa* mostrando fibras septadas com núcleo evidente, paredes pecto-celulósicas espessas com campos de pontoação primários (pontas de seta) e

septos (setas) (Barra= 20 μm). 14. Dissociado do sistema vascular do pulvino de *Senna rugosa* mostrando fibra septada com septos (setas) e campos de pontoação primários (Barra= 50 μm). 15. Secção transversal do pulvino de *Senna rugosa* mostrando floema com elementos de tubo crivado (etc), células companheiras (cc) e células parenquimáticas (cp). A seta indica idioblasto com cristal (Barra= 13 μm). 16. Secção transversal do pulvino de *Mimosa rixosa* mostrando floema com elementos de tubo crivado (etc), células companheiras (cc), células parenquimáticas (cp) e idiblastos (id) mucilaginosos (Barra= 20 μm). 17. Secção transversal do pulvino de *Copaifera langsdorffii* mostrando fibras septadas (fs), floema (fl) e xilema (xl). Raios parenquimáticos atravessam xilema, o floema e chegam até as fibras septadas. A seta indica idioblasto fenólico no raio parenquimático do xilema (Barra= 20 μm).

Figuras 18-23. Eletronmicrografias de fibras septadas do pulvino de leguminosas do cerrado.

18. Fibra septada do pulvino de *Copaifera langsdorffii* em corte longitudinal mostrando parede (pc) pecto-celulósica espessada multilamelada, núcleo (n) desenvolvido com nucléolo (nu) evidente e citoplasma denso com mitocôndrias (mi) e polirribossomos (Barra= 0,75 μm). 19. Secção transversal de fibra septada do pulvino de *Copaifera langsdorffii* mostrando parede (pc) espessa multilamelada com aspecto laxo. cpp= campo de pontoação primário (Barra= 1,3 μm). 20. Detalhe mostrando campo de pontoação primário com plasmodesmos (setas) em fibra septada do pulvino de *Mimosa rixosa*. mi= mitocôndria (Barra= 0,3 μm). 21. Fibra septada de *Copaifera langsdorffii* mostrando plastídios (pl), polirribossomos, mitocôndrias (mi), retículo endoplasmático (re) e gotas de óleo (ol) dispersas no citoplasma e dentro de vacúolos (va). pc= parede celular (Barra= 0,25 μm). 22. Parte de fibra do pulvino de *Stryphnodendron polyphyllum* onde se observam paredes delgadas e septo (Barra= 1,3 μm). 23. Detalhe da figura anterior mostrando septo formado por lamela mediana (lm) e duas

porções de parede celular (pc). Notar a ocorrência de plasmodesmos e de citoplasma denso na região do septo (Barra= 0,3 μm).

Figuras 24-27. Eletronmicrografias do floema do pulvino de leguminosas do cerrado. 24. Aspecto geral do floema de *Stryphnodendron polyphyllum* mostrando idioblastos (id) fenólicos, elementos de tubo crivado (etc) com lúmen amplo, células companheiras (cc) e células de parênquima (cp). n= núcleo; ol= gotas de óleo (Barra= 2,3 μm). 25. Pulvino de *Mimosa rixosa* mostrando elementos de tubo crivado (etc) com lúmen amplo, células companheiras (cc) e células de parênquima (cp) (Barra= 1,5 μm). 26. Floema do pulvino de *Zornia diphylla* mostrando elementos de tubo crivado (etc), células companheiras (cc) com invaginações digitiformes na parede e células de parênquima (cp). Observar a ocorrência de agrupamentos de células floemáticas (Barra= 3 μm). 27. Detalhe da figura anterior mostrando elementos de tubo crivado (etc) com paredes nacaradas, células companheiras (cc) com paredes labirínticas e células de parênquima (cp). A seta indica corpo proteico cristalino no elemento de tubo crivado (Barra= 1,3 μm).

Figuras 28-34. Eletronmicrografias do floema do pulvino de leguminosas do cerrado. 28. Elemento de tubo crivado de *Mimosa rixosa* onde são observados numerosos plastídios (pl) com inclusões proteicas. Notar a presença de placa crivada (pcr) com acúmulo de calose e retículo do tubo crivado (re) extensivo (Barra= 0,75 μm). 29. Detalhe mostrando plasmodesmos (setas) na placa crivada em elemento de tubo crivado do pulvino de *Dalbergia miscolobium*. pr= poros da placa crivada (Barra= 0,15 μm). 30. Detalhe da figura 28 mostrando retículo endoplasmático liso (rel) extensivo na extremidade do elemento de tubo crivado. pc= parede celular; *= corpo cristalino proteico (Barra= 0,2 μm). 31. Retículo do tubo crivado (setas) próximos à membrana plasmática no floema do pulvino de

Stryphnodendron polyphyllum. pc= parede celular (Barra= 0,2 μm). 32. Detalhe mostrando mitocôndrias (mi) próximas à membrana plasmática, envoltas por retículo endoplasmático liso (rel) em elemento de tubo crivado de *Mimosa rixosa*. pc= parede celular (Barra= 0,2 μm). 33. Plastídio-P com inclusões proteicas cristalinas (*) e proteínas fibrilares (pfi) no elemento de tubo crivado de *Stryphnodendron polyphyllum*. Notar a ocorrência de mitocôndrias (mi) envolta por retículo endoplasmático liso (rel) nas adjacências da membrana plasmática. pc= parede celular (Barra= 0,2 μm). 34. Plastídio com corpo cristalino protéico (*) e proteínas tubulares (pt) e fibrilares (pfi) no elemento de tubo crivado de *Mimosa rixosa*. pc= parede celular (Barra= 0,2 μm).

Figuras 35-40. Eletronmicrografias do floema do pulvino de leguminosas do cerrado. 35. Detalhe mostrando proteínas fibrilares (pfi) e filamentosas (pfl) no elemento de tubo crivado de *Stryphnodendron polyphyllum*. O * indica corpo proteico cristalino dentro do plastídio (Barra= 0,25 μm). 36. Proteínas fibrilares dispersas e aglomeradas na forma de grumos (setas) no elemento de tubo crivado de *Andira humilis* (Barra= 0,35 μm). 37. Proteínas tubulares (pt) e corpo proteico cristalino (*) no elemento de tubo crivado do pulvino de *Mimosa rixosa* (Barra= 0,15 μm). 38. Célula companheira (cc) no pulvino de *Stryphnodendron polyphyllum* onde se observa núcleo (n) desenvolvido, mitocôndrias (mi) e gotas de óleo (ol). etc= elemento de tubo crivado (Barra= 0,6 μm). 39. Detalhe de célula de transferência no pulvino de *Mimosa rixosa* onde se observam projeções (*) da parede, núcleo (n) desenvolvido com nucléolo (nu) evidente, mitocôndrias (mi), retículo endoplasmático rugoso (rer), polirribossomos e vesículas (Barra= 0,4 μm). 40. Célula parenquimática do pulvino de *Mimosa rixosa* mostrando numerosas mitocôndrias (mi) volumosas, retículo endoplasmático rugoso (rer), polirribossomos, plastídios (pl) com plastoglóbulos e vesículas (Barra= 0,25 μm).

Figuras 41-46. Eletronmicrografias do xilema do pulvino de leguminosas do cerrado. 41. Aspecto geral do xilema do pulvino primário de *Mimosa rixosa* mostrando elementos de vaso (ev), elementos fibriformes (ef) e células de parênquima (cp) (Barra= 5,5 µm). 42. Detalhe de elemento de vaso do pulvino de *Stryphnodendron polyphyllum* mostrando pontoações guarnecidas (Barra= 1,3 µm). 43. Célula parenquimática do xilema do pulvino de *Zornia diphylla*, onde são observadas mitocôndrias, plastídios (pl) com grãos de amido e plastoglóbulos, polirribossomos e vacúolos (va). A seta indica campo de pontoação com plasmodesmos. ev= elemento de vaso (Barra= 1,0 µm). 44. Célula de transferência em contato com pontoações guarnecidas do elemento de vaso (ev) de *Copaifera langsdorffii* mostrando invaginações (*) da parede, núcleo (n), mitocôndrias (mi), plastídio (pl), polirribossomos e vesículas (Barra= 0,6 µm). 45. Célula de transferência do xilema do pulvino de *Mimosa rixosa*, onde são observadas mitocôndrias (mi), plastídios (pl) com plastoglóbulos, retículo endoplasmático rugoso (rer), polirribossomos e vesículas e vacúolos (va). Os * indicam vilosidades da parede (Barra= 0,6 µm). 46. Detalhe de elemento fibriforme no xilema do pulvino de *Mimosa rixosa* mostrando núcleo (n) conspícuo com nucléolo (nu) evidente, mitocôndrias (mi), polirribossomos e vacúolos (va). Observar a ocorrência de campo de pontoação (seta) (Barra= 0,75µm).

Considerações finais

Considerações finais

Esse trabalho possibilitou a complementação dos estudos sobre anatomia e ultra-estrutura dos pulvinos de espécies de leguminosas, além de fornecer informações detalhadas sobre a endoderme e o sistema vascular dos pulvinos de leguminosas com diferentes tipos e velocidades de movimento foliar.

De um modo geral, as características estruturais e ultra-estruturais observadas para o pulvino primário das espécies estudadas são típicas de pulvinos de leguminosas e semelhantes ao descrito em literatura. Independentemente da subfamília à qual pertencem, os pulvinos de leguminosas apresentam um padrão geral de organização anatômica que lhes conferem características apropriadas à sua função, tais como córtex parenquimático desenvolvido, com conteúdo fenólico nas espécies somente seismonásticas, endoderme repleta de grãos de amido e sistema vascular central com redução de lignificação.

A análise das células da endoderme dos pulvinos permitiu-nos confirmar a relação existente entre o conteúdo de tais células e o tipo e velocidade de movimento foliar apresentados, como sugerido em literatura para algumas espécies násticas; além disso, o estudo do pulvino de *Zornia diphylla*, espécie que apresentam somente movimentos heliotrópicos, permitiu-nos a observação de que o conteúdo celular da endoderme é idêntico àquele apresentado pela endoderme de pulvinos de espécies com movimentos seismonásticos rápidos.

Quanto ao sistema vascular, nossos dados corroboraram a existência de fibras septadas ao redor do floema, ao invés de colênquima, em todas as espécies estudadas, contrariamente ao descrito na maior parte da literatura. As peculiaridades observadas no floema e xilema confirmam a hipótese da participação do sistema vascular no funcionamento do pulvino.

As peculiaridades estruturais apresentadas pelos pulvinos relacionam-se com sua função principal, que é promover o ajuste do posicionamento das folhas em situações adversas. A falta de lignificação dos tecidos proporciona maior flexibilidade a esta região da folha; a ausência de barreiras apoplásticas e a ocorrência generalizada de plasmodesmos favorecem a continuidade apoplástica e simplástica, respectivamente, desde a epiderme até o cilindro vascular do pulvino. Tal continuidade é fundamental para a rápida redistribuição de íons que se dá durante os movimentos foliares e constitui uma característica diferencial do pulvino em relação às demais regiões foliares.

Referências bibliográficas

- ACCORSI, W.R. 1952. Os fenômenos de movimento no reino vegetal: Aula Inaugural. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, v. 9.
- CALDAS, L.S.L., LÜTTGE, U., FRANCO, A.C. & HARIDASAN, M. 1997. Leaf heliotropism in *Pterodon pubescens*, a woody legume from the Brazilian cerrado. Revista Brasileira de Fisiologia vegetal 9: 1-7.
- CAMPBELL, N.A. & THOMSON, W.W. 1977. Multivacuolate motor cells in *Mimosa pudica* L.. Annals of Botany 41: 1361-1362.
- CAMPBELL, N.A., STIKA, K.M. & MORRISON, G.H. 1979. Calcium and potassium in the motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscope. Science 204: 185-187.
- CAMPBELL, N.A. & GARBER, R.C. 1980. Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizia* during leaf movement. Planta 148: 251-255.
- CHANG, S-C., CHO, M.H., KANG, B.G. & KAUFMAN, P.B. 2001. Changes in starch content in oat (*Avena sativa*) shoot pulvini during the gravitropic response. Journal of Experimental Botany 52: 1029-1040.
- EHLERINGER, J. & FORSETH, I. 1980. Solar tracking by plants. Science 210: 1094-1098.
- DATTA, M. 1957. The contractile vacuoles. Nature 179: 253-254.
- DAYANANDAN, P., HEBARD, F.V., BALDWIN, V.D. & KAUFMAN, P.B. 1977. Structure of gravity-sensitive sheath and internodal pulvini in grass shoots. American Journal of Botany 64 (10): 1189-1199.
- DUTT, A.K. 1957. Vacuoles of the pulvinus and the mechanism of movement. Nature 179: 254.
- ESAU, K. 1970. On the phloem of *Mimosa pudica* L.. Annals of Botany 34: 505-515.
- ESAU, K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher: São Paulo.
- FLEURAT-LESSARD, P. 1981. Ultrastructural features of the starch sheath cells of the primary pulvinus after gravistimulation of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). Protoplasma 105: 177-184.

- FLEURAT-LESSARD, P. 1988. Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. *Biological Review* 63: 1-22.
- FLEURAT-LESSARD, P. & BONNEMAIN, J-L. 1978. Structural and ultrastructural characteristics of the vascular apparatus of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). *Protoplasma* 94: 127-143.
- FLEURAT-LESSARD, P. & ROBLIN, G. 1982. Comparative histocytology of the petiole and the main pulvinus in *Mimosa pudica* L.. *Annals of Botany* 50: 83-92.
- FLEURAT-LESSARD, P. & MILLET, B. 1984. Ultrastructural features of cortical parenchyma cells (“motor cells”) in stems of *Berberis canadensis* Mill. and tertiary pulvini of *Mimosa pudica* L.. *Journal of Experimental Botany* 35:1332-1341.
- FLEURAT-LESSARD, P. & SATTER, R.L. 1985. Relationship between structure and motility of *Albizia* motor organs: changes in ultrastructure of cortical cells during dark-induced closure. *Protoplasma* 128: 72-79.
- FLEURAT-LESSARD, P., ROBLIN, G., BONMORT, J. & BESSE, C. 1988. Effects of colchicine, vinblastine, cytochalasin B and phalloidin on the seismonastic movement of *Mimosa pudica* leaf and on motor cell ultrastructure. *Journal of Experimental Botany* 39: 209-221.
- GRIGNON, N., TOURAINE, B. & GRIGNON, C. 1992. Internal phloem in the pulvinus of Soybean plants. *American Journal of Botany* 50: 83-92.
- HEWITSON, J. 2001. Nyctinasty and *Mimosa* leaf movement. Disponível em: <http://www-saps.plantsci.ca.ac.uk/records/rec117.htm>.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOG E.A. & STEVENS, P.F. 1999. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates: Massachusetts.
- KAMEYAMA, K., KISHI, Y., YOSHIMURA, M., KANZAWA, N., SAMESHIMA, M. & TSUCHIYA, T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37.
- KOLLER, D. 1990. Light-driven leaf movements. *Plant, Cell and Environment* 13: 615-632.
- MACHADO, S.R. & RODRIGUES, T.M. 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27 (1): 135-147.

- MAUSETH, J.D. 1988. Plant Anatomy. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, California.
- MAYER, W.-E., FLACH, D., RAJU, M.V.S., STARRACH, N. & WIECH, E. 1985. Mechanics of circadian pulvini movements in *Phaseolus coccineus* L.. *Planta* 163: 381-390.
- MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA, M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, A.V. & NOGUERIA, P.E. 1998. Flora vascular do bioma Cerrado. In *Cerrado: ambiente e flora* (S.M. Sano & S.P. Almeida, eds). EMBRAPA-CPAC: Planaltina.
- MORSE, M.J. & SATTER, R.L. 1979. Relationship between motor cell ultrastructure and leaf movements in *Samanea saman*. *Physiology Plantarum* 46: 338-346.
- MORILLON, R., LIÉNARD, D., CHRISPEELS, M.J. & LASSALLES, J-P. 2001. Rapid movements of plants organs require solute-water cotransporters or contractile proteins. *Plant Physiology* 127: 720-723.
- MOYSSET, L. & SIMÓN, E. 1991. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *American Journal of Botany* 78:1467-1486
- PFEFFER, W. 1907. The physiology of plants. Claredon Press, Oxford, v. 3.
- POLHILL, R.M. 1981. Advances in legume systematics. Royal Botanic Gardens, Kew.
- RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230.
- RODRIGUES, T.M. & MACHADO, S.R. 2004. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Botanica Brasilica* 18 (2): 381-390.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W. 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, California.
- SATTER, R.L., SABNIS, D.D. & GALSTON, A.W. 1970. Phytochrome controlled nyctinasty in *Albizzia julibrissin*. I. Anatomy and fine structure of the pulvinule. *American Journal of Botany* 57: 374-381.

- SATTER, R.L. & GALSTON, A.W. 1981. Mechanisms of control of leaf movements. Annual Review of Plant Physiology 32: 83-110.
- SATTER, R.L., GARBER, R.C., KHAIRALLAH, L. & CHENG, Y-S. 1982. Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. The Journal of Cell Biology 95: 893-902.
- SATTER, R.L., MORSE, M.J., LEE, Y., CRAIN, R.C., COTE, G. & MORAN, N. 1988. Light and clock-controlled leaflet movements in *Samanea saman*: a physiological, biophysical and biochemical analysis. Botanical Acta 101: 205-213.
- SONG, I., LU, C.R., BROCK, T.G. & KAUFMAN, P.B. 1988. Do Starch statoliths act as gravisensors in cereal grass pulvini? Plant Physiology 86: 1155-1162.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum: Nova Odessa.
- TORIYAMA, H. 1953. Observational and experimental studies of sensitive plants I: The structure of parenchymatous cells of pulvinus. Cytology 18: 283-292.
- TORIYAMA, H. 1954. Observational and experimental studies of sensitive plants. II. On the changes in motor cells of diurnal and nocturnal condition. Cytologia 19: 29-40.
- TORIYAMA, H. 1955. Observational and experimental studies of sensitive plants. V. The development of the tannin vacuole in the motor cell of the pulvinus. Botanical Magazine 68: 203-208.
- TORIYAMA, H. 1957. Observational and experimental studies of sensitive plants. VII. The migration of colloidal substance in the primary pulvinus. Cytologia 22: 184-192.
- TORIYAMA, H. 1967. A comparison of the *Mimosa* motor cells before and after stimulation. Proceedings of the Japan Academy 43 (6): 541-546.
- TORIYAMA, H. & SATÔ, S. 1968. Electron microscopic observations of the motor cells of *Mimosa pudica* L. I. A comparison of the motor cells before and after stimulation. Proceedings of the Japan Academy 44 (7): 702-706.
- TORIYAMA, H. & KOMADA, Y. 1971. The recovery process of the tannin vacuole in the motor cell of *Mimosa pudica* L.. Cytologia 36: 690-697.

- TORIYAMA, H. & JAFFE, M.J. 1972. Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiology* 49: 72-81.
- WILKINSON, H. P. 1979. The plant surface. *In* *Anatomy of dicotyledons*. (C.R. Metcalfe & L. Chalk, eds). Clarendon Press, Oxford, v. 1.
- YAMASHIRO, S., KAMEYAMA, K., KANZAWA, N., TAMIYA, T., MABUCHI, I. & TSUCHIYA, T. 2001. The gelsolin/fragminfamily protein identified in the higher plant *Mimosa pudica*. *Journal of Biochemistry* 130 (2): 243-249.