



ANÁLISES ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM FOLHAS
DE *MIMOSA* (LEGUMINOSAE) COM DIFERENTES TIPOS DE
MOVIMENTO FOLIAR E INFLUÊNCIA DO CÁLCIO EM ASPECTOS
ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DOS PULVINOS

STEFANY CRISTINA DE MELO SILVA

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências, campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, AC: Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU-SP
2023

A decorative graphic in the bottom right corner consisting of overlapping geometric shapes (triangles and polygons) in shades of light blue and white, with a pattern of small white dots on the blue areas.

ANÁLISES ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM FOLHAS
DE *MIMOSA* (LEGUMINOSAE) COM DIFERENTES TIPOS DE
MOVIMENTO FOLIAR E INFLUÊNCIA DO CÁLCIO EM ASPECTOS
ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DOS PULVINOS

STEFANY CRISTINA DE MELO SILVA

PROF^a DR^a TATIANE MARIA RODRIGUES

ORIENTADORA

**BOTUCATU-SP
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Stefany Cristina de Melo.

Análises anatômicas e ultraestruturais em folhas de Mimosa (Leguminosae) com diferentes tipos de movimento foliar e influência do cálcio em aspectos estruturais e funcionais dos pulvinos / Stefany Cristina de Melo Silva.
- Botucatu, 2023

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

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Capes: 20302002

1. Anatomia vegetal. 2. Análise foliar. 3. Oxalatos. 4. Pulvínulo. 5. Leguminosa.

Palavras-chave: Cristais de oxalato de cálcio; Elemento de tubo crivado; Endoderme; Pecíolo; Pulvino.

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista a minha família, em especial aos meus pais, Cecília e José, ao meu irmão Lucas, à minha avó Catarina e ao meu companheiro Henrique por todo o amor, incentivo e apoio nas diferentes fases da minha vida.

Agradecimentos

A **Deus**, por todas as bênçãos na minha vida, pela força para superar os desafios e pela conquista de mais essa vitória.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES** pelo apoio financeiro (Código de Financiamento 001).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq** pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo- 140743/2019-7).

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, Câmpus de Botucatu, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), pela estrutura e formação acadêmica.

À **Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues** pela orientação, por todo o apoio, paciência, incentivo e ensinamentos que foram fundamentais durante esse processo de desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos alunos de Iniciação científica **Lúcio Queiroz de Carvalho** e **Yasmin Massimino Sampaio de Souza** pela participação e colaboração na realização deste trabalho.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica**, Unesp – Botucatu, pelo processamento de amostras.

Aos membros da banca de qualificação, **Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado**, **Profa. Dra. Makeli Garibotti Lusa** e a **Profa. Dra. Rosani do Carmo de Oliveira Arruda** pelas contribuições.

Aos membros da banca da defesa **Profa. Dra. Aline Rodondo Martins**, **Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Marques**, **Prof. Dr. Luiz Ricardo dos Santos Tozin**, **Profa. Dra. Yve Canaveze**, e aos suplentes por aceitarem o convite para auxiliar na qualidade dessa pesquisa.

Aos **docentes do Departamento de Biologia Vegetal** pelas contribuições na minha formação acadêmica.

A todos os **funcionários do Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia (DBBVPZ)**, pela convivência e auxílios.

Aos **funcionários da biblioteca** pelo ótimo atendimento e pela edição da ficha catalográfica.

Aos **funcionários da seção de pós-graduação**, IBB, UNESP pela assistência.

Aos **colegas da pós-graduação**, e a todos os membros do **LaPAV (Laboratório de Pesquisas em Anatomia Vegetal)** pela convivência e amizade. Em especial, a **Diana P. Seixas** pelos ensinamentos e auxílio na montagem dos experimentos.

Às queridas amigas **Laisa Cabral** e **Eliandra Nunes** pelo agradável convívio, apoio e amizade.

À **minha família**, em especial minha mãe Cecília, por todo amparo, carinho, inspiração e força.

Agradeço ao meu **companheiro**, Henrique Vasque, pelo auxílio durante o experimento, por estar sempre ao meu lado, por todo o suporte e companheirismo.

Muito obrigada!

Sumário

Resumo	8
Abstract	10
Introdução geral	11
Capítulo 1: Pulvinus and petiole comparative anatomy in a species of <i>Mimosa</i> with slow nyctinastic movement.....	18
Capítulo 2: Influência do cálcio na formação de cristais em pulvinos e pecíolos e na movimentação foliar em duas espécies de <i>Mimosa</i> (Leguminosae).....	33
Capítulo 3: Morphometry of sieve members and P-protein accumulation in pulvini and petioles of <i>Mimosa</i> species (Leguminosae, Caesalpinioideae) with different types of leaf movement.....	61
Considerações finais	77

SILVA, SCM. **Análises anatômicas e ultraestruturais em folhas de *Mimosa* (Leguminosae) com diferentes tipos de movimento foliar e influência do cálcio em aspectos estruturais e funcionais dos pulvinos.** 2023. 77p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo

Leguminosas são caracterizadas pela presença de pulvinos que garantem às folhas capacidade de movimentação em resposta à estímulos endógenos ou exógenos. O funcionamento dos pulvinos está relacionado com mudanças na pressão de turgor e alterações na conformação do citoesqueleto nas células corticais (células motoras), o que envolve proteínas cálcio-dependentes, além das características do sistema vascular, especialmente do floema. Estudos demonstram que pulvinos de folhas com movimentos lentos apresentam cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme, enquanto que pulvinos de espécies com movimentos rápidos apresentam endoderme desprovida de cristais. Este trabalho teve como objetivo investigar aspectos anatômicos e ultraestruturais de pulvinos e pecíolos de forma comparativa entre espécies de *Mimosa* com diferentes tipos de movimento foliar com ênfase nas características subcelulares do floema, além de averiguar se a disponibilidade de cálcio influencia na formação de cristais na endoderme e no funcionamento dos pulvinos. Indivíduos de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., espécie com movimentos foliares nictinásticos lentos, e *Mimosa pudica* L., espécie com movimentos foliares seismonásticos rápidos, foram submetidos a 360, 240, 120 e 0 mgL⁻¹ de Ca²⁺ em meio hidropônico. Pulvinos e pecíolos foram processados segundo técnicas convencionais em microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Análises utilizando espectroscopia por energia dispersiva foram realizadas ao MEV para quantificação de cálcio; técnica ultracitoquímica foi aplicada para localização de depósitos subcelulares de cálcio ao MET. Os pulvinos de *M. caesalpiniiifolia* apresentam características comumente encontradas em outras espécies de leguminosas, incluindo espécies de *Mimosa* com movimentos foliares rápidos. Embora seja um aspecto comum para pulvinos com movimentos lentos, a detecção de cristais de oxalato de cálcio na endoderme é uma novidade para pulvinos de *Mimosa*, corroborando a ideia de que o conteúdo da endoderme dos pulvinos está relacionado ao tipo de movimento foliar apresentado. Proteínas filamentosas, tubulares e corpos paracristalinos foram observados nos elementos de tubo crivado de pulvinos e pecíolos de ambas as

espécies, sendo que a abundância de proteína-P pareceu ser maior nos pulvinos que nos pecíolos, o que pode estar relacionado ao envolvimento do floema no funcionamento dos pulvinos. Nos pulvinos e pecíolos de *M. pudica*, o acúmulo de proteína-P pareceu ser maior que em *M. caesalpinifolia*, o que parece ter relação com o tipo de movimento foliar apresentado. Além disso, a abundância de proteína-P no pecíolo de *M. pudica* sugere o papel do floema peciolar na transmissão basípeta de estímulos dos folíolos para o pulvino. As paredes dos elementos de tubo crivado se mostraram mais espessas nos pulvinos em comparação com pecíolo, especialmente em *M. pudica*, sugerindo seu envolvimento no transporte radial de íons durante a movimentação foliar. Cristais prismáticos de oxalato de cálcio se formaram na endoderme de pulvinos e pecíolos de *M. caesalpinifolia* em todos os tratamentos, exceto na ausência de Ca^{2+} . Nos pulvinos de *M. pudica* não houve formação de cristais de oxalato de cálcio em nenhum dos tratamentos; por outro lado, nos pecíolos dessa espécie, cristais foram formados em todos os tratamentos, exceto na ausência de cálcio. Em *M. caesalpinifolia*, as folhas apresentaram movimentos nictinásticos lentos em todos os tratamentos, inclusive na ausência de cálcio. Plantas de *M. pudica* mantiveram sua capacidade de movimentação foliar em resposta a estímulos mecânicos, exceto na ausência de Ca^{2+} . Nossos resultados sugerem o maior envolvimento do cálcio nos mecanismos de funcionamento e reações celulares em pulvinos de folhas com movimentos seismonásticos rápidos em comparação com pulvinos de folhas com movimentos foliares nictinásticos lentos.

Palavras-chave: cristais de oxalato de cálcio, elemento de tubo crivado, endoderme, pecíolo, pulvino, proteína-P

Abstract

Legumes are characterized by the presence of pulvini guarantee the ability of leaves to move in response to endogenous or exogenous stimuli. The functioning of the pulvini is related to changes in the turgor pressure and changes in the conformation of the cytoskeleton in the cortical cells (motor cells), which involves calcium-dependent proteins, in addition to the characteristics of the vascular system, especially the phloem. Studies show that pulvini from leaves with slow movements have prismatic crystals of calcium oxalate in the endodermis, while pulvini from species with fast movements have endoderm devoid of crystals. Aspects of pulvini and petioles in a comparative way between *Mimosa* species with different types of leaf movement with emphasis on the subcellular characteristics of the phloem, in addition to investigating whether the availability of calcium influences the formation of crystals in the endoderm and in the functioning of the pulvini. Individuals of *Mimosa caesalpinifolia* Benth., a species with slow nyctinastic leaf movements, and *Mimosa pudica* L., a species with fast seismonastic leaf movements, were submitted to 360, 240, 120 and 0 mgL⁻¹ of Ca²⁺ in hydroponic solution. Pulvini and petioles were processed according to conventional techniques in light and scanning electron (SEM) and transmission (TEM) microscopy. Analyzes using energy dispersive spectroscopy were performed under SEM for calcium quantification; The ultracytochemical technique was applied to localize subcellular calcium deposits to TEM. Pulvini of *M. caesalpinifolia* exhibit features commonly found in other legume species, including *Mimosa* species with rapid leaf movements. Although it is a common aspect for pulvini with slow movements, the detection of calcium oxalate crystals in the endodermis is a novelty for pulvini of *Mimosa*, corroborating the idea that the content of the endodermis of pulvini is related to the type of leaf movement presented. Filamentous, tubular proteins and paracrystalline bodies were observed in the sieve tube elements of pulvini and petioles of both species, and the abundance of P-protein appeared to be greater in pulvini than in petioles, which may be related to the involvement of the phloem in the pulvini functioning. In the pulvini and petioles of *M. pudica*, the accumulation of P-protein seemed to be greater than in *M. caesalpinifolia*, which seems to be related to the type of leaf movement presented. Furthermore, the abundance of P-protein in the petiole of *M. pudica* suggests the role of the petiolar phloem in the basipetal transmission of stimuli from the leaflets to the pulvinus. The walls of sieve-tube elements were thicker in pulvini compared to petioles, especially in *M. pudica*, suggesting their involvement in radial ion transport during leaf movement. Prismatic crystals of calcium oxalate formed in the endodermis of pulvini and petioles of *M. caesalpinifolia* in all treatments, except in the absence of Ca²⁺. In *M. pudica* pulvinus there was no formation of calcium oxalate crystals in any of the treatments; on the other hand, in the petioles of this species, crystals were formed in all treatments, except in the absence of calcium. In *M. caesalpinifolia*, the leaves showed slow nyctinastic movements in all treatments, even in the absence of calcium. *M. pudica* plants maintained their leaf movement capacity in response to mechanical stimuli, except in the absence of Ca²⁺. Our results suggest a greater involvement of calcium in the functioning mechanisms and cellular reactions in leaf pulvini with fast seismonastic movements compared to leaf pulvini with slow nyctinastic leaf movements.

Key-words: calcium oxalate crystals, endodermis, P-protein, petiole, pulvinus, sieve tube members

Introdução geral

Leguminosae Adans. é a terceira maior família de Angiospermas com aproximadamente 770 gêneros e mais de 19.500 espécies e possui distribuição cosmopolita (LPWG 2017). Esta é a maior família em número de espécies da flora brasileira e seus representantes ocorrem em todos os tipos de vegetação, apresentando grande diversidade de formas, incluindo desde pequenas ervas até árvores de grande porte (Souza et al. 2018). A família é particularmente importante no cerrado, onde ocorrem aproximadamente 110 gêneros e 1000 espécies de Leguminosae (Souza et al. 2018). Além de sua grande importância ecológica relacionada a fixação biológica de nitrogênio (Hungria & Nogueira 2022), diversos representantes de Leguminosae apresentam importância econômica e medicinal (Souza & Lorenzi 2012), incluindo ainda espécies bastante utilizadas na restauração de áreas degradadas (Silva & Corrêa 2011, Ferreira et al. 2007).

Atualmente, Leguminosae é composta por seis subfamílias: Cercidoideae LPWG, Detarioideae Burmeister. *emend.* LPWG, Duparquetioideae LPWG, Dialioideae LPWG, Papilionoideae DC. e Caesalpinioideae DC. *emend.* LPWG, onde está inserido o clado Mimosoide que inclui os mesmos representantes da antiga subfamília Mimosoideae (LPWG 2017). De forma geral, as leguminosas compartilham características morfológicas como folhas compostas alternas com pulvinos, inflorescência geralmente racemosa, flores bissexuadas, ovário monocarpelar e frutos do tipo legume, mas outros tipos podem ser encontrados, incluindo drupa, fóliculo, sâmaras, craspédio ou lomento (LPWG 2017, Souza et al. 2018).

Espécies de leguminosas são capazes de ajustar o posicionamento das folhas ou movimentar seus folíolos em respostas a estímulos externos ou endógenos (Accorsi 1952, Minorsky 2019). Movimentos foliares nictinásticos são bastante comuns entre as leguminosas e são caracterizados pela mudança na orientação das folhas ao longo do dia; no período diurno as folhas permanecem abertas, enquanto que no período noturno as folhas se fecham com o posicionamento vertical dos folíolos (Minorsky 2019). Esse é um processo rítmico controlado pelas interações entre o ambiente externo e o relógio biológico da planta (Accorsi 1952, Minorsky 2019). Além disso, alguns representantes do clado Mimosoide são conhecidos por apresentarem movimentos foliares seismonásticos que fazem com que os folíolos rapidamente se fechem em resposta ao toque (Accorsi 1952, Weintraub 1952), o que representa uma forma de proteção contra ataques de insetos herbívoros (Chaudhary et al. 2018, Hagihara et al. 2022).

Os pulvinos são as estruturas responsáveis pelos movimentos foliares rápidos ou lentos (Campbell & Thomson 1977, Campbell et al. 1979, Satter et al. 1982, Moysset & Simón 1991, Grignon et al. 1992, Rodrigues & Machado 2006). Morfologicamente, o pulvino é um espessamento que ocorre na base de folhas (pulvino primário), folíolos (pulvino secundário) e foliólulos (pulvino terciário), semelhante a uma articulação (Esau 1974, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978). É caracterizado pela presença de córtex amplo constituído por células parenquimáticas ricas em taninos (células motoras), escassez de lignificação, sistema vascular em posição central, ausência ou redução de medula e extensiva continuidade simplástica entre suas células e tecidos (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 2006). Essas características estruturais têm sido relacionadas com a maior flexibilidade do pulvino em relação às demais regiões foliares como pecíolo e raque (Fleurat-Lessard & Roblin 1982, Rodrigues & Machado 2004).

Estudos sugerem que o movimento foliar em espécies de leguminosas ocorre devido a diferenças na pressão de turgor entre as células motoras do córtex dos pulvinos que, devido à redistribuição de íons potássio, cloreto e de água, podem sofrer rápida reorganização no número e tamanho de seus vacúolos (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). Além das mudanças de turgor das células motoras, alterações na conformação do citoesqueleto em tais células, especialmente dos microfilamentos de actina estão envolvidas no funcionamento do pulvino (Fleurat-Lessard et al. 1988, Kameyama et al. 2000, Hewitson 2001, Yamashiro et al. 2001).

A interação entre elementos do citoesqueleto e o cálcio tem sido demonstrada em estudos envolvendo diferentes tipos de células motoras, como as de pulvinos. Yao et al. (2008) demonstraram que a despolimerização dos microfilamentos de actina nas células do pulvino de *Mimosa pudica* acarretou a elevação do cálcio intracelular. Assim, supomos que a deficiência de cálcio poderia afetar processos de polimerização dos elementos do citoesqueleto, em especial actina, comprometendo o funcionamento dos pulvinos. Por outro lado, o excesso de cálcio no corpo da planta pode causar toxidez (White & Broadley 2003). Estudos sugerem que o excesso de cálcio pode ser imobilizado na forma de cristais de oxalato de cálcio (Franceschi 2001) que se depositam em tecidos específicos como um

mecanismo para regulação dos níveis desse elemento nos tecidos vegetais (Franceschi & Nakata 2005). Entretanto, as funções desses cristais são ainda muito especulativas (Paiva 2019).

Em espécies com movimentos foliares násticos rápidos, a endoderme dos pulvinos apresenta somente grãos de amido, enquanto que nas espécies que apresentam movimentos foliares násticos lentos, cristais de oxalato de cálcio ocorrem juntamente com amiloplastos nas células endodérmicas (Fleurat-Lessard 1988, Morse & Satter 1979, Rodrigues & Machado 2007). Rodrigues & Machado (2007) mostraram que cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme de pulvinos de leguminosas com movimentos násticos lentos são envoltos por um compartimento formado por espessamentos, lignificados ou não, das paredes anticlinais e periclinal interna das células endodérmicas.

Estudos sugerem que em pulvinos de folhas com movimentos násticos rápidos, o cálcio se encontra livre e disponível para atuar em reações cálcio-dependente (Roblin et al. 1989, Rodrigues & Machado 2007) como a polimerização dos microfilamentos de actina nas células motoras. Por outro lado, o cálcio imobilizado na forma de cristais não pode agir na produção de sinais fisiológicos, impedindo a rápida resposta do pulvino à estímulos externos (Rodrigues & Machado 2007). Nós arguimos se as plantas com movimentos foliares rápidos que recebem doses excessivas de cálcio passam a acumular cristais no pulvino e se o suposto acúmulo de cristais de oxalato de cálcio na endoderme do pulvino de folhas com movimentos rápidos poderia comprometer seu funcionamento.

O sistema vascular dos pulvinos, especialmente o floema, pode atuar na redistribuição de íons e na transmissão de estímulos durante os movimentos foliares (Pfeffer 1907, Toriyama 1953, Satter & Galston 1981, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Moysset & Simón 1991, Rodrigues & Machado 2008). Estudos mostram que as paredes dos elementos de tubo crivado de pulvinos são espessas e com arranjo frouxo das microfibrilas de celulose, sendo que em algumas espécies foram relatados elementos de tubo crivado com paredes nacaradas (Rodrigues & Machado 2008). Nos elementos de tubo crivado de pulvinos, merece destaque a diversidade morfológica de proteína-P (filamentos curtos ou longos, agregados tubulares, material fibroso, corpos cristalinos), além da abundância de retículo de tubo crivado formando redes de membranas tubulares com vários graus de desenvolvimento (Rodrigues & Machado 2008). Entretanto, não há informações sobre a existência de relação entre a abundância e diversidade morfológica da proteína-P nos elementos de tubo crivado dos pulvinos e o tipo de movimento foliar.

Se a abundância e diversidade morfológica da proteína-P nos elementos de tubo crivado é restrita ao floema dos pulvinos em detrimento de outras regiões foliares foi um aspecto investigado nesse estudo.

Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar aspectos anatômicos e ultraestruturais de pulvinos e pecíolos de forma comparativa entre espécies de *Mimosa* com diferentes tipos de movimento foliar com ênfase nas características subcelulares do floema, além de averiguar se a disponibilidade de cálcio influencia na formação de cristais na endoderme e no funcionamento dos pulvinos. Como modelo para o estudo, foram escolhidas duas espécies de *Mimosa* que apresentam folhas compostas bipinadas e diferentes tipos de movimentos foliares: *Mimosa pudica* L. que apresenta movimentos foliares seismonásticos rápidos em resposta ao toque, e *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., cujas folhas apresentam movimentos nictinásticos lentos. Especificamente, nós investigamos a) a anatomia foliar de *M. caesalpiniiifolia* de forma comparativa entre pulvinos e pecíolos; b) a influência de diferentes concentrações de cálcio na formação de cristais na endoderme de pulvinos e na movimentação foliar em *M. pudica* e *M. caesalpiniiifolia*; e c) os aspectos ultraestruturais do floema, em especial as características das paredes dos elementos de tubo crivado e a abundância e diversidade de proteína-P, em pecíolos e pulvinos de *M. pudica* e *M. caesalpiniiifolia*.

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.
- Campbell, N.A., Garber, R.C. 1980. Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizia* during leaf movement. *Planta* 148: 251-255.
- 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., Thomson, W.W. 1977. Multivacuolate motor cells in *Mimosa pudica* L. *Annals of Botany* 41: 1361-1362.
- Chaudhary, A., Bala, K., Thakur, S., Kamboj, R., Dumra, N. 2018. Plant defenses against herbivorous insects: A Review. *International Journal of Chemical Studies* 5: 681-688.
- Esau, K. 1970. On the phloem of *Mimosa pudica* L. *Annals of Botany* 34:505-515.
- Ferreira, R.L.C.; Lira Junior, M.A.; Rocha, M.S. da; Santos, M.V.F. dos; Lira, M.A.; Barreto, L.P. 2007. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serapilheira em um bosque de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.). *Revista Árvore*, Viçosa-MG, 31: 7-12.
- 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., Bonnemain, J.P. 1978. Structural and ultrastructural characteristics of the vascular apparatus of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). *Protoplasma* 94: 127-143.
- 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., 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., 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.
- Franceschi, V. 2001. Calcium oxalate in plants. *Trends in Plant Science* 6: 331.
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* 56:41-71
- Grignon, N., Touraine, B., Grignon, C. 1992. Internal phloem in the pulvinus of soybean plants. *American Journal of Botany* 50: 83-92.

- Hagihara, T., Mano H., Miura, T., Hasebe, M., Toyota, M. 2022. Calcium-mediated rapid movements defend against herbivorous insects in *Mimosa pudica*. *Nature communications* 13:6412.
- Hewitson, J. 2001. Nyctinasty and *Mimosa* leaf movement. Disponível em: <http://www.saps.plantsci.ca.ac.uk/records/rec117.htm>. Acesso em: 3 janeiro. 2022.
- Hungria M., Nogueira M.A. Fixação biológica de nitrogênio. In. Bioinsumos na cultura da soja. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Soja Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Brasília, 2022.
- Kameyama, K., Kishi, Y., Yoshimura, M., Kanzawa, N., Sameshima, M. & Tsuchiya, T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37.
- 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: 381390.
- Minorsky, P.V. 2019. The functions of foliar nyctinasty: a review and hypothesis. *Biological Reviews* 94: 216–229.
- Morse, M.J., Satter, R.L. 1979. Relationship between motor cell ultrastructure and leaf movements in *Samanea saman*. *Physiology Plantarum* 46: 338-346.
- Moyssset, L., Simón, E. 1991. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *American Journal of Botany* 78:1467-1486.
- Paiva, E.A.S. 2019. Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants? *New Phytologist* 223: 1707-1711.
- Pfeffer, W. 1907. *The physiology of plants*. Clarendon Press, Oxford, v. 3.
- Roblin, G., Fleurat-Lessard, P., Bonmort, J. 1989. Effects of compounds affecting calcium channels on phytochrome- and bluepigment-mediated pulvinar movements of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiology* 90: 697-701.
- Rodrigues, T.M., Machado, S.R. 2004. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Botanica Brasilica* 18: 381-390.
- Rodrigues, T.M., Machado, S. R. 2006. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 709-720.
- 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.
- Silva, L. C. R.; Corrêa, R. S. 2011. Evolução da qualidade do substrato de uma área minerada no Cerrado revegetada com *Stylosanthes* spp *Revista Árvore*, Viçosa, MG, 35: 907- 918.

- Souza, V. C., Lorenzi, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Nova Odessa: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2012. 768 p.
- The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66: 44-77.
- Toriyama, H. 1953. Observational and experimental studies of sensitive plants I: The structure of parenchymatous cells of pulvinus. *Cytology* 18: 283-292.
- 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.
- Weintraub, M. 1952. Leaf Movements in *Mimosa pudica* L. *The New Phytologist* 50: 357-382.
- White, P.J., Broadley M.R. 2003. Calcium in Plants. *Annals of Botany*. 92: 487-511.
- 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: 243-249.
- Yao H., Xu, Q., Yuan, M. 2008. Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. *Plant Signaling & Behavior* 3: 954-960.

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, os resultados obtidos durante a execução deste capítulo foram compilados em um manuscrito que foi submetido para publicação (Brazilian Journal of Botany)

CAPÍTULO 1

Pulvinus and petiole comparative anatomy in a species of *Mimosa* with slow nyctinastic movement

Stefany Cristina de Melo Silva, Tatiane Maria Rodrigues

São Paulo State University – UNESP, Institute of Biosciences of Botucatu – IBB,
Department of Biodiversity and Biostatistics, ZIP Code 1861870, PO Box 510,
Botucatu city, São Paulo State, Brazil.

Corresponding author: Stefany Cristina de Melo Silva
(e-mail: stefany.cm.silva@unesp.br)

Abstract

The pulvinus is the thickening at the base of leguminous plant leaves responsible for rapid or slow leaf movements. The structural characteristics of pulvini have usually been studied in plants with rapid leaf movements, especially *Mimosa* species. On the other hand, information on the pulvini of slow leaf movement species is scarce. We investigated whether the anatomical characteristics of pulvini from *Mimosa* species presenting slow leaf movements were different from those of the species in this genus with rapid leaf movements and if these structural aspects differed from those in the petioles. Samples of primary and secondary pulvini and petioles of *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Leguminosae, Caesalpinioideae), a species with slow nastic leaf movements, were processed according to conventional techniques in plant anatomy. We found that the primary and secondary pulvini had characteristics commonly found in the pulvini of other legume species with different types of leaf movements, such as a highly developed parenchyma cortex, a reduced vascular system, and a lack of lignification, which explains the pulvinus' greater flexibility compared with the petiole. The presence of septate pericyclic fibers with pectocellulosic walls containing primary pit fields ensures symplastic communication between cortex and vascular cylinder in the pulvini; in the petiole, the pericyclic fibers are lignified. The occurrence of internal phloem in pulvini and petioles is uncommon in leguminous species and a novelty for this genus. A new discovery was the detection of calcium oxalate crystals in the endodermis in the *Mimosa* pulvini. However, this feature is common in pulvini with slow movements, corroborating the idea that the pulvinus endodermis content is related to the type of leaf movement, regardless of taxonomic considerations.

Keywords: endodermis, internal phloem, nastic movement, prismatic calcium oxalate crystals, septate fibers

1 Introduction

The presence of compound leaves with a clearly discernable pulvinus is one of the morphological aspects that characterize Leguminosae species (Judd et al. 1999). The pulvinus is a thickening at the base of petioles responsible for rapid or slow leaf movements in response to external or endogenous stimuli (Campbell and Thomson 1977; Moysset and Simón 1991; Minorsky 2019). Among legumes, some species of *Mimosa* are famous for the rapid movement of their leaflets in response to touch; a movement called seismonasty (Salisbury and Ross 1992; Minorsky 2019). Nevertheless, several species of this genus have slow nyctinastic movements that keep their leaflets open during the day and close them in the late afternoon (Rodrigues and Machado 2007).

The structural characteristics of pulvini have mainly been studied in leguminous species with rapid leaf movement, particularly in *Mimosa pudica* (Toriyama 1953; 1954; 1955; 1957; 1967; Toriyama and Satô 1968; Toriyama and Komada 1971; Campbell and Thomson 1977; Fleurat-Lessard and Bonnemain 1978; Fleurat-Lessard 1981; 1988; Fleurat-Lessard and Roblin 1982). Studies on the pulvini of leguminous species with slow leaf movements are scarce and restricted to a few species (Moysset and Simón 1991; Rodrigues and Machado 2004; 2006). In general, the pulvinus is characterized by the presence of a highly developed cortex composed of parenchyma cells (motor cells) rich in tannins, a lack of lignification, vascular system in a central position, absence or reduction of medulla, and extensive symplastic continuity between cortex and vascular cylinder (Toriyama 1955; Fleurat-Lessard and Bonnemain 1978; Campbell et al. 1979; Moysset and Simon 1991; Rodrigues and Machado 2006). However, structural peculiarities have been reported, especially in the endodermal cells of pulvini of species with different types of leaf movement. For example, studies show that the endodermal cells of the pulvini from slow movement leaves contain starch grains and prismatic calcium oxalate crystals, while the pulvini from rapid movement leaves have endodermal cells rich in starch grains but without calcium crystals (Rodrigues and Machado 2007). However, further research is necessary to find whether the presence/absence of calcium crystals in the pulvinus endodermis is exclusively related to the type of leaf movement or whether this is a characteristic related to the taxonomic group of the species.

Comparative anatomical studies have pointed to the structural peculiarities of the pulvinus that ensure greater flexibility compared to other leaf regions (Fleurat-Lessard and Roblin 1982; Moysset and Simón 1991; Rodrigues and Machado, 2004).

Nevertheless, these studies were based on a few species of legumes belonging to different genera, and there appear to be no studies comparing the anatomical structure of pulvini and petioles in species of *Mimosa* with slow leaf movements.

Mimosa caesalpinifolia Benth. (Leguminosae, Caesalpinioideae), a woody species endemic to Brazil (Dourado et al. 2013), is an alternate-leaved plant with compound leaves with four to six opposite pinnae and has pulvini responsible for reversible slow nyctinastic movements controlled by circadian rhythms. *Mimosa caesalpinifolia* presents a primary pulvinus located at the base of the petiole, a secondary pulvinus at the base of the leaflet (pinna), and a tertiary pulvinus at the base of the pinnule. We argued whether the anatomical characteristics of pulvini from *Mimosa* species that present slow leaf movements are distinct from the species of this genus with rapid leaf movements. The objective of the present study was to expand the knowledge on the structural characteristics of the leaf of species of *Mimosa* with slow nastic movements, describing the anatomy of primary and secondary pulvini and petiole of *M. caesalpinifolia* in a comparative way.

2 Material and methods

Plant material

We collected fully expanded leaves for the anatomical studies. The leaves were located between the third and fourth stem nodes in five adult individuals of *M. caesalpinifolia* from a rural area in the municipality of Botucatu (22°59'20" S, 48°26'36" W).

Light microscopy

Samples from the median region of primary and secondary pulvini and the petiole were fixed in a mixture of formaldehyde, acetic acid, and 50% ethanol (Johansen 1940) for 24 h and stored in 70% alcohol. A portion of the samples was dehydrated in an ethylic series, included in methacrylate resin, and sectioned transversely and longitudinally in a semiautomatic rotary microtome. Sections (5 µm thick) were stained with toluidine blue pH 4.7 (O'Brien et al. 1964) and mounted in synthetic resin. Another part of the material stored in 70% alcohol was manually cross-sectioned using razor blades. Subsequently, these sections were cleared in 20% sodium hypochlorite, washed in 1% acetic water,

stained with Astra Blue and Safranin (Bukatsch 1972; Burger and Richter 1991), and mounted in glycerin.

We analyzed the slides using a photomicroscope (Leica DMR) and recorded the relevant data with a digital camera (Leica DFC425). For better visualization of calcium oxalate crystals, we also analyzed the slides under polarized light.

Histochemical tests

Sections of fresh material, obtained with the aid of razor blades, were treated with Lugol's solution to detect starch and alkaloids (Johansen 1940), 10% ferric chloride solution for phenolic substances (Johansen 1940), ruthenium red for polysaccharides (Johansen 1940), acidified phloroglucinol for lignin (Johansen 1940), and acetic acid and hydrochloric acid (Howart and Horner 1959) for calcium oxalate crystals. Control tests were performed according to the authors' recommendations for each technique. We analyzed the slides using a photomicroscope (Leica DMR) and recorded the relevant data with a digital camera (Leica DFC425).

3 Results

Anatomical details of the pulvini

Primary (Fig. 1A) and secondary (Fig. 1B) pulvini of *M. caesalpiniifolia*, in cross-section, presented a cylindrical shape and a regular surface. The epidermis was uniseriate and consisted of oval, tabular, or tangentially elongated cells covered by a smooth and moderately thick cuticle (Fig. 2A and B). Uniseriate tector trichomes were observed on the surface of the pulvini (Fig. 2B).

The cortical region was highly developed in the primary (Fig. 1A) and secondary (Fig. 1B) pulvini. In the primary pulvinus, the cortex had approximately 20 layers of parenchyma cells with irregular shapes and sizes (Fig. 1A and 2A). In the secondary pulvinus, the cortex had approximately 11 layers of parenchyma cells with the same arrangement and disposition observed in the primary pulvinus (Fig. 1B and 2B). In the outer portion of the cortex, the cells were more voluminous, with a polyhedral shape, thin pectocellulosic walls, a nucleus with an evident nucleolus, and vacuoles filled with phenolic content in both primary and secondary pulvini (Fig. 1A and 2A). Intercellular

spaces were observed in this region (Fig. 2C). Prismatic calcium oxalate crystals were observed in some cells of the outer cortex (Fig. 2A) of primary and secondary pulvini.

The inner cortical region of primary (Fig. 2A) and secondary (Fig. 2C) pulvini was formed by approximately three layers of less voluminous parenchyma cells without phenolic content. Abundant starch grains were detected in the inner cortex of primary and secondary pulvini, especially in the endodermis (Fig. 2D). Prismatic calcium oxalate crystals were observed in primary (Fig. 2E) and secondary pulvini. In endodermal cells with prismatic calcium oxalate crystals, the inner periclinal walls and the lower portion of the anticlinal walls were thicker and lignified, forming a U-shaped thickening around the crystals (Fig. 2E).

A cross-section in the median region of primary and secondary pulvini showed that the vascular system was centrally positioned and ring-shaped (Fig. 1A and B). External to the phloem, we observed three to five layers of cells with non-lignified thickened pectocellulosic walls in both pulvini (Fig. 2C and E). In longitudinal section, these cells were fusiform and had cell wall septa that divided them transversely into compartments (Fig. 2F–G). Large primary pit fields and a voluminous nucleus were observed in these cells (Fig. 2F). The phloem of primary and secondary pulvini comprised sieve tube elements, companion, and parenchyma cells, some with phenolic content (Fig. 2E and F). We also observed voluminous laticifer cells (Fig. 2C, E and F) in the phloem of primary and secondary pulvini (Fig. 2C and E). The xylem in both pulvini consisted of vessel elements and fibers with thick, lignified walls (Fig. 2C). The medullary region in both pulvini was reduced (Fig. 1A, B and 2C) and consisted of a few layers of thin-walled parenchyma cells. Portions of phloem containing sieve tube elements, companion cells, common parenchyma cells, and laticifers were observed between the medullary parenchyma and the primary xylem (Fig. 2C) of primary and secondary pulvini.

Anatomical details of the petiole

In cross-section, the petiole had a concave-convex shape, with two lateral projections on the adaxial surface where vascular traces were found (Fig. 3A). The petiole epidermis was uniseriate, consisting of oval, tabular, or tangentially elongated cells covered by a smooth and moderately thick cuticle (Fig. 3B). Stomata with prominent ridges were observed on the petiole surface (Fig. 3B); the substomatal chambers were large (Fig. 3B). Tector trichomes were observed on the petiole.

The petiole cortex was reduced and formed by one to three layers of collenchyma and approximately three layers of parenchyma cells (Fig. 3A and B). The endodermis was formed by tangentially oval cells arranged in a compact way (Fig. 3B and C). Sparse starch grains and prismatic calcium oxalate crystals were observed in the endodermis (Fig. 3C).

The petiole vascular system had a peripheral position in the organ and was formed by collateral bundles arranged in a discontinuous ring, separated by interfascicular parenchyma (Fig. 3A). Externally to the phloem, we observed a ring consisting of four to five layers of fibers with thick and lignified walls (Fig. 3A–E). In the longitudinal section, these walls were elongated and had tapered ends (Fig. 3E). The phloem was composed of sieve tube elements, companion, and parenchyma cells (Fig. 3D and E). Large laticifers were found immersed in the phloem (Fig. 3D and E). The xylem was composed of vessel elements, fibers, and parenchyma cells (Fig. 3D and G). The medulla was relatively large and composed of parenchyma cells (Fig. 3F and G) containing starch grains (Fig. 3F). Portions of phloem were observed between the medullary parenchyma and the xylem and presented the same cellular elements found in the phloem of the vascular bundles (Fig. 3G).

4 Discussion

The results of the present study increase the body of knowledge about the structural aspects of pulvini, contributing new information about a species of *Mimosa* with slow nastic movement leaves. The general anatomical features observed for primary and secondary pulvini of *M. caesalpiniifolia* were similar to the pulvini of other legume species (Morse and Satter 1979; Moysset and Simón 1991; Rodrigues and Machado 2004; Rodrigues and Machado 2006), including species of *Mimosa* with rapid movement leaves (Campbell and Thomson 1977; Fleurat-Lessard 1981; 1988).

In *M. caesalpiniifolia*, the primary and secondary pulvini present structural differences in relation to the petiole, such as the presence of a large parenchymatic cortex and the lack of lignification. Such anatomical characteristics are similar to those observed in comparative studies on different leaf regions in other species of legumes (Fleurat-Lessard and Roblin 1982; Fleurat-Lessard 1988; Rodrigues and Machado 2004;

Rodrigues and Machado 2006). Similar to the pulvini of other plant species with rapid or slow leaf movements (Satter et al. 1970; Moysset and Simón 1991; Morse and Satter et al. 1997; Machado and Rodrigues 2004), the cortex of the primary and secondary pulvini of *M. caesalpinifolia* is highly developed and consists exclusively of parenchyma cells. In the outer and middle regions of the cortex, these cells accumulate phenolic compounds and have spaces among them. These cells are known as motor cells (Toriyama 1953).

The presence of phenolic compounds in the cell vacuole was related to the storage and release of ions, such as potassium and calcium (Toriyama and Jaffe 1970; Toriyama and Komada 1971; Campbell et al. 1979; Fleurat-Lessard 1988; Moysset and Simón 1991) that are fundamental for the functioning of the pulvinus, acting on changes in the turgor of the motor cells (Campbell and Thomson 1977; Campbell et al. 1979; Campbell and Garber 1980; Satter and Galston 1981; Satter et al. 1982; Mayer et al. 1985; Fleurat-Lessard 1988; Moysset and Simón 1991) and the polymerization of cytoskeletal elements (Fleurat-Lessard et al. 1988; Kameyama et al. 2000; Hewitson 2001; Yamashiro et al. 2001). Regarding the presence of intercellular spaces in the cortex of the *M. caesalpinifolia* pulvini, such a cell arrangement could facilitate changes in cell shape and size during leaf movement (Fleurat-Lessard and Millet 1984).

The occurrence of prismatic calcium oxalate crystals in the endodermis of primary and secondary pulvini of *M. caesalpinifolia* has not been reported in other species of *Mimosa* and confirms the relationship between this cellular inclusion and the type of leaf movement. The pulvini endodermis of leaves with rapid nastic movements contains only starch grains, while leaves with slow nastic movements, in addition to starch grains, have calcium oxalate crystals in the endodermal cells (Morse and Satter 1979; Rodrigues and Machado 2007). Thus, in slow movement leaves, calcium is immobilized in the form of crystals, while in rapid movement leaves, calcium is available to act quickly in the calcium-dependent reactions necessary for the functioning of the pulvinus (Roblin et al. 1989; Rodrigues and Machado 2007). To the best of our knowledge, this is the first study showing the content of the pulvini endodermis in a species of *Mimosa*, supporting the proposition that the presence/absence of calcium crystals has functional importance and is not related to the taxonomic group.

The occurrence of a sheath of cells with thick, non-lignified walls external to the phloem, as observed here in *M. caesalpinifolia*, has been reported for the pulvini of several species of legumes (Machado and Rodrigues 2004; Rodrigues and Machado 2006; 2008) as well as the pulvini of species belonging to other families (Ferreira et al. 2022).

Such cells were initially described as collenchyma cells due to their appearance in cross-sections (Esau 1970; Fleurat-Lessard and Bonnemain 1978; Fleurat-Lessard and Roblin 1982; Moysset and Simón 1991); however, in the present study, they were analyzed in longitudinal view, with observations indicating that they were quite elongated, with tapered ends and transverse septa of pectocellulosic material dividing them into compartments. On the petiole of *M. caesalpinifolia*, in the same position as the septate fibers in the pulvini, we observed a ring of lignified fibers exactly like those in the petiole of other legume species previously reported (Fleurat-Lessard and Roblin 1982; Machado and Rodrigues 2004). This suggests homology between the septate fibers of the pulvini and the lignified fibers of the petioles. Thus, in pulvini and petioles, the ring of cells that externally surrounds the phloem is composed of fibers of pericyclic origin, and its degree of lignification varies according to the leaf region, which is related to the function of the organs studied. The structural characteristics of the septate fibers, especially the pectocellulosic walls with numerous primary pit fields, ensure the symplastic communication of the cortex and the vascular system, which is fundamental for the functioning of the pulvinus (Rodrigues and Machado 2006; 2008), while the presence of fibers with lignified walls in the petiole demonstrates symplastic discontinuity between the cortical region and the vascular system, providing greater rigidity to this leaf region (Fleurat-Lessard and Roblin 1982; Rodrigues and Machado 2004).

The presence of internal phloem, as observed in the median region of the *M. caesalpinifolia* pulvini and petioles, is a characteristic that warrants attention. Although the occurrence of internal phloem has been reported in aerial organs of species belonging to several families of eudicots (Metcalf and Chalk 1983; Zozimo et al. 2011; Patil et al. 2014), this seems to be an uncommon feature in legumes, since it has been described in only a few species (Kuo and Pate 1981; Kuo and Pate 1985; Grignon et al. 1992). Internal phloem, located in the medullary region, has been reported in soybean pulvini; this specialized phloem might be involved in the transport of solutes to the root (Grignon et al. 1992). In general, studies suggest the involvement of the internal phloem in the transport of macromolecules, proteins, and several other substances (Turgeon and Oparka 2010; Zhang et al. 2010; Patil et al. 2014); whether this phloematic portion plays a role in the transport of substances related in some way to leaf movement in *M. caesalpinifolia* needs to be investigated.

In summary, our results showed previously unknown characteristics for some species of *Mimosa*, such as the presence of internal phloem in pulvini and petioles and

the occurrence of prismatic calcium oxalate crystals in pulvini, corroborating the idea that calcium crystals are present in the pulvini endodermis of slow movement leaves, regardless of the taxonomic group of the plants.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil – CAPES (Finance Code 001). TM Rodrigues (Process number 312900/2021-0) received research productivity fellowship and SCM Silva (Process number 140743/2019-7) received scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brazil.

Authors contributions

SCMS collected data on anatomy, performed analyses, and wrote the paper. TMR performed analyses, and wrote the paper.

Declarations

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung: Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255
- Burger LM, Richter HG (1991) Anatomia da Madeira. Livraria Nobel: São Paulo
- Campbell NA, Stika KM, Morrison GH (1979) Calcium and potassium in the motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscope. *Science* 204:185–187
- Campbell NA, Thomson WW (1977) Multivacuolate motor cells in *Mimosa pudica* L. *Ann Bot* 41:1361–1362
- Campbell NA, Garber, RC (1980) Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizzia* during leaf movement. *Planta* 148:251-255
- Dourado DAO, Conceição AS, Santos-Silva J (2013) O gênero *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. *Biota Neotrop* 13: 4
- Esau K (1970) On the phloem of *Mimosa pudica* L. *Ann Bot* 34:505-515
- Ferreira C, Castro NM, Rodrigues TM, Seixas DP, Groppo M (2022) Pulvinus or not pulvinus, that is the question: anatomical features of the petiole in the *Citrus* family (Rutaceae, Sapindales) *Braz J Bot* 45:485–496

- 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. *Biol Rev* 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, Millet B (1984) Ultrastructural features of cortical parenchyma cells (“motor cells”) instamen of *Berberis canadensis* Mill. and terciary pulvini of *Mimosa pudica* L. *J Exp Bot* 35:1332–1341
- Fleurat-Lessard P, Roblin G (1982) Comparative histocytology of the petiole and the main pulvinus in *Mimosa pudica* L. *Ann Bot* 50:83–92
- Grignon N, Touraine B, Grignon C (1992) Internal phloem in the pulvinus of soybean plants. *Am J Bot* 50:83–92
- Hewitson J (2001) Nyctinasty and *Mimosa* leaf movement. <https://www.saps.org.uk>. Accessed 10 May 2022
- Howart WO, Horner LGG (1959) *Practical Botany for the Tropics*. University of London, London
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Massachusetts
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York
- Kameyama K, Kishi Y, Yoshimura M, Kanzawa N, Sameshima M, Tsuchiya T (2000) Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37
- Kuo J, Pate JS (1981) Internal (medullary) phloem in *Macrotyloma uniflorum* Lam. (Fabaceae). *Ann Bot* 48:403-406
- Kuo J, Pate JS (1985) Unusual network of internal phloem in the pod mesocarp of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) (Fabaceae). *Ann Bot* 55:635-647
- Machado SR, Rodrigues TM (2004) Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primario de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae- Faboideae). *Rev Bras Bot* 27:135–147
- Mayer WE, Flach D, Raju MVS, Starrach N, Wiech E (1985) Mechanics of circadian pulvini movements in *Phaseolus coccineus* L. *Planta* 163:381- 390
- Metcalfe CR, Chalk L (1983) *Anatomy of the dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction*. Clarendon Press, Oxford
- Minorsky PV (2019) The functions of foliar nyctinastic: a review and hypothesis. *Biol rev* 94:216-229.
- Moysset L, Simon E (1991) Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *Am J Bot* 78:1467–1486
- Moysset L, Llambrich E, Simon E (2019) Calcium changes in *Robinia pseudoacacia* pulvinar motor cells during nyctinastic closure mediated by phytochromes. *Protoplasma* 256:615–629
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368–373
- Pitil VS, Koyani RD, Sanghvi V, Rajput KS (2014) Structure and development of internal phloem in *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) *IWA Journal* 35:1-11
- Roblin G, Fleurat-Lessard P, Bonmort J (1989) Effects of compounds affecting calcium channels on phytochrome- and blue pigment mediated pulvinar movements of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiol* 90:697–701
- Rodrigues TM, Machado SR (2004) Anatomia comparada do pulvino, peciolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Bot Bras* 18:381–390

- Rodrigues TM, Machado SR (2006) Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. *Rev Bras Bot* 29:709–720
- Rodrigues TM, Machado SR (2007) The pulvinus endodermal cells and their relations to leaf movement in legumes of the Brazilian Cerrado. *Plant Biol* 9:469–477
- Rodrigues TM, Machado SR (2008) Pulvinus functional traits in relation to leaf movements: a light and transmission electron microscopy study of the vascular system. *Micron* 39:7–16
- Satter RL, Galston AW (1981). Mechanisms of control of leaf movements. *Ann Rev Plant Physiol* 32: 83-110
- Satter RL, Sabnis, D.D, Galston AW (1970) Phytochrome controlled nyctinasty in *Albizia julibrissin*. I. Anatomy and fine structure of the pulvinule. *Am J Bot* 57: 374-381.
- Satter RL, Garber RC, Khairallah L, Cheng Y-S (1982) Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. *J Cell Biol* 95:893–902
- 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. *Cytology* 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. *Bot Mag* 68:203–208
- Toriyama H (1957) Observational and experimental studies of sensitive plants. VII. The migration of colloidal substance in the primary pulvinus. *Cytology* 22:184–192
- Toriyama H (1967) A comparison of the *Mimosa* motor cells before and after stimulation. *Proc Jpn Acad* 43:541–546
- Toriyama H, Jaffe MJ (1972) Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol* 49:72–81
- Toriyama H, Komada Y (1971) The recovery process of the tannin vacuole in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Cytology* 36:690–697
- Toriyama H, Sato S (1968) Electron microscopic observations of the motor cells of *Mimosa pudica* L. I. A comparison of the motor cells before and after stimulation. *Proc Jpn Acad* 44:702–706
- Turgeon R, Oparka K (2010) The secret phloem of pumpkins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 107: 13201–13202
- Ueda M, Yamamura S (2000) Chemistry and biology of plant leaf movements. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 1400–1414
- Yamashiro S, Kameyama K, Kanzawa N, Tamiya T, Mabuchi I, Tsuchiya T (2001) The gelsolin/fragmin family protein identified in the higher plant *Mimosa pudica*. *J Biochem* 130:243–249
- Zhang B, Tolstikov V, Turnbull C, Hicks LM, Fiehn O (2010) Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 107: 13532–13537
- Zozimo E, Tamaio N, Vieira RC (2011) Development of intraxylary phloem in the stem of *Combretum rotundifolium* (Combretaceae). *IAWA J.* 32: 14–24

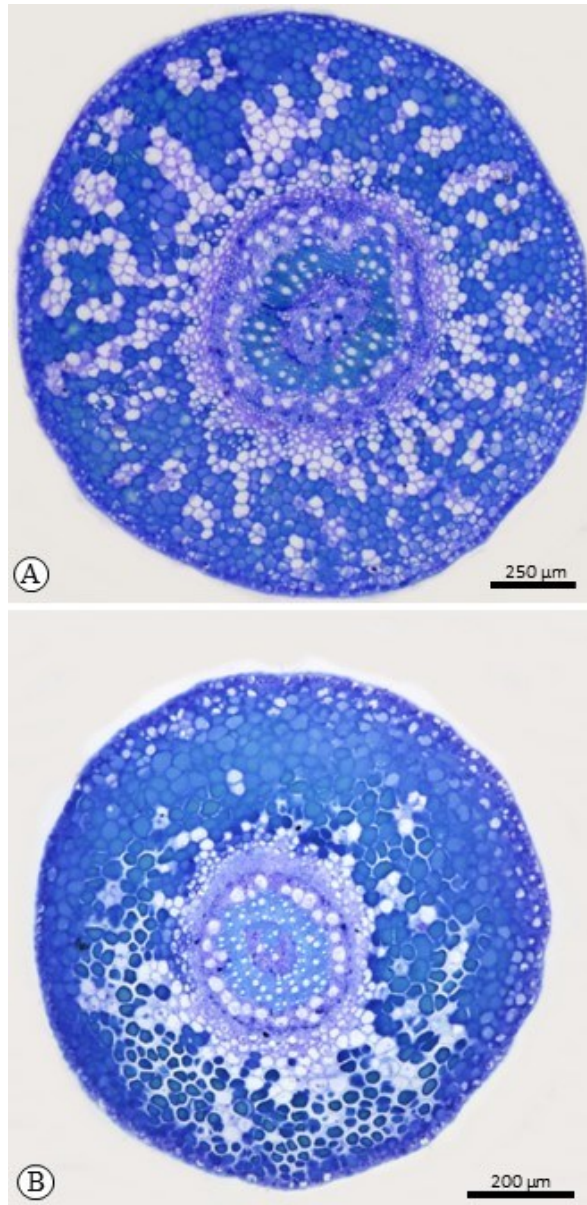


Fig. 1 Cross-sections of *Mimosa caesalpiniiifolia* pulvini. A Cross-section of primary pulvinus. B Cross-section of secondary pulvinus.

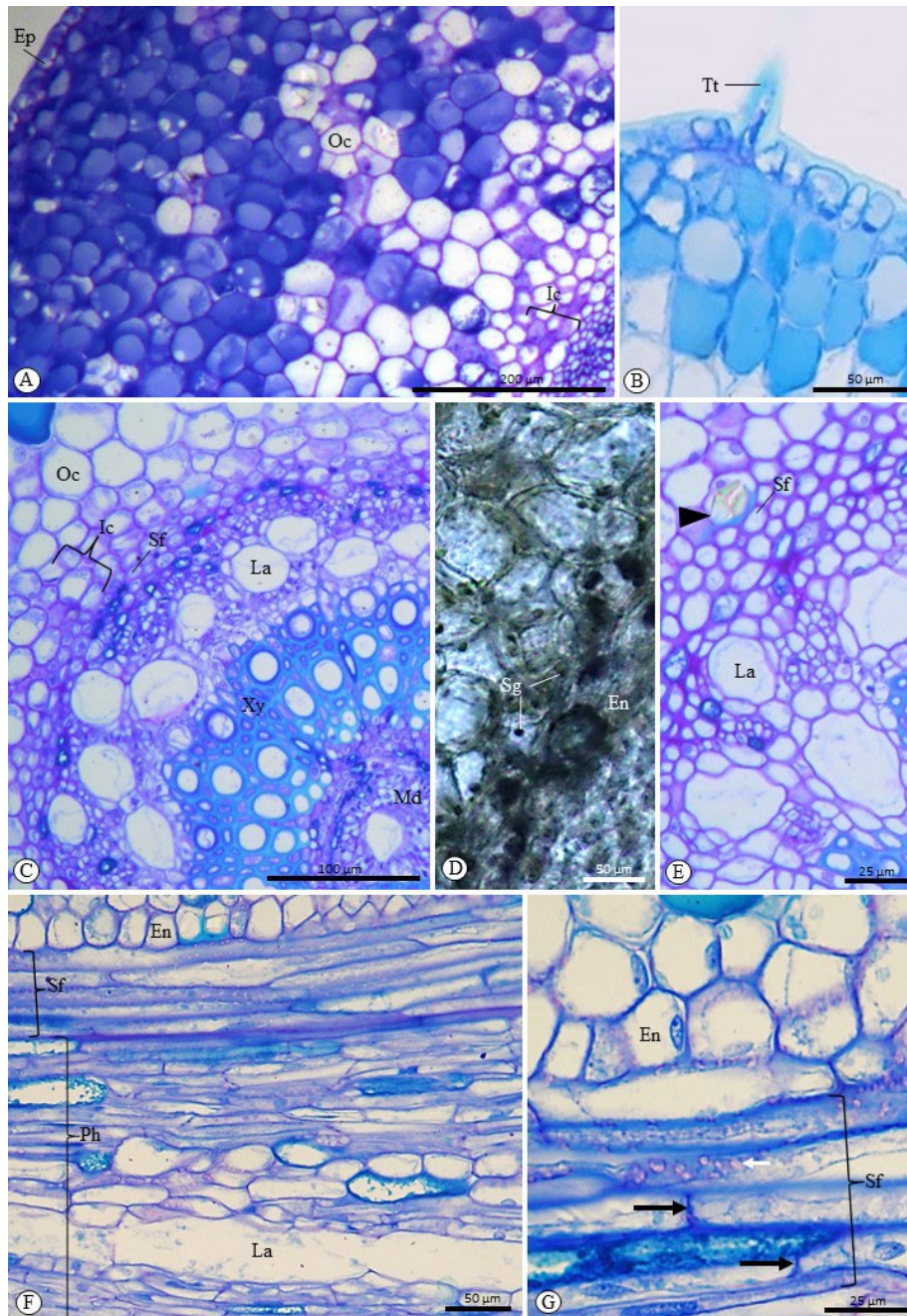


Fig. 2 Sections of *Mimosa caesalpinifolia* pulvini. A General appearance of primary pulvinus showing uniseriate epidermis and large parenchymal cortex. Note cells with phenolic content in the outer cortex. B Portion of secondary pulvinus showing epidermis with moderately thick cuticle and tector trichomes, and external cortex with voluminous parenchyma cells with phenolic content. C Detailed view of secondary pulvinus showing external cortex with cells with phenolic content, internal cortex, and central vascular system with reduced medulla. D Section of primary pulvinus treated with Lugol showing the presence of starch grains in the endodermis and adjacent layers. E Detailed view of primary pulvinus showing prismatic calcium oxalate crystals (arrowhead) in the endoderm. Note the U-shaped lignified thickening of the inner periclinal walls and part of the anticlinal walls around the crystals. F and G. Longitudinal sections of primary pulvinus. F Section showing septate fibers with thick pectocellulosic wall with primary pitting fields (white arrow) and voluminous nucleus with obvious nucleolus. The arrow indicates the septa. G General view showing endodermis, septate fibers with intrusive growth, phloem, and laticifer. En: endodermis; Ep: epidermis; Ic: inner cortex; La: laticifer; Oc: outer cortex; Ph: phloem; Sf: septate fiber; Xy: xylem.

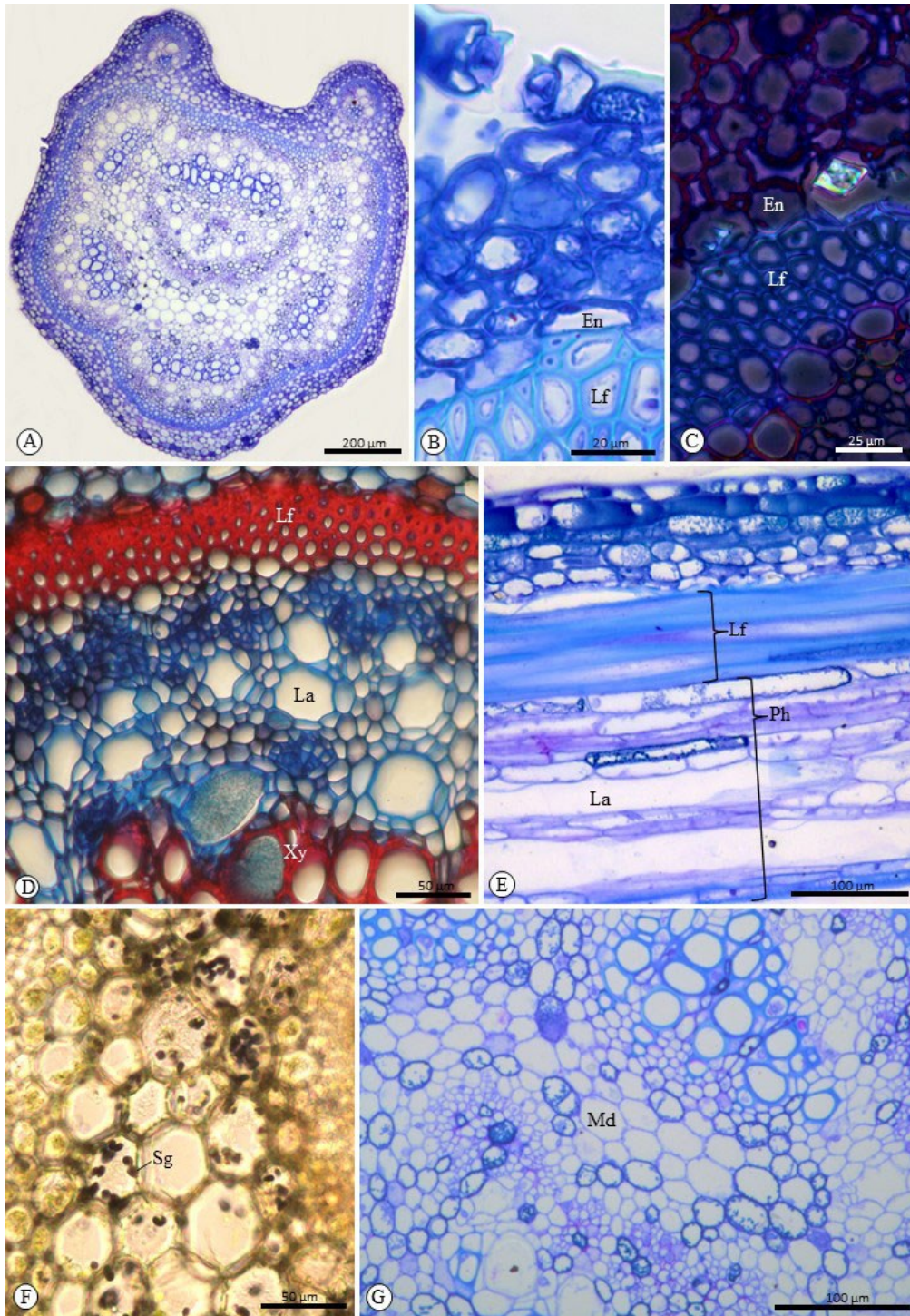


Fig. 3 Petiole of *Mimosa caesalpinifolia*. A General view of the middle region of the petiole. B Detailed view of stomata on the petiole. C Detailed view of prismatic calcium oxalate crystals in the endodermis under polarized light. D Section showing lignified fibers, phloem-immersed laticifers, xylem vessel elements. E Longitudinal section showing reduced cortex, fibers, phloem, laticifer, and xylem vessel elements. F Detailed view of medulla composed of parenchyma cells filled with starch grains. G Detailed view of portions of phloem between medullary parenchyma and xylem. D: Safrablau. A-B, E, G: Toluidine blue. F: Lugol. En: endodermis; Lf: lignified fibers; Ph: phloem; Sg: starch grains; La: laticifer; Md: medulla; Xy= xylem.

CAPÍTULO 2

Influência do cálcio na formação de cristais em pulvinos e pecíolos e na movimentação foliar em duas espécies de *Mimosa* (Leguminosae)

Resumo

Nos pulvinos, a presença/ausência de cristais de oxalato de cálcio está relacionada com a velocidade dos movimentos foliares násticos. Cristais prismáticos de oxalato de cálcio estão presentes na endoderme dos pulvinos de espécies com movimentos foliares lentos e ausentes em espécies com movimentos foliares rápidos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de cálcio na formação de cristais na endoderme de pulvinos e pecíolos e no funcionamento dos pulvinos em espécies de *Mimosa* (Leguminosae) com diferentes tipos de movimento foliar. Indivíduos de *M. caesalpinifolia* com movimentos foliares nictinásticos lentos e de *M. pudica* que apresenta movimentos foliares seismonásticos rápidos foram submetidos a 360, 240, 120 e 0 mgL⁻¹ de Ca²⁺ em meio hidropônico. Folhas foram processadas para estudos em microscopia de luz e a densidade de cristais de cálcio na endoderme foi calculada em secções transversais de pulvinos e pecíolos sob luz polarizada. A concentração de cálcio nos tecidos foi detectada por meio de sistema de espectroscopia de energia dispersiva em microscopia eletrônica de varredura. Técnica citoquímica foi aplicada para localização de depósitos subcelulares de cálcio ao microscópio eletrônico de transmissão. Cristais prismáticos de oxalato de cálcio se formaram na endoderme de pulvinos e pecíolos de *M. caesalpinifolia* e nos pecíolos de *M. pudica*, exceto em plantas mantidas sob ausência de Ca²⁺. Nos pulvinos de *M. pudica* não houve formação de cristais de oxalato de cálcio em nenhum dos tratamentos. Nos pulvinos de *M. caesalpinifolia* a concentração de cálcio nos tecidos aumentou conforme a fornecimento de cálcio em solução nutritiva; em *M. pudica* a concentração de cálcio foi baixa em todos os tratamentos. Depósitos subcelulares de cálcio foram detectados nos pulvinos de *M. caesalpinifolia* em todos os tratamentos, exceto na ausência de cálcio; em *M. pudica* marcações citoquímicas foram observadas somente em plantas sob 360 mgL⁻¹ de Ca²⁺. Em *M. caesalpinifolia*, as folhas apresentaram movimentos nictinásticos lentos em todos os tratamentos, inclusive na ausência de cálcio. Plantas de *M. pudica* mantidas sob os diferentes tratamentos mantiveram sua capacidade de movimentação foliar em resposta a estímulos mecânicos, exceto na ausência de Ca²⁺. Nossos resultados comprovam o comportamento diferencial entre pulvinos e pecíolos e entre pulvinos de espécies com diferentes tipos de movimentos

foliares no que se refere ao acúmulo de cálcio e formação de cristais, sugerindo que os mecanismos celulares envolvidos nos movimentos rápidos sejam distintos daqueles ocorrentes durante movimentos lentos, apresentando maior envolvimento de reações dependentes do cálcio.

Palavras-chave: cristais prismáticos de oxalato de cálcio; endoderme; folha; movimento nictinástico; movimento seismonástico.

Introdução

Tropismos e nastias são os mais frequentes tipos de movimento entre as plantas superiores (Accorsi 1992). Movimentos trópicos são aqueles que ocorrem na direção do estímulo, enquanto nos movimentos násticos (Minorsky 2019), o estímulo não determina a direção do movimento (Salisbury & Ross 1992). Os movimentos foliares násticos são frequentes principalmente entre espécies de leguminosas (Salisbury & Ross 1992; Rodrigues & Machado 2006). Em muitas espécies da família, os folíolos posicionam-se horizontalmente durante o dia e verticalmente à noite, num processo rítmico controlado pelas interações entre o ambiente externo e o relógio biológico das plantas, conhecido como nictinastia (Satter et al. 1981). Espécies de leguminosas pertencentes ao gênero *Mimosa* (Caesalpinioideae, Mimosoide, LPWG 2017) podem ainda apresentar movimentos foliares seismonásticos, caracterizados pelo rápido e reversível fechamento dos folíolos em resposta ao toque. (Salisbury & Ross 1992).

Movimentos foliares násticos são causados por pulvinos (Salisbury & Ross 1992, Mano & Hasebe 2021), um espessamento da base foliar e foliolar semelhante a uma articulação (Esau 1974), bastante desenvolvido dentre as leguminosas (Judd et al. 1999). De forma geral, os pulvinos são caracterizados pela presença de epiderme unisseriada, córtex amplo constituído por células parenquimáticas ricas em taninos (células motoras), escassez de lignificação, sistema vascular em posição central, ausência ou redução de medula e extensiva continuidade simplástica entre córtex e cilindro vascular (Toriyama 1955, Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978, Campbell et al. 1979, Moysset & Simón 1991, Rodrigues & Machado 2006). Tais características são relacionadas a maior flexibilidade do pulvino em relação às demais regiões foliares (Rodrigues & Machado 2004)

A deformação do pulvino que resulta no movimento foliar ocorre devido a diferenças na pressão de turgor entre as células motoras do córtex que podem sofrer rápida reorganização vacuolar de acordo com a redistribuição de água e íons potássio e cloreto (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). Além disso, mudanças na conformação do citoesqueleto, especialmente dos microfilamentos de actina estão envolvidas no funcionamento do pulvino (Kameyama et al. 2000; Hewitson 2001, Yamashiro et al. 2001). Considerando a participação de proteínas cálcio-dependentes na constituição dos microfilamentos de actina em pulvinos (Yamashiro et al. 2001), fica clara a importância do cálcio no controle da atividade de tais componentes do citoesqueleto e, conseqüentemente, no funcionamento dos pulvinos.

Pesquisas sugerem que em pulvinos de folhas com movimentos rápidos, o cálcio se encontra livre e disponível para atuar em reações cálcio-dependente como a polimerização dos microfilamentos de actina nas células motoras, enquanto que em espécies com movimentos foliares lentos, o cálcio se apresenta imobilizado na forma de cristais, impedindo a resposta rápida do pulvino à estímulos externos (Rodrigues & Machado 2007). De fato, estudos têm sugerido a relação direta entre o acúmulo de cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme de pulvinos de leguminosas com o tipo de movimento foliar apresentado. Espécies com movimentos násticos lentos apresentam grãos de amido e cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme dos pulvinos (Morse & Satter 1979, Rodrigues & Machado 2007), enquanto que somente grãos de amido ocorrem na endoderme de pulvinos com movimentos rápidos (Fleurat-Lessard 1988; Rodrigues & Machado 2007).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da disponibilidade de cálcio na formação de cristais na endoderme de pulvinos e pecíolos e na movimentação foliar em *Mimosa pudica* (espécie com movimento foliar seismonástico rápido) e *Mimosa caesalpiniifolia* (espécie com movimento foliar nictinástico lento). Nós argüimos se: a) o excesso de cálcio leva a formação de cristais na endoderme de pulvinos de folhas com movimentos rápidos; b) cristais de cálcio se formam na endoderme de pulvinos com movimentos lentos mesmo em plantas mantidas sob condições de baixa disponibilidade desse elemento; c) plantas mantidas sob escassez ou ausência de cálcio ainda são capazes de apresentar movimentos foliares; e d) se pulvinos e pecíolos respondem de formas diferentes aos tratamentos com cálcio no que se refere ao acúmulo de cristais de cálcio na endoderme.

Material e métodos

Espécies estudadas

Mimosa caesalpiniiifolia Benth. popularmente como sansão-do-campo ou sabiá, é uma espécie arbórea (Carvalho 2007), com folhas compostas bipinadas que apresentam movimento nictinástico lento, sendo que seus folíolos se apresentam fechados a partir do final da tarde e início da noite. *Mimosa pudica* L., popularmente conhecida como dormideira, é uma espécie subarborescente com folhas compostas bipinadas que apresentam movimento seismonástico rápido em resposta ao toque (Tamashiro & Escobar 2016).

Sementes de ambas as espécies foram obtidas por meio da empresa Biosementes do Brasil LTDA. As sementes, após desinfecção, foram acondicionadas em caixas tipo gerbox transparentes sobre papel filtro umedecido com água destilada e mantidas em câmaras de germinação a 25°C, fotoperíodo de 12 horas, 2500lux até a expansão do primeiro par de eófilos.

Experimento

Após a expansão do primeiro par de eófilos, as plântulas foram transferidas para meio hidropônico com solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon (1950) com aeração constante em casa de vegetação do tipo “Paddy Fan” com controle de temperatura em 26°C ± 4°C. Após a expansão do terceiro par de folhas, as plantas foram submetidas a diferentes tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados. Plantas foram mantidas no período de novembro/2019 a janeiro/2020 em solução nutritiva nº 2 de Hoagland e Arnon (1950). Indivíduos de ambas as espécies foram submetidos a diferentes concentrações de cálcio: solução nutritiva contendo 240 mgL⁻¹ de Ca²⁺ (controle), 360 mg L⁻¹ de Ca²⁺, 120 mg L⁻¹ de Ca²⁺ e 0 mg L⁻¹ de Ca²⁺. Dez indivíduos de cada espécie foram submetidos a cada um dos tratamentos (n = 10).

As soluções nutritivas foram continuamente arejadas com um soprador rotatório e renovadas a cada semana (Dantas et al. 1979). O pH das soluções foi mantido entre 5,5 e 6,5 e a condutividade elétrica da solução foi controlada utilizando-se um condutivímetro e mantida entre 1,5 e 2,5 mS cm⁻¹ (Carmello 1992).

Análise de movimento foliar

Após a formação e completa expansão de folhas sob cada condição experimental, foram realizadas análises do movimento foliar. A observação das folhas de *M. caesalpiniifolia* mantidas em diferentes concentrações de cálcio foi realizada às 8:00h, 12:00h, 16:00h e 19:00h por cinco dias consecutivos. Em *M. pudica*, a verificação de movimentação dos folíolos em resposta ao toque foi realizada às 12:00h em cinco dias consecutivos. Registros fotográficos e filmagens foram realizados utilizando câmera digital Canon Sx 530 (Song et al. 2014).

Microscopia de luz (ML)

Para análises ao microscópio de luz, foram coletadas amostras do pulvino primário e do pecíolo do segundo par de folhas completamente expandidas formadas após a aplicação dos tratamentos, a partir de 10 indivíduos (n=10) de cada condição experimental.

Amostras da região mediana dos pulvinos primários e pecíolos foram fixadas em mistura de formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% (Johansen 1940), desidratadas em série etílica e infiltradas em historesina (Leica Historesin). Secções transversais (5µm) obtidas em micrótomo rotativo semi-automático (Leica) foram coradas com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien et al. 1964) e montadas em resina sintética Entellan. O laminário foi analisado sob luz polarizada ao microscópio de luz (DMR, Leica) e os resultados relevantes documentados com câmera digital acoplada (DFC 425, Leica).

A densidade dos cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme de pulvinos e pecíolos foi calculada em uma área de 1mm² utilizando o software Image J 1.53a, versão 64.

Análises estatísticas

Os dados coletados referentes à densidade de cristais na endoderme de pulvinos e pecíolos foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Sisvar (Statistical Analysis System) versão 5.8 (Ferreira, 2011).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para localização de depósitos subcelulares de cálcio no córtex de pulvinos, amostras foram submetidas a técnica ultracitoquímica descrita por Forbes et al. (1977). Amostras de pulvinos (n=3) de ambas as espécies mantidas sob as diferentes condições experimentais foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M com CaCl_2 5mM, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão e ferrocianeto de potássio a 0,8%. Posteriormente, as amostras foram contrastadas com acetato de uranila, desidratadas em série cetônica, embebidas em Araldite (Machado & Rodrigues 2004) e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Spirit, FEI Tecnai) no Centro de microscopia do IBB, UNESP, Botucatu.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Amostras de pulvino primário e pecíolo do segundo par de folhas completamente expandidas formadas após a aplicação dos tratamentos foram coletadas de plantas (n=5) de ambas as espécies mantidas sob as diferentes condições experimentais. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora e desidratadas em série etílica. A seguir, foram secadas em ponto crítico e metalizadas com ouro (Robards 1978). Para localização e quantificação do acúmulo de cálcio nos tecidos, as amostras foram analisadas utilizando equipamento de espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200, FEI Company).

Resultados

As plantas de *M. caesalpinifolia* (Fig. 1A-C) e de *M. pudica* (Fig. 2A-C) submetidas a 360, 240, 120 mg L⁻¹ de Ca²⁺ não apresentaram alterações morfológicas visíveis no eixo vegetativo aéreo durante o período de experimento, enquanto os indivíduos de ambas as espécies cultivadas sob a ausência de cálcio apresentaram caule menos ramificado (Fig. 1D, 2D) e folhas com superfície de contorno irregular e sinais de clorose (Fig. 1D). Plantas mantidas na ausência de cálcio apresentaram gema apical caulinar com sinais de ressecamento e eixo caulinar com menor comprimento em comparação com plantas dos demais tratamentos (Tab. 1, 2).

Em *M. caesalpinifolia*, cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram observados nas células endodérmicas dos pulvinos primários (Fig. 3A-C) e pecíolos (Fig. 4A-C) de

indivíduos submetidos a 360, 240 e 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ (Tab. 3). A densidade de cristais na endoderme dos pulvinos foi semelhante entre plantas mantidas sob 360, 240 e 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ (Tab. 3). Entretanto, a densidade de cristais no pecíolo diminuiu de acordo com a diminuição da concentração de Ca²⁺ às quais as plantas foram submetidas (Tab. 3). Quando se compara as diferentes regiões foliares, a densidade de cristais de cálcio na endoderme foi maior em pecíolos que em pulvinos de plantas mantidas sob 360, 240 e 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ (Tab. 3). Nos pulvinos (Fig. 3D) e pecíolos (Fig. 4D) de indivíduos mantidos na ausência de cálcio não foram observados cristais na endoderme (Tab. 3).

Em *M. pudica* não houve formação de cristais de oxalato de cálcio na endoderme dos pulvinos primários (Fig. 5A-F) em nenhum dos tratamentos. Já na endoderme dos pecíolos, cristais de oxalato de cálcio foram formados em todos os tratamentos (Fig. 6A-C), exceto na ausência de cálcio (Fig. 6D; Tab. 4). A densidade de cristais de oxalato de cálcio na endoderme dos pecíolos foi semelhante entre indivíduos mantidos sob 360 e 240 mgL⁻¹ de Ca²⁺; entretanto, plantas mantidas a 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ apresentaram menor densidade de cristais em comparação com indivíduos mantidos sob maiores concentrações de Ca²⁺ (Tab. 4).

A quantificação de cálcio nos tecidos utilizando MEV/EDS mostrou maior concentração desse elemento nos pulvinos primários de plantas de *M. caesalpinifolia* submetidas a 360 mgL⁻¹ de Ca²⁺ em comparação com plantas sob os demais tratamentos, sendo que a concentração de cálcio detectada foi semelhante em plantas tratadas sob 240 e 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺, não tendo sido detectada a presença desse elemento em plantas mantidas sob ausência de Ca²⁺ (Tab. 5). Em *M. pudica* (Tab. 6), a quantidade de cálcio detectada nos pulvinos foi menor que em *M. caesalpinifolia* (Tab. 5), especialmente quando se compara indivíduos de ambas as espécies mantidos sob 360 mgL⁻¹ de Ca²⁺. Em plantas de *M. pudica* submetidas ao tratamento com 240 mgL⁻¹ de Ca²⁺ e sob ausência de cálcio não foi detectada a presença de cálcio nos pulvinos (Tab. 6).

Cristais primários de oxalato de cálcio foram observados ao MET na endoderme dos pulvinos de *M. caesalpinifolia* (Fig. 7A-B). Tais células apresentaram espessamento da parede periclinal interna e da porção inferior das paredes anticlinalis formando uma estrutura em formato de U (Fig. 7A-B). Nessas regiões, as porções espessas das paredes apresentam aspecto lamelar (Fig. 7B). Nas células endodérmicas de indivíduos mantidos sob ausência de cálcio, não foi observado esses espessamentos nas amostras analisadas. A técnica ultracitoquímica utilizada para marcação de depósitos subcelulares de cálcio mostrou a formação de precipitados eletrondensos nos pulvinos de indivíduos de *M.*

caesalpiniiifolia (Fig. 7C-F). Depósitos elétron-densos foram observados na superfície interna da membrana plasmática, no citoplasma, no interior dos vacúolos e nos espaços intercelulares do córtex interno dos pulvinos de indivíduos tratados com 360, 240 e 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ (Fig. 7C-F). Não houve acúmulo de precipitados elétron-densos em plantas mantidas na ausência de cálcio.

Em *M. pudica* a técnica ultracitoquímica para marcação de cálcio intracelular produziu depósitos elétron-densos no citoplasma e nas proximidades da membrana plasmática (Fig. 8A) das células do córtex interno nos pulvinos de plantas sob 360 mgL⁻¹ de Ca²⁺; além disso, porções do retículo endoplasmático foram impregnadas com depósitos da reação (Fig. 8A). Não houve acúmulo de precipitado nos pulvinos de plantas mantidas sob as demais concentrações de cálcio (Fig. 8B-C).

No que se refere à movimentação, as folhas de *M. caesalpiniiifolia* continuaram apresentando movimentos nictinásticos em todos os tratamentos, mantendo-se abertas durante o dia (Fig. 9A) e fechadas durante a noite (Fig. 9B), mesmo no tratamento sob ausência de cálcio. Plantas de *M. pudica* (Fig. 10A-B) mantidas sob os diferentes tratamentos mantiveram sua capacidade de movimentação foliar rápida em resposta a estímulos mecânicos, exceto plantas mantidas na ausência de Ca²⁺ que se tornaram não responsivas ao toque.

Discussão

Plantas de *M. caesalpiniiifolia* e *M. pudica* mantidas sob diferentes concentrações de cálcio mantiveram seu desenvolvimento normal mostrando aspecto morfológico externo e comprimento do eixo aéreo semelhantes em todos os tratamentos, exceto na ausência desse elemento. Entretanto, peculiaridades foram observadas ao nível celular entre espécies e entre pulvinos e pecíolos em plantas mantidas sob diferentes concentrações de cálcio. Nossos dados corroboram a ideia de que pulvinos de espécies que apresentam movimentos foliares násticos lentos, como *M. caesalpiniiifolia*, são acumuladores de cristais de cálcio na endoderme desde que este elemento esteja disponível, enquanto que em espécies com movimentos foliares násticos rápidos, como *M. pudica*, não ocorre formação de cristais na endoderme (Roblin et al. 1989, Rodrigues & Machado 2007), independentemente da concentração de cálcio à qual a planta foi submetida. De acordo com nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo comparativo sobre a formação de cristais de cálcio em pulvinos e pecíolos de espécies vegetais com diferentes tipos de movimentação foliar.

A análise de amostras ao MEV/EDS mostrou que pulvinos de *M. caesalpiniiifolia* acumulam concentrações de cálcio correspondentes à quantidade desse elemento fornecida em solução nutritiva. A quantificação de cálcio nos tecidos de pulvinos dessa espécie mostrou que plantas mantidas a 360 mgL⁻¹ de Ca²⁺ de fato apresentaram maior concentração desse elemento; entretanto, a densidade dos cristais de cálcio na endoderme dos pulvinos de plantas sob essa condição não foi diferente em comparação com plantas mantidas sob 240 e 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺. Por outro lado, nos pecíolos, a densidade de cristais de cálcio variou de acordo com a concentração de cálcio recebida pelas plantas por meio da solução nutritiva. Dados semelhantes foram observados para o pecíolo de *M. pudica*, onde menor densidade de cristais foi observada na endoderme de pecíolos de plantas mantidas sob 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ em comparação com plantas mantidas sob maiores concentrações desse elemento. Para os pulvinos de *M. pudica*, mesmo quando a concentração de cálcio oferecida às plantas por meio de solução nutritiva era abundante, não houve formação de cristais na endoderme, sendo que a concentração de cálcio detectada nos pulvinos dessa espécie por meio de MEV/EDS foi baixa em todos os tratamentos. Pesquisas tem mostrado que a densidade de cristais de oxalato de cálcio aumenta no limbo foliar de plantas tratadas com alta concentração de cálcio e que o número dos cristais diminui em plantas que recebem pouco cálcio (Zindler-Frank 1975, Borchert 1986, Wu et al. 2006, Paiva 2019). Entretanto, a formação dos cristais parece estar relacionada à função dos tecidos/órgãos analisados. Nesse sentido, estudos envolvendo espécies de leguminosas têm mostrado que a formação de cristais de cálcio na bainha dos feixes vasculares do limbo foliar é algo constitutivo e independente da concentração de cálcio à qual as plantas estão expostas, enquanto que a formação desses elementos nas células do mesofilo deve ser induzida pela exposição a altas concentrações de cálcio (Paiva 2019). Nakata & McConn (2006) identificaram o gene responsável pela formação de cristais em *Medicago truncatula* e demonstraram que, embora plantas mutantes e selvagens apresentassem a mesma concentração de cálcio, cristais de cálcio não foram formados nas plantas mutantes. Assim, parece que a variação na densidade dos cristais parece ser um aspecto variável de acordo com a concentração de cálcio recebida pelas plantas e também com a região/tecido foliar analisado. De fato, nossos resultados mostraram resposta diferencial entre pulvinos e pecíolos, o parece estar relacionado à função peculiar de cada região foliar. Além disso, a formação ou não de cristais em pulvinos parece ser uma característica constitutiva de cada espécie, estando intimamente

relacionada ao tipo de movimentação foliar apresentado, conforme já sugerido por Rodrigues & Machado (2007).

Estudos tem mostrado ainda que, em determinadas espécies de leguminosas, a proporção de oxalato de cálcio por massa seca aumenta conforme a disponibilidade de cálcio, sem que haja alterações na porcentagem de cálcio insolúvel ligado aos cristais por área de folha, indicando que o excesso de cálcio insolúvel pode se depositar em outras porções celulares (Zindler-Frank et al. 2001), tais como a lamela média. Nas leguminosas, grandes quantidades de cálcio têm sido detectadas nas paredes celulares (Emanuele & Staples 1990). De fato, nossas imagens obtidas por meio da utilização de técnica ultracitoquímica para marcação de depósitos de cálcio mostrou impregnações nos vacúolos, citoplasma, membrana plasmática e, principalmente, na região entre células do córtex interno dos pulvinos. Em *M. caesalpinifolia* tais depósitos foram observados em todos os tratamentos, exceto na ausência de cálcio, enquanto que em *M. pudica* marcações citoquímicas foram observadas somente em plantas mantidas sob 360 mgL^{-1} de Ca^{2+} , o que mais uma vez demonstra o comportamento diferencial dos pulvinos entre espécies com diferentes tipos de movimento foliar.

Como mencionado, é importante ressaltar que no tratamento onde as plantas de *M. caesalpinifolia* foram mantidas na ausência de cálcio, não houve formação de cristais na endoderme dos pulvinos e pecíolos. Cristais de oxalato de cálcio são inclusões sólidas comumente encontradas em células de diferentes tecidos e órgãos vegetais e desempenham funções importantes na regulação dos níveis de cálcio citoplasmático, na proteção contra herbivoria, desintoxicação de metais pesados, na distribuição da luz com consequência para a fotossíntese (Franceschi & Nakata 2005, Paiva 2019) e na regulação dos níveis celulares de cálcio (Faheed et al. 2013). O cálcio desempenha diversas funções na planta, participando da composição da parede celular, em especial da lamela média, atuando na divisão e crescimento celular, contribuindo para a estabilização das biomembranas, para a regulação osmótica, e atuação de diversas enzimas (Taiz & Zeiger 2009). Entretanto, a concentração de Ca^{2+} no citoplasma deve ser mantida em níveis baixos a fim de evitar a alteração de atividade de determinadas enzimas, visto que o cálcio é um importante mensageiro secundário na transdução de sinais (Bush 1995, Yang 1996). Assim, o excesso do cálcio passa a ser armazenado na forma de cristais, os quais podem representar até 90% do conteúdo total de cálcio em uma planta (Franceschi & Horner 1980, Paiva 2019). Em *M. caesalpinifolia*, o cálcio imobilizado na forma de cristais não estaria disponível imediatamente para atuar em reações cálcio-dependentes, impedindo a

rápida resposta dos pulvinos a estímulos externos (Rodrigues & Machado 2007). Considerando que os movimentos foliares nictinásticos lentos característicos de *M. caesalpinifolia* continuaram a ocorrer mesmo em plantas mantidas sob ausência de cálcio, podemos inferir que outros mecanismos não relacionados a reações cálcio-dependentes, como seria o caso da polimerização dos microfilamentos de actina nas células motoras (Yao et al. 2008), estariam envolvidos no funcionamento dos pulvinos nessa espécie. Nesse contexto, nossos dados reforçam as ideias de que a mudança de turgor das células corticais motoras seria a força motriz para o funcionamento do pulvino (Toriyama 1955) em espécies com movimentos nictinásticos lentos.

Em *M. caesalpinifolia*, as células endodérmicas dos pulvinos apresentaram espessamentos de parede em forma de U ao redor dos cristais. A formação de cristais prismáticos de oxalato de cálcio nas endodérmicas de pulvinos de folhas com movimentos lentos acompanhada pelo espessamento de porções das paredes celulares tem sido relatada em outras espécies de leguminosas com movimentos lentos e associada à diminuição de trocas simplásticas importantes no funcionamento dos pulvinos (Rodrigues & Machado 2007). Embora a maioria dos cristais nas angiospermas ocorra no interior de vacúolos (Kinzel 1989), a deposição de parede ao redor do cristal leva ao seu isolamento em relação ao protoplasto (Ilarslan et al. 2001), o que poderia dificultar ainda mais a disponibilização de cálcio intracelular por remobilização a partir dos cristais.

Plantas de *M. pudica* mantidas sob os diferentes tratamentos mantiveram sua capacidade de movimentação foliar rápida em resposta a estímulos mecânicos, exceto plantas mantidas sob ausência de cálcio que se tornaram não responsivas ao toque. O papel fundamental do cálcio na polimerização dos elementos do citoesqueleto tem sido comprovado em diferentes situações, tais como crescimento de tubo polínico (Chen et al. 2013) e no funcionamento de células-guarda (Chent et al. 2013). No que se refere aos pulvinos, Yao et al. (2008) demonstraram o envolvimento do cálcio e dos microfilamentos de actina no funcionamento dos pulvinos de *M. pudica* (Yao et al. 2008). Assim, além das mudanças de turgor das células motoras, alterações na conformação dos elementos do citoesqueleto envolvendo mecanismos cálcio-dependentes são essenciais para o funcionamento dos pulvinos em folhas com movimentos rápidos. Estudos têm mostrado que a concentração de cálcio nas células motoras dos pulvinos de *Mimosa* se modifica durante o movimento foliar devido à abertura e fechamento de canais de cálcio presentes no tonoplasto dos vacúolos taníferos (Toriyama & Jaffe 1972, Turnquist et al. 1993, Yao et al. 2008). Durante o fechamento das folhas, a concentração de cálcio no

citoplasma aumenta devido à sua liberação a partir dos vacúolos (Toriyama & Jaffe 1972), o que torna esse elemento disponível para o funcionamento do citoesqueleto (Yao et al. 2008). Tratamentos com inibidores de canais de cálcio retardam os movimentos foliares de *M. pudica* e comprovam a íntima relação entre os níveis de cálcio, a dinâmica dos microfilamentos de actina e a movimentação foliar nessa espécie (Yao et al. 2008).

Em suma, nossos resultados comprovam o comportamento diferencial entre pulvinos e pecíolos no que se refere ao acúmulo de cálcio e formação de cristais e que pulvinos de espécies com movimentos foliares rápidos respondem de forma distinta à disponibilidade desse elemento em comparação com pulvinos de espécies com movimentos foliares lentos. Considerando o fato de que pulvinos de *M. caesalpinifolia* continuaram a produzir movimentos foliares mesmo na ausência de cálcio e que as folhas de *M. pudica* se tornaram não responsivas nesse tratamento, podemos sugerir que os mecanismos celulares envolvidos nos movimentos rápidos sejam distintos daqueles ocorrentes durante movimentos lentos, apresentando maior envolvimento de reações dependentes do cálcio.

Referências bibliográficas

- ACCORSI, W.R. Os fenômenos de movimento no reino vegetal: Aula Inaugural. Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1952.
- BORCHERT, R. Calcium acetate induces calcium uptake and formation of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. *Planta*, v. 168, p. 571-578, 1986.
- BUSH, D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 46, p. 95-122, 1995.
- CAMPBELL, N.A.; GARBER, R.C. Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizia* during leaf movement. *Planta*, v. 148, p. 251-255, 1980.
- CAMPBELL, N.A.; STIKA, K.M.; MORRISON, G.H. Calcium and potassium in the motor organ of the sensitive plant: localization by ion microscope. *Science*, v. 204, p. 185-187, 1979.
- CAMPBELL, N.A.; THOMSON, W.W. Multivacuolate motor cells in *Mimosa pudica* L. *Ann. Bot.*, v. 41, p. 1361-1362, 1977.

- CARMELLO, Q.A.C. Hidroponia. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20, 1992, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” – CENA, 1992, p. 355-68.
- CARVALHO, P.E.R. Sabiá, *Mimosa caesalpinifolia*. Circular Técn. 135. ISSN 1517-5278, 2007.
- CHEN, L.; ZHANG, X.; ZHOU, W.; QIAO, Q.; LIANG, H.; et al. The Interactive Effects of Cytoskeleton Disruption and Mitochondria Dysfunction Lead to Reproductive Toxicity Induced by Microcystin-LR. PLoS ONE, v. 8: e53949, 2013.
- DANTAS, J.P.; BERGAMIN FILHO, H.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão macassar (*Vigna sinensis* (L.) Endl.), IV. Exigências de macro e micronutrientes. Anais da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, São Paulo, v. 36, p. 425-433, 1979.
- EMANUELE, S.M.; STAPLES, C.R. Ruminal release of minerais from six forage species, J. Anim. Sci., v. 68, p. 2052-2060, 1990.
- ESAU, K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher: São Paulo.
- FAHEED, F.A.; MUSAB, M.; ELMOHSEN, S.A. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. Doga, Turkish J. Bot., v. 37, p. 139-152, 2013.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecn. (UFLA), v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- FRANCESCHI, V.R & HORNER, R.T. Calcium oxalate crystals in plants. The Bot. Rev., v. 6, p. 361-427, 1980.
- FRANCESCHI, V.R.; NAKATA, P.A. Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function. Ann. Rev. Plant Biol., v. 5, p- 641-671, 2005.
- FLEURAT-LESSARD, P. Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. Biol. Rev., v. 63: 1-22, 1988.
- FLEURAT-LESSARD, P.; BONNEMAIN, J-L. Structural and ultrastructural characteristics of the vascular apparatus of the sensitive plant (*Mimosa pudica* L.). Protoplasma, v. 94, p. 127-143, 1978.
- FORBES, M.S.; PLANTHOL, B.A.; SPERELAKIS, N. Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular systems of muscle: Modifications and Applications. J. Ultrastruc. Res., v. 60, p. 306-327, 1977.

- HAVALDAR, V.D.; MALI, S.S.; MALI, K.K.; SHINDE, S.S.; JADHAV, S.N. An overview on *Mimosa pudica* (touch-me-not plant). *Int. J. Med. Pharm. Res.*, v. 6, p. 28-34, 2022.
- HEWITSON, J. 2001. Nyctinasty and *Mimosa* leaf movement. Disponível em: <http://www.saps.plantsci.ca.ac.uk/records/rec117.htm>. Acesso em: 3 janeiro. 2022.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agric. Exp. Station Circular*, v. 347, p. 1–32, 1950.
- ILARSLAN H.; PALMER, R.G.; HORNER, H. T. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Ann. Bot.*, v. 88, p. 243-257, 2001.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York. 1940.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG E.A.; STEVENS, P.F. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates: Massachusetts. 1999.
- KAMEYAMA, K., KISHI, Y., YOSHIMURA, M., KANZAWA, N., SAMESHIMA, M.; TSUCHIYA, T. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature*, v. 407, p. 37, 2000.
- KANZAWA N.; HOSHINO Y.; CHIBA M.; HOSHINO D.; KOBAYASHI H.; KAMASAWA N.; et al. Change in the actin cytoskeleton during seismonastic movement of *Mimosa pudica*. *Plant and Cell Physiol.*, v. 47, p. 531–539, 2006.
- KINZEL, H. Calcium in the vacuoles and cell walls of plant tissue forms of deposition and their Physiological and Ecological Significance. *Flora.*, v. 182, p. 99-125, 1989.
- MACHADO, S.R.; RODRIGUES, T.M. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Rev. Brasil. Bot.*, v. 27, p.135-147, 2004.
- MANO, H.; HASEBE, M. Rapids movements in plants. *J. P. Res.*, v. 134, p. 3-17, 2021.
- 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.
- MINORSKY, P.V. The functions of foliar nyctinasty: a review and hypothesis. *Biological Rev.*, v. 94, p. 216–229, 2019.
- MORSE, M.J.; SATTER, R.L. Relationship between motor cell ultrastructure and leaf movements in *Samanea saman*. *Physiol. Plant.*, v. 46, p. 338-346, 1979.
- MOYSSET, L.; SIMÓN, E. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *Amer. J. Bot.*, v. 78, p. 1467-1486, 1991.

- NAKATA, P.A.; McCONN, M.M. A genetic mutation that reduces calcium oxalate content increase availability in *Medicago truncatula*. *Funct Plant Biol.*, v.33, p.703–706, 2006.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, p. 368-373, 1964.
- PAIVA, E.A.S. Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants? *New Phytolog.*, v. 223, p. 1707-1711, 2019.
- ROBARDS, A.W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. *In: Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. J. L. Hall. (eds.). Elsevier: New York. 1978.
- ROBLIN, G.; FLEURAT-LESSARD, P.; BONMORT, J. Effects of compounds affecting calcium channels on phytochrome and blue pigment mediated pulvinar movements of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiol.*, v. 90, p. 697-701, 1989.
- RODRIGUES, T.M.; MACHADO, S.R. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Bot. Bras.*, v. 18, p. 381-390, 2004.
- RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. *Revista Brasil. Bot.*, v. 29, p.709-720, 2006.
- RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. The pulvinos endodermal cells and their relation to leaf movement in legumes of Brazilian cerrado. *Plant Biol.*, v. 9, p. 469-477, 2007.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, California. 1992.
- SATTER, R.L.; GALSTON, A.W. Mechanisms of control of leaf movements. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v. 32, p. 83-110, 1981.
- SATTER, R.L.; GARBER, R.C.; KHAIRALLAH, L.; CHENG, Y-S. Elemental analysis of freeze-dried thin sections of *Samanea* motor organs: barriers to ion diffusion through the apoplast. *J. Cell Biol.*, v. 95, p. 893-902, 1982.
- SONG, K.; YEOM, E.; LEE, S.J. Real-time imaging of pulvinus bending in *Mimosa pudica*. *Sci. Rep.*, v. 4, p. 6466, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- TAMASHIRO, J.Y.; ESCOBAR, N.A.G. Mimosoideae. Parte integrante da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Tozzi, A.M.G.A. (coord.) *In: Wanderley,*

- M.G.L. et al. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 8, p. 84-166, 2016.
- THE LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP (LPWG). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, v. 66, p. 44-77, 2017.
- TORIYAMA, H. Observational and experimental studies of sensitive plants. V. The development of the tannin vacuole in the motor cell of the pulvinus. *Bot. Mag.*, v. 68, p. 203-208, 1955.
- TORIYAMA, H.; JAFFE, M.J. Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.*, v. 49, p.72-81, 1972.
- TURNQUIST, H.; ALLEN, N.; JAFFE, M.J. A pharmacological study of calcium flux mechanisms in the tannin vacuoles of *Mimosa pudica* L. motor cells. *Protoplasma*, v. 176, p. 91-99, 1993.
- WU, CHI-C.; CHEN, S-J.; YEN, T-B.; KUO-HUANG, L-L. Influence of calcium availability on deposition of calcium carbonate and calcium oxalate crystals in the idioblasts of *Morus australis* Poir. Leaves. *Bot. Studies.*, v.47, p. 119-127, 2006.
- YAMASHIRO, S.; KAMEYAMA, K.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; MABUCHI, I.; TSUCHIYA, T. The gelsolin/fragminfamily protein identified in the higher plant *Mimosa pudica*. *J. Biochem.*, v. 130, n. 2, p. 243-249, 2001.
- YANG, Z. Signal transducing proteins in plants: an overview. In: VERMA, D.P.S. (Ed.). *Signal transduction in plant growth and development*. New York: Springer-Verlag, 1996. 1-37 p.
- YAO, H.; XU, Q.; YUAN, M. Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. *Plant Signal. Behav.*, v. 3, n. 11, p. 954-960, 2008.
- ZINDLER-FRANK, E. On the formation of the pattern of crystal idioblasts in *canavalia ensiformis* DC.VII. Calcium and oxalate content of the leaves in dependence of calcium nutrition. *Z. Pflanzenphysiol.*, v. 77, n. 1, p. 80-85, 1975.
- ZINDLER-FRANK, E.; HONOW, R.; HESSE, A. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *J Plant Physiol.*, v. 158, p. 139-144, 2001.

Tabela 1. Dados médios do comprimento do eixo vegetativo aéreo de plantas (n= 10) de *Mimosa caesalpinifolia* (Leguminosae) sob diferentes concentrações de Ca²⁺

Tratamento (mgL ⁻¹ de Ca ²⁺)	Comprimento do eixo aéreo (cm)
360	31 a
240	34 a
120	30 a
0	20 b
CV (%)	7,58

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). CV. Coeficiente de variação.

Tabela 2. Dados médios do comprimento do eixo vegetativo aéreo de plantas (n= 10) de *Mimosa pudica* (Leguminosae) sob diferentes concentrações de Ca²⁺

Tratamento (mgL ⁻¹ de Ca ²⁺)	Comprimento do eixo aéreo (cm)
360	25 a
240	26 a
120	27 a
0	14 b
CV (%)	16,53

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). CV. Coeficiente de variação.

Tabela 3. Densidade média de cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme dos pulvinos primários e pecíolos em plantas (n= 10) de *Mimosa caesalpinifolia* (Leguminosae) sob diferentes concentrações de Ca^{2+}

Tratamento (mgL^{-1} de Ca^{2+})	Densidade de cristais	
	Pulvino primário	Pecíolo
360	41,06 Ba	107,26 Aa
240	46,09 Ba	92,17 Ab
120	49,12 Ba	69,87 Ac
0	0 Ab	0 Ad
CV (%)	18,87	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. CV. Coeficiente de variação.

Tabela 4. Densidade média de cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme de pecíolos de plantas (n= 10) de *Mimosa pudica* (Leguminosae) sob diferentes concentrações de Ca^{2+}

Tratamento (mgL^{-1} de Ca^{2+})	Densidade de cristais
360	103,23 a
240	101,89 a
120	45,40 b
0	0 c
CV (%)	27,64

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). CV. Coeficiente de variação.

Tabela 5. Quantificação de cálcio ao MEV/EDS em pulvinos primários de plantas (n= 5) de *Mimosa caesalpinifolia* (Leguminosae) sob diferentes concentrações de Ca^{2+}

Tratamento (mgL^{-1} de Ca^{2+})	Quantificação de cálcio (%)
360	1,8
240	0,3
120	0,5
0	0

Tabela 6. Quantificação de cálcio ao MEV/EDS em pulvinos primários de plantas (n = 5) de *Mimosa pudica* (Leguminosae) sob diferentes concentrações de Ca^{2+}

Tratamento (mgL^{-1} de Ca^{2+})	Quantificação de cálcio (%)
360	0,2
240	0
120	0,2
0	0

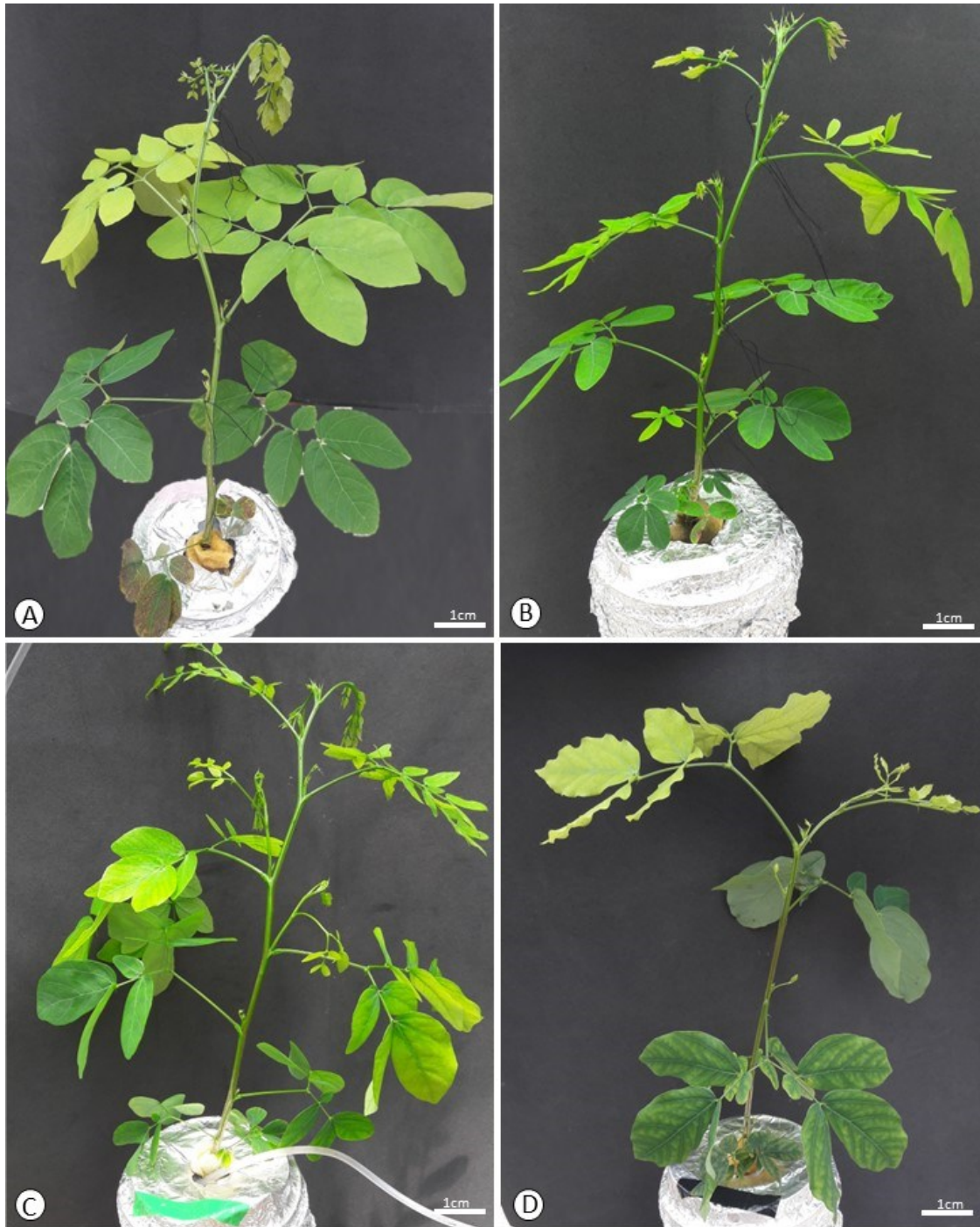


Fig. 1A-D. Morfologia externa de plantas de *Mimosa caesalpinifolia* mantidas sob diferentes concentrações de cálcio. A. $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. B. $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. C. $120 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. D. $0 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$.

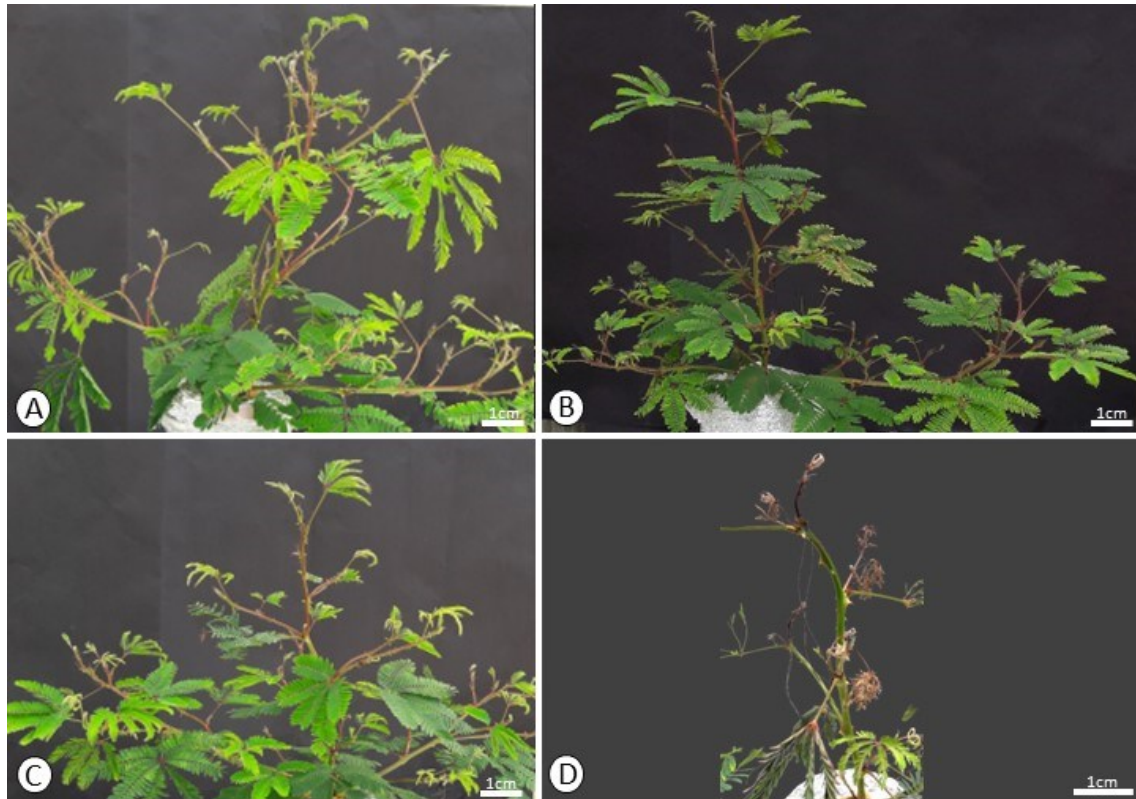


Fig. 2A-D. Morfologia externa de plantas de *Mimosa pudica* mantidas sob diferentes concentrações de cálcio. A. $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. B. $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. C. $120 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. D. $0 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$.

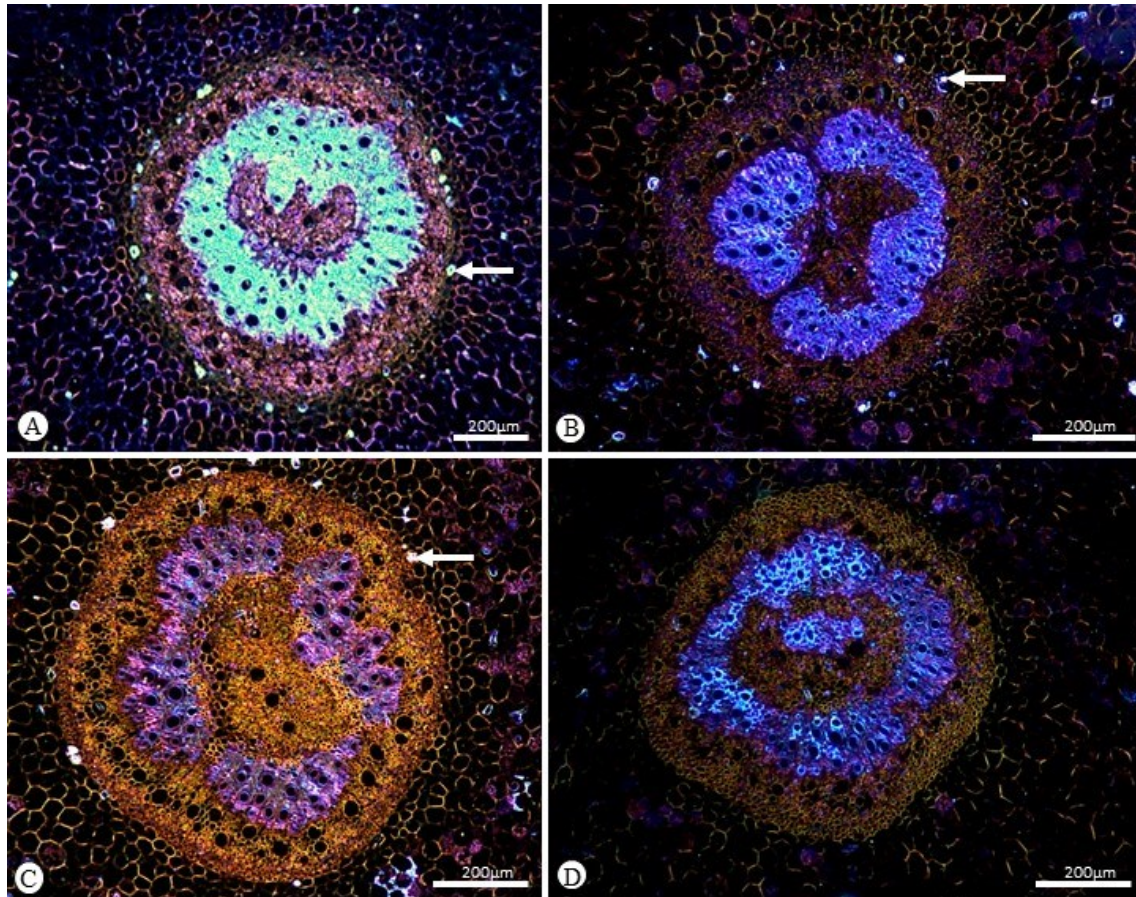


Fig. 3A-D. Seções transversais do pulvino primário sob luz polarizada de indivíduos de *Mimosa caesalpinifolia* sob diferentes concentrações de cálcio. A. 360 mgL⁻¹ Ca²⁺. B. 240 mgL⁻¹ Ca²⁺. C. 120mgL⁻¹ Ca²⁺. D. 0 mgL⁻¹ As setas apontam cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme.

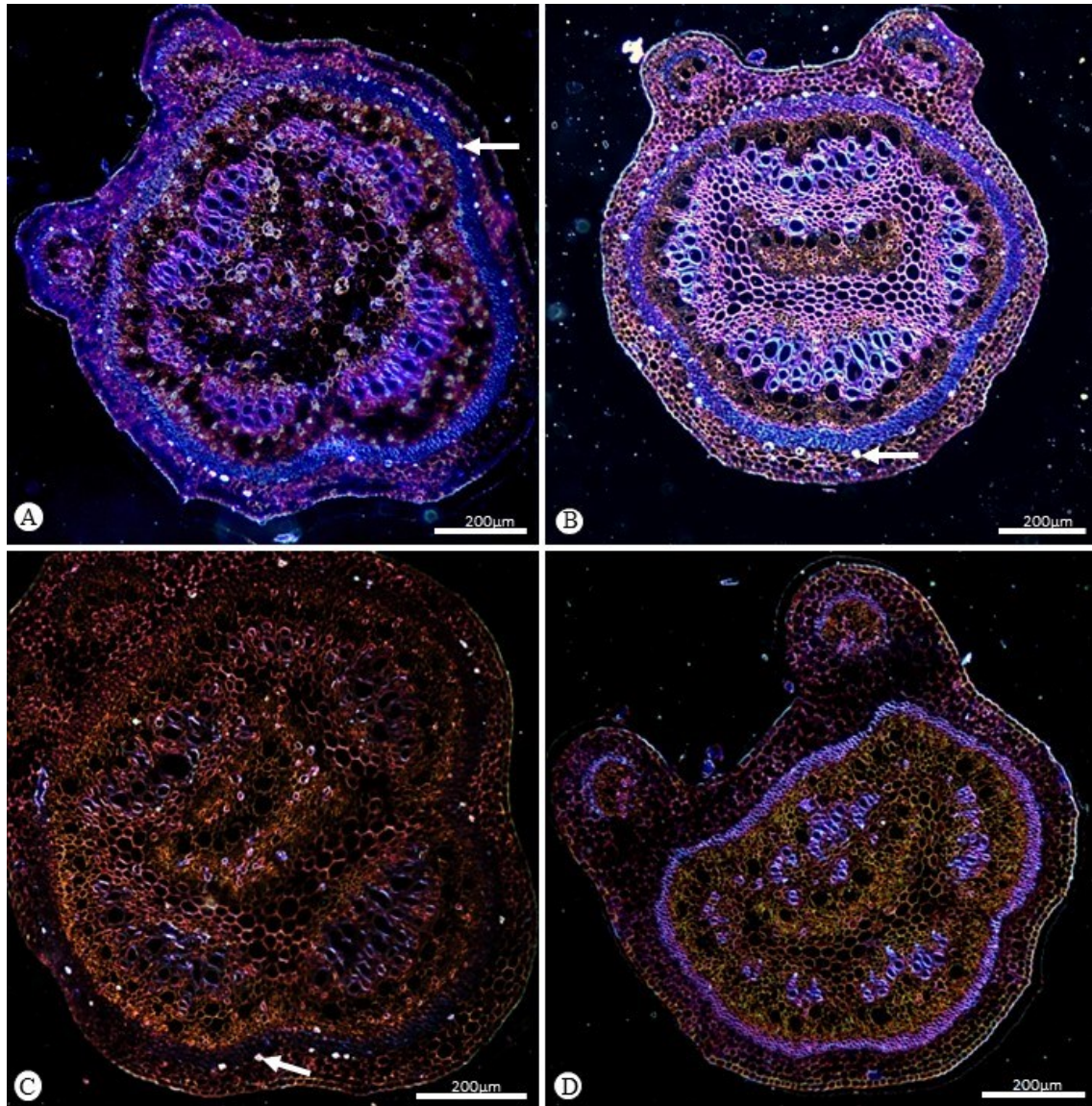


Fig. 4A-D. Secções transversais do pecíolo sob luz polarizada de indivíduos de *Mimosa caesalpinifolia* sob diferentes concentrações de cálcio. A. 360 mgL⁻¹ Ca²⁺. B. 240 mgL⁻¹ Ca²⁺. C. 120mgL⁻¹ Ca²⁺. D. 0 mgL⁻¹. As setas apontam cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme.

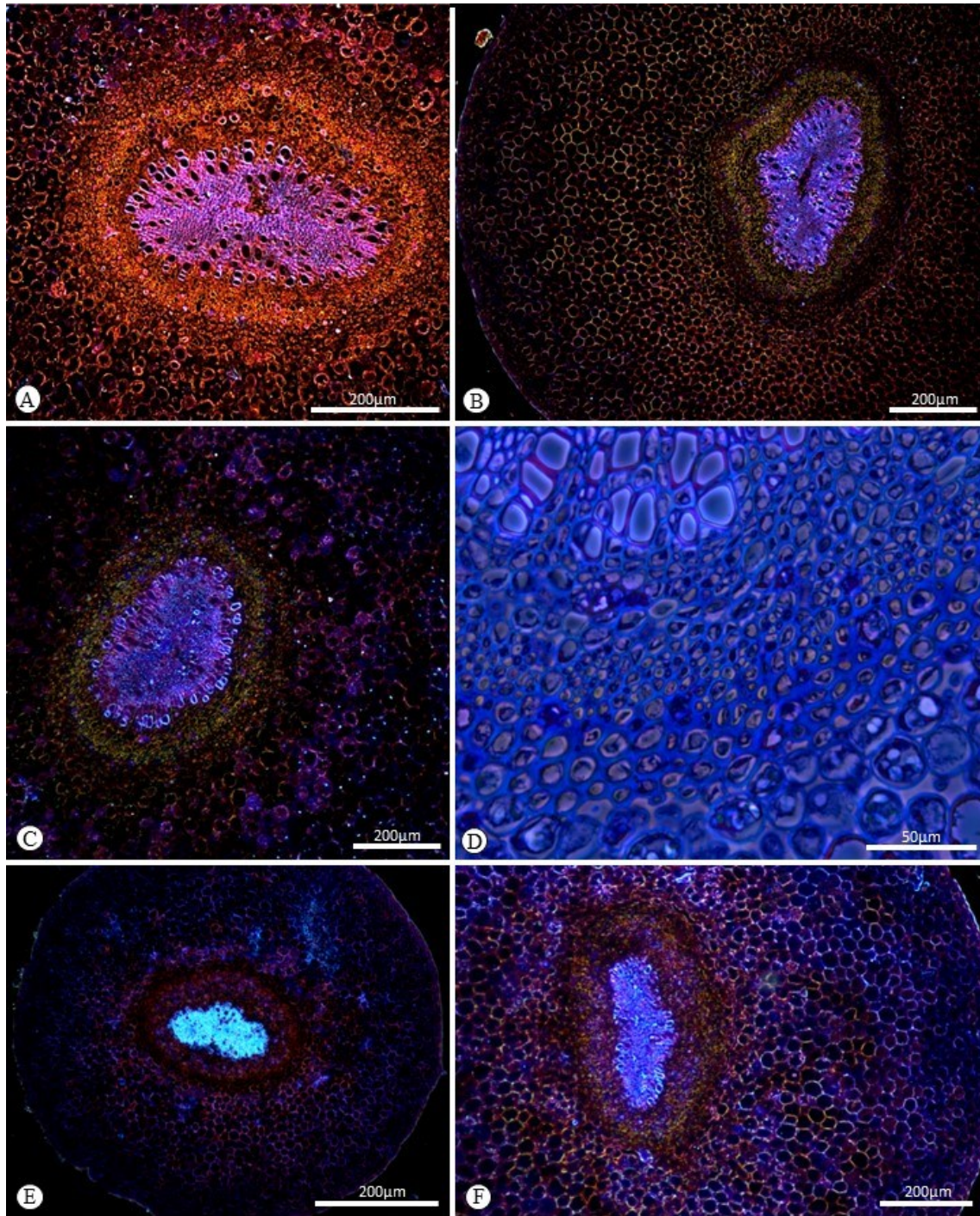


Fig. 5A-F. Secções transversais do pulvino primário sob luz polarizada de indivíduos de *Mimosa pudica* sob diferentes concentrações de cálcio. A. $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. B. $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. C-D. $120 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. E-F. $0 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$.

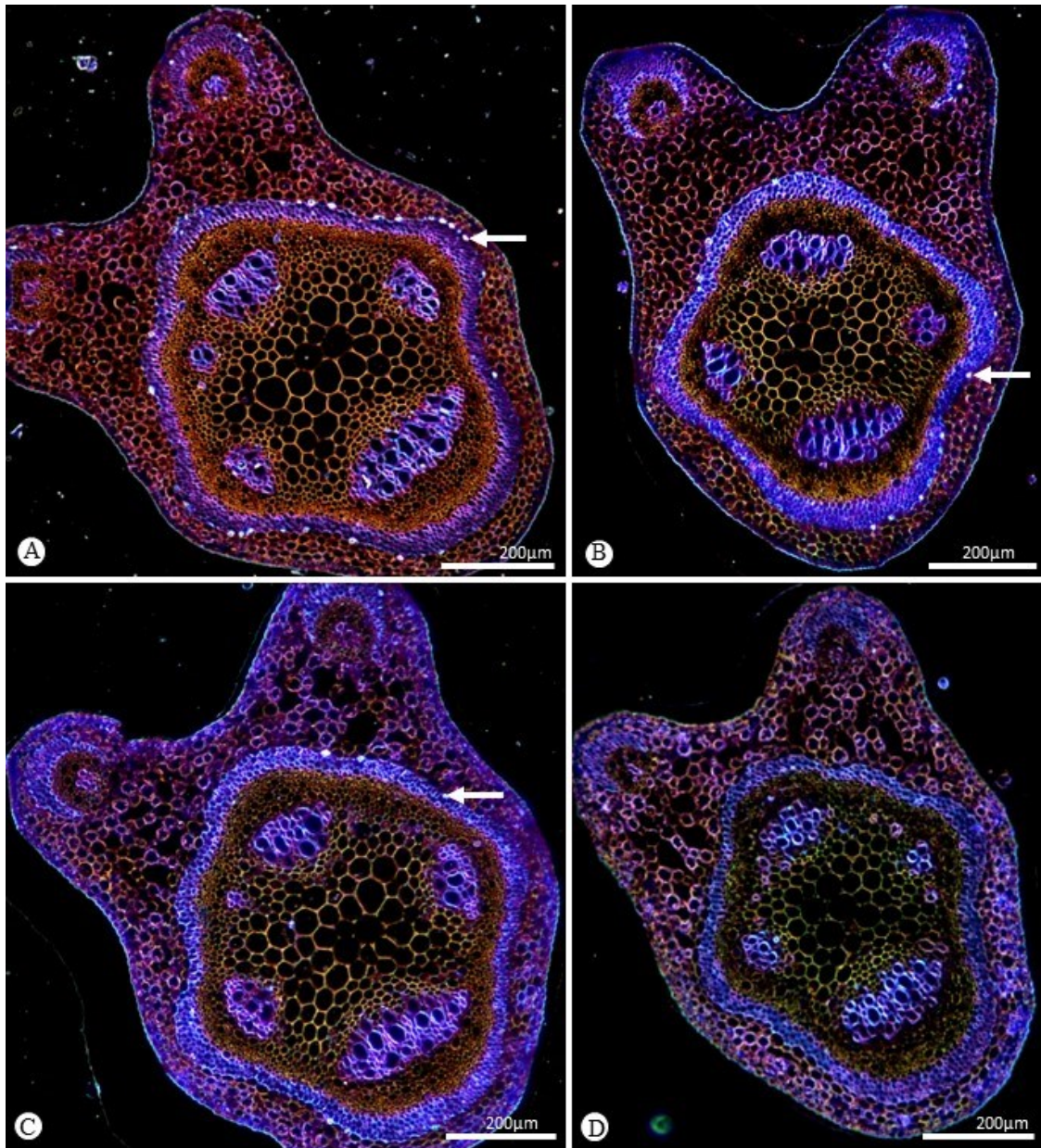


Fig. 6A-D. Secções transversais do pecíolo sob luz polarizada de indivíduos de *Mimosa pudica* sob diferentes concentrações de cálcio. A. $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. B. $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. C. $120 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. D. $0 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. As setas apontam cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme.

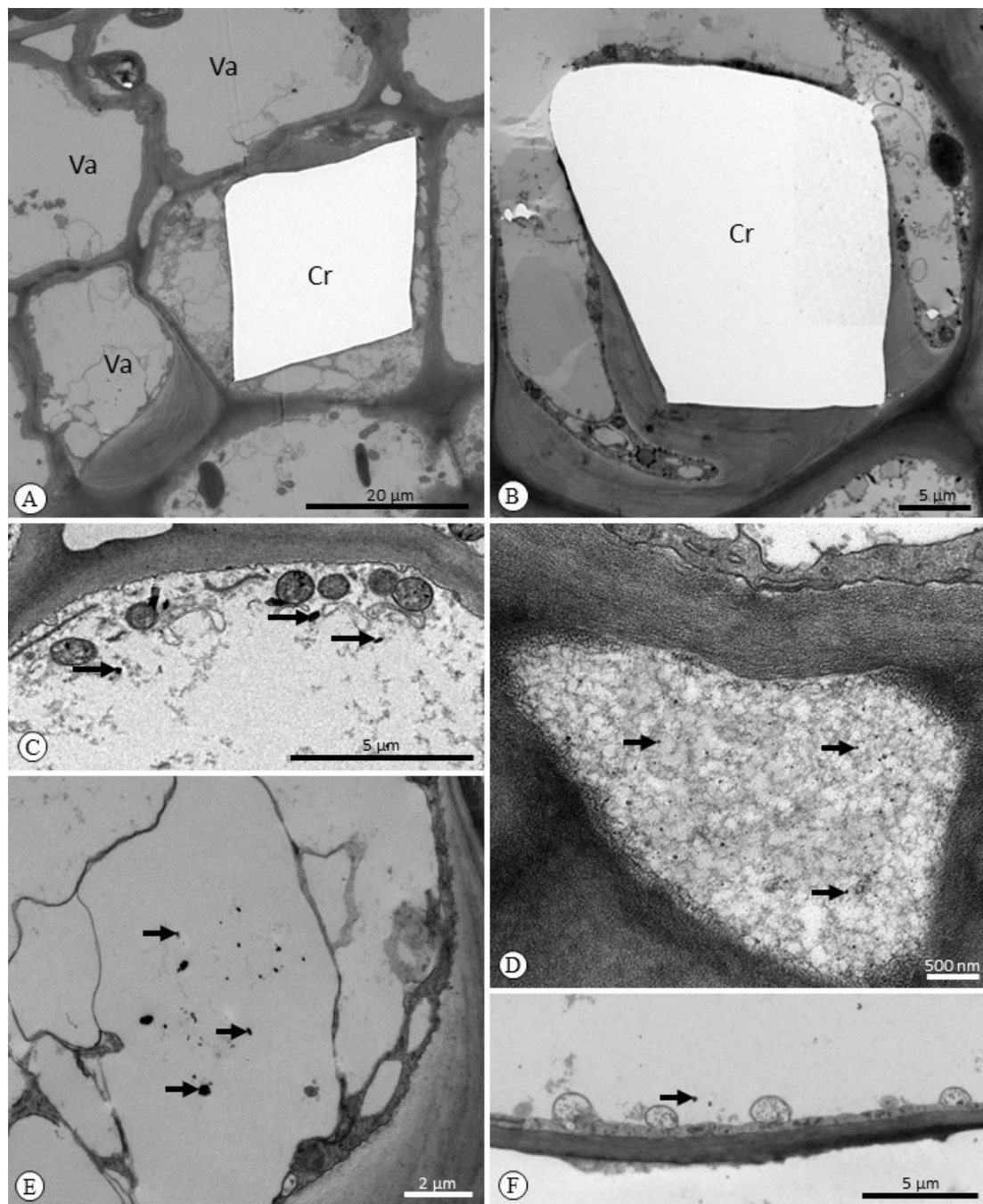


Fig. 7A-F. Citoquímica ultraestrutural ao MET para marcação de depósitos subcelulares de cálcio no pulvino primário de plantas de *Mimosa caesalpiniiifolia* mantidas sob diferentes concentrações de cálcio. A, D, E. $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. B, C. $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. F. $120 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. C. Precipitados (setas) no citoplasma das células endodérmicas. D. Precipitados (setas) de cálcio nos espaços intercelulares no córtex interno. E. Precipitados (setas) no interior de vacúolos das células endodérmicas. F. Precipitados (seta) no citoplasma das células corticais.

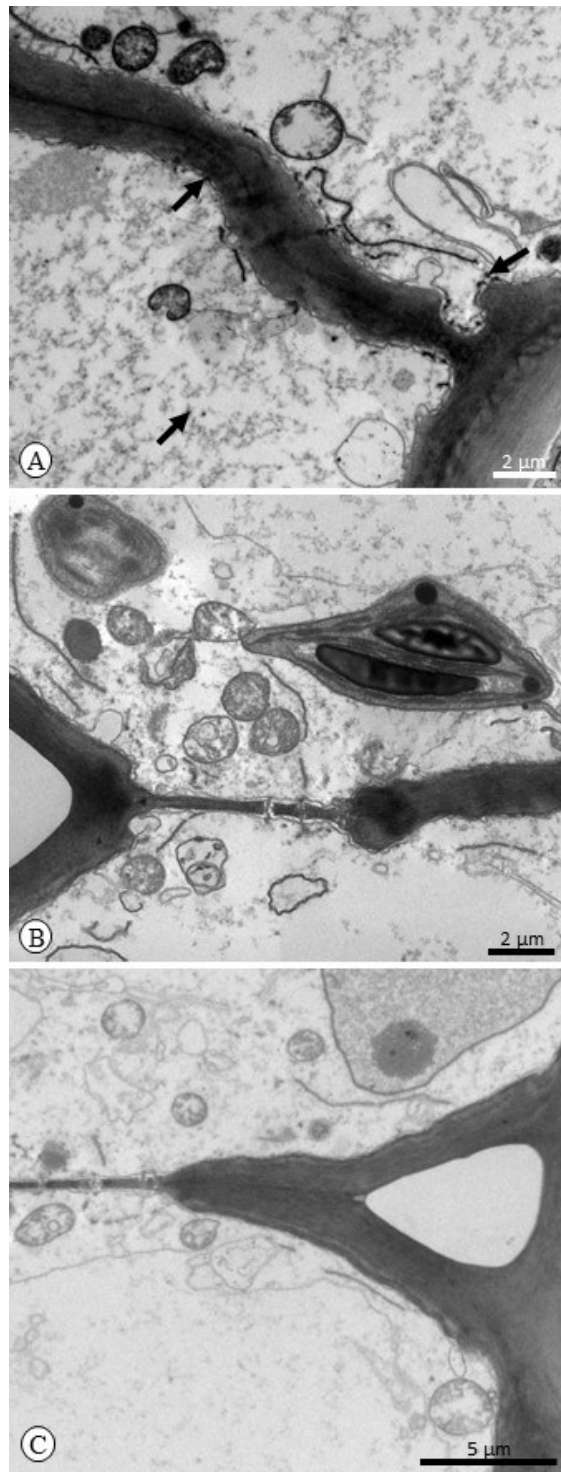


Fig. 8A-C. Citoquímica ultraestrutural ao MET para marcação de depósitos subcelulares de cálcio no pulvino primário de plantas de *Mimosa pudica* mantidas sob diferentes concentrações de cálcio. A. $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. B-C. $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$.

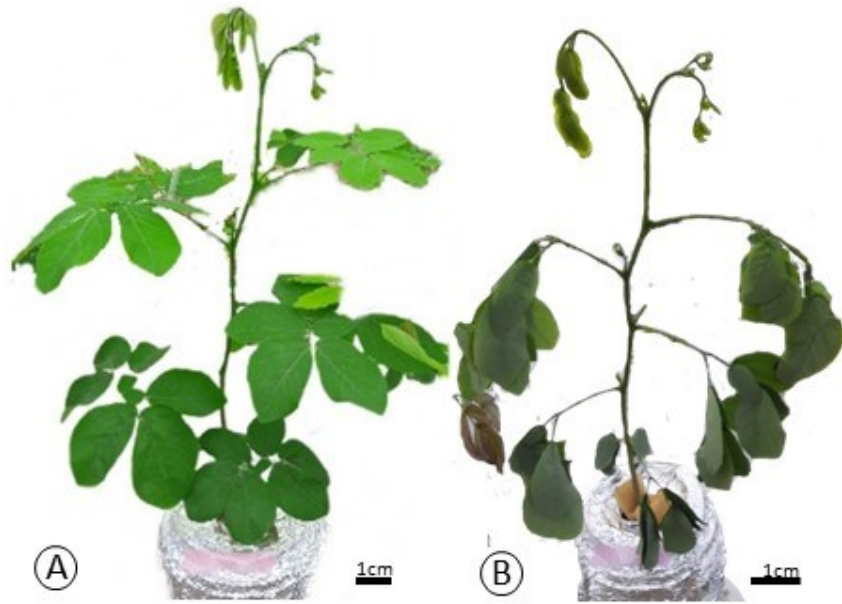


Fig. 9A-B. Movimentação foliar nictinástica em indivíduos de *Mimosa caesalpiniiifolia* sob $360 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. A. Foliólos abertos durante o dia. B. Foliólos fechados no início da noite.



Fig. 10A-B. Movimentação foliar seismonástica em indivíduos de *Mimosa pudica* sob $240 \text{ mgL}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$. A. Foliólos abertos. B. Foliólos fechados após o toque.

CAPÍTULO 3

Morphometry of sieve members and P-protein accumulation in pulvini and petioles of *Mimosa* species (Leguminosae, Caesalpinioideae) with different types of leaf movement

Abstract

The pulvini is a swollen of the basal portion of petiole responsible for the leaf movements. Their functioning is attributed to changes in turgor and in the cytoskeleton configuration in cortical motor cells. However, studies have demonstrated that the vascular system, especially the phloem, is involved in pulvini functioning. We analyzed the morphological diversity of P-protein and accessed morphometric data of sieve tube members in pulvini and petioles of *Mimosa pudica* (species with fast seismonastic leaf movement) and *Mimosa caesalpiniiifolia* (species with slow nyctinastic leaf movements) aiming to detect differential structural features between different leaf regions and between leaves with different types of movement. Primary pulvini and petioles were analyzed under transmission electron microscopy. Pulvini exhibited sieve members with thicker walls in comparison to petioles in both species. The sieve members of *M. pudica* had thicker walls than *M. caesalpiniiifolia* in both petioles and pulvini. These data can be related to the role of the sieve members walls in facilitating the apoplastic transport of ions, special potassium, during the leaf movement. Filaments and lumps of proteins occurred in the sieve members of pulvini and petioles of *M. caesalpiniiifolia*. In the pulvini of *M. pudica*, sieve members exhibited lumen filled with homogeneous material interspersed with filamentous and clustered proteins. Filamentous material was observed in the sieve members of *M. pudica* petioles. Apparently higher abundance of protein inclusions occurred in pulvini in comparison to petioles this species. The suggested interaction of protein-P with the endomembrane system and with the intracellular calcium levels can be important in stimulus transmission during the pulvinus functioning. In the pulvini and petioles of *M. caesalpiniiifolia*, plastids containing exclusively protein inclusions were observed, while in the pulvini and petioles of *M. pudica* occurred plastids containing protein and starch grains. The presence of starch in plastids of *M. pudica* can represent an important source of energy for immediate mobilization during the rapid leaf movements.

Keywords: cell wall thickness, nyctinastic movement, P-plastid, protein, sieve tube members, seismonastic movement

Introduction

Several species of angiosperms, especially those belonging to the Leguminosae, are capable of reversible leaf movements in response to external or internal stimuli (Roblin 1976). Such movements can be fast or slow and are caused by pulvinus (Moysset & Simón 1991). In general, pulvini exhibit uniseriate epidermis, wide parenchymal cortex filled by motor cells rich in phenolic compounds, reduced vascular system in a central position and scarcity of lignified cells (Toriyama 1953; 1955; Fleurat-Lessard & Millet 1984; Rodrigues & Machado 2004; Machado & Rodrigues 2004). However, structural peculiarities have been reported among pulvinus of species with different types of leaf movements (Rodrigues & Machado 2007).

The functioning of the pulvinus is attributed to changes in the turgor pressure between the motor cells of the cortex which, due to the redistribution of potassium and chloride ions and water, can undergo rapid reorganization in the number and size of their vacuoles (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). In addition, studies have evidenced the participation of cytoskeletal elements in pulvinus functioning (Kameyama et al. 2000; Yamashiro et al. 2001). Added to the motor cortical cells, the participation of the vascular system in the pulvinus functioning has been reported due to its role in the ion redistribution and in the stimulus transmission during the leaf movements (Pfeffer 1907; Toriyama 1953; Satter & Galston 1981; Fleurat-Lessard & Bonnemain 1978; Moysset & Simón 1991).

The phloem of pulvini have structural peculiarities that have been associated to their involvement in leaf movement (Esau 1970; 1971; Fleurat-Lessard & Roblin 1982; Moysset & Simón 1991; Grignon et al. 1992; Rodrigues & Machado 2008). In pulvini, the walls of the sieve tube elements are thick and with a loose arrangement of cellulose microfibrils, including the occurrence of sieve tube with nacreous walls in some legume species. Such peculiar organization of the walls of the sieve tube members could facilitate the radial transport of ions during operation of the pulvinus (Rodrigues & Machado 2008). Despite the reports of thick walls in sieve members, morphometric data are not available supporting this distinctive feature of pulvini in relation to other portions of leaves. Furthermore, although the phloem of the most angiosperm species have protein inclusions in the sieve tube elements (Golecki et al. 1999), the abundance and diversity of P-protein seems to be a remarkable feature in the phloem of pulvini (Esau 1971; Rodrigues &

Machado 2008) and may be related to the functioning of the organ. Although studies have shown differential structural aspects between pulvini of species with fast and slow leaf movements (Rodrigues & Machado 2007), little is known about possible phloem morphological peculiarities among species with different types of leaf movements.

Several species belonging to the genus *Mimosa* (Leguminosae, Caesalpinioideae) are known for their ability to respond quickly to external stimuli by closing their leaflets in fractions of a second. *Mimosa pudica* is the most studied species regarding the structural and functional aspects of pulvinus (Toriyama 1953; 1955; Campbell & Thompson 1977; Fleurat-Lessard 1981; Fleurat-Lessard & Roblin 1982; Fleurat-Lessard et al. 1988; Kanzawa et al. 2006; Yao et al. 2008; Song et al. 2014). Their bipinnate compound leaves exhibit rapid seismonastic movements in response to touch (Weintraub 1952; Havaladar et al. 2022) and are regarded as a model for pulvini studies. However, the genus also includes species that perform slow leaf movements related to circadian rhythm. *Mimosa caesalpiniiifolia* is a legume species bearing bipinnated leaves which leaflets remain open during the day and close very slowly in the late afternoon in a nyctinastic movement (personal observations).

In this paper we analyzed the morphological diversity of P-protein and accessed morphometric data of sieve tube members in pulvini and petioles of *Mimosa pudica* and *Mimosa caesalpiniiifolia* aiming to detect differential structural features between different leaf regions and between leaves with different types of movement.

Material and methods

Plant material

Seeds of *M. pudica* and *M. caesalpiniiifolia* were germinated inside germination chambers under 25°C, photoperiod of 12 h, and 2500lux. After the expansion of the first pair of eophylls, the seedlings were transferred to 6.0 L pots filled with complete Hoagland and Arnon (1950) n° 2 nutrient solution and maintained under 25°C ± 4°C and constant aeration in a “Paddy Fan” greenhouse.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Fully expanded leaves located at the third stem node of six plants (n=6) of each species were collected. Samples from the median region of the petioles and primary pulvini were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.3, post-fixed

in 1% osmium tetroxide in the same buffer, dehydrated in acetone series and embedded in Araldite resin. Ultrathin sections (90nm) were treated with lead citrate and uranyl acetate (Machado & Rodrigues 2004) and analyzed using a transmission electron microscope Philips (FEI Tecnai) at 60kV.

The thickness of the walls and the lumen area of the sieve tube members were measured in cross plane of the phloem from petioles and pulvini from six plants (n = 6) using Image J 1.53a software, version 64. We measured all the sieve members in each figure obtained from TEM. The mean of the values was calculated for each image. The standard deviation was obtained using Microsoft Excel. In *M. caesalpinifolia* we measured the sieve members in the outer phloem, since this species possesses vascular bundles with outer and inner phloem.

Results

The phloem of both the petioles and primary pulvini was comprised by sieve tube members, companion cells and parenchyma cells in *M. caesalpinifolia* (Fig. 1A-G) and in *M. pudica* (Fig. 2A-F). Larger laticifers cells occurred in the phloem of pulvini (Fig. 1A) and petioles (Fig. 1B) of *M. caesalpinifolia*.

In the primary pulvini of both the studied species, the sieve tube members were characterized by thick pectin-cellulosic walls and sieve plate with accumulation of callose around the pores (Fig. 1C; 2B-C). The cell walls exhibited irregular internal contour, and loose and lamellar appearance (Fig.1E). In *M. pudica*, the inner contour of the sieve tube members walls was more sinuous and accompanied by the plasmalemma (Fig. 2E). The sieve tube members of the pulvini of *M. pudica* exhibited wall thickness 2.5 times higher than in pulvini of *M. caesalpinifolia* (Table 1). In addition, the area of the lumen of the sieve tube members was wider in pulvini of *M. pudica* in comparison to pulvini of *M. caesalpinifolia* (Table 1).

Sieve tube members in the petioles exhibited morphological features similar to those in the pulvini in both the studied species. However, the thickness of their walls was smaller in petioles in comparison to the pulvini, specially in *M. pudica* (Table 1). The petioles in *M. caesalpinifolia* had sieve tube members with larger internal area in comparison to the pulvini (Table 1). However, the pulvini of *M. pudica* exhibited sieve tube members with very larger area than the petioles of this species (Table 1).

Proteinaceous material dispersed in the form of short filaments occurred in the protoplast of the sieve tube members of the pulvini and petioles of *M. caesalpinifolia*

(Fig. 1C-F). Small lumps of electron-dense material were also observed in these cells. In the pulvini and petioles of this species, P-plastids circular to oval in shape were observed in the sieve tube members and contained fibrillar and cuneiform (Fig. 1D, E) protein inclusions. In the pulvini of *M. pudica*, several sieve tube members presented the lumen completely filled with material with a relatively homogeneous appearance interspersed with dispersed filamentous material and inclusions in the form of electron-dense clumps (Fig. 2C). Other sieve tube members contained tubular proteins interspersed with filamentous protein material dispersed and in the form of clusters in the pulvini (Fig. 2D). Large circular plastids containing cuneiform protein inclusions (Fig. 2D) and plastids with bulky starch grains and protein inclusions (Fig. 2E) were observed in pulvini of *M. pudica*. Filamentous protein material dispersed or in form of lumps (Fig. 2F) were observed in the sieve tube members of *M. pudica* petioles; however, the sieve tube members of petioles exhibited smaller abundance of inclusions in comparison to the pulvini in this species. The plastids in sieve tube members of *M. pudica* petioles exhibited similar features to those from the pulvini. They were large and contained starch grains and cuneiform protein bodies (Fig. 2F).

Discussion

Morphometrical differences concerning the sieve tube members were here registered between pulvini and petioles and between *Mimosa* species with different types of leaf movement. In general, sieve tube members of pulvini exhibited thicker walls than these cells in petioles. In addition, the pulvini of *M. pudica*, a legume species with fast seismonastic leaf movement, presented sieve members with thicker walls than the pulvini of *M. caesalpinifolia*, a species with slow nyctinastic leaf movement. Although the involvement of the sieve tube walls is poorly exploited for most of the theories of translocation in phloem (Spanner & Jones 1970), it has been suggested that thicker walls with loosed arrangement of cellulose microfibrils could facilitate radial transport of ions during the leaf movement (Rodrigues & Machado 2008). In pulvini of *M. pudica*, the inner portion of the thick walls of the sieve members present irregular contour that is accompanied by the plasmalemma. This irregular contour of the cell wall could greatly increase the surface area of the plasmalemma representing an important site of active transport of potassium (Spanner & Jones 1970), which ions are essential to turgor changes

of motor cells and consequently to the pulvini working. The wider lumen of sieve tube members in *M. pudica* pulvini also can suggest a more efficient transport of substances and stimuli and the involvement of these cells in the pulvini functioning culminating in the fast leaf movements.

Our data also showed that the sieve tube elements of the pulvini and petioles of *M. caesalpinifolia* and *M. pudica* contain protein material of different aspects, such as filamentous proteins, tubular proteins and electron-dense clumps. In addition, P-plastids with cuneiform and fibrillar protein inclusions were also observed. The relationship between structure and function of P-protein in sieve tube elements has been investigated in order to understand its role in phloem biology (Anstead et al. 2012). The occurrence of P-protein with diverse morphology is a common aspect of legume phloem and has been described in different organs of different species (Wergin et al. 1975; Machado & Rodrigues 2004). According to the literature, the P-protein can undergo changes in its configuration during the maturation of phloem cells (Cronshaw & Esau 1967; 1968; Esau 1971; Palevitz & Newcomb 1971; Wergin et al. 1975), and fibrillar proteins are considered the precursors of crystalline protein formats present in differentiated cells (Wergin et al. 1975). However, in the present study, only mature portions of pulvini and petioles were analyzed, showing that several P-protein morphotypes can occur simultaneously in fully differentiated phloem cells and suggesting their possible involvement in the functioning of mature organs.

In the present study, the abundance of P-protein appeared to be higher in pulvini than in petioles, and in the pulvinus of *M. pudica* the accumulation of P-protein seemed to be even greater than in the pulvinus of *M. caesalpinifolia*. Material with a relatively homogeneous appearance interspersed with dispersed filamentous material and in the form of electron-dense clumps completely filled the lumen of the sieve tube elements in pulvini of *M. pudica*. Some studies indicate that P-protein bodies dispersed or accumulated at the end of the sieve tube elements or present in the vicinity of the sieve plate can help seal the pores of the sieve plate in cases of injuries, acting together with the callose (Eschirich 1975) for reducing the loss of assimilates (Ehlers et al. 2000). On the other hand, other researches have suggested the translocation of P-proteins in the phloem (Golecki et al. 1999) and their interaction with the endomembrane system (Smith et al. 1987), which can be important in stimulus transmission during the pulvinus functioning.

Protein inclusions in legume phloem cells may undergo changes from the globular shape to the dispersed state, in which they may obstruct the pores of the sieve plates (Knoblauch et al. 2001). P-protein dispersion in sieve members can be induced by increased Ca^{2+} concentration increasing plasmalemma permeability or by abrupt turgor changes (Knoblauch et al. 2001). Considering that both changes in intracellular calcium levels (Yao et al. 2008) and changes in turgor (Toriyama 1953; 1955; Satter & Galston 1981; Fleurat-Lessard & Millet 1984; Moysset & Simón 1991) are phenomena that occur during the functioning of the pulvini, it is to be expected that there are changes in the shape of the protein inclusions in the sieve tube elements during leaf opening and closing. Esau (1971) have demonstrated changes in P-protein configurations during the development of phloem in pulvini of *Mimosa pudica*, however nothing is known about structural changes of P-protein during the leaf movement. So, further studies considering pulvinus from closed and open leaves may confirm this hypothesis.

In the petioles, P-protein was apparently more abundant in *M. pudica* than in *M. caesalpiniiifolia*, which can be related to the different types of leaf movement presented by these species. In *M. pudica*, the stimulus generated by touching the leaflets must reach the pulvinus and produce a response in fractions of seconds, with the petiole involved in the transmission of signals (Kameyama et al. 2000; Volkov 2010). The stimulus generated by touching the leaflets generates an action potential that must travel basically through the phloem and reach the pulvinus, leading to the unloading of sucrose into the apoplast, which will generate turgor changes in the cortical cells and the closure of the leaflets (Fromm 1991). Thus, we suggest that P-protein in petioles may have an influence on the transmission of these signals and on phloem loading. Whether in leaves that do not exhibit movement the features of the sieve-tube elements are similar to legume petioles in terms of protein accumulation remains unknown.

In the pulvini and petioles of *M. caesalpiniiifolia*, plastids containing exclusively protein inclusions were observed, while in the pulvini and petioles of *M. pudica* occurred plastids containing protein and starch grains. Plastids in the sieve tube elements can be of the S-type, when they accumulate starch or when they are devoid of any inclusions. The plastids of the phloem cells are P-type when they carry crystalline and/or filamentous proteins; some P-plastids, in addition to proteins, may also have grains of starch (Behnke 1991). Differences in the plastids of the sieve-tube elements are important taxonomically (Behnke 2003). The function of P-plastids is not fully understood (van Bel 2003), however, it is thought that they may act in phloem defense against injury. External stimuli

can lead to rupture of the P-plastids with the consequent release of proteins that would be involved in the sealing of the sieve plate pores (Knoblauch & van Bel 1998, Wise 2007). In addition, S-plastids and P-plastids could act in the reserve of proteins and starch (Wise 2007), with the presence of starch being an important source of energy for immediate mobilization in the case of pulvinus with rapid leaf movements (From & Eschrich 1988).

In summary, our results showed differential aspects of the sieve tube members between pulvini and petiole and between species with different types of leaf movements, suggesting the involvement of the thicker cell walls and the higher abundance of P-protein in the pulvinus functioning, specially in leaves with seismonastic fast movement.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq for the PhD scholarship (140743/2019-7) and staff of the Centro de Microscopia Eletrônica, IBB, UNESP, for helping in the sample preparation.

References

- ANSTEAD, J.A., FROELICH D.R., KNOBLAUCH M., THOMPSON G.A. 2012. Arabidopsis P-Protein filament formation requires both AtSEOR1 and AtSEOR2. *Plant and Cell Physiology* 53: 1033–1042.
- BEHNKE, D. 1991. Distribution and evolution of forms and types of sieve-element plastids in the Dicotyledons. *A Journal of Systematic and Floristic Botany* 13: 6.
- BEHNKE H.D. 2003. Sieve-element plastids and evolution of mono- cotyledons, with emphasis on melanthiaceae sensu lato and aristolochiaceae-asaroideae, a putative dicotyledon sister group. *Botanical Review* 68: 524–544.
- CAMPBELL, N.A. & GARBER, R.C. 1980. Vacuolar reorganization in motor cells of *Albizia* during leaf movement. *Planta* 148: 251-255.
- 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.
- CRONSHAW, J. & ESAU, K. 1967. Tubular and fibrillar components of mature and differentiating sieve elements. *The journal of cell biology* 34: 801–815.

- EHLERS, K., KNOBLAUCH, M. & VAN BEL, A. J. E. 2000. Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma* 214: 80-92.
- 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.
- ESCHIRICH, W. 1975. Sealing systems in phloem. *In* Transport in plants. I. Phloem transport. *Encyclopedia of plant physiology*, NS, vol 1. (M.H. Zimmermann & J.A. Milburn, eds) Springer, New York, pp 39-56.
- 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.
- FROMM, J. 1991. Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa*. *Physiologia Plantarum* 83: 529-533.
- FROMM, J. & ESCHIRICH, W. 1988. Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica* L. *Environmental Science Biology* 2: 7-17.
- GOLECKI, B., SCHULZ, A., & THOMPSON, G. A. 1999. Translocation of structural P-proteins in the phloem. *Plant Cell* 11: 127-140.
- GRIGNON, N., TOURAINE, B. & GRIGNON, C. 1992. Internal phloem in the pulvinus of soybean plants. *American Journal of Botany* 50: 83-92.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.
- KANZAWA, N., HOSHINO, Y., CHIBA, M., HOSHINO, D., KOBAYASHI, H., KAMASAWA, N.; et al. 2006. Change in the actin cytoskeleton during seismonastic movement of *Mimosa pudica*. *Plant and Cell Physiology* 47: 531-539.
- KAMEYAMA, K., KISHI, Y., YOSHIMURA, M., KANZAWA, N., SAMEISHIMA, M. & TSUCHIYA, T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37.

- KNOBLAUCH, M., PETERS, W.S., EHLERS, K. & VAN BEL, A.J.E. 2001. Reversible Calcium-Regulated Stopcocks in Legume Sieve Tubes. *Plant Cell* 13: 1221–1230.
- KNOBLAUCH, M. & VAN BEL, A.J.E. 1998. Sieve tubes in action. *Plant Cell* 10: 35–50.
- 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: 135-147.
- 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.
- MOYSSET, L. & SIMÓN, E. 1991. Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): structural and ultrastructural features. *American Journal of Botany* 78:1467-1486.
- PALEVITS, B.A. & NEWCOMB, E. 1971. The ultrastructure and development of tubular and crystalline P-protein in the sieve elements of certain papilionaceous legumes. *Protoplasma* 72: 399-426.
- PFEFFER, W. 1907. *The physiology of plants*. Clarendon Press, Oxford, 658 p.
- ROBLIN, G. 1976. Experimental analysis of seismonastic movement in the sensitive plant. *Nature* 261:437-438
- RODRIGUES, T.M. & MACHADO, S.R. 2004. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Acta Botanica Brasilica* 18: 381-390.
- RODRIGUES, T.M. & MACHADO, S.R. 2007. Pulvinus functional relation to leaf movements: a light and transmission electron microscopy study of the vascular system. *Micron* 39: 7-16.
- 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.
- SONG, K.; Y.E.O.M, E. & LEE, S.J. 2014. Real-time imaging of pulvinos bending in *Mimosa pudica*. *Scientific Reports* 4: 6466.

- SMITH, L.M, SABNIS, D.D. & JOHNSON, R.P.C. 1987. Immunocytochemical localisation of phloem lectin from *Cucurbita maxima* using peroxidase and colloidal-gold labels. *Planta* 170: 461-470.
- SPANNER, D.C. & JONES R.L. 1970. The sieve tube wall and its relation to translocation. *Plant (Berl.)* 92: 64-72.
- TORIYAMA, H. 1953. Observational and experimental studies of sensitive plants. I. The structure of parenchymatous cells of pulvinus. *Cytology* 18: 283-292.
- 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.
- VAN BEL, A.J.E. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* 26: 125-149.
- WEINTRAUB, M. 1952. Leaf Movements in *Mimosa pudica* L. *The New Phytologist* 50: 357-382.
- WERGIN, W.P, PALEVITZ, B.A. & NEWCOMB, E.H. 1975. Structure and development of P-protein in phloem parenchyma and companion cells of legumes. *Tissue and Cell* 7: 227-242.
- WISE, R.R. 2007. The diversity of plastid form and function. In: *The structure and function of plastids. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 3 (Wise, R.R., Hooper, J.K. eds). Springer, Dordrecht. 22p.
- 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: 243-249.
- YAO, H., XU, Q. & YUAN, M. 2008. Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. *Plant Signaling & Behavior* 3: 954-960.

Table 1. Morphometrical data on the sieve tube members in phloem of primary pulvini and petioles of *Mimosa* species with different types of leaf movement.

Morphometrical data	<i>Mimosa caesapiniifolia</i>		<i>Mimosa pudica</i>	
	Primary pulvini	Petioles	Primary pulvini	Petioles
Thickness of sieve member walls (μm)	0.77 ± 0.14	0.53 ± 0.16	1.95 ± 0.09	0.75 ± 0.21
Lumen area of the sieve members (μm^2)	37.2 ± 4.53	72.83 ± 19.96	60.04 ± 27.40	39.81 ± 3.97

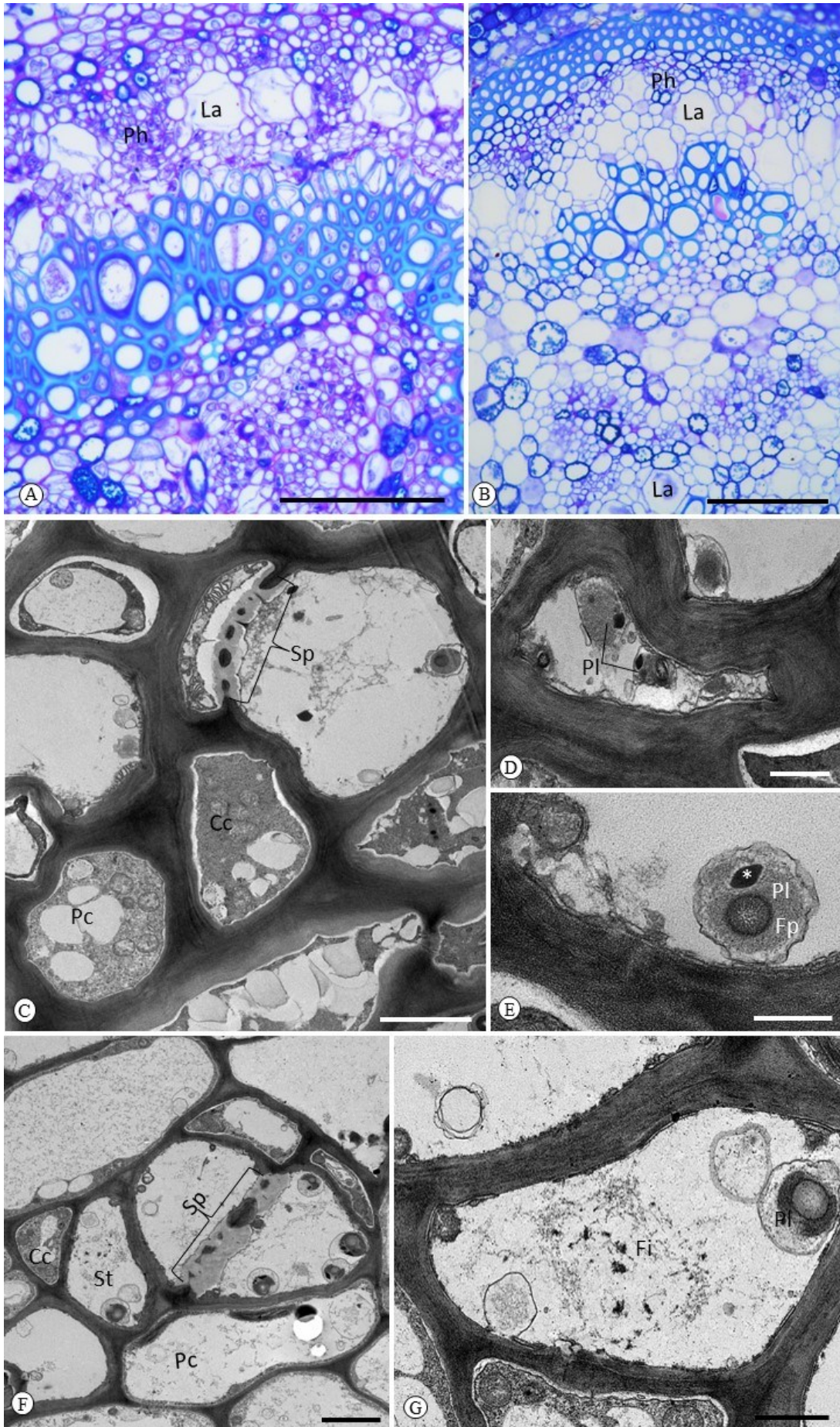


Fig. 1A-G. Micrographs (A-B) and electron micrographs (C-E) of primary pulvinus (A, C-E) and petiole (B, F, G) of *Mimosa caesalpinifolia*. A, B. General view of the vascular system showing phloem (Ph). La: laticifers. (C) General view showing sieve tube members with sieve plates (Sp) with callose. Cc: companion cell. D. Thick-walled sieve-tube member with lamellar appearance and P-plastids with wedge-shaped protein inclusions. E. Detail showing P-plastid (Pl) with fibrillar (Fp) and cuneiform protein inclusions (*). F. General view showing sieve tube members (St), companion cells (Cc) and common parenchyma cells (Pc). G. Detail of sieve members with sparse filamentous proteinaceous material (Fi) and plastids (Pl) containing starch grains. Scale Bars: A- B= 100 μm , C, E=5 μm , D, F= 2 μm .

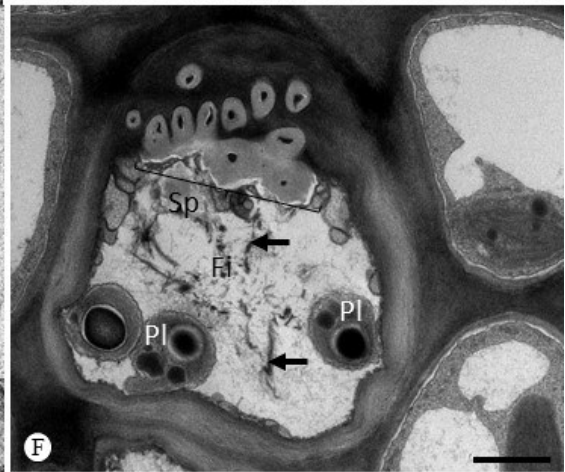
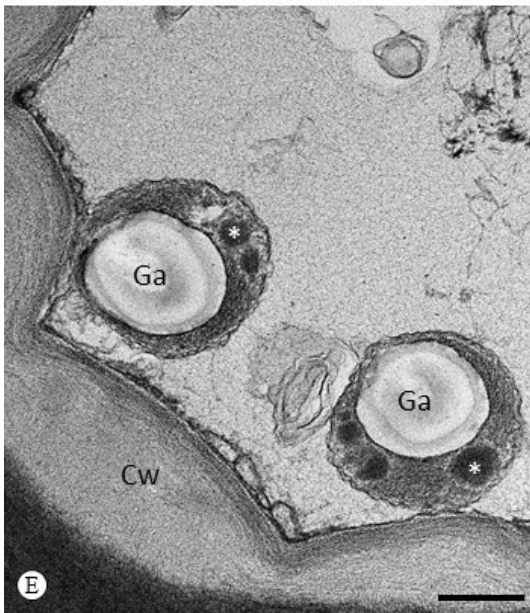
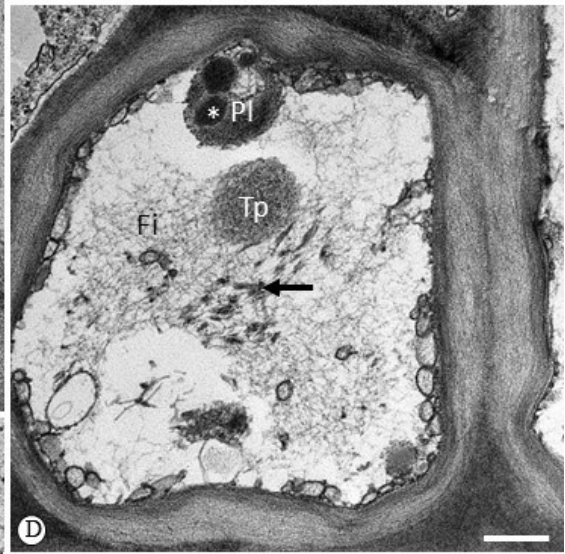
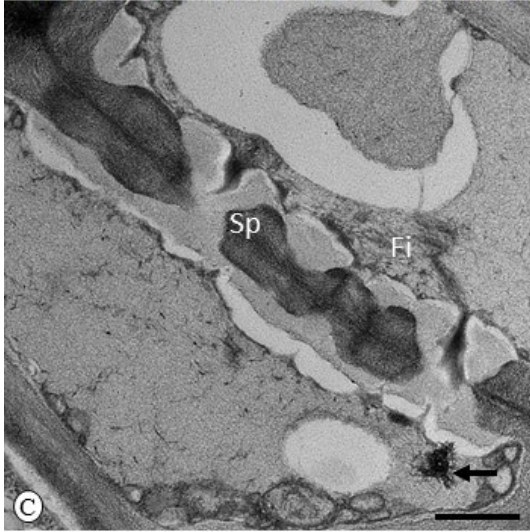
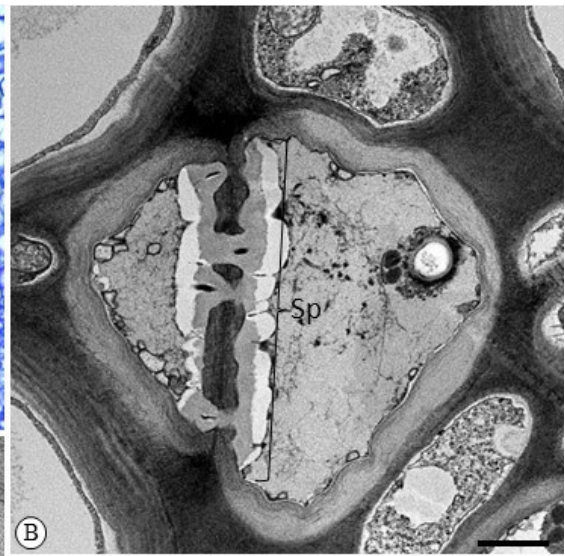
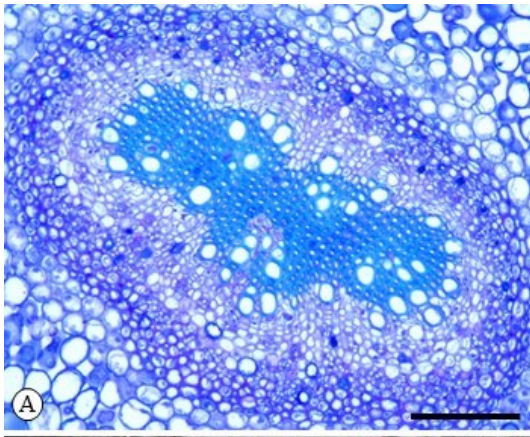


Fig. 2A-F. Micrography (A) and Electron micrographs of primary pulvinus phloem (B-E) and petiole (F) of *Mimosa pudica*. A. Cross-section showing the general appearance of the vascular cylinder. B. General appearance showing parenchyma cells and sieve tube member with thick walls with irregular outline and lumen filled with relatively homogeneous content. Sp: sieve plate. C. Detail showing a portion of a sieve tube member with a lumen filled with material of a relatively homogeneous appearance interspersed with filamentary material (Fi) dispersed and in the form of electron-dense clumps (arrows). D. Sieve tube member containing tubular (Tp), filamentous (Fi) proteins and electron-dense clumps (arrows). Note plastid (Pl) with cuneiform protein inclusions (*). E. Detail showing plastids with starch grains (Ga) and wedge-shaped protein inclusions (*) inside a sieve tube member. Cw: cell wall. F. General view showing sieve tube member with filamentous proteinaceous material (Fi) and electron-dense clumps (arrows) and plastids (Pl) in the protoplast. Scale bars: A= 100 μm , B= 2 μm , C-E= 1 μm , F= 2 μm .

Considerações finais

Este trabalho aborda aspectos anatômicos e ultraestruturais de pulvinos e pecíolos numa abordagem comparativa entre *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., espécie com movimentos foliares nictinásticos lentos, e *Mimosa pudica* L., espécie com movimentos foliares seismonásticos rápidos.

Os pulvinos de *M. caesalpiniiifolia* apresentam características comumente encontradas em outras espécies de leguminosas, incluindo espécies de *Mimosa* com movimentos foliares rápidos. A novidade verificada nesse trabalho foi a presença de cristais de oxalato de cálcio na endoderme dos pulvinos de *Mimosa*, reforçando a ideia de que o conteúdo da endoderme dos pulvinos está relacionado ao tipo de movimento foliar. Assim, nossos dados preenchem uma lacuna na literatura no que diz respeito aos aspectos estruturais de pulvinos de espécies de *Mimosa* com movimentos foliares lentos.

Ultraestruturalmente, analisamos de forma comparativa o floema de pulvinos e pecíolos de ambas as espécies, focando na abundância e diversidade estrutural de proteína-P. De forma geral, maior abundância de proteína-P foi observada nos pulvinos, especialmente em *M. pudica*, sugerindo seu envolvimento na movimentação foliar, em especial em folhas com movimento rápido. A análise detalhada das inclusões proteicas dos elementos de tubo crivado e das características de suas paredes de forma comparativa entre pulvinos e pecíolos e entre espécies com diferentes tipos de movimentos foliares mas pertencentes ao mesmo gênero é inédita e complementa estudos que sugerem a importância do floema na movimentação foliar.

Nossa investigação sobre a influência da disponibilidade de cálcio na formação de cristais na endoderme de pulvinos e pecíolos e na movimentação foliar mostrou respostas diferentes entre pulvinos de ambas as espécies, comprovando de forma experimental a ideia de que cristais de cálcio não se formam em pulvinos de folhas com movimentos rápidos.

Folhas de *M. caesalpiniiifolia* apresentaram movimentos nictinásticos em diferentes concentrações de cálcio, enquanto que as folhas de *M. pudica* perderam sua capacidade de movimentação foliar em resposta a estímulos mecânicos na ausência de Ca^{2+} . Tais resultados sugerem maior envolvimento do cálcio nos mecanismos de funcionamento e reações celulares em pulvinos de folhas com movimentos seismonásticos rápidos em comparação com pulvinos de folhas com movimentos foliares nictinásticos. Assim, nossos dados fornecem subsídios para o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos e eletro-químicos envolvidos na movimentação foliar.