

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maria Carolina Scatolin do Rio

**Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey.
(Apocynaceae) de cerrado**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de
Doutor em Biologia Vegetal

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília de Moraes Castro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Luiza Sumiko Kinoshita

Campinas

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

R476e

Rio, Maria Carolina Scatolin do
Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.
Mey. (Apocynaceae) de cerrado / Maria Carolina Scatolin
do Rio. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Marília de Moraes Castro.
Co-orientadora: Luiza Sumiko Kinoshita.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Apocynaceae. 2. *Forsteronia*. 3. Folhas -
Anatomia. 4. Ginostégio. 5. Histoquímica. I. Castro,
Marília de Moraes. II. Kinoshita, Luiza Sumiko. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Anatomical studies of *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) species of cerrado.

Palavras-chave em inglês: Apocynaceae; *Forsteronia*; Leaves - Anatomy; Gynostegium; Histochemistry.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marília de Moraes Castro, Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, Simone de Pádua Teixeira, Washington Marcondes-Ferreira, Sandra Maria Carmello-Guerreiro.

Data da defesa: 15/05/2006.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Marília de Moraes Castro (orientadora)

Professor Associado (MS 5)

Departamento de Botânica - IB - UNICAMP



Drª Solange Cristina Mazzoni-Viveiros

Pesquisador Científico (PqC VI)

Instituto de Botânica de São Paulo



Profª Drª Simone de Pádua Teixeira

Professor Doutor (MS 3)

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Dr. Washington Marcondes-Ferreira

Curador do Herbário UEC

Departamento de Botânica - IB - UNICAMP



Profª Drª Sandra Maria Carmello-Guerreiro

Professor Doutor (MS 3)

Departamento de Botânica - IB - UNICAMP



Drª Ingrid Koch

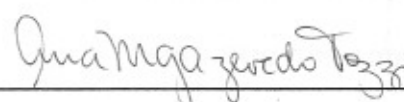
Pós-doutoranda

Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA

Profª Drª Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi

Professor Associado (MS 5)

Departamento de Botânica - IB - UNICAMP



Drª Roseli Buzanelli Torres

Pesquisador Científico (PqC IV)

Instituto Agronômico de Campinas - IAC

2006 A2.194

**À minha mãe, Neide,
pelo exemplo de força e coragem
com que enfrenta o seu dia a dia.
Às minhas avózinhas, Maria e Luiza,
pelo amor e empenho com que cuidaram
de todos os seus descendentes.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Marília de Moraes Castro, pelo ensino impecável das técnicas e da teoria necessárias para estudos de Anatomia Vegetal; pela paciência e compreensão nos momentos difíceis em todos esses anos e, principalmente, pela amizade e interesse no meu crescimento pessoal e profissional, demonstrados sempre que necessário.

À minha co-orientadora, Luiza Sumiko Kinoshita, pelo apoio, confiança, incentivo e amizade durante todo o meu desenvolvimento no meio acadêmico.

Aos membros da pré-banca e banca, Solange C. Mazzoni-Viveiros, Simone de Pádua Teixeira, Washington Marcondes-Ferreira e Sandra Maria Carmello-Guerreiro, pela avaliação criteriosa da tese, pelas sugestões e comentários que melhoraram consideravelmente a versão final e pela atenção, tempo e cuidado que empregaram durante o processo todo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida (proc. nº 01/05341-3), pelo auxílio ao Projeto Temático onde foi inserida esta pesquisa (Biota/FAPESP proc. nº 00/1249-3) e pelo auxílio à vinda de pesquisador estrangeiro (FAPESP proc. nº 02/13532-6), que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

À Dra. Lia Ascensão, da FCUL (Portugal), pelo ensino das técnicas de histoquímica e colaboração com o terceiro capítulo desta tese.

Aos demais professores do Departamento de Botânica, especialmente à Marlies Sazima, Ana Tozzi e todos que influenciaram na minha formação, pela boa convivência, pelas aulas, críticas e sugestões valiosas durante os últimos sete anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e ao Departamento de Botânica, por terem proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Sebastião Henrique Militão (Tião), técnico do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela colaboração e disposição em atender a todos os meus pedidos, muitos feitos em cima da hora.

Ao Fabiano Machado Martins, por ter me levado pacientemente para o campo durante todo o doutorado, por ter ouvido minhas histórias malucas durante as viagens, pela amizade e bom humor na convivência dentro do laboratório.

Ao André Olmos Simões, pela companhia em algumas viagens para o campo, pela paciência e auxílio no reconhecimento das espécies em seu habitat natural, pelas identificações das exsiccatas e pelo apoio e incentivo ao meu trabalho desde o início.

Ao Mário Almeida-Neto, Rafael Luís Galdini Raimundo e Umberto Kubota, do Laboratório de Interações Inseto-Planta (LIIP), pela “apresentação” da Fazenda Campininha no início deste trabalho, por me levarem junto em várias viagens, proporcionando a oportunidade para as primeiras coletas de material quando eu ainda não tinha financiamento para ir sozinha e por terem “podado aquele cipózinho que cresce sobre tudo”, fazendo com que os indivíduos de *Forsteronia* crescessem vigorosos nas trilhas durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Diego Demarco, Ana Paula Stechhann Lacchia e Gláucia Morelli Alves, pelas viagens divertidas ao campo, pelas comidinhas e bolachinhas, por serem ótimas companhias e conselheiros muito sensatos, por auxiliarem sempre com informações relevantes e por terem compartilhado momentos muito agradáveis durante esses anos todos.

Aos demais colegas de laboratório, especialmente à Sandra Obando, Raquel Antunes, Shesterson Aguiar, Isabel Cristina, Priscila Cortez, Tania Watanabe, Rosina Marasca, pelos momentos de descontração durante o trabalho no laboratório e pelas conversas divertidas.

Aos colegas do Departamento de Botânica, em especial à Samantha Koehler pela ajuda com uma referência impossível de se encontrar por aqui, e ao Leonardo Meirelles, por ser querido e sempre agradável comigo. À Catia Urbanetz, por me ensinar o quanto é importante, na vida, termos uma postura coerente com nosso discurso.

Aos amigos do Laboratório de Biossistemática, Itayguara Ribeiro da Costa, Christiano Franco Verola e Mariana Esteves Mansanares, pelas risadas no banquinho da botânica e pelo

papel essencial desempenhado nas viagens das disciplinas. Obrigada pela paciência, atenção, leveza e descontração que me fizeram aprender a gostar de ir ao campo.

Aos amigos Arnaldo da Silva Jr. (Pim) e Simone Segatelli (Mags), pela ajuda com a coleta das flores na última semana da floração de 2004 e pelo crescimento que me proporcionaram ensinando-me a afirmar o meu valor pessoal.

À minha querida mãe, Neide Scatolin do Rio, ao meu irmão Diogo e às minhas avós Maria e Luiza, pela compreensão em relação às minhas ausências nos finais de semana, por terem apoiado minhas escolhas profissionais e por me amarem como eu sou. Obrigada pela educação que me deram, pelo incentivo à leitura e ao pensamento crítico e pelo estímulo muito importante para que eu me tornasse quem eu realmente sou hoje. Eu amo vocês.

Ao meu querido “Pai” Babatonican Mário de Ogum, pelo apoio espiritual, pelos bons conselhos e boas broncas, pela amizade e pelos momentos de descontração quando eles mais foram necessários. Aos meus irmãos, especialmente Gabriel de Yansã e Virna de Oxalá, pelo carinho com que me tratam, e, é claro, à Vânia e ao Marcelo, pelo apoio em geral.

Finalmente, aos meus amigos mais queridos (quase em ordem alfabética!!!): Alexandre Costa (Minino), pela amizade distante porém constante; Ana Deckmann, pela companhia diária, pelo carinho e atenção durante tantas “elocubrações psico-sentimentais”; Carla Vizeu e Rodrigo Drummond (Boial), por ela cantar maravilhosamente, por cuidar de mim e me incentivar a ser uma pessoa melhor, e por ele ser tão gentil e atencioso comigo; Christiano Verola, pelas comidas deliciosas, conversas ótimas e pelo apoio em momentos essenciais; Gabriel Mazotti, por me agüentar quando fico mais chata, pelos palpites indispensáveis e teimosias divertidas; Itayguara Costa, pelo ótimo exemplo de responsabilidade e bondade; e Marina Bonsch, minha “assessora para assuntos locomotivos”, por toda a ajuda, diversão e aprendizado que me proporcionou nesses anos.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVOS	13
Objetivos específicos	13
1. CAPÍTULO 1	15
Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de <i>Forsteronia</i> G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas	17
Abstract	17
Resumo	17
Introdução	17
Material e métodos	18
Resultados	19
Discussão	21
Referências bibliográficas	37
2. CAPÍTULO 2	39
Coléteres foliares em espécies de <i>Forsteronia</i> G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado	39
Abstract	41
Resumo	42
Introdução	43
Material e métodos	45
Resultados	48
Discussão	51
Referências bibliográficas	55
3. CAPÍTULO 3	79
Histoquímica da hipoderme e de laticíferos de ápice caulinar vegetativo de <i>Forsteronia glabrescens</i> Müll.Arg. (Apocynaceae)	79

Introdução	79
Material e métodos	81
Resultados	83
Discussão	86
Referências bibliográficas	88
4. CAPÍTULO 4	101
Caracterização anatômica das glândulas florais de quatro espécies de <i>Forsteronia</i> G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado	101
Introdução	101
Material e métodos	103
Resultados	105
Discussão	112
Referências bibliográficas	115
5. CAPÍTULO 5	159
Ginostégio em espécies de <i>Forsteronia</i> G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado	159
Introdução	159
Material e métodos	160
Resultados	162
Discussão	163
Referências bibliográficas	164
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	187
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196

ÍNDICE DE TABELAS

1. CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Relação dos espécimes de <i>Forsteronia</i>	18
Tabela 2. Tipo de coléteres nas espécies de <i>Forsteronia</i>	35
Tabela 3. Caracteres diagnósticos levantados para <i>F. australis</i> , <i>F. glabrescens</i> , <i>F. pubescens</i> e <i>F. thyrsoides</i>	36

2. CAPÍTULO 2

Tabela 1. Lista das espécies estudadas de <i>Forsteronia</i> , material testemunha e fixadores	46
Tabela 2. Posição no primórdio foliar, número por nó vegetativo e tipos estruturais dos coléteres foliares nas espécies de <i>Forsteronia</i>	49
Tabela 3. Tratamentos aplicados aos coléteres foliares de <i>Forsteronia glabrescens</i>	52

3. CAPÍTULO 3

Tabela 1. Tratamentos aplicados às secções de material fresco e fixado de caule jovem de <i>Forsteronia glabrescens</i> Müll.Arg.	85
--	-----------

4. CAPÍTULO 4

Tabela 1. Espécies estudadas. Relação do material testemunha: local de coleta, coletores, data e fixadores utilizados	105
Tabela 2. Distribuição dos idioblastos secretores e aspecto de seu conteúdo no parênquima de peças florais de espécies de <i>Forsteronia</i>	107
Tabela 3. Distribuição da hipoderme secretora e aspecto do conteúdo de suas células nas peças florais de espécies de <i>Forsteronia</i>	108
Tabela 4. Distribuição dos laticíferos nas peças florais das espécies de <i>Forsteronia</i>	109
Tabela 5. Posição, número e tipo dos coléteres florais observados em <i>Forsteronia</i>	111

5. CAPÍTULO 5

Tabela 1. Dados referentes ao material testemunha das espécies de <i>Forsteronia</i> : local de coleta, data, coletores e herbário	161
---	------------

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tabela 1. Utilidades e atividades funcionais atribuídas à presença de compostos fenólicos em espécies de Apocynaceae	194
---	------------

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Observação: Todas as pranchas apresentadas são constituídas por fotomicrografias, exceto as figuras 1-6 da Introdução, que são fotografias das plantas no campo, e as figuras 1-4 do Capítulo 1, que são esquemas de pecíolos em secção transversal.

INTRODUÇÃO

Figuras 1-6. Fotografias de espécies de *Forsteronia* G.Mey. em ambiente natural 11

1. CAPÍTULO 1

Figuras 1-4. Esquemas de secções transversais da região proximal de pecíolos. 1. *F. australis*; 2. *F. glabrescens*; 3. *F. pubescens*; 4. *F. thyrsoides* 17

Figuras 5-12. Secções transversais de pecíolos de folhas adultas de *F. australis* e *F. glabrescens* 23

Figuras 13-17. Secções transversais de pecíolos de folhas adultas de *F. pubescens* e *F. thyrsoides* 25

Figuras 18-23. Secções transversais e longitudinais de folha adulta e primórdio foliar de *F. australis* 27

Figuras 24-29. Secções transversais e longitudinais de folha adulta e primórdio foliar de *F. glabrescens* 29

Figuras 30-36. Secções transversais e longitudinais de folha adulta e primórdio foliar de *F. pubescens* 31

Figuras 37-41. Secções transversais e longitudinais de folha adulta e primórdio foliar de *F. thyrsoides* 33

2. CAPÍTULO 2

Figuras 1-6. Secções longitudinais de ápice caulinar vegetativo de *F. australis* e *F. glabrescens* 61

Figuras 7-14. Secções transversais do terceiro nó vegetativo de *F. pubescens* 63

Figuras 15-22. Secções transversais de ápice caulinar vegetativo de *F. thyrsoides* 65

Figuras 23-28. Secções transversais e longitudinais do terceiro nó vegetativo de *F. australis* e *F. glabrescens*, com coléteres foliares, coradas com vermelho de rutênio ou negro de Sudão B 67

Figuras 29-35. Secções transversais de terceiro nó vegetativo de *F. pubescens* e *F. thyrsoides*, com coléteres axilares, coradas com vermelho de rutênio 69

Figuras 36-39. Secções transversais de terceiro nó vegetativo de *F. glabrescens*, com coléteres marginais e axilares, coradas com ácido tânico e cloreto de ferro 71

Figuras 40-42. Secções longitudinais de ápice caulinar vegetativo de *F. glabrescens* submetidas à reação PAS 73

Figuras 43-47. Secções longitudinal e transversais de ápice caulinar vegetativo de *F. glabrescens* submetidas à reação PAS 75

Figuras 48-54. Secções transversais de ápice caulinar vegetativo de *F. glabrescens* fixado em SFF 77

3. CAPÍTULO 3

Figuras 1-9. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com hipoderme secretora 93

Figuras 10-15. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com laticíferos e hipoderme 95

Figuras 16-21. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com laticíferos e hipoderme 97

Figuras 22-25. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com laticíferos, idioblastos e hipoderme 99

4. CAPÍTULO 4

Figuras 1-4. Secções transversais de botões florais, mostrando o ápice da cabeça do estilete de *F. australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens*, e *F. velloziana* 119

Figuras 5-9. Secções transversais e longitudinais da região inferior do botão floral de *F. australis* 121

Figuras 10-14. Secções transversais de botão floral de *F. australis* com coléteres calicinais 123

Figuras 15-18. Secções transversais e longitudinais de botão floral e flor em antese de *F. glabrescens* 125

Figuras 20-25. Secções transversais de botão floral de *F. glabrescens* com coléteres calicinais 127

Figuras 26-30. Secções transversais e longitudinais de flores em antese de *F. glabrescens* com coléteres calicinais 129

Figuras 31-35. Secções transversais da região inferior de botão floral de *F. glabrescens* 131

Figuras 36-39. Secções transversais e longitudinais de flor em antese de *F. glabrescens* 133

Figuras 40-46. Secções longitudinais e transversais de flores em antese de *F. glabrescens* fixadas em FNT e SFF 135

Figuras 47-51. Secções longitudinais e transversais de flor em antese de *F. glabrescens* coradas pelo negro de Sudão B 137

Figuras 52-56. Secções longitudinais e transversais de flor em antese de *F. glabrescens* coradas com acetato de cobre/ácido rubeânico 139

Figuras 57-61. Secções longitudinais e transversais de flor em antese de *F. glabrescens* coradas pelo cloreto de ferro III 141

Figuras 62-66. Secções longitudinais e transversais de flor em antese de <i>F. glabrescens</i> coradas pelo dicromato de potássio	143
Figuras 67-70. Secções longitudinais e transversais de botão floral de <i>F. pubescens</i>	145
Figuras 71-75. Secções longitudinais e transversal de botão floral de <i>F. pubescens</i>	147
Figuras 76-80. Secções transversais de botão floral de <i>F. pubescens</i> com coléteres calicinais	149
Figuras 81-88. Secções transversais de flor em antese de <i>F. pubescens</i> com coléteres calicinais	151
Figuras 89-94. Secções longitudinais e transversais de botão floral de <i>F. pubescens</i>	153
Figuras 95-100. Secções transversais de flor em antese e botão floral de <i>F. pubescens</i>	155
Figuras 101-102. Secções transversais de botão floral de <i>F. velloziana</i>	157

5. CAPÍTULO 5

Figuras 1-5. Secções longitudinal e transversais de botão floral de <i>F. australis</i>	167
Figuras 6-9. Secções transversais de botão floral de <i>F. australis</i>	169
Figuras 10-12. Secções longitudinal e transversais de botão floral de <i>F. glabrescens</i>	171
Figuras 13-16. Secções transversais de botão floral de <i>F. glabrescens</i>	173
Figuras 17-20. Secções transversais de botão floral de <i>F. glabrescens</i>	175
Figuras 21-24. Secções transversais de botão floral de <i>F. glabrescens</i> ; ginostégio	177
Figuras 25-30. Secções transversais de botão floral de <i>F. glabrescens</i> submetidas à reação PAS	179
Figuras 31-36. Secções transversais de botão floral de <i>F. pubescens</i>	181
Figuras 37-42. Secções transversais de botão floral de <i>F. pubescens</i>	183
Figuras 43-48. Secções transversais de botão floral de <i>F. velloziana</i>	185

RESUMO

A anatomia foliar de quatro espécies de *Forsteronia* que ocorrem em cerrados paulistas foi investigada com o objetivo de identificar caracteres morfo-anatômicos úteis para a identificação das espécies semelhantes em estágio vegetativo. Onze caracteres foliares foram levantados, dois macromorfológicos e nove anatômicos, permitindo diferenciar *F. australis* de *F. glabrescens* e *F. pubescens* de *F. thyrsoides*. A anatomia das domácias e os coléteres sésseis e ramificados foram descritos pela primeira vez para órgãos vegetativos de Apocynaceae. A detecção de mucilagem na secreção dos coléteres foliares das quatro espécies confirma a identificação dessas estruturas. Os coléteres são marginais ou axilares, de acordo com a região em que se originam no primórdio foliar. Em ramos completamente desenvolvidos, os marginais são caducos e suas cicatrizes ocupam posição interpeciolar; os axilares são persistentes e posicionam-se sobre a nervura mediana na base da lâmina foliar. Em todos os tipos estruturais (padrão, sésil e ramificado), a secreção é produzida por uma epiderme em paliçada que reveste o eixo central parenquimático. Os coléteres marginais de *F. glabrescens* produzem inicialmente mucilagem, passando a secretar compostos fenólicos em uma segunda fase de secreção. O estudo histoquímico de ápices caulinares vegetativos de *F. glabrescens* indicou que as células da hipoderme secretora produzem uma mistura heterogênea de ácidos graxos e compostos fenólicos, enquanto o látex é uma emulsão de substâncias lipofílicas, incluindo lipídios neutros, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcalóides. Provavelmente, a hipoderme e os laticíferos atuam em conjunto, protegendo o ápice vegetativo de radiação UV e do ataque de herbívoros no cerrado. As estruturas secretoras florais encontradas em *F. australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens* e *F. vellosiana* foram: idioblastos; hipoderme e epiderme, laticíferos; apêndices apicais e epiderme da cabeça do estilete; coléteres calicinais, coléteres bracteolares (apenas em *F. pubescens*); e nectários. Em *F. glabrescens*, os idioblastos secretores, as células que constituem os apêndices da cabeça do estilete, a hipoderme de diferentes órgãos

(anteras, lacínias da corola e do cálice, e ovário) e a epiderme do nectário produzem ácidos graxos e compostos fenólicos. Três tipos estruturais de coléteres (padrão, sésil ou ramificado) ocorrem indefinidamente distribuídos pela base do cálice. Os cinco nectários podem ser livres ou unidos dois a dois na base (e o quinto livre), ou uma estrutura anelar, dividida em cinco lobos apicais. O ginostégio é formado pela união dos estames com a cabeça do estilete, que é revestida por uma epiderme secretora em paliçada. Em *F. glabrescens*, a secreção é composta por polissacarídeos. A cabeça do estilete, 5-lobada, apresenta cinco projeções laterais adnatas ao conectivo pela cimentação das paredes das células epidérmicas de ambas as estruturas. A zona de adesão é dividida em duas partes, uma envolvida com a produção e acúmulo de secreção, e outra com o processo de adnação. Essas características do ginostégio, associadas à ocorrência de coléteres calicinais sésseis em *Forsteronia*, corroboram a exclusão do gênero da tribo *Apocynae* e o seu reposicionamento em *Mesechiteae*.

ABSTRACT

The leaf anatomy of four cerrado species of *Forsteronia* was investigated in order to determine characters that could help to identify individuals collected in vegetative stage. Eleven characters, two macromorphological and nine anatomical, were surveyed and are useful to differ *F. australis* from *F. glabrescens* and *F. pubescens* from *F. thyrsoides*. Domatia and sessile and branched colleters were described for the first time in vegetative organs of species of Apocynaceae. The mucilage detection in the secretion of foliar colleters confirms the identification of these structures on the four species. The colleters are marginal or axilar, in agreement with the region of leaf primordia that they originate. In completely developed branches, the marginal colleters are deciduous and their traces are interpetiolar placed; the axilar colleters are persistent and they are placed upon the midrib, on the base of leaf blade. In all structural types (standard, sessile and branched), the secretion is produced by a secretory epidermis that surrounds the central core of parenchyma. The marginal colleters of *F. glabrescens* produce mucilage initially and become secretory of phenolic compounds on a second phase of secretion. The shoot apex histochemical analysis of *F. glabrescens* indicated that the secretory hypodermis produces a heterogeneous secretion containing fatty acids and phenolic compounds, while the latex is an emulsion of lipophilic substances including neutral lipids, fatty acids, phenolic compounds and alkaloids. Probably both the hypodermis and the laticifers protect the shoot apex from UV radiation and from herbivorous in the cerrado vegetation. The floral secretory structures found in *F. australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens* e *F. velloziana* were: idioblasts, hypodermis and epidermis, laticifers, style-head apical appendages and secretory epidermis; calycine colleters, bracteole colleters (only in *F. pubescens*); and nectaries. In *F. glabrescens*, the secretory idioblasts, the cells that constitute the style-head apical appendages, the hypodermis of several organs (anthers, corolla and calyx lobes, and ovary) and the nectary epidermis produce fatty acids and phenolic compounds. Three structural types of

colleters (standard, sessile and branched) occur indefinitely distributed on the calyx base. The five nectaries may be free each other or united two and two (the fifth free), or an annular structure divided in five apical lobes. The gynostegium is a structure formed by the union of stamens and style-head; the last is surrounded by a palisade secretory epidermis. In *F. glabrescens*, the secretion is constituted by polysaccharides. The 5-lobed style-head has the five projecting ribs adnated to the connective by the cementation of the both structures epidermal cells walls. The glue zone is divided in two functional and structural parts, one of them involved in production and storage of secretion, and other involved with the adnation process. These gynostegium characters, associated to occurrence of sessile calycine colleters, support the exclusion of the genus from the tribe *Apocynae* and their inclusion in *Mesechiteae*.

INTRODUÇÃO GERAL

Apocynaceae apresenta grande importância econômica e medicinal devido à presença de diversas classes de metabólitos secundários isolados a partir de folhas e cascas de seus representantes, como glicosídeos cardiotônicos, alcalóides e antibióticos (Rizzini & Mors 1976). A produção de alguns desses compostos do metabolismo secundário pode estar relacionada à presença de estruturas secretoras, dentre as quais vários tipos já foram mencionados para a família: tricomas, coléteres, idioblastos, cavidades, nectários, laticíferos e osmóforos (Solleder 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1983; Thomas 1991; Stranghetti & Kinoshita 1996; Galetto 1997; Torres & Galetto 1998; Sennblad *et al.* 1998).

Poucos trabalhos referentes aos caracteres anatômicos vegetativos de espécies de Apocynaceae foram realizados recentemente, destacando-se aqueles relacionados à arquitetura foliar de 29 espécies pertencentes a 19 gêneros (Mohan & Inamdar 1982), à anatomia de folhas xeromórficas em *Allamanda*, *Thevetia* e *Vinca* (Fjell 1983) e à anatomia do sistema aéreo e ultraestrutura dos laticíferos em *Mandevilla* (Appezatto-da-Glória & Estelita-Teixeira 1992, Appezatto-da-Glória & Estelita 1997).

Dentre as estruturas secretoras já relatadas para espécies de Apocynaceae, os coléteres merecem destaque especial tanto pela função que desempenham, quanto por sua comprovada importância taxonômica em diferentes níveis hierárquicos (Woodson & Moore 1938, Thomas 1991, Simões & Kinoshita 2002, Rio & Kinoshita 2005). Eles são estruturas presentes em órgãos vegetativos e/ou reprodutivos que produzem uma substância viscosa que lubrifica e protege meristemas em início de desenvolvimento (Fahn 1979), sendo encontrados em diversas famílias de dicotiledôneas (Thomas 1991). A secreção dessas glândulas pode ser constituída apenas por mucilagem (Fahn 1979, Thomas 1991) ou por uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979).

Poucos trabalhos relacionados à estrutura, distribuição, desenvolvimento e/ou histoquímica dos coléteres de espécies de Apocynaceae foram realizados, sendo citados aqueles efetuados em *Aganosma caryophyllata* G.Don. (Dave & Kuriachen 1987), *Allamanda*

cathartica L., *Alstonia scholaris* L., *Nerium oleander* L. (= *Nerium indicum* Mill.; Thomas & Dave 1989a,b,c), *Roupelia grata* Wall. (Thomas *et al.* 1989), *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, *M. pohliana* (Stadelm.) A.H.Gentry (Appezato-da-Glória & Estelita 2000) e *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio *et al.* 2002). Além desses, os trabalhos que descrevem o modo de secreção de coléteres em *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1990), a ultra-estrutura dos coléteres de *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986) e os aspectos filogenéticos de coléteres em Apocynaceae (Thomas & Dave 1991) podem ser mencionados.

O trabalho mais abrangente envolvendo a estrutura floral de espécies de Apocynaceae foi realizado por Woodson & Moore (1938), onde 39 gêneros e 59 espécies foram estudados sob o ponto de vista da vascularização e morfologia comparativa das flores. Posteriormente, destacaram-se os trabalhos de Fallen (1986), Galetto (1997), Torres & Galetto (1998) e Lin & Bernardello (1999). Nesses estudos, quatro tipos de estruturas secretoras já foram relatados: epiderme que reveste a cabeça do estilete; coléteres, também conhecidos como glândulas ou “esquamelas” calicinais; nectários e osmóforos.

Nos últimos anos, Apocynaceae foi alvo de uma controvérsia quanto à sua circunscrição, culminando na proposição de uma nova classificação, baseada em caracteres morfológicos e apoiada por dados moleculares, que inclui Asclepiadaceae (Endress & Bruyns 2000). Dessa forma, Apocynaceae (ou Apocynaceae *s.l.*) ficou constituída por cinco subfamílias: Rauvolfioideae Kostel. e Apocynoideae Burnett, referentes à antiga família Apocynaceae (atualmente designada Apocynaceae *s.str.*); Periplocoideae R.Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R. Br. ex Burnett, que constituíam a antiga família Asclepiadaceae.

Este trabalho é parte integrante de uma ampla pesquisa realizada por pesquisadores do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas (IB - UNICAMP), incluindo professores e alunos de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Estudos envolvendo aspectos morfo-anatômicos e histoquímicos de 55 espécies estão sendo desenvolvidos com o objetivo de ampliar o conhecimento das espécies brasileiras Apocynaceae. Até o presente momento, teses concluídas e artigos publicados são referidos como produtos do grupo de

pesquisa: Rio (2001), Rio *et al.* (2002), Aguiar (2003), Simões (2004), Rio & Kinoshita (2005), compreendendo espécies de Apocynoideae; Demarco (2005a), que contempla espécies de Rauvolfioideae e Asclepiadoideae; e Gomes (2006), que pesquisou espécies das cinco subfamílias. Os seguintes gêneros estão sendo estudados atualmente no Laboratório de Anatomia Vegetal: *Rauvolfia* (Marasca 2005), *Odontadenia*, *Secondatia*, *Temnadenia* (Martins 2003), *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Blepharodon*, *Couma*, *Cryptostegia*, *Forsteronia*, *Hancornia*, *Himathanthus*, *Mandevilla*, *Mesechites*, *Rauvolfia*, *Thevetia*, *Tabernaemontana* (Aguiar 2004), *Fischeria*, *Gonioanthela* e *Mateleia* (Demarco 2005b).

Além disso, esta tese é vinculada ao projeto temático intitulado “Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais em plantas de cerrado (*sensu lato*) do Estado de São Paulo” (Biota/FAPESP proc. nº 00/1249-3), que reúne pesquisadores de vários centros de pesquisa de universidades paulistas e estuda espécies de cerrado pertencentes a dez famílias de angiospermas.

O gênero *Forsteronia* G.Mey. foi contemplado nesta investigação devido à ocorrência comum de suas espécies em cerrados paulistas, indicada pelo levantamento realizado para a Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo – FFESP (Koch & Kinoshita 2005). Seus representantes são predominantemente lianas, raros arbustos, e apresentam as menores flores dentre as Apocynaceae (Hansen 1985). Duas espécies apresentam importância medicinal e/ou farmacológica: *Forsteronia gracilis* (Benth.) Müll.Arg., que é utilizada por comunidades tradicionais da Guiana contra doenças de pele e como inibidor de veneno de sapo (DeFilipps *et al.* 2004), e *Forsteronia refracta* Müll.Arg., que contém um flavonóide com atividade contra proliferação de células cancerígenas isolado a partir de extratos de folhas (Smith *et al.* 2005).

Forsteronia é constituído por 46 espécies de distribuição neotropical, 24 delas já registradas para o Brasil (Hansen 1985). O levantamento da FFESP localizou nove espécies (Koch & Kinoshita 2005), das quais cinco são encontradas em regiões de cerrado: *F. australis* Müll.Arg. (figuras 1-2), *F. glabrescens* Müll.Arg. (figuras 3-4), *F. pubescens* A.DC., *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg e *F. velloziana* (A.DC.) Woodson (figuras 5-6). *Forsteronia australis* é muito

semelhante a *F. glabrescens*, separando-se desta pelo maior tamanho de suas folhas e principalmente pelo indumento mais denso no eixo da inflorescência e nas lacínias do cálice. *Forsteronia thyrsoides* pode ser facilmente confundida com *F. pubescens*, quando em estágio vegetativo. Os caracteres que as diferenciam são o formato da inflorescência e o aspecto dos frutos (Koch & Kinoshita 2005).

Faltam dados anatômicos de espécies de *Forsteronia*, uma vez que estudos desta natureza ainda não foram realizados para o gênero (Hansen 1985). Solereder (1908) descreveu algumas características foliares para *Forsteronia*, como a ocorrência de laticíferos e floema intraxilemático. Metcalfe & Chalk (1950), embora tenham listado o gênero dentre os descritos na obra, não o mencionaram na descrição anatômica detalhada da família. Hansen (1985) registrou a presença de glândulas nodais e foliares, posicionadas na base da nervura central, para todo o gênero; preferiu não identificá-las como coléteres por não ter avaliado a natureza química da secreção.

Segundo a proposta de classificação para Apocynaceae de Endress & Bruyns (2000), o gênero *Forsteronia* está incluído na tribo *Apocynae* Rchb. Com base em estudos filogenéticos apoiados por caracteres morfológicos e moleculares, Simões *et al.* (2004) propuseram um rearranjo dos gêneros pertencentes à tribo *Mesechiteae* Miers; para que a tribo seja considerada monofilética, é necessária a manutenção de *Mandevilla*, *Macrosiphonia* e *Mesechites* em sua circunscrição, associada à inclusão de *Forsteronia* e à exclusão de *Galactophora* e *Secondatia* (Simões *et al.* 2004). Os principais caracteres diagnósticos para a tribo *Mesechiteae* são o formato pentagonal da cabeça do estilete e a adnação entre essa estrutura e o conectivo dos estames, formando o ginostégio (Simões *et al.* 2004).

Tendo em vista a importância econômica e sistemática do gênero e a escassez de dados anatômicos publicados para seus representantes, este trabalho estudou a anatomia de órgãos vegetativos e florais de espécies de *Forsteronia* de cerrado com ênfase na caracterização das estruturas secretoras, de forma a auxiliar a taxonomia de espécies semelhantes, identificar a natureza química do exsudato de suas glândulas, avaliar o

reposicionamento do gênero na tribo *Mesechiteae* e, finalmente, ampliar o conhecimento da anatomia de espécies brasileiras de Apocynaceae e de cerrados paulistas.

As cinco espécies estudadas neste trabalho correspondem a todas aquelas encontradas nas regiões de cerrado do Estado de São Paulo (Koch & Kinoshita 2005). As quatro espécies de *Forsteronia* consideradas semelhantes em estágio vegetativo (*F. australis* e *F. glabrescens*; *F. pubescens* e *F. thyrsoides*) foram abordadas nos estudos sobre anatomia foliar como subsídio à taxonomia (Rio *et al.* 2005; capítulo 1) e caracterização anatômica dos coléteres foliares (capítulo 2). Para a caracterização anatômica das estruturas secretoras florais (capítulo 4) e do ginostégio (capítulo 5), *F. australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens* e *F. velloziana* foram utilizadas, uma vez que não foi possível encontrar material de *F. thyrsoides* com botões florais ou flores em antese. *Forsteronia glabrescens* foi escolhida como espécie modelo para a realização do estudo histoquímico (hipoderme e laticíferos no ápice caulinar vegetativo, capítulo 3; hipoderme e idioblastos em órgãos florais, capítulo 4; epiderme secretora da cabeça do estilete, capítulo 5) pela grande quantidade de estruturas secretoras encontradas em suas partes vegetativas e reprodutivas, pela ocorrência comum de seus indivíduos na Fazenda Campininha e pelo bom resultado apresentado pela fixação do material em diversos fixadores.



Figuras 1-6. Espécies em ambiente natural. **1-2.** *Forsteronia australis*. **1.** Hábito. **2.** Detalhe do ramo florífero. **3-4.** *F. glabrescens*. **3.** Ramos com inflorescências. **4.** Detalhe da inflorescência. **5-6.** *F. velloziana*. **5.** Hábito. **6.** Ramo com inflorescências. Fotos: Itayguara Ribeiro da Costa (1-4) e André Olmos Simões (5-6).

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo investigar a estrutura foliar e floral das espécies de *Forsteronia* encontradas em regiões de cerrado, enfatizando a caracterização anatômica das estruturas secretoras. Cinco espécies são estudadas: *Forsteronia australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC., *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg. e *F. velloziana* (A.DC.) Woodson. As seguintes questões são formuladas:

1. É possível separar as espécies semelhantes que ocorrem em cerrados paulistas através do uso de caracteres morfo-anatômicos vegetativos?
2. As glândulas registradas na região nodal e na base da lâmina foliar são coléteres?
3. Qual a natureza química do exsudato das glândulas secretoras encontradas em *Forsteronia glabrescens*?
4. As glândulas florais de *Forsteronia* correspondem aos tipos encontrados em Apocynaceae?
5. A caracterização anatômica do ginostégio confirma o recente posicionamento do gênero na tribo *Mesechiteae*?

Objetivos específicos

A proposta da presente investigação é:

- Levantar caracteres morfo-anatômicos vegetativos que facilitem a distinção das espécies semelhantes (*Forsteronia australis* e *F. glabrescens*; *F. pubescens* e *F. thyrsoides*) encontradas em formações de cerrado do Estado de São Paulo, visando a auxiliar a taxonomia do gênero.
- Verificar se as glândulas observadas na região nodal e na base da lâmina foliar das espécies são coléteres, determinar o estágio de desenvolvimento foliar em que se encontrem em fase secretora de mucilagem, definir sua posição e número no primórdio foliar e caracterizar a sua estrutura.

- Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes em estruturas secretoras de *F. glabrescens*, através da caracterização histoquímica do exsudato em amostras de material fresco e fixado.
- Caracterizar as estruturas secretoras florais e verificar se os tipos que ocorrem em *Forsteronia* correspondem àqueles encontrados em Apocynaceae.
- Estudar o ginostégio, visando a corroborar o reposicionamento do gênero na tribo *Mesechiteae* com dados anatômicos.

1. CAPÍTULO 1

Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas

O estudo de anatomia foliar realizado em quatro espécies de cerrado de *Forsteronia*, de autoria de Maria Carolina Scatolin do Rio, Luiza Sumiko Kinoshita e Marília de Moraes Castro, foi submetido para publicação na Revista Brasileira de Botânica em 13/01/2005, aceito em 13/10/2005, e encontra-se no prelo desde 20/01/2006. O artigo será publicado no volume 28 (4): 713-726, e a prova gráfica está sendo apresentada como capítulo 1 da tese.

Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas¹

MARIA CAROLINA S. RIO², LUIZA S. KINOSHITA² e MARÍLIA M. CASTRO^{2,3}

(recebido: 13 de janeiro de 2005; aceito: 13 de outubro de 2005)

ABSTRACT – (Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of *Forsteronia* G. Mey. species (Apocynaceae) in cerrados of São Paulo). The foliar anatomy of four cerrado species of *Forsteronia* was investigated in order to determine characters that could help to identify individuals collected in vegetative stage. Specimens of *F. pubescens* A.DC., *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg., *F. australis* Müll.Arg., and *F. glabrescens* Müll.Arg. were collected in Moji-Guaçu and Itirapina cities (São Paulo state, Brazil). Results support the use of foliar features to achieve determination of individuals in vegetative state. *Forsteronia australis* differs from *F. glabrescens* in two macromorphological and four anatomical characters: 1. petiole outline in transverse sections; 2. occurrence of phloem strand above the petiole's midvein; 3. occurrence of secretory hypoderm in the petiole; 4. occurrence of trichomes in the domatia; 5. occurrence of secretory idioblasts and the aspect of their secretion; 6. axilar colleter type. *F. pubescens* is distinguished from *F. thyrsoides* by eight characters: 1. petiole outline in transverse sections; 2. occurrence of phloem strands above the petiole midrib; 3. midvein shape; 4. position of secretory idioblasts in the petiole; 5. mesophyll type; 6. occurrence of crystal idioblasts; 7. occurrence of secretory idioblasts around main vascular bundle; 8. occurrence of axilar branched collaters. This is the first work describing domatia anatomy and sessile and branched collaters in vegetative organs of species of Apocynaceae. The characters described herein have taxonomic significance and are useful to identify *Forsteronia* species, thus contributing to a better delimitation of similar species found in *cerrado* vegetation of São Paulo.

Key words - “cerrado” vegetation, domatia, *Forsteronia*, leaf anatomy, secretory structures

RESUMO – (Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey (Apocynaceae) dos cerrados paulistas). Quatro espécies de *Forsteronia* encontradas em regiões de cerrado tiveram sua anatomia foliar investigada com o objetivo de levantar caracteres que auxiliem a identificar indivíduos em estágio vegetativo. Indivíduos de *F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg. foram coletados em Moji-Guaçu e Itirapina (São Paulo, Brasil). De acordo com os dados obtidos, é possível identificar indivíduos em estágio vegetativo através da estrutura foliar. Dois caracteres macromorfológicos e quatro anatômicos diferenciam *F. australis* de *F. glabrescens*: 1. contorno do pecíolo em secção transversal; 2. ocorrência de cordão de floema acima do feixe vascular no pecíolo; 3. ocorrência de hipoderme secretora no pecíolo; 4. ocorrência de indumento nas domácias; 5. ocorrência de idioblastos secretores e aspecto da sua secreção; 6. tipo dos coléteres axilares. *F. pubescens* distingue-se de *F. thyrsoides* por oito caracteres: 1. contorno do pecíolo em secção transversal; 2. ocorrência de cordões de floema acima do feixe vascular no pecíolo; 3. formato do feixe vascular; 4. posição dos idioblastos secretores no pecíolo; 5. tipo de mesofilo; 6. ocorrência de idioblastos cristalíferos; 7. ocorrência de idioblastos secretores ao redor do feixe vascular mediano; 8. ocorrência de coléter axilar ramificado. A anatomia das domácias e os coléteres dos tipos sésil e ramificado são ineditamente descritos para órgãos vegetativos de espécies de Apocynaceae. Os caracteres levantados têm importância taxonômica e são úteis na identificação das espécies de *Forsteronia*, contribuindo dessa forma para uma melhor delimitação das espécies consideradas semelhantes ocorrentes nos cerrados paulistas.

Palavras-chave - anatomia foliar, cerrado, domácias, estruturas secretoras, *Forsteronia*

Introdução

Incluído na subfamília *Apocynoideae* Burnett (Endress & Bruyns 2000), *Forsteronia* G. Mey. é

constituído por 46 espécies de distribuição neotropical, cujos representantes são predominantemente lianas, raro arbustos; para o Brasil, já foram registradas 24 espécies (Hansen 1985). O levantamento da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (Koch & Kinoshita 2005) localizou nove espécies, das quais quatro, *F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg., podem ser encontradas em regiões de cerrado. Em estágio vegetativo, *F. australis* é muito semelhante a *F. glabrescens*, e *F. thyrsoides* pode ser facilmente confundida com

1. Parte da tese de doutorado de Maria Carolina S. Rio, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
2. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brasil.
3. Autor para correspondência: mariliac@unicamp.br

F. pubescens, sendo diferenciadas apenas por caracteres essencialmente reprodutivos.

Poucos trabalhos referentes aos caracteres anatômicos vegetativos de espécies de Apocynaceae foram realizados, destacando-se aqueles relacionados à arquitetura foliar de 29 espécies pertencentes a 19 gêneros (Mohan & Inamdar 1982), anatomia de folhas xeromórficas em espécies de *Allamanda*, *Thevetia* e *Vinca* (Fjell 1983), anatomia do sistema aéreo, coléteres e ultra-estrutura dos laticíferos em espécies de *Mandevilla* (Appezatto-da-Glória & Estelita-Teixeira 1992, Appezatto-da-Glória & Estelita 1997, 2000).

Domácias estão presentes em 37 espécies de Apocynaceae, estando incluída *F. brasiliensis* A.DC. (Brouwer & Clifford 1990, Gregory 1990). Tais estruturas são mencionadas para algumas espécies de *Forsteronia* na obra de revisão de Hansen (1985) e foram adotadas como um caráter importante para separar grupos em chave de identificação de espécies (Koch & Kinoshita 2005). Glândulas nodais e foliares, posicionadas na base da nervura mediana, foram registradas para o gênero (Hansen 1985) e identificadas como coléteres em estudos recentes de representantes dessa família (Rio *et al.* 2002, Koch & Kinoshita 2005).

Solereder (1908) descreveu a ocorrência de laticíferos e de floema intraxilemático para as folhas de *Forsteronia*. Metcalfe & Chalk (1950, 1979) citaram o gênero no item de anatomia geral, mas não o mencionaram nas descrições detalhadas. Faltam dados anatômicos sobre as espécies brasileiras de *Forsteronia*, uma vez que estudos desta natureza ainda não foram realizados (Hansen 1985).

A presente investigação teve por objetivo levantar caracteres anatômicos foliares que pudessem auxiliar na taxonomia do gênero, principalmente em espécies de cerrado, facilitando a distinção entre espécies semelhantes

ou próximas, que são difíceis de serem diferenciadas pela morfologia externa. Especial atenção foi dada à caracterização anatômica das domácias e das estruturas secretoras foliares.

Material e métodos

Ramos vegetativos de indivíduos de *Forsteronia australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg. foram coletados na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (Fazenda Campininha) e/ou na Estação Ecológica de Itirapina, dependendo da disponibilidade de material; material testemunha para cada indivíduo foi providenciado e está sendo incorporado no herbário UEC. Dois indivíduos de cada espécie (três no caso de *F. pubescens*) foram utilizados nos estudos morfológicos; para *F. thyrsoides* e *F. pubescens*, recorreu-se também a material herborizado (tabela 1). A identificação dos indivíduos foi realizada pela Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita e pelo Dr. André Olmos Simões. Observações sobre a fenologia dos indivíduos marcados da Fazenda Campininha foram realizadas mensalmente durante o ano de 2003.

O material coletado foi fixado em FAA (Johansen 1940) por 24 horas. Alguns indivíduos foram fixados em formalina neutra tamponada (FNT) por 48 horas (Lillie 1948 *apud* Clark 1973) e em sulfato ferroso em formalina (SFF) por 48 horas (Johansen 1940). Todo o material fixado foi estocado em etanol 70%. Folhas adultas foram selecionadas do material fixado ou herborizado e ápices caulinares vegetativos foram isolados do material fixado. A região mediana da folha adulta e a região proximal do pecíolo (junto à base da lâmina foliar) foram utilizadas para o estudo estrutural; a nervura mediana e a margem da lâmina foram isoladas em peças com cerca de 1 cm².

Ápices vegetativos e peças isoladas das folhas adultas foram transferidos para álcool butílico 70%, desidratados pela série butílica (Johansen 1940) e incluídos em

Tabela 1. Relação dos espécimes de *Forsteronia*.

Table 1. List of *Forsteronia* specimens.

Espécie	Indivíduo	Local (tipo de vegetação)	Coletor e número	Data
<i>Forsteronia australis</i>	AUS1	Moji-Guaçu (cerrado)	M.C.S. do Rio <i>et al.</i> 21	6.I.2002
	AUS2	Moji-Guaçu (cerrado)	M.C.S. do Rio <i>et al.</i> 26	6.II.2003
<i>F. glabrescens</i>	GLA1	Moji-Guaçu (cerrado)	M.C.S. do Rio <i>et al.</i> 19	22.XI.2001
	GLA8	Itirapina (cerrado)	M.C.S. do Rio <i>et al.</i> 32	8.XI.2003
<i>F. pubescens</i>	PUB1	Itirapina (cerrado)	M.C.S. do Rio <i>et al.</i> 28	8.XI.2003
	PUB94	São José do Rio Pardo (cerradão)	L.S. Kinoshita & A. Sartori 94-19	8.XI.1994
	PUB95	Suzanópolis (cerrado)	M.R. Pereira-Noronha <i>et al.</i> 1583	VIII.1995
<i>F. thyrsoides</i>	THY1	Itirapina (cerrado)	M.C.S. do Rio <i>et al.</i> 29	8.XI.2003
	THY98	Pilar do Sul – Sarapuí (cerrado)	A.M.G.A. Tozzi <i>et al.</i> 357	3.XII.1998

Paraplast. Cortes seriados longitudinais e transversais, com espessura de 12 a 16 μm , foram obtidos em micrótomo rotativo, corados com safranina e azul de astra (Gerlach 1969) e as lâminas montadas em resina sintética Permount. Os cortes obtidos a partir do material fixado em SFF (Johansen 1940), específico para evidenciar compostos fenólicos, foram desparafinizados, diafanizados e montados em resina sintética.

Folhas adultas selecionadas de exsiccatas de *F. pubescens* e *F. thyrsioidea* depositadas no Herbário UEC foram hidratadas; o material permaneceu em hidróxido de potássio para distensão dos tecidos (Smith & Smith 1942) e folhas inteiras foram utilizadas para a clarificação da lâmina foliar. A região mediana da lâmina foliar e a região proximal do pecíolo foram isoladas para inclusão das peças em resina plástica. As peças isoladas foram desidratadas rapidamente, transferidas para etanol 100% e incluídas em resina plástica (Gerrits 1991). Cortes com 10 μm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964); as lâminas permanentes, montadas em resina sintética.

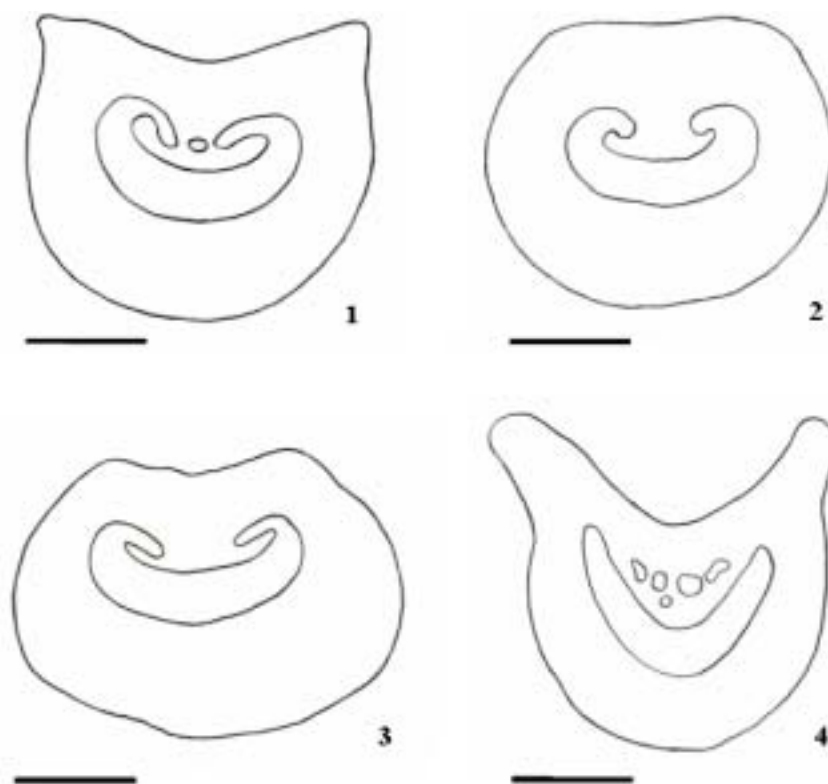
Para a clarificação das lâminas foliares, foram utilizadas folhas adultas fixadas em FAA (*F. australis* e *F. glabrescens*) ou hidratadas de material herborizado (*F. pubescens* e *F. thyrsioidea*). As folhas foram diafanizadas e coradas

segundo Shobe & Lersten, modificado por Monteiro *et al.* (1979), para estudo da epiderme em vista frontal, com especial atenção às domácias.

Os esquemas dos pecíolos foram obtidos em câmara clara acoplada a microscópio. As ilustrações foram efetuadas através de fotomicrografias coloridas obtidas em microscópio Olympus BX51 com o uso de filme Kodak ProImage 100 ou Kodak Gold 100; as escalas foram obtidas através da projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. Todas as figuras foram digitalizadas com alta resolução (600 dpi) e as pranchas montadas em meio digital.

Resultados

Os dados referentes ao pecíolo (figuras 1-17) e lâmina foliar (figuras 18-41) permitem diferenciar *Forsteronia australis* Müll.Arg. (figuras 1, 5-8, 18-23) de *F. glabrescens* Müll.Arg. (figuras 2, 9-12, 24-29) e *F. pubescens* A.DC. (figuras 3, 13, 14, 30-36) de *F. thyrsioidea* (Vell.) Müll.Arg. (figuras 4, 15-17, 37-41). Pecíolo – O contorno da secção transversal do pecíolo (figuras 1-4) é um caráter macromorfológico útil na



Figuras 1-4. Esquemas das secções transversais da região proximal dos pecíolos obtidos dos cortes ilustrados nas figuras 5, 9, 13 e 15 respectivamente. 1. *F. australis*. 2. *F. glabrescens*. 3. *F. pubescens*. 4. *F. thyrsioidea*. Barras = 500 μm .

Figures 1-4. Diagrams of petiole outline and midrib in transection obtained from sections illustrated in figures 5, 9, 13 and 15, respectively. 1. *F. australis*. 2. *F. glabrescens*. 3. *F. pubescens*. 4. *F. thyrsioidea*. Bars = 500 μm .

distinção das espécies. *Forsteronia australis* (figuras 1, 5) e *F. thyrsoides* (figuras 4, 15) possuem o pecíolo achatado dorsiventralmente. *Forsteronia glabrescens* e *F. pubescens* têm pecíolos cilíndricos (figuras 2, 3, 9, 13). A epiderme apresenta células pequenas com paredes arqueadas (figuras 6, 10, 14), com aspecto papiloso apenas em *F. thyrsoides* (figuras 16, 17). O feixe vascular é bicolateral em todas as espécies e tem formato de arco tênue com as extremidades curvas em *F. australis* (figuras 5, 7) e *F. glabrescens* (figuras 9, 11); arco tênue em *F. pubescens* (figura 13) e arco pronunciado em formato de “V” em *F. thyrsoides* (figura 15). Cordões de floema são observados acompanhando o feixe mediano em *F. australis* (figuras 5, 7, 8) e *F. thyrsoides* (figura 15).

Forsteronia australis difere de *F. glabrescens* quanto à distribuição dos idioblastos secretores. Em *F. australis*, os idioblastos são raros e possuem um conteúdo fracamente corado (figura 6), sendo encontrados no córtex, acima da nervura mediana (figura 5), e junto ao floema (figuras 7, 8). Em *F. glabrescens*, os idioblastos constituem uma hipoderme contínua em toda a circunferência do pecíolo; também estão presentes no parênquima cortical (figura 9) e apresentam um conteúdo acidófilo de aspecto denso fortemente corado pela safranina (figuras 10, 12).

Forsteronia thyrsoides também difere de *F. pubescens* quanto à posição dos idioblastos secretores, que se encontram dispersos na porção inferior do córtex e seu conteúdo apresenta coloração verde (figura 15). Idioblastos nesta posição nunca foram observados em *F. pubescens* (figura 13); nessa espécie, eles ocorrem associados ao floema do feixe mediano e também possuem um conteúdo acidófilo de aspecto denso, corado em vermelho pela safranina.

Laticíferos foram observados no córtex e ao redor dos feixes vasculares (indicados por setas) em todas as espécies. Suas células apresentam parede espessa em *F. australis* e *F. glabrescens* (figuras 8, 12) e calibre maior que as demais em *F. pubescens* e *F. thyrsoides* (figuras 13, 15).

Lâmina foliar – Nas quatro espécies estudadas, a epiderme é unisseriada em ambas as faces (figuras 18, 23-26, 30, 31, 37, 38). *Forsteronia australis* e *F. glabrescens* possuem células epidérmicas com paredes anticlinais sinuosas (figuras 22 e 27, respectivamente); em *F. pubescens* (figura 34) e *F. thyrsoides* as paredes são retas, o que confere um aspecto poligonal a essas células.

Estômatos estão restritos à epiderme da face inferior, são predominantemente do tipo paracítico (figura 22) e

encontram-se no mesmo nível das demais células epidérmicas (figuras 23, 26, 31, 38). Tricomas multicelulares unisseriados não secretores são encontrados em três espécies; em *F. glabrescens*, eles estão restritos às criptas das domácias (figura 25). Em *F. pubescens* (figura 36) e *F. thyrsoides*, esses tricomas predominam ao longo das nervuras mediana e laterais, principalmente na face inferior. Nesta última espécie, um adensamento de tricomas tectores é observado nas axilas da nervura mediana com as laterais. Apenas a epiderme de *F. australis* é glabra.

Em corte transversal (figuras 18, 24, 30, 37), as células epidérmicas da nervura mediana são menos volumosas que as demais, tanto na face superior quanto na inferior. Ao longo da nervura, duas a três camadas de colênquima ocorrem junto à epiderme em ambas as faces da lâmina foliar.

O feixe vascular é bicolateral e apresenta formato de arco (figuras 18, 24, 30) à exceção de *F. thyrsoides*, que tem arco pronunciado em forma de “V” e cinco cordões de floema voltados em direção à face adaxial (figura 37); apenas *F. pubescens* possui costela na nervura mediana (figura 30). O metaxilema é constituído por elementos de condução de grande calibre entremeados por células parenquimáticas pouco volumosas (figuras 18, 24, 30, 33, 37, 40). Células esclerenquimáticas são encontradas acima do floema próximo à face superior em *F. australis* (figura 18) e *F. glabrescens* (figura 24). O floema apresenta idioblastos secretores de compostos fenólicos com conteúdo de aspecto denso em *F. australis* (figura 18), *F. pubescens* (figura 13) e *F. glabrescens* (figuras 24, 25).

Laticíferos são encontrados ao redor do feixe vascular mediano (figuras 18, 24, 30, 33, 37, 40, 41). Essas estruturas (setas) possuem parede espessada em *F. pubescens* (figura 33) e calibre maior que as demais células em *F. thyrsoides* (figuras 37, 40, 41).

As espécies apresentam mesofilo dorsiventral (figuras 23, 26, 38) exceto *F. pubescens* (figura 31), cujo mesofilo é homogêneo, sem clara distinção entre parênquima paliádico e lacunoso. O número de camadas do clorênquima é próximo de cinco em *F. australis* (figura 23); de três em *F. glabrescens* (figura 26) e *F. pubescens* (figura 31) e de duas em *F. thyrsoides* (figura 38). Laticíferos são encontrados apenas em *F. australis* (figura 23).

Os feixes vasculares do mesofilo são bicolaterais em *F. glabrescens* (figura 26) e colaterais em *F. australis* (figura 23), *F. pubescens* (figura 31) e em *F. thyrsoides* (figura 38). Em *F. pubescens*, a bainha parenquimática do feixe apresenta cloroplastos e as suas extensões

atingem a epiderme em ambas as faces (figura 31). Fibras não são registradas nos feixes vasculares de *F. thyrsoidea* e a bainha do feixe com suas extensões são bem definidas (figura 38). Apenas *F. pubescens* apresenta costela nas nervuras laterais de primeira ordem (figura 31).

Dois tipos de idioblastos foram encontrados: os secretores, com conteúdo granuloso (figura 23) ou denso (figura 26); e os cristalíferos, sob a forma de drusas (figura 26), cristais romboidais (figura 29) ou prismáticos (figura 35).

Os idioblastos secretores estão presentes em *F. australis* (figuras 20, 23), *F. glabrescens* (figuras 24-26) e *F. thyrsoidea* (figuras 37, 41). Nas duas primeiras, eles estão distribuídos no parênquima paliádico, onde apresentam formato retangular (figuras 23, 26) e na bainha dos feixes vasculares e suas extensões, onde são arredondados; na terceira, estão presentes no córtex, ao redor do feixe vascular mediano (figuras 37, 41). Os idioblastos de *F. glabrescens* são mais longos que as demais células do parênquima paliádico (figura 26) e podem apresentar conteúdo denso (figura 26) ou granuloso (figura 25). Em *F. australis*, há somente idioblastos com conteúdo granuloso (figuras 20, 23), três a quatro vezes mais longos que as células do parênquima paliádico (figura 23).

Idioblastos cristalíferos são observados dispersos no mesofilo em todas as espécies estudadas à exceção de *F. thyrsoidea*. O formato dos cristais e sua frequência variam de espécie para espécie. *Forsteronia glabrescens* apresenta drusas (figura 26, 29) e cristais romboidais em grande quantidade (figura 29); em *F. australis*, ambos os tipos de cristais são raros. *Forsteronia pubescens* apresenta cristais prismáticos (figura 35) e drusas.

Forsteronia pubescens e *F. thyrsoidea* diferem quanto ao tipo de idioblastos que apresentam. *Forsteronia pubescens* possui idioblastos cristalíferos com cristais prismáticos dispersos pelo parênquima ao redor da nervura mediana (figura 30); esse tipo de idioblasto não foi registrado em *F. thyrsoidea*. Já nesta última, idioblastos secretores com conteúdo acidófilo (denso ou granuloso) são encontrados no parênquima fundamental ao redor do feixe vascular (figura 37); esses idioblastos não ocorrem nesta posição em *F. pubescens* (figura 30).

Domácias foram registradas em *F. australis* (figuras 19, 20) e *F. glabrescens* (figura 25), estando presentes nas axilas da nervura mediana com as laterais, na face inferior da lâmina foliar. Em *F. australis*, as domácias estão restritas à região mediana da lâmina, as criptas são rasas e revestidas por duas camadas de

células com conteúdo granuloso; tricomas não são observados (figuras 19, 20). Em *F. glabrescens*, elas são encontradas ao longo da nervura mediana, em quase toda a extensão da lâmina foliar, estando ausentes apenas no ápice e na base da lâmina. São criptas profundas revestidas por duas camadas de células obliteradas; tricomas tectores multicelulares unisseriados, eretos ou recurvados, estão presentes apenas próximo à região de abertura da cripta (figura 25). Em ambas as espécies, observa-se que a cripta é formada com redução apenas do parênquima lacunoso (figuras 19, 20, 25).

Coléteres em fase secretora são encontrados nos ápices caulinares vegetativos das quatro espécies (figuras 21, 28, 32, 39). Todos eles têm origem no primórdio foliar, ocupando posição marginal ou axilar e não apresentam tecido vascular ou qualquer tipo de modificação estrutural.

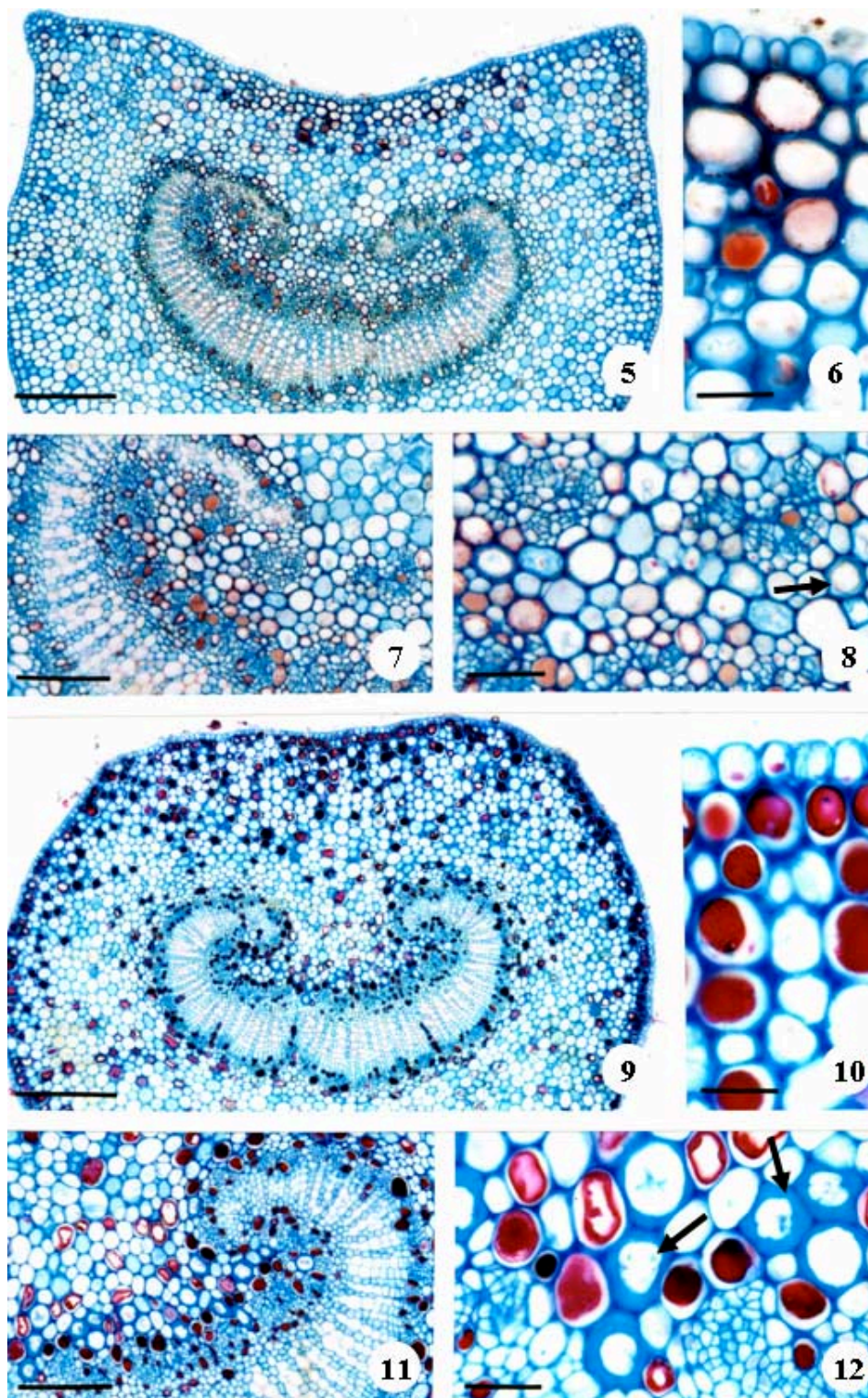
Os coléteres marginais são caducos em órgãos adultos, restando apenas cicatrizes em posição interpeciolar. Os coléteres axilares são persistentes e ficam reduzidos a pequenas estruturas senescentes posicionadas na base da lâmina foliar próximas ao pecíolo, sobre a nervura mediana. O número de coléteres marginais e axilares é variável nas quatro espécies; 4-8 marginais e 2-8 axilares são encontrados em média por nó vegetativo, considerando os dois primórdios foliares com filotaxia oposta. O número de coléteres varia entre as espécies, entre indivíduos da mesma espécie e em nós diferentes de um mesmo indivíduo.

Três tipos de coléteres foram registrados: padrão, sésil e ramificado. O tipo padrão é formado por um eixo alongado recoberto por epiderme em paliçada e um pedúnculo curto (figura 21). O tipo sésil não apresenta pedúnculo e possui a paliçada secretora extremamente espessa (figura 28). O tipo ramificado é semelhante ao tipo padrão e ramifica-se ao longo do seu comprimento (figura 32). A ramificação só é registrada através da análise de cortes transversais seriados.

O tipo padrão foi encontrado nos coléteres marginais de todas as espécies; apenas *F. pubescens* possui dois tipos: padrão e sésil. Em relação aos coléteres axilares, *F. australis* e *F. glabrescens* apresentam os tipos padrão e sésil respectivamente. *F. pubescens* possui os três tipos; o ramificado não foi observado em *F. thyrsoidea* (tabela 2).

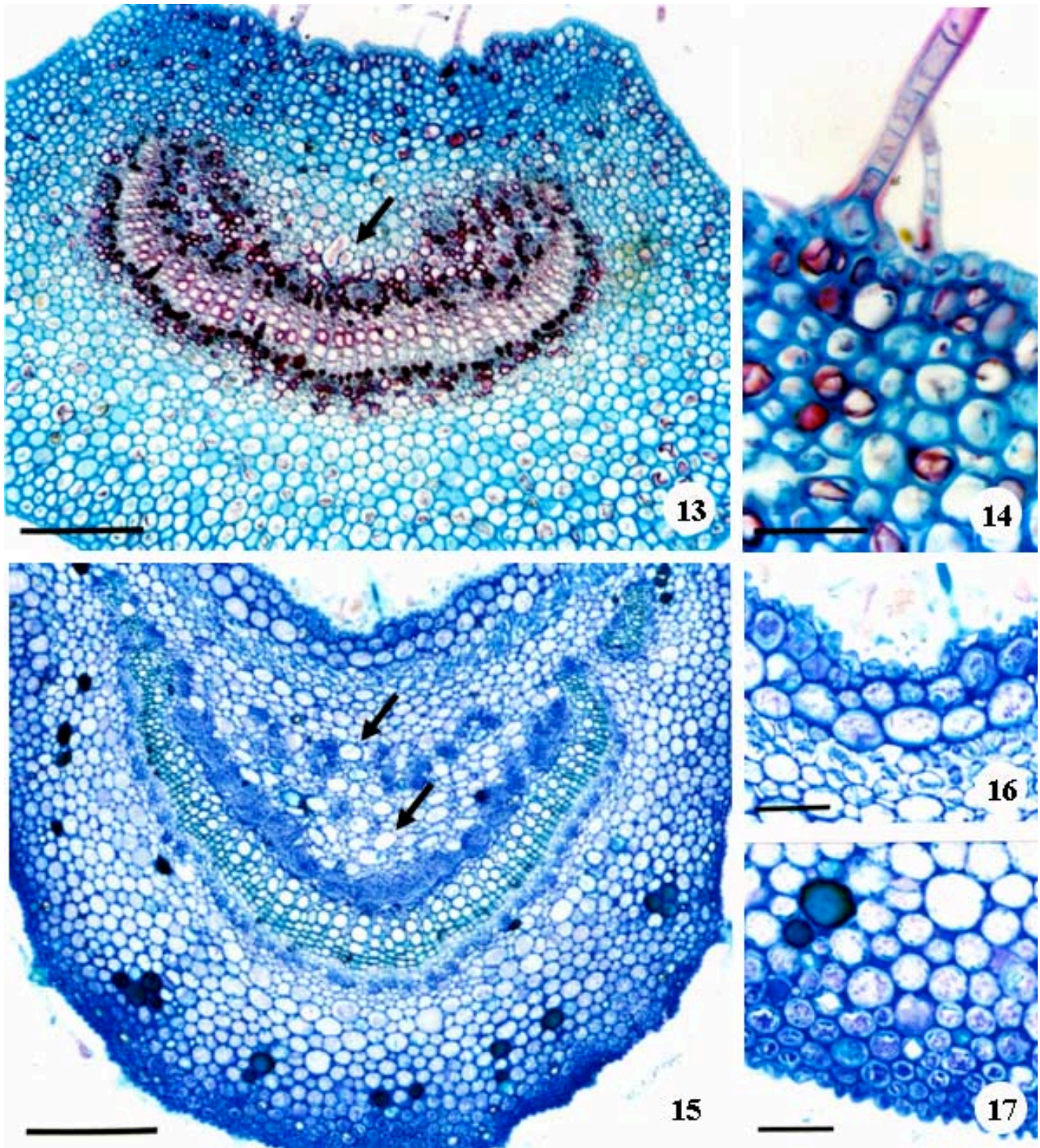
Discussão

Todas as espécies de *Forsteronia* estudadas apresentam epiderme unisseriada em ambas as faces da lâmina foliar e estômatos predominantemente paracíticos



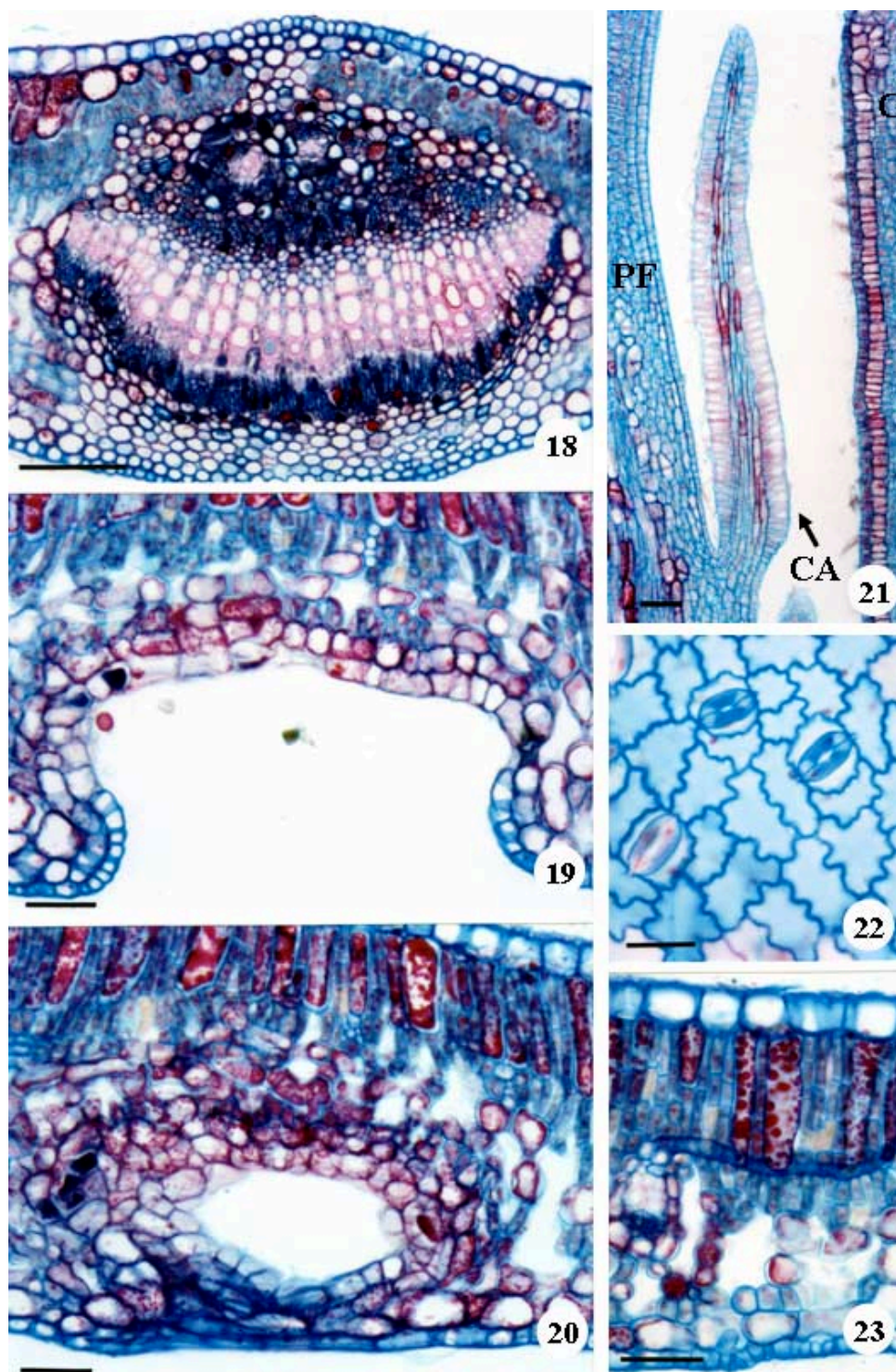
Figuras 5-12. Pecíolo de folhas adultas de *F. australis* (5-8) e *F. glabrescens* (9-12) em secções transversais. 5, 9. Vista geral. 6, 10. Detalhe da região cortical da face adaxial. 7, 11. Detalhe do feixe vascular. 8. Detalhes dos cordões floemáticos e de laticífero (seta). 12. Detalhe do floema; idioblastos e laticíferos (setas). Barras = 200 μ m (5, 9), 100 μ m (7, 11), 25 μ m (6, 8, 10, 12).

Figures 5-12. Petiole of *F. australis* (5-8) and *F. glabrescens* (9-12) mature leaves; transections. 5, 9. General view. 6, 10. Region above midrib. 7, 11. Vascular bundle. 8. Phloem strands and laticifer (arrow). 12. Phloem; idioblasts and laticifers (arrows). Bars = 200 μ m (5, 9), 100 μ m (7, 11), 25 μ m (6, 8, 10, 12).



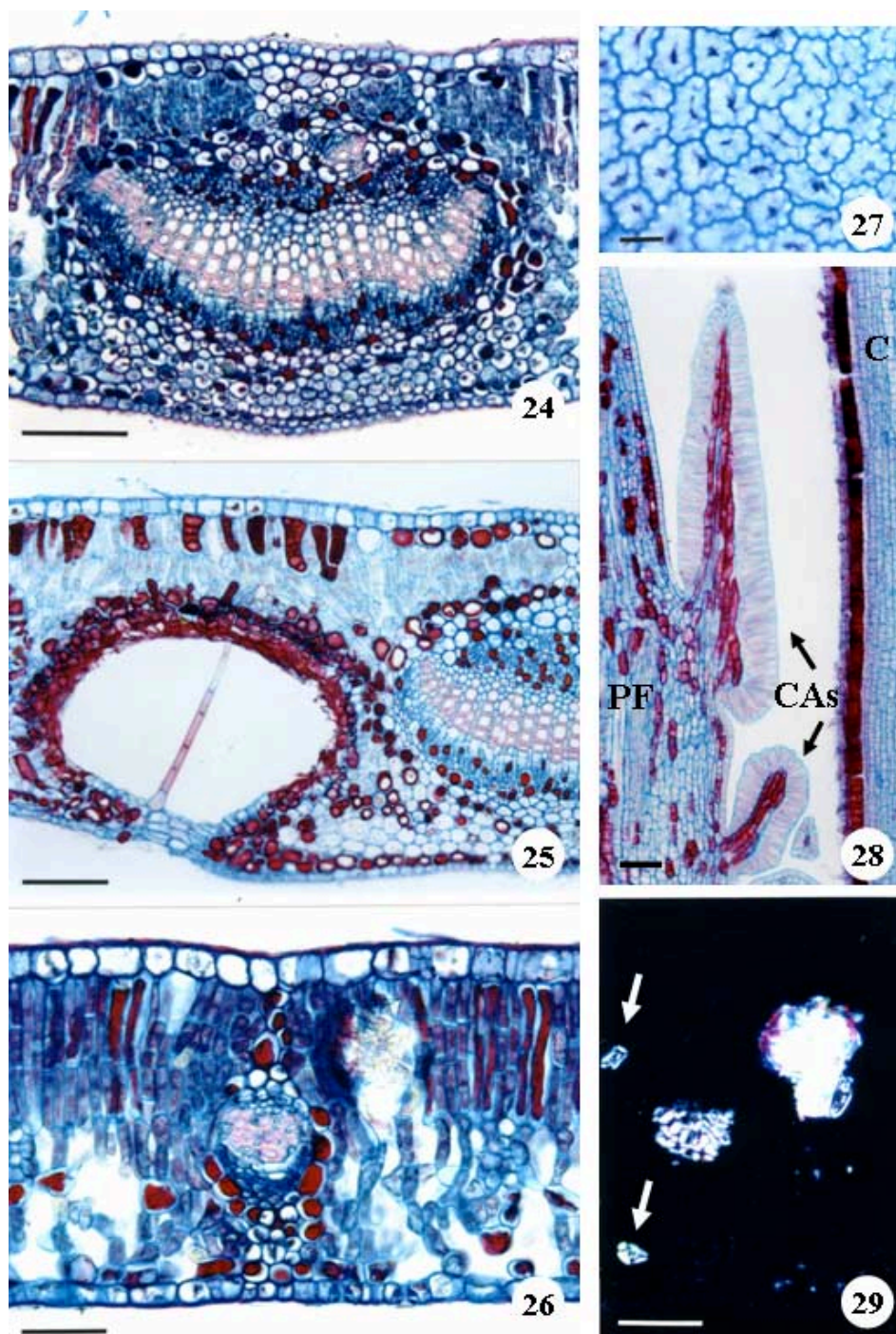
Figuras 13-17. Pecíolo de folhas adultas de *F. pubescens* (13-14) e *F. thyrsoides* (15-17) em seções transversais. 13, 15. Vista geral; laticíferos (setas). 14. Detalhe da região cortical da face adaxial. 16-17. Detalhes da epiderme das faces superior (16) e inferior (17); células epidérmicas papilosas. Barras = 200 μ m (13, 15), 50 μ m (14, 16, 17).

Figures 13-17. Petiole of *F. pubescens* (13-14) and *F. thyrsoides* (15-17) mature leaves; transections. 13, 15. General view; laticifers (arrows). 14. Region above midrib. 16-17. Upper (16) and lower (17) papillose epidermis. Bars = 200 μ m (13, 15), 50 μ m (14, 16, 17).



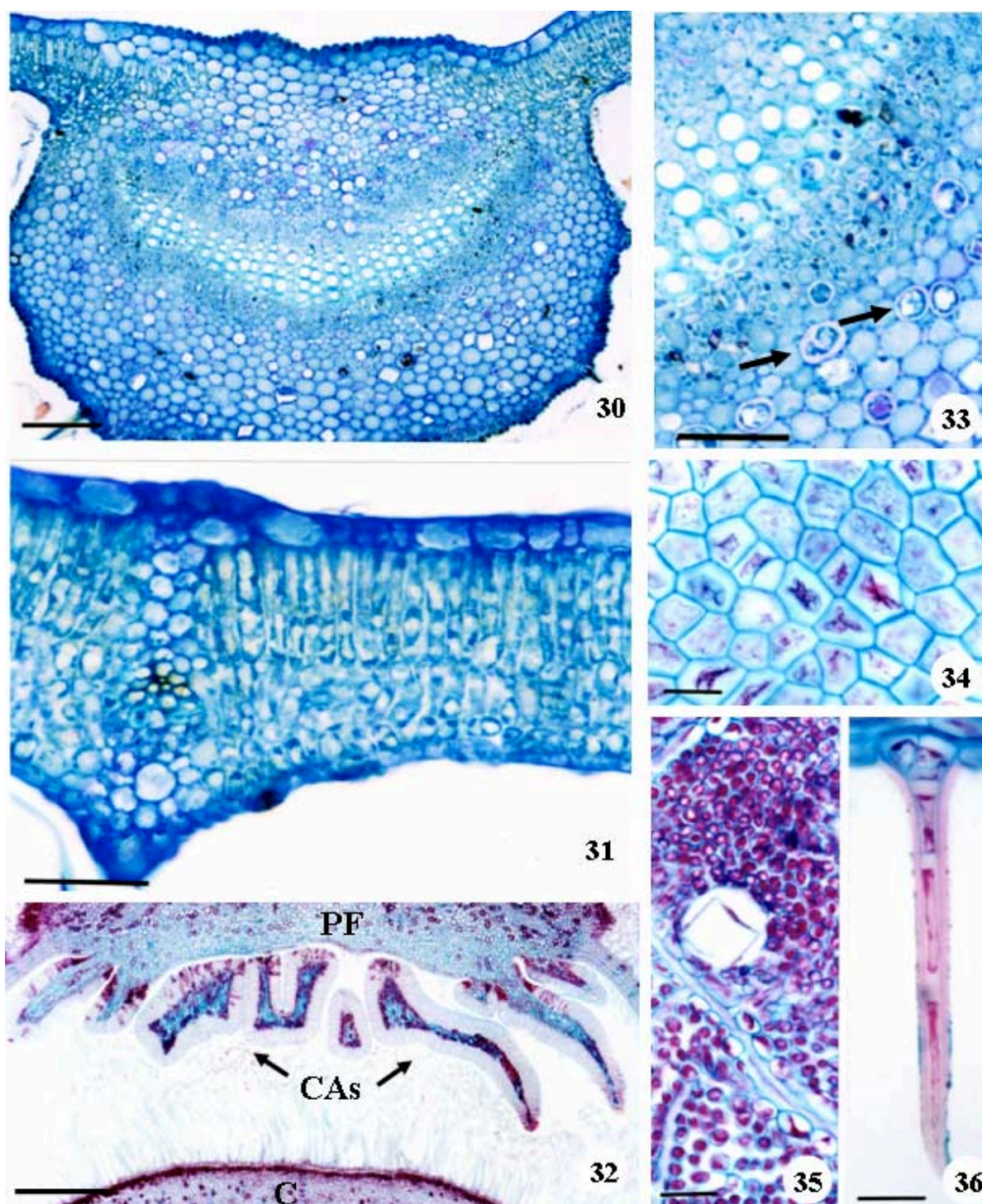
Figuras 18-23. Folha adulta (18-20, 22-23) e primórdio foliar (21) de *F. australis* em secções transversais (18-20, 23) e longitudinais (21-22). 18. Nervura mediana. 19. Domácia em secção transversal mediana. 20. Domácia em secção tangencial. 21. Coléter axilar padrão. 22. Epiderme da face abaxial em vista frontal; estômatos paracíticos e células com paredes sinuosas. 23. Mesofilo dorsiventral; laticífero e feixe vascular lateral. C = caule; CA = coléter axilar; PF = primórdio foliar. Barras = 100 μ m (18), 50 μ m (19-21, 23), 25 μ m (22).

Figures 18-23. Mature (18-20, 22-23) and young leaf (21) of *F. australis*; transections (18-20, 23) and longisections (21-22). 18. Midrib. 19. Median transection of domatia. 20. Tangential transection of domatia. 21. Standard axillary colletter. 22. Lower epidermis in surface view; paracytic stomata and wavy walls. 23. Dorsiventral mesophyll; laticifer and lateral vascular bundle. C = stem; CA = axillary colletter; PF = young leaf. Bars = 100 μ m (18), 50 μ m (19-21, 23), 25 μ m (22).



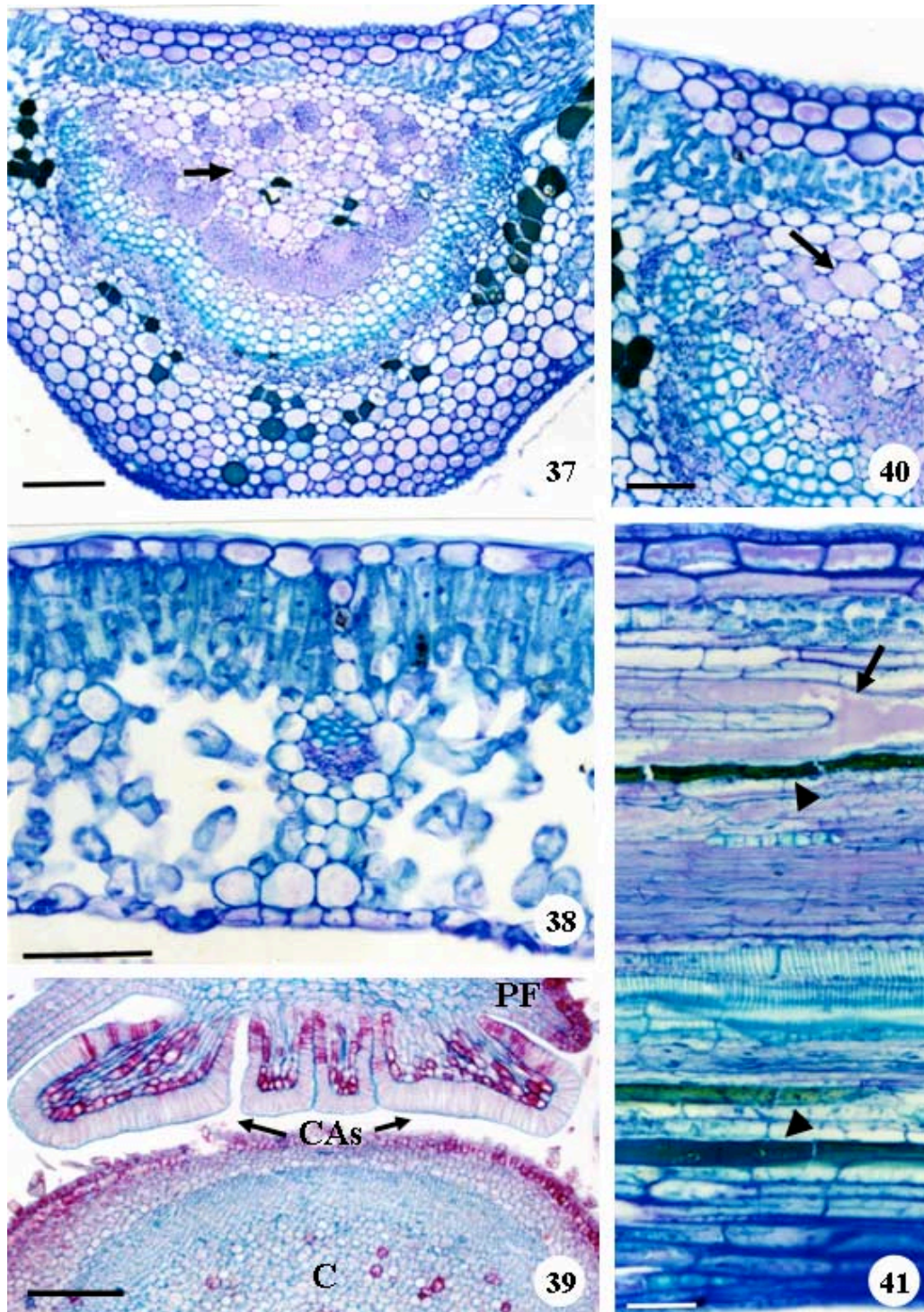
Figuras 24-29. Folha adulta (24-27, 29) e primórdio foliar (28) de *F. glabrescens* em secções transversais (24-26, 29) e longitudinais (27-28). 24. Nervura mediana. 25. Domácia; tricoma tector multicelular unisseriado. 26. Mesofilo dorsiventral; idioblastos com conteúdo denso no parênquima paliçádico, na bainha do feixe vascular e extensões. 27. Epiderme da face adaxial em vista frontal com células de paredes sinuosas. 28. Coléter axilar séssil. 29. Mesofilo em luz polarizada; drusa e cristais romboidais (setas). C = caule; CAs = coléteres axilares; PF = primórdio foliar. Barras = 100 μ m (24, 25), 50 μ m (26, 28, 29), 25 μ m (27).

Figures 24-29. Mature (24-27, 29) and young leaf (28) of *F. glabrescens*; transections (24-26, 29) and longisections (27-28). 24. Midrib. 25. Domatia; multicellular uniseriate trichome. 26. Dorsiventral mesophyll; idioblasts with dense contents in palisade parenchyma, bundle sheaths and bundle-sheath extensions. 27. Upper epidermis in surface view with wavy walls. 28. Sessile axillary colleter. 29. Mesophyll observed under polarized light; druse and rhomboid (arrows) crystal. C = stem; CA = axillary colleter; PF = young leaf. Bars = 100 μ m (24, 25), 50 μ m (26, 28, 29), 25 μ m (27).



Figuras 30-36. Folha adulta (30-31, 33-36) e primórdio foliar (32) de *F. pubescens* em secções transversais (30-33, 36) e longitudinais (34-35). 30. Nervura mediana. 31. Mesofilo homogêneo; feixe vascular lateral. 32. Coléteres axilares ramificados. 33. Detalhe do feixe vascular mediano; laticíferos (setas). 34. Epiderme da face adaxial em vista frontal; células com paredes retas. 35. Cristal prismático no mesofilo. 36. Tricoma tector multicelular unisseriado. C = caule; CAs = coléteres axilares; PF = primórdio foliar. Barras = 200 μ m (32), 100 μ m (30), 50 μ m (31, 33), 25 μ m (34-36).

Figures 30-36. Mature (30-31, 33-36) and young leaf (32) of *F. pubescens*; transections (30-33, 36) and longisections (34-35). 30. Midrib. 31. Regular mesophyll; lateral vascular bundle. 32. Branched axillar colletes. 33. Detailed view of midrib; laticifers (arrows). 34. Upper epidermis in surface view; straight walls. 35. Prismatic crystal. 36. Multicellular uniseriate trichome. C = stem; CA = axillar colleter; PF = young leaf. Bars = 200 μ m (32), 100 μ m (30), 50 μ m (31, 33), 25 μ m (34-36).



Figuras 37-41. Folha adulta (37-38, 40-41) e primórdio foliar (39) de *F. thyrsoides* em secções transversais (37-40) e longitudinal (41). 37. Nervura mediana; laticíferos (seta). 38. Mesofilo dorsiventral; feixe vascular lateral e estômatos. 39. Coléteres axilares não ramificados. 40-41. Detalhe da nervura mediana. 40. Colênquima e laticíferos (seta). 41. Idioblastos secretores (cabeças de seta) e laticífero (seta). C = caule; CAs = coléteres axilares; PF = primórdio foliar. Barras = 100 µm (37, 39), 50 µm (38, 40, 41).

Figures 37-41. Mature (37-38, 40-41) and young leaf (39) of *F. thyrsoides*; transections (37-40) and longisections (41). 37. Midrib; laticifers (arrow). 38. Dorsiventral mesophyll; lateral vascular bundle and stomata. 39. Not branched axillary colletes. 40-41. Detailed view of midrib. 40. Colenchyma and laticifers (arrow). 41. Secretory idioblasts (arrow heads) and laticifer (arrow). C = stem; CA = axilar colleter; PF = young leaf. Bars = 100 µm (37, 39), 50 µm (38, 40, 41).

Tabela 2. Tipo de coléteres nas espécies de *Forsteronia*. P = padrão; S = sésil; R = ramificado.

Table 2. Colleters types of *Forsteronia* species. P = standard; S = sessile; R = branched.

	Marginais	Axilares
<i>Forsteronia australis</i>	P	P
<i>F. glabrescens</i>	P	S
<i>F. pubescens</i>	P, S	P, S, R
<i>F. thyrsoides</i>	P	P, S

restritos à face inferior, assim como feixe vascular em forma de arco na nervura mediana. Esses caracteres foram anteriormente registrados para as folhas de *Allamanda neriifolia* Hook. (hoje *A. schottii* Pohl), *Thevetia peruviana* (Pers.) K.Schum e *Vinca minor* L., consideradas xeromórficas por Fjell (1983).

Todas as espécies analisadas neste trabalho à exceção de *F. pubescens* apresentam mesofilo dorsiventral, da mesma forma que *A. neriifolia*, *T. peruviana* e *V. minor* (Fjell 1983). Segundo Metcalfe & Chalk (1950), este é o tipo de mesofilo mais comum em Apocynaceae, podendo ocorrer raramente mesofilo isobilateral. Idioblastos secretores de compostos fenólicos com conteúdo granuloso ou denso estão presentes no parênquima paliçádico apenas em *F. australis* e *F. glabrescens* respectivamente. Esse tipo de idioblasto não foi registrado nas espécies estudadas por Fjell (1983); Metcalfe & Chalk (1950) mencionaram a ocorrência de células secretoras abaixo do parênquima paliçádico em *Cleghornia*, *Echites*, *Kopsia* e *Tabernaemontana*. Idioblastos cristalíferos (drusas e cristais prismáticos ou romboidais) são encontrados nas espécies de *Forsteronia* estudadas, à exceção de *F. thyrsoides*. Cristais foram anteriormente registrados em *A. neriifolia* e *T. peruviana* (Fjell 1983), sendo as drusas o tipo mais comum, e em *Acokanthera*, *Alstonia*, *Apocynum*, *Cerbera*, *Gonioma*, *Hunteria* e *Oncinotis* (Metcalfe & Chalk 1950).

O tipo de idioblasto cristalífero varia entre as espécies estudadas; este não é considerado um caráter diagnóstico importante, pois pode variar com o meio ambiente (Metcalfe 1983). Os cristais podem estar presentes em maior ou menor quantidade de acordo com a composição do solo onde a planta se encontra. O estudo de um maior número de indivíduos, inclusive de outras localidades, seria necessário para avaliar melhor a questão da variação da frequência dos cristais.

Tricomas de vários tipos podem ser encontrados em Apocynaceae (Metcalfe & Chalk 1950). Em *Forsteronia*, apenas tricomas multicelulares unisseriados

não secretores (tipo 1) são observados em três das espécies estudadas. Os coléteres presentes nos nós vegetativos e na base da lâmina foliar das quatro espécies de *Forsteronia* estudadas não são considerados tricomas e sim emergências, uma vez que sua origem não é exclusivamente protodérmica.

O termo domácia é usualmente aplicado a tufo de tricomas, depressões, bolsos ou sacos presentes nas axilas das nervuras de maior calibre, quando ocorrem exclusivamente na face inferior das folhas (Wilkinson 1979). Segundo Brouwer & Clifford (1990), as domácias foram definidas pela primeira vez como formações ou transformações em plantas com função de hospedar simbiontes durante um período essencial do seu desenvolvimento, configurando mutualismo. Vários autores consideram que há uma relação restrita entre as domácias e organismos animais, principalmente ácaros e formigas (Wilkinson 1979). Domácias são encontradas predominantemente em plantas lenhosas de regiões tropicais úmidas ou subtropicais; apesar de estarem presentes em plantas de regiões frias, nunca foram registradas em espécies que ocorrem em solos permanentemente secos. Os tipos de domácias foliares já descritos são: tufo de tricomas, bolsos, sacos (bolsos estendidos), criptas e margem revoluta na base da lâmina (Wilkinson 1979).

Dentre as espécies estudadas, domácias são registradas em *F. australis* e *F. glabrescens*, constituindo-se um importante caráter macromorfológico devido à presença de tricomas na cripta. As características anatômicas das domácias encontradas em *Forsteronia* assemelham-se às descritas por Wilkinson (1979), principalmente quanto à compactação das células, redução do número de camadas do parênquima lacunoso na região da cripta e ausência de estômatos na epiderme interna. Diferentemente do descrito por essa autora, nenhum tecido de sustentação foi encontrado ao redor da domácia. A descrição da anatomia das domácias foliares é inédita para espécies de Apocynaceae. A distribuição das domácias não se mostrou um caráter consistente para a identificação de espécies a partir dos indivíduos coletados em estágio vegetativo, uma vez que se observou uma grande variação entre diferentes indivíduos da mesma espécie e entre diferentes folhas de um mesmo indivíduo. No entanto, a ocorrência de tricomas nas domácias é sempre constante e independe do número de domácias por folha.

Coléter do tipo padrão, caracterizado pela presença de um eixo alongado recoberto por epiderme em paliçada e um pedúnculo curto (Lersten 1974), foi encontrado em todas as espécies estudadas de *Forsteronia*. Este

termo, proposto para coléteres de Rubiaceae, tem sido amplamente utilizado na descrição dos coléteres de várias famílias, inclusive Apocynaceae (Thomas 1991, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Rio *et al.* 2002). Além de coléteres do tipo padrão, coléteres sésseis foram registrados em *F. glabrescens*, *F. pubescens*, *F. thyrsoides* e coléteres ramificados em *F. pubescens* (tabela 2). Os tipos sésseis e ramificados são descritos pela primeira vez para órgãos vegetativos de espécies de Apocynaceae.

Considerando-se as espécies estudadas, os coléteres marginais são caducos em órgãos completamente desenvolvidos, restando apenas cicatrizes em posição interpeciolar, restringindo sua utilização para fins taxonômicos. O tipo dos coléteres axilares é um caráter constante e importante na distinção entre *F. australis* e *F. glabrescens*, e entre *F. pubescens* e *F. thyrsoides*, devendo ser observado nos ápices caulinares vegetativos (tabela 3). Os coléteres observados nestas espécies de *Forsteronia* são equivalentes às glândulas nodais e foliares registradas por Hansen (1985).

O número de coléteres encontrados por nó vegetativo é variável em diferentes indivíduos de uma mesma espécie e em folhas de um mesmo indivíduo, e por isto não constitui um caráter útil para fins taxonômicos. Variações no número de coléteres em folhas

de uma mesma espécie são comuns e já foram relatadas para outras espécies de Apocynaceae (Ramayya & Bahadur 1968, Thomas & Dave 1989, Thomas 1991).

Forsteronia australis distingue-se de *F. glabrescens* pelo contorno do pecíolo em secção transversal, ocorrência dos idioblastos secretores no pecíolo e nervura mediana e ocorrência de cordões de floema acima do feixe vascular no pecíolo. Essas características, somadas à ocorrência de tricomas nas domácias, ocorrência de laticíferos no mesofilo e tipo dos coléteres axilares, constituem um conjunto de caracteres taxonomicamente consistentes para diagnóstico destas espécies a partir de indivíduos coletados apenas em estágio vegetativo.

Forsteronia pubescens diferencia-se de *F. thyrsoides* pelo contorno do pecíolo e formato do feixe vascular em secção transversal, tipo de mesofilo, ocorrência de idioblastos cristalíferos, ocorrência de cordões de floema acima do feixe vascular e ocorrência de idioblastos secretores ao redor do feixe vascular mediano da lâmina foliar.

Os principais caracteres diagnósticos das folhas adultas das espécies estudadas de *Forsteronia* de cerrado referem-se às domácias; ocorrência, tipo e posição das estruturas secretoras e formato do feixe vascular mediano em secção transversal. Alguns caracteres destacam-se

Tabela 3. Caracteres diagnósticos levantados para *Forsteronia australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens* e *F. thyrsoides*. + = presença; – = ausência; P = padrão; S = sésseis; R = ramificado.

Table 3. Diagnostic character survey of *Forsteronia australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens* e *F. thyrsoides*. + = presence; – = absence; P = standard; S = sessile; R = branched.

	Caracteres diagnósticos	<i>F. australis</i>	<i>F. glabrescens</i>	<i>F. pubescens</i>	<i>F. thyrsoides</i>
Pecíolo	Contorno em secção transversal	achatado	cilíndrico	cilíndrico	achatado
	Cordões de floema acima do feixe vascular	+	–	–	+
	Hipoderme secretora	–	+	–	–
	Formato do feixe vascular	arco tênue	arco tênue	arco tênue	arco pronunciado (V)
	Posição dos idioblastos secretores	floema	floema e córtex	floema	córtex
Lâmina foliar	Domácias	+	+	–	–
	Indumento nas domácias	–	+		
	Idioblastos secretores na nervura mediana	+	+	–	–
	Aspecto do conteúdo dos idioblastos	granuloso	denso		
	Tipo de coléter axilar	P	S	P, S, R	P, S
	Tipo de mesofilo	dorsiventral	dorsiventral	homogêneo	dorsiventral
	Idioblastos cristalíferos	+	+	+	–
	Idioblastos secretores no córtex da nervura mediana	+	+	–	+
	Coléter axilar ramificado	–	–	+	–

pela facilidade de observação na lupa ou através da obtenção de cortes a mão livre, diferenciando *F. australis* de *F. glabrescens* e *F. pubescens* de *F. thyrsoides* (tabela 3).

Agradecimentos – As autoras agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa de doutorado (proc. 01/05341-3) e pelo auxílio à pesquisa do projeto temático (Biota/Fapesp proc. 00/12469-3) concedidos.

Referências bibliográficas

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA-TEIXEIRA, M.E.M. 1992. Anatomia do sistema aéreo vegetativo de *Mandevilla pohliana* (Stadelm.) A. Gentry (Apocynaceae). *Hoehnea* 19:39-50.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifer systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66:301-306.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23:113-120.
- BROUWER, Y.M. & CLIFFORD, H.T. 1990. An annotated list of domatia-bearing species. *Notes from the Jodrell Laboratory* 12:1-33.
- CLARK, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae s.l. *The Botanical Review* 66:1-56.
- FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda nerifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3:383-392.
- GERLACH, D. 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgart.
- GERRITS, P.A. 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands.
- GREGORY, M. 1990. Additional records of occurrence of domatia. *Notes from the Jodrell Laboratory* 12:34-50.
- HANSEN, B.F. 1985. A monographic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis. University of South Florida, Tampa.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae - *Forsteronia* G.Mey. In *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti, coords.). Fapesp, Rima, São Paulo, v.4, p.48-53.
- LERSTEN, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61:973-981.
- METCALFE, C.R. 1983. Secreted mineral substances. In *Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction* (C.R. Metcalfe & L. Chalk, eds.). Clarendon Press, Oxford, v.2, p.82-97.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject*. Clarendon Press, Oxford.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1982. Leaf architecture of Apocynaceae. *Proceedings of Indian Academy of Science (Plant Science)* 91:189-200.
- MONTEIRO, W.R., GIULIETTI, A.M., MAZZONI, S.C. & CASTRO, M.M. 1979. Hairs on reproductive organs of some Eriocaulaceae and their taxonomic significance. *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo* 7:43-59.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.
- RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. *Current Science* 18:520-522.
- RIO, M.C.S., CASTRO, M.M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:339-349.
- SMITH, F.H. & SMITH, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* 29:464-471.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. *Feddes Repertorium* 102:23-28.
- THOMAS, V., DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- WILKINSON, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). In *Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject* (C.R. Metcalfe & L. Chalk, eds.). Clarendon Press, Oxford, v.1, p.97-165.
- WILLIAMS, R.F., METCALFE, R.A. & GUST, L.W. 1982. The genesis of form in oleander (*Nerium oleander* L.). *Australian Journal of Botany* 30:677-687.

2. CAPÍTULO 2

Coléteres foliares em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado¹

MARIA CAROLINA S. DO RIO², LUIZA S. KINOSHITA² & MARÍLIA DE M. CASTRO^{2,3}

Título resumido: Coléteres foliares em *Forsteronia*

-
1. Parte da Tese de Doutorado de Maria Carolina Scatolin do Rio, Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas.
 2. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brasil.
 3. Autor para correspondência: mariliac@unicamp.br

ABSTRACT – (Foliar collectors of species of *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) in cerrados of São Paulo). The collectors of four cerrado species of *Forsteronia* (*F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg.) were investigated in order to determine in which stage of leaf development they produce mucilage, to establish its origin and position in leaf primordia and to describe its structure. Histochemical tests were performed in order to elucidate the chemical nature of the secretion produced by the foliar collectors of *F. glabrescens* in different vegetative nodes. The differentiation and the secretion occur in the early stages of leaf development, in primordia with less than 5 mm; the detection of mucilage on collector's secretion of the four species confirms the identification of these structures. All collectors originate from the foliar primordia. The marginal collectors originate from the stipular region. They are placed in interpetiolar position in young organs, but they are not permanent in adult organs. The axilar collectors originate from the axilar region of the primordia and they are placed on the base of the leaf blade upon the midrib in leaves completely developed. Standard, sessile and branched collectors were found in studied species; sessile collectors were found in three species, except *F. australis*, and branched collectors were found only in *F. pubescens*. In all types, the secretion is produced by a palisade epidermis that surrounds the central core of parenchymatic cells, independently if this central core is whole or branched. The foliar marginal collectors of *F. glabrescens* produce initially mucilage (second and third nodes) and become secretory of phenolic compounds in a second stage of secretion (third and fourth nodes).

Key words – Apocynaceae, foliar collectors, *Forsteronia*, mucilage, phenolics.

RESUMO – (Coléteres foliares em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrados paulistas). Os coléteres foliares de quatro espécies de *Forsteronia* (*F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg.) encontradas em cerrados paulistas foram estudados com o objetivo de determinar o estágio de desenvolvimento foliar em que se encontrem em fase secretora de mucilagem; definir sua origem e posição por primórdio foliar, e caracterizar a sua estrutura. Testes histoquímicos foram aplicados aos ápices vegetativos de *F. glabrescens* para determinar a natureza química do exsudato dos coléteres em diferentes nós. A diferenciação e a fase secretora dos coléteres ocorrem em estádios iniciais do desenvolvimento foliar, em primórdios foliares menores que 5 mm; a detecção de mucilagem na secreção dos coléteres nas quatro espécies confirma a identificação dessas estruturas. Todos os coléteres são formados no primórdio foliar. Os marginais originam-se na região correspondente à estípula, ocupam posição interpeciolar em ramos jovens e são caducos em órgãos adultos. Os axilares têm origem na axila do primórdio e posicionam-se sobre a nervura mediana na base da lâmina de folhas totalmente desenvolvidas. Coléteres dos tipos padrão, sésil e ramificado foram registrados nas espécies estudadas; sésil em três espécies, exceto *F. australis* e ramificado apenas em *F. pubescens*. Em todos os tipos, a secreção é produzida por uma epiderme em paliçada que reveste o eixo central parenquimático, seja ele ramificado ou inteiro. Os coléteres foliares marginais de *F. glabrescens* produzem inicialmente mucilagem (segundo e terceiro nós), passando a secretar compostos fenólicos em uma segunda fase de secreção (terceiro e quarto nós).

Palavras chave – Apocynaceae, coléteres foliares, compostos fenólicos, *Forsteronia*, mucilagem.

Introdução

Os coléteres são estruturas secretoras que produzem uma substância viscosa que lubrifica e protege gemas em início de desenvolvimento (Fahn 1979); sua secreção pode ser composta apenas por mucilagem (Fahn 1979, Thomas 1991), ou por uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979), incluindo os terpenos (Fahn 1990). Eles são encontrados em órgãos vegetativos, presentes nos ápices caulinares e primórdios foliares, e/ou reprodutivos de diversas famílias de dicotiledôneas (Thomas 1991). Estruturalmente, podem ser tricomas, emergências ou glândulas, se vascularizados (Fahn 1990).

Os coléteres receberam diferentes denominações ao longo do tempo, de acordo com sua posição ou identidade morfológica e estrutural com outras estruturas secretoras (Thomas 1991). Dentre essas denominações, destacam-se: “esquamelas” ou “glândulas” (Woodson & Moore 1938, Rao & Ganguli 1963, Ramayya & Bahadur 1968), “glandular shaggy hairs” (Metcalf & Chalk 1950, 1979), “glândulas resiníferas” (Subramanian *et al.* 1986). Os coléteres também foram equivocadamente interpretados como “nectários extraflorais” (Mohan & Inamdar 1986).

Em Apocynaceae, família atualmente composta por 335 gêneros e 3700 espécies (Judd *et al.* 2002), os coléteres são emergências ou glândulas persistentes registradas em ápices vegetativos, folhas, brácteas, bractéolas e cálice de 71 gêneros (Woodson & Moore 1938, Rao & Ganguli 1963, Ramayya & Bahadur 1968, Silva *et al.* 1975, Fjell 1983, Hansen 1985, Dave & Kuriachen 1987, Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1989a,b,c, 1990, 1991, Thomas 1991, Sennblad *et al.* 1998, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Rio *et al.* 2002, Schwarz & Furlan 2002, Simões 2004, Demarco 2005). Nas partes vegetativas, eles podem ocupar posição interpeciolar ou intrapeciolar (Sennblad *et al.* 1998, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000). A ocorrência dos coléteres não é universal na família, uma vez que estão ausentes em alguns

gêneros (Woodson & Moore 1938, Marcondes-Ferreira 1988, Sennblad *et al.* 1998, Demarco 2005).

Apesar de serem estruturas freqüentes na família, poucos trabalhos relacionados à estrutura, à distribuição, ao desenvolvimento e/ou à histoquímica dos coléteres de espécies de Apocynaceae foram realizados nos últimos anos, sendo citados aqueles efetuados em *Aganosma caryophyllata* G. Don. (Dave & Kuriachen 1987), *Allamanda cathartica* L., *Alstonia scholaris* L., *Nerium oleander* L. (= *N. indicum* Mill.; Thomas & Dave 1989a,b,c), *Roupelia grata* Wall. (Thomas *et al.* 1989). Os trabalhos que descrevem o modo de secreção de coléteres em *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1990), a ultra-estrutura dos coléteres de *Plumeria rubra* L. (Mohan & Inamdar 1986) e os aspectos filogenéticos de coléteres em Apocynaceae (Thomas & Dave 1991) também podem ser mencionados. Estudos envolvendo coléteres presentes em partes vegetativas de espécies brasileiras foram efetuados em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, *M. pohliana* (Stadelm.) A.H.Gentry (= *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson) (Appenzato-da-Glória & Estelita 2000), *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio *et al.* 2002), *Oxypetalum* R.Br. (Schwarz & Furlan 2002) e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. (Demarco 2005).

Forsteronia G.Mey. foi incluído na subfamília Apocynoideae Burnett, tribo Apocyneae Rchb. (Endress & Bruyns 2000). No entanto, um estudo filogenético com base em caracteres morfológicos e moleculares indicou que o gênero deveria ser reposicionado na tribo *Mesechiteae* Miers, de forma a torná-la monofilética (Simões *et al.* 2004). Seus representantes são lianas, raramente arbustos; constituem 46 espécies de distribuição neotropical, das quais 24 ocorrem no Brasil (Hansen 1985). Nove espécies podem ser encontradas no Estado de São Paulo, sendo cinco delas freqüentes em cerrado (Koch & Kinoshita 2005). Há registro da presença de glândulas nodais e foliares, posicionadas na base da nervura mediana, para todo o gênero; Hansen (1985) não as identificou como coléteres por não ter avaliado a secreção que produzem. Apesar disso,

essas estruturas foram consideradas coléteres em estudo taxonômico (Koch e Kinoshita 2005) e em estudo de anatomia foliar subsidiando a taxonomia de espécies de cerrado de *Forsteronia* (Rio *et al.* 2005; capítulo 1).

Tendo em vista a inexistência de dados anatômicos referentes às glândulas observadas em órgãos vegetativos de *Forsteronia*, o objetivo deste trabalho é verificar se as estruturas citadas como glândulas por Hansen (1985) e como coléteres por Koch & Kinoshita (2005) e por Rio *et al.* (2005; capítulo 1) podem ser consideradas coléteres por meio de estudos de secreção, origem, posição e caracterização anatômica. Para tanto, pretende-se avaliar a presença de mucilagem na secreção e determinar o estágio de desenvolvimento da folha em que as glândulas se encontrem em fase secretora; definir a origem e posição ocupada por estas estruturas no ápice caulinar vegetativo e caracterizar os tipos estruturais. Além disso, objetiva-se avaliar a natureza química do exsudato das glândulas de *F. glabrescens* com a aplicação de testes histoquímicos.

Material e métodos

Quatro espécies de *Forsteronia* encontradas em cerrados do Estado de São Paulo foram investigadas: *F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. thyrsoides* (Vell.) Müll.Arg. Ramos vegetativos com ápices caulinares e primórdios foliares foram coletados na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu e na Estação Ecológica e Experimental de Itirapina (tabela 1). Material testemunha para os oito indivíduos coletados foi incorporado ao Herbário UEC. Todo o material foi identificado pela Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita e pelo Dr. André Olmos Simões.

O material coletado foi fixado em FAA (formalina:ácido acético:álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940). Além disso, ápices caulinares de *F. glabrescens* também foram fixados em FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato:formalina, 9:1 v/v)

por 48 horas (Lillie 1948 *in* Clark 1973) e em SFF (sulfato ferroso em formalina; solução de sulfato ferroso:formalina 9:1 v/v) por 48 horas (Johansen 1940) para avaliação da natureza química do exsudato das glândulas. Todo o material foi mantido em mantido em vácuo durante a fixação e, em seguida, estocado em álcool etílico 70%.

Tabela 1. Lista das espécies estudadas de *Forsteronia*, material testemunha e fixadores utilizados (FAA = Formalina:Ácido acético:Álcool etílico 50%; FNT = Formalina Neutra Tamponada; SFF = Sulfato Ferroso em Formalina).

Table 1. List of studied species, voucher and fixatives utilized (FAA = formalin: acetic acid: etilic alcohol 50%; FNT = Buffered neutral formalin; SFF = Ferrous sulfate in formalin).

espécie	local	data	coletor	herbário	fixador
<i>F. australis</i>	Mogi Guaçu	06-I-2002	<i>MCS do Rio et al. 21</i>	UEC	FAA
	Mogi Guaçu	11-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 26</i>	UEC	FAA
<i>F. glabrescens</i>	Mogi Guaçu	22-XII-2001	<i>MCS do Rio et al. 19</i>	UEC	FAA, FNT, SFF
	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 22</i>	UEC	FAA, FNT, SFF
	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 24</i>	UEC	FAA, FNT, SFF
	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 25</i>	UEC	FAA, FNT, SFF
<i>F. pubescens</i>	Itirapina	8-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 28</i>	UEC	FAA
<i>F. thyrsoides</i>	Itirapina	8-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 33</i>	UEC	FAA

Ápices vegetativos foram isolados a partir dos ramos fixados. As peças foram transferidas para álcool butílico 70, desidratadas pela série butílica e incluídas em “paraplast” (Johansen 1940). Secções seriadas longitudinais e transversais com espessura de 10µm foram obtidas com o uso de micrótomo rotativo.

Para o estudo estrutural, as secções foram coradas com Safranina alcoólica 0,25% e Azul de Astra aquoso 1% (Gerlach 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética Permunt. Para a avaliação da presença de mucilagem na secreção, secções de material fixado em FAA das quatro espécies foram coradas com Vermelho de Rutênio (Gregory & Baas 1989).

Para o estudo histoquímico de *F. glabrescens*, secções obtidas do material fixado em FAA, considerado um bom fixador para substâncias hidrossolúveis, foram utilizados para os testes que evidenciam polissacarídeos (incluindo mucilagem), proteínas e compostos fenólicos hidrossolúveis; em FNT, adequado para fixação de substâncias lipofílicas, para os testes que evidenciam lipídios totais (incluindo ácidos graxos livres) e compostos fenólicos lipossolúveis, e em SFF, fixador específico para compostos fenólicos, para confirmar os resultados obtidos para compostos fenólicos.

Os seguintes tratamentos foram efetuados para evidenciar as principais classes de metabólitos da secreção dos coléteres de *F. glabrescens*:

- a. Vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989);
- b. Ácido tânico/cloreto de ferro III para mucilagem (Pizzolato & Lillie 1973);
- c. Azul de Alcian para mucopolissacarídeos ácidos (Pearse 1985);
- d. Reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reagent) para polissacarídeos totais (McManus 1948);
- e. Azul brilhante de Comassie para proteínas totais (Fisher 1968);
- f. Preto de Sudão B para lipídios totais (Pearse 1985);
- g. Sulfato azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947, Jensen 1962);
- h. Acetato de cobre/ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969, 1970);
- i. Cloreto de ferro III para compostos fenólicos totais (Johansen 1940);
- j. Dicromato de potássio para compostos fenólicos totais (Gabe 1968).

Secções obtidas do material fixado em SFF foram desparafinizadas, diafanizadas e montadas em resina sintética; as lâminas resultantes dos demais tratamentos foram montadas em gelatina glicerinada.

Ápices caulinares inteiros foram submetidos a uma solução de extração de lipídios (metanol:clorofórmio:água:HCl, 66:33:4:1 v/v; High 1984) por 48h à temperatura ambiente e

utilizados para a realização dos controles negativos dos testes para substâncias lipofílicas. Após a extração, parte do material foi fixado em FNT e parte em SFF; após a fixação, esse material recebeu o mesmo tratamento para inclusão e seccionamento que as demais peças. Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados segundo as indicações nas respectivas técnicas. O controle para o teste que evidencia proteínas não foi realizado.

Após observação e análise do laminário, o registro dos aspectos importantes foi efetuado através de fotomicrografias coloridas obtidas em microscópio Olympus BX51 com a utilização de filme Kodak ProImage 100; as escalas foram obtidas através da projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. As fotomicrografias foram digitalizadas com alta resolução (600 dpi) e as pranchas de ilustrações montadas em meio digital.

Resultados

Os coléteres são encontrados em fase secretora de mucilagem no início do desenvolvimento dos primórdios foliares dos ápices caulinares vegetativos de *F. australis* (figuras 1-3, 23-24), *F. glabrescens* (figuras 4-6, 25-47), *F. pubescens* (figuras 7-14, 29-32) e *F. thyrsoidea* (figuras 15-22, 33-35). Para fins elucidativos, os nós vegetativos foram numerados de acordo com a ordem crescente a partir do ápice caulinar vegetativo do ramo. Dessa forma, o primeiro nó vegetativo é subsequente ao ápice, o segundo nó é subsequente ao primeiro, e assim por diante (figura 4).

No primeiro nó vegetativo de *F. glabrescens*, os coléteres ainda não se formaram (figura 4). A presença de mucilagem na secreção das células epidérmicas dos coléteres de todas as espécies (figuras 23-24, 26-35) foi evidenciada pelo Vermelho de rutênio no segundo e terceiro nós vegetativos, com primórdios foliares de até 5 mm de comprimento.

Os coléteres foliares de *Forsteronia* são marginais ou axilares, de acordo com a região do primórdio foliar em que se originam. Essa terminologia foi definida pelas autoras e será utilizada para diferenciar os coléteres, de acordo com a sua origem, durante a descrição anatômica detalhada. Os coléteres marginais têm origem na região lateral do primórdio foliar que seria correspondente à estípula, quando esta ainda está unindo os dois primórdios do nó, que apresentam filotaxia oposta (figuras 21-22). Os coléteres axilares originam-se na axila do primórdio, e encontram-se uniformemente distribuídos (figuras 7-14). Em órgãos completamente desenvolvidos, os coléteres marginais são caducos, restando apenas cicatrizes em posição interpeciolar; os axilares ficam reduzidos a pequenas estruturas senescentes posicionadas na base da lâmina foliar, sobre a superfície adaxial da nervura mediana. O número de coléteres marginais e axilares por nó vegetativo é variável nas espécies estudadas (tabela 2). Essa variação também é observada entre indivíduos da mesma espécie e em órgãos distintos de um mesmo indivíduo.

Tabela 2. Posição no primórdio foliar, número por nó vegetativo e tipos estruturais dos coléteres foliares nas espécies de *Forsteronia*.

Table 2. Position on leaf primordia, number on each vegetative node and structural types of foliar colleters on species of *Forsteronia*.

espécie	posição	número	tipos
<i>F. australis</i>	marginal	6	padrão
	axilar	4-6	padrão
<i>F. glabrescens</i>	marginal	6-8	padrão
	axilar	4-6	séssil
<i>F. pubescens</i>	marginal	4-8	padrão; séssil
	axilar	4-16	séssil; ramificado
<i>F. thyrsoides</i>	marginal	6	padrão
	axilar	4-8	padrão; séssil

Três tipos estruturais distintos de coléteres foliares foram encontrados nas espécies de *Forsteronia*: padrão, ramificado e sésil (tabela 2). O tipo padrão (figuras 1-5, 24-25) é formado por um eixo de células parenquimáticas rodeado por uma epiderme secretora unisseriada em paliçada sobre um pedúnculo curto, onde as células epidérmicas são cúbicas e não apresentam atividade secretora; o conjunto é recoberto por uma fina cutícula (figura 25). O tipo sésil (figuras 6, 26-27) não possui pedúnculo e sua paliçada secretora é extremamente espessa. Os coléteres ramificados são semelhantes àqueles do tipo padrão em corte longitudinal; no entanto, apresentam uma base alargada e ramificam-se em dois ou três a partir da região mediana em corte transversal (figuras 7-14); em microscopia de luz, a ramificação só pode ser detectada através da observação de secções seriadas. As células epidérmicas em paliçada dos coléteres, responsáveis pela secreção do exsudato, têm paredes celulares finas, citoplasma denso e núcleo relativamente grande, características comuns a células secretoras (figuras 24, 27-42). Células com retração do protoplasto são observadas em ambas as faces dos coléteres axilares (figura 2; seta) ou em apenas uma delas (figura 24; seta) em *F. australis*, e em ambas as faces dos coléteres marginais de *F. glabrescens* (figuras 26, 28). A secreção é evidenciada dentro das células (figuras 23-24, 26-28, 31-32, 34-42), retida no espaço entre a célula e a cutícula (figuras 36, 42) e no meio extracelular (figuras 40-41). A distensão da cutícula ocorre (figuras 38-39), embora o seu rompimento não tenha sido observado. Nenhum dos coléteres apresenta tecido vascular ou modificações estruturais como presença de tricomas e laticíferos.

Em *F. glabrescens*, o Negro de Sudão evidenciou a fina cutícula que recobre os coléteres (figura 25). A secreção das células epidérmicas dos coléteres marginais e axilares do segundo e terceiro nós, e dos axilares do quarto nó apresentam resultado positivo (tabela 3) para mucilagem (figuras 36-39), mucilagens ácidas (figuras 26-28) e polissacarídeos totais (figuras 40-47). Hifas de fungos foram registradas ao redor dos coléteres (figuras 28, 46).

Durante a fase secretora de mucilagem, as células epidérmicas dos coléteres marginais e axilares apresentam resultado negativo para compostos fenólicos (figuras 48-51). A partir do terceiro nó vegetativo, as células secretoras do ápice dos coléteres marginais apresentam resultado positivo para compostos fenólicos (figura 52). Do quarto nó em diante, todas as células epidérmicas dos coléteres marginais têm compostos fenólicos no protoplasto (figuras 53-54). Isso indica que os coléteres marginais têm uma segunda fase de secreção, onde predominam os compostos fenólicos. Nessa fase, a secreção foi observada apenas no interior das células parenquimáticas e epidérmicas do coléter, e hifas de fungos não foram registradas no material (figuras 52-54).

Discussão

Os coléteres foliares de *Forsteronia* encontram-se em fase secretora de mucilagem em estádios muito iniciais do desenvolvimento da folha (coléteres marginais, segundo ao terceiro nós; coléteres axilares, segundo ao quarto nós vegetativos), em primórdios com ca. 5 mm de comprimento, o que confirma a identificação dessas estruturas. Segundo Thomas (1991), os coléteres começam a secretar antes da expansão da lâmina foliar, o que foi observado nas espécies de *Forsteronia* estudadas e, anteriormente, para *P. coalita* (Rio *et al.* 2002). A natureza mucilaginosa da secreção e a fase inicial de desenvolvimento foliar em que os coléteres são encontrados em fase secretora estão relacionadas à função que essas estruturas desempenham, de lubrificar e proteger gemas em início de desenvolvimento (Fahn 1979). Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com outros descritos para Apocynaceae, onde os coléteres foliares são ativos apenas em estádios iniciais de desenvolvimento do órgão em que se encontram (Appezato-da-Glória & Estelita 2000, Rio *et al.* 2002, Demarco 2005).

Tabela 3. Tratamentos aplicados aos coléteres foliares de *Forsteronia glabrescens* (M = coléteres marginais; A = coléteres axilares; – = negativo; + = fraco positivo; ++ = positivo; +++ = forte positivo).

Table 3. Treatments applied to foliar colleters of *Forsteronia glabrescens* (M = marginal colleters; A = axilar colleters; – = negative; + = weak positive; ++ = positive; +++ = strong positive).

Tratamento (substância evidenciada)	Cor (resultado positivo)	2º nó		3º nó		4º nó	
		M	A	M	A	M	A
vermelho de rutênio (mucilagens ácidas)	vermelho a rosa	++	++	++	++	–	++
ácido tânico/Cloreto de ferro III (mucilagem)	preto	++	++	++	++	–	++
azul de Alcião (mucopolissacarídeos ácidos)	azul	–	–	–	–	–	–
reação PAS (polissacarídeos totais)	rosa a púrpura	+++	+++	+++	+++	–	+++
azul brilhante de Comassie (proteínas)	azul	–	–	–	–	–	–
negro de Sudão B (lipídios totais)	azul, preto ou castanho escuro	–	–	–	–	–	–
sulfato azul do Nilo (lipídios ácidos/neutros)	azul/rosa	– / –	– / –	– / –	– / –	– / –	– / –
acetato de cobre/ácido rubeânico (ácidos graxos)	verde escuro	–	–	–	–	–	–
cloreto de ferro III (compostos fenólicos)	castanho escuro	–	–	+	–	++	–
dicromato de potássio (compostos fenólicos)	castanho avermelhado	–	–	+	–	++	–
sulfato ferroso em formalina (compostos fenólicos)	castanho escuro	–	–	++	–	+++	–

De acordo com a posição de origem no primórdio foliar, os coléteres das espécies de *Forsteronia* são marginais ou axilares. Essa terminologia foi definida pelas autoras e utilizada para a caracterização dos coléteres em estudo de anatomia foliar (Rio *et al.* 2005; capítulo 1). Todos os coléteres marginais são originados a partir das expansões laterais da base do primórdio

foliar, região correspondente às estípulas. Apenas os coléteres axilares têm origem na região axilar do primórdio foliar. Dessa forma, a teoria proposta por Woodson & Moore (1938) de que todos os coléteres têm origem estipular em Apocynaceae é confirmada no caso dos marginais de *Forsteronia*, que ocuparão posição interpeciolar em órgãos jovens. No entanto, devido à presença de coléteres axilares em *Forsteronia* e em outras espécies de Apocynaceae (Rio *et al.* 2002, Schwarz & Furlan 2002, Demarco 2005), o estudo dos coléteres foliares deveria ser estendido para outras espécies da família com o objetivo de reavaliar a teoria proposta por Woodson & Moore (1938).

Os coléteres marginais das espécies estudadas de *Forsteronia* são caducos em órgãos adultos, restando apenas cicatrizes em posição interpeciolar, que dificulta a sua observação em ramos completamente desenvolvidos. Geralmente as emergências são persistentes, no entanto, os coléteres marginais apresentam um eixo parenquimático muito reduzido, composto por poucas camadas de células, o que dificulta a permanência dessas estruturas nos ramos adultos. Isso mostra a necessidade de investigar meristemas e órgãos jovens para o estudo dos coléteres, pois apesar destes já terem sido observados em órgãos vegetativos de 53 gêneros de Apocynaceae, com ocorrência registrada para pecíolos em todos os casos e para lâmina foliar apenas em *Blepharodon*, *Forsteronia*, *Mandevilla* e *Oxypetalum* (Woodson & Moore 1938, Ramayya & Bahadur 1968, Silva *et al.* 1975, Fjell 1983, Hansen 1985, Dave & Kuriachen 1987, Thomas *et al.* 1989, Thomas & Dave 1989a,b,c, 1990, 1991, Thomas 1991, Sennblad *et al.* 1998, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Rio *et al.* 2002, Schwarz & Furlan 2002, Koch & Kinoshita 2005, Demarco 2005), eles podem estar ausentes em alguns gêneros da família (Marcondes-Ferreira 1988; Sennblad *et al.* 1998, Demarco 2005). Os coléteres axilares de *Forsteronia* são persistentes e posicionam-se na base da lâmina foliar de folhas adultas, sobre superfície adaxial da nervura mediana. Coléteres nessa posição são freqüentes nas espécies da

tribo *Mesechiteae* (Endress & Bruyns 2000, Simões 2004), onde *Forsteronia* foi posicionado recentemente (Simões *et al.* 2004).

Sobreposições no número de coléteres foliares foram observadas no ápice vegetativo de todas as espécies estudadas de *Forsteronia*. Essa variação ocorre entre indivíduos da mesma espécie e em diferentes nós vegetativos de um mesmo indivíduo. Embora o número e a posição dos coléteres já tenham sido referidos como caracteres taxonômicos relevantes para as espécies de Apocynaceae (Woodson & Moore 1938, Schwarz & Furlan 2002, Rio & Kinoshita 2005), estudos quantitativos, envolvendo a investigação de um maior número de indivíduos provenientes de diferentes localidades, associada a uma análise estatística dos dados, são necessários para avaliar a plasticidade desse caráter nas espécies de *Forsteronia* e definir a sua utilidade para fins taxonômicos. Variações no número de coléteres nas folhas de uma mesma espécie já foram registradas para a família (Thomas 1991). Ramayya & Bahadur (1968) observaram 10-13 coléteres foliares em *Allamanda cathartica* L., enquanto Thomas & Dave (1989a) registraram apenas quatro a seis coléteres foliares para esta espécie. Diferentes números de coléteres peciolares também foram referidos para *Thevetia peruviana* (Pers.) K.Schum. (Thomas 1991, Fjell 1983). Segundo Thomas (1991), o número de coléteres de uma mesma espécie pode variar de acordo com a sua distribuição geográfica.

A maioria dos coléteres observados em espécies de *Forsteronia* é do tipo padrão (“standard” – S) descrito por Lersten (1974), caracterizado pela presença de um eixo alongado recoberto por epiderme em paliçada sobre um pedúnculo curto. A terminologia definida por Lersten (1974), proposta para coléteres de Rubiaceae, tem sido amplamente utilizada para a descrição dos coléteres de várias famílias, inclusive Apocynaceae (Thomas 1991, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000, Rio *et al.* 2002, Simões 2004). No entanto, além desse tipo, coléteres sésseis ocorrem em três das espécies estudadas de *Forsteronia*, já que *F. australis* apresenta

apenas coléteres do tipo padrão. Coléteres ramificados foram encontrados somente em *F. pubescens*. Tais tipos estruturais foram registrados em estudo de anatomia foliar realizado nas espécies de *Forsteronia* de cerrado, sendo utilizados para separar as espécies semelhantes em estágio vegetativo: *F. australis*, com coléteres axilares do tipo padrão, diferencia-se de *F. glabrescens*, que apresenta coléteres sésseis nessa posição; *F. pubescens*, com coléteres axilares ramificados, distingue-se de *F. thyrsoides*, onde este tipo de coléter não ocorre (Rio *et al.* 2005).

Os coléteres de *Forsteronia glabrescens* produzem polissacarídeos (incluindo mucilagem) em uma primeira fase de secreção, diferentemente do que foi registrado nos coléteres foliares de *Blepharodon bicuspidatum* Fourn., que produzem uma mistura de mucilagem e lipídios (Demarco 2005). A partir do terceiro nó, uma segunda fase de secreção foi observada apenas nos coléteres marginais de *F. glabrescens*, quando as células epidérmicas produzem compostos fenólicos. A presença de compostos lipofílicos em células epidérmicas de coléteres em fase pós-secretora de mucilagem foi registrada anteriormente em espécies de *Mandevilla* (Appenzato-da-Glória & Estelita 2000).

Agradecimentos – As autoras agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa de doutorado (proc. nº 01/05341-3) e pelo auxílio à pesquisa do projeto temático (Biota/Fapesp proc. nº 00/12469-3) concedidos.

Referências bibliográficas

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23:113-120.

- CAIN, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88:383-392.
- CLARK, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- DAVE, Y. & KURIACHEN, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. *Pakistan Journal of Botany* 19:243-248.
- DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae *s.l.*). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae *s.l.* The *Botanical Review* 66:1-56.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.
- FAHN, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FISHER, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16:92-96.
- FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3:383-392.
- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie, Paris.
- GANTER, P. & JOLLES, G. 1969, 1970. Histologie normale et pathologique. Vols. I e II. Gauthier – Villars, Paris.
- GERLACH, D. 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgart.
- GREGORY, M. & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- HANSEN, B.F. 1985. A monographic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis, University of South Florida, Tampa.

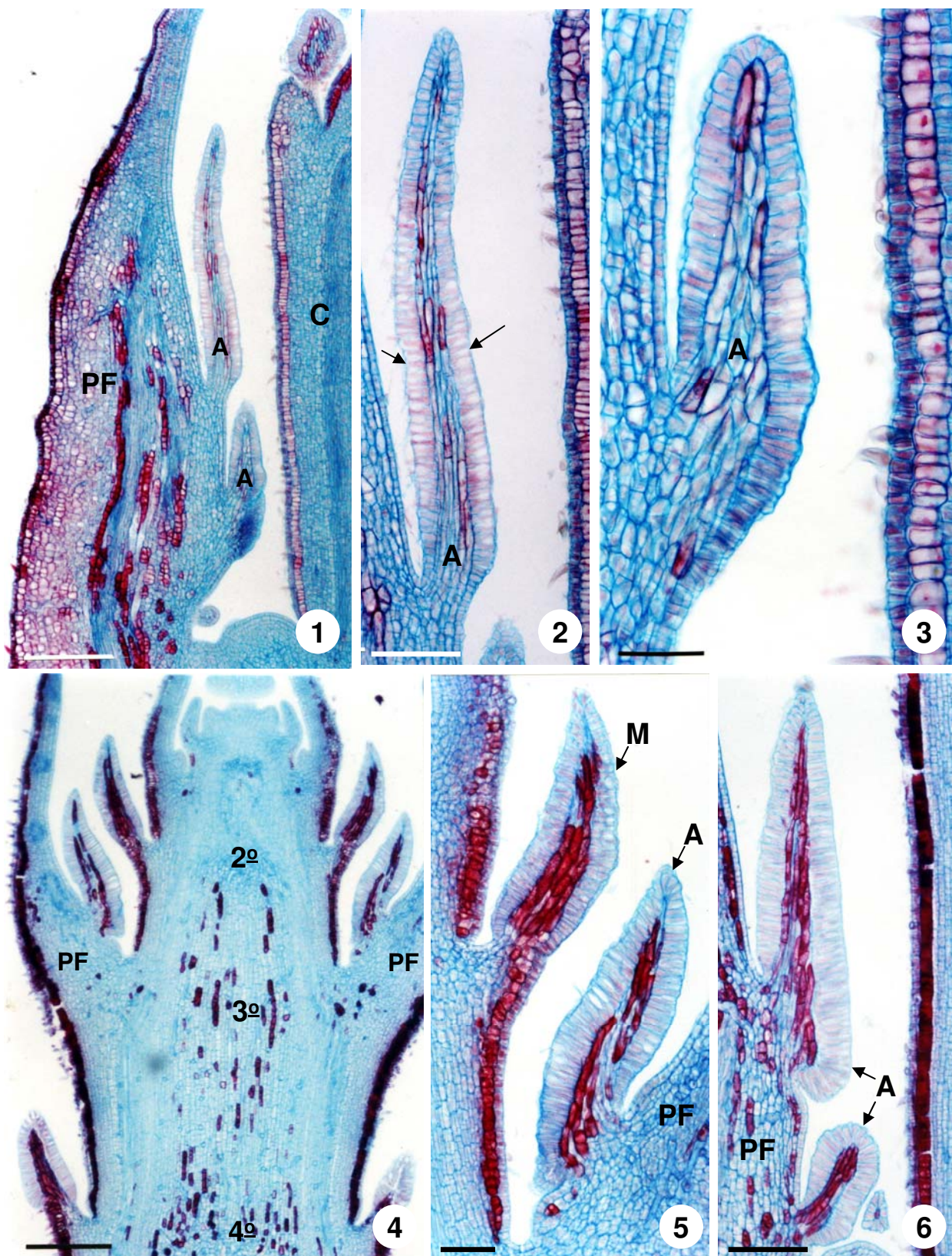
- HIGH, O.B. 1984. Lipid histochemistry. Oxford University Press, New York.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 2002. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae - *Forsteronia* G.Mey. In Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti, coords.). Fapesp, Rima, São Paulo, v.4, p.48-53.
- LERSTEN, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). American Journal of Botany 61:973-981.
- MARCONDES-FERREIRA, W. 1988. *Aspidosperma* Mart. *nom. cons.* (Apocynaceae): estudos taxonômicos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MCMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technology 23:99-108.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press, Oxford.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry, theoretical and applied. C. Livingstone, Edinburgh.

- PIZZOLATO, T.D. & LILLIE, R.D. 1973. Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21:56-64.
- RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the “squamellae” in the light of their ontogeny. *Current Science* 18:520-522.
- RAO, V.S. & GANGULI, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42:419-435.
- RIO, M.C.S.; CASTRO, M.M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:339-349.
- RIO, M.C.S. & KINOSHITA, L.S. 2005. *Prestonia* R.Br. (Apocynaceae) no Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 32:233-258.
- RIO, M.C.S.; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M.M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Revista Brasileira de Botânica* 28:713-726.
- SCHWARZ, E.A. & FURLAN, A. 2002. Coléteres foliares de *Oxypetalum* R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) – Aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). *Acta Biologica Paranaense* 31:79-97.
- SENNBLAD, B.; ENDRESS, M.E. & BREMER, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe *Wrightieae* (Apocynaceae) revisited. *American Journal of Botany* 85:1143-1158.
- SILVA, N.M.F.; VALENTE, M.C.; ALENCASTRO, F.M.M.R.; PEREIRA, J.F. & SUCRE, B.D. 1975. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras – X. Estudo taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. *Revista Brasileira de Biologia* 35:745-756.

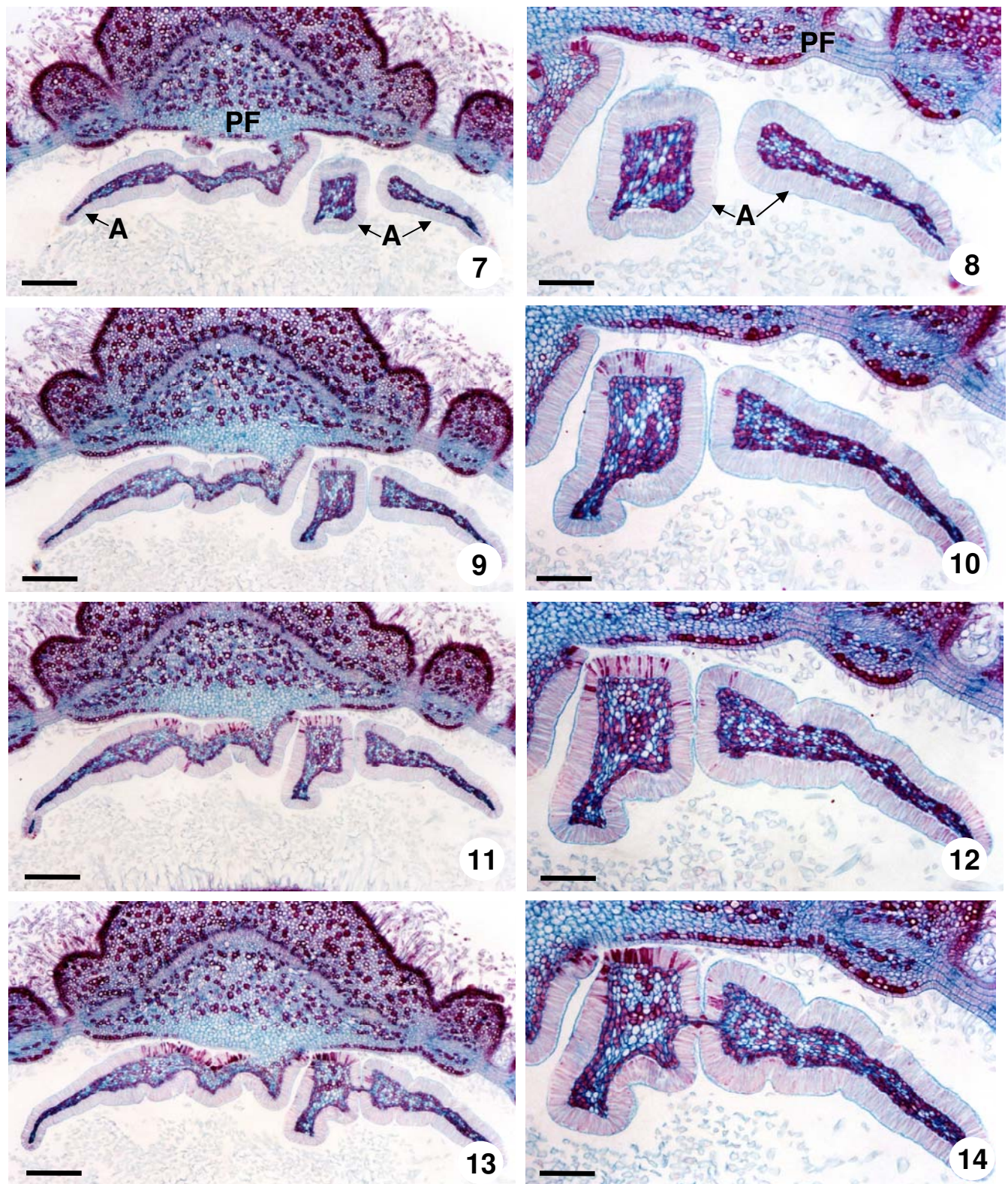
- SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo *Mesechiteae* Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SIMÕES, A.O.; ENDRESS, M.E.; VAN DER NIET, T.; KINOSHITA, L.S. & CONTI, E. 2004. Tribal and intergeneric relationships of *Mesechiteae* (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence from three noncoding plastid DNA regions and morphology. *American Journal of Botany* 91:1409-1418.
- SUBRAMANIAN, R.B.; MURUGAN, V.; MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Plant Science* 99:423-429.
- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contactor* 6:25-29.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1990. Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton* 30:209-212.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. *Feddes Repertorium* 102:23-28.

- THOMAS, V.; DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleter in *Roupelia grata* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.
- WOODSON, R.E. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.

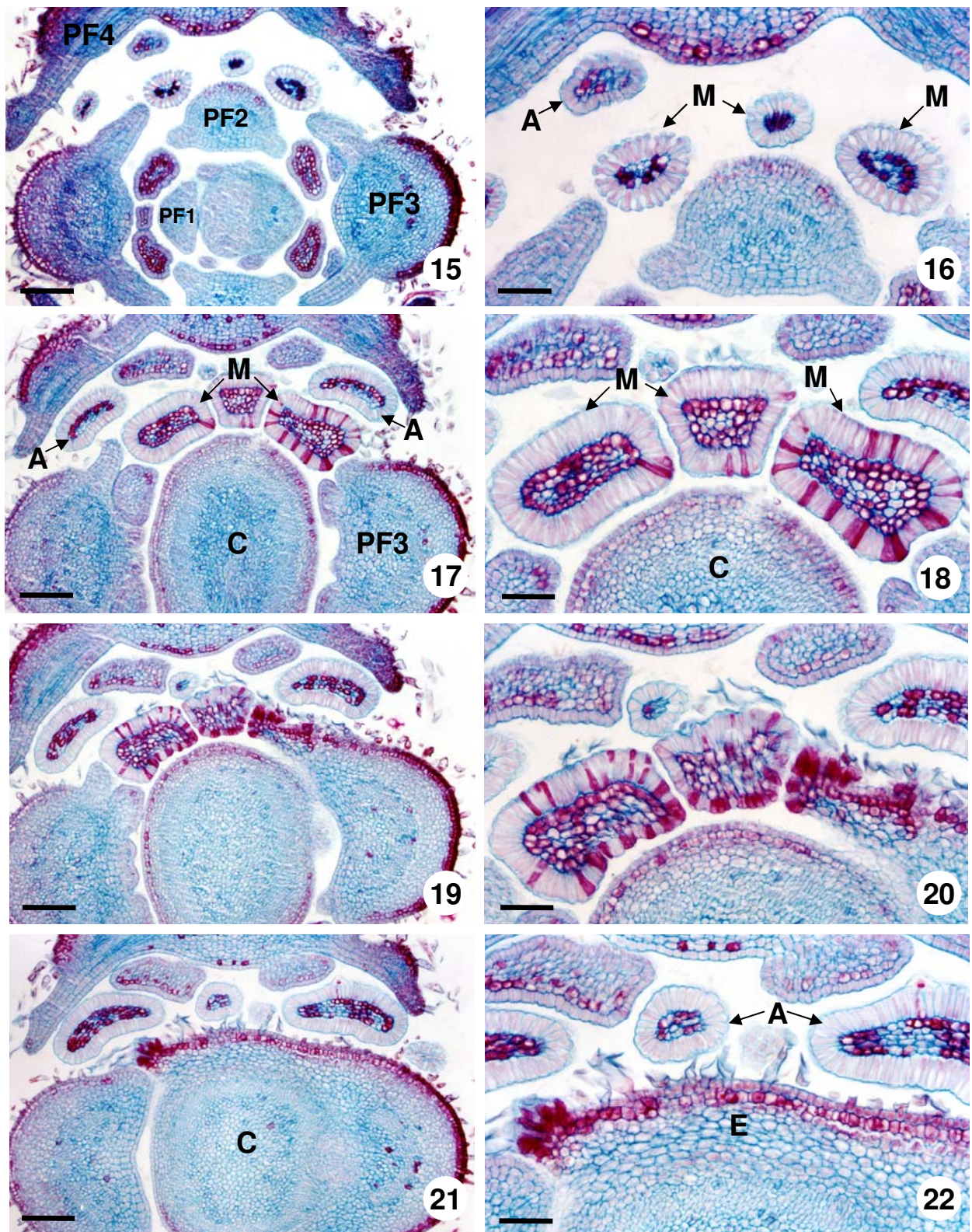
ILUSTRAÇÕES



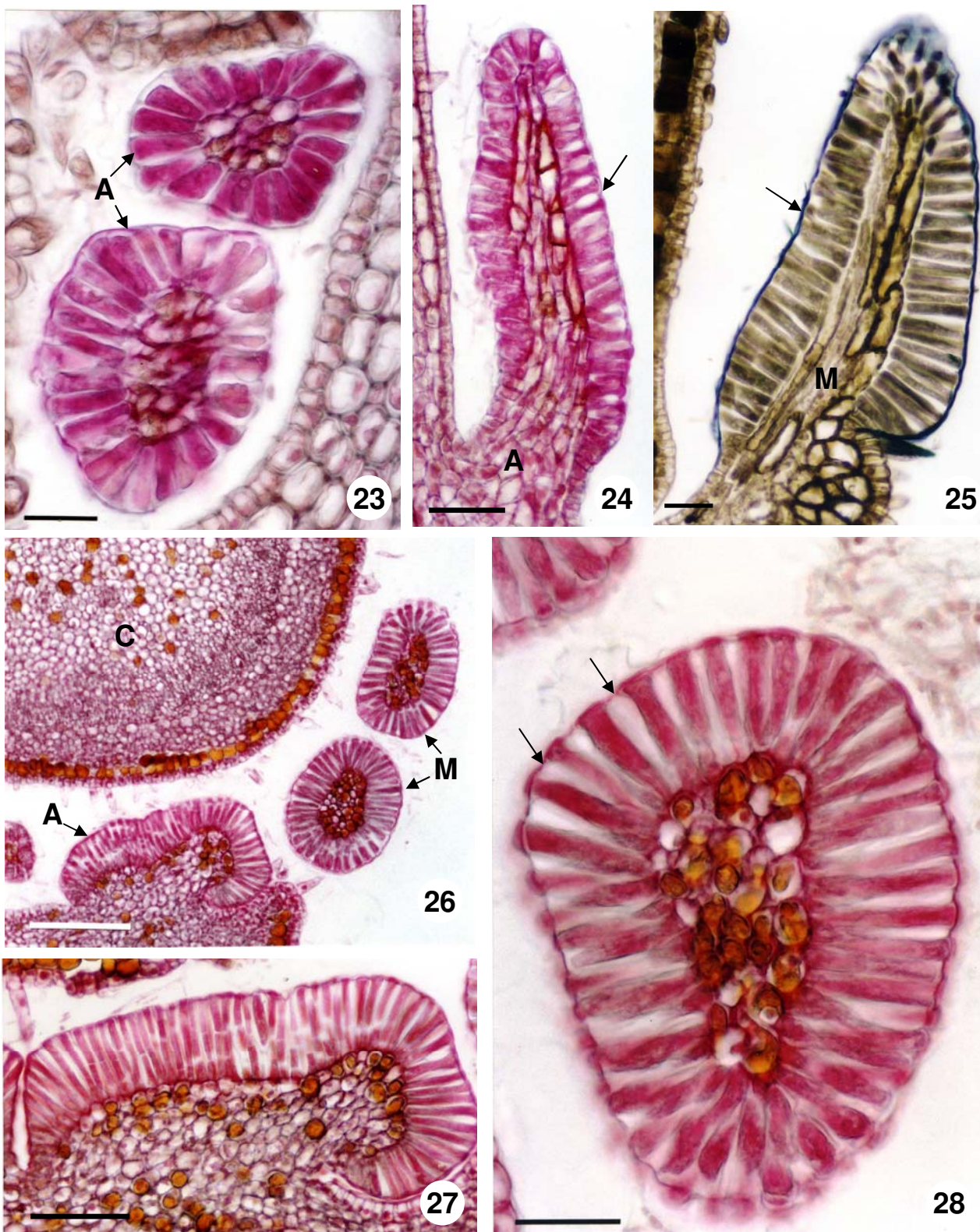
Figuras 1-6. Secções longitudinais de ápice caulinar vegetativo de *F. australis* (1-3) e *F. glabrescens* (4-6). **1.** Vista geral do primórdio foliar (PF) no terceiro nó, com coléteres axilares (A). **2.** Coléter axilar (A); células epidérmicas com protoplasto retraído (setas). **3.** Outro coléter axilar (A), de tamanho reduzido. **4.** Vista geral do ápice, mostrando coléteres no segundo (2º), terceiro (3º) e quarto (4º) nós. **5.** Coléteres marginal (M) do segundo nó e axilar (A) do primórdio foliar no terceiro nó. **6.** Coléteres axilares (A). **2, 5.** Pormenores das figuras 1 e 4, respectivamente. PF = primórdio foliar; C = caule; A = coléter axilar; M = coléter marginal. Barras = 200µm (1, 4), 100µm (2, 6), 50µm (3, 5).



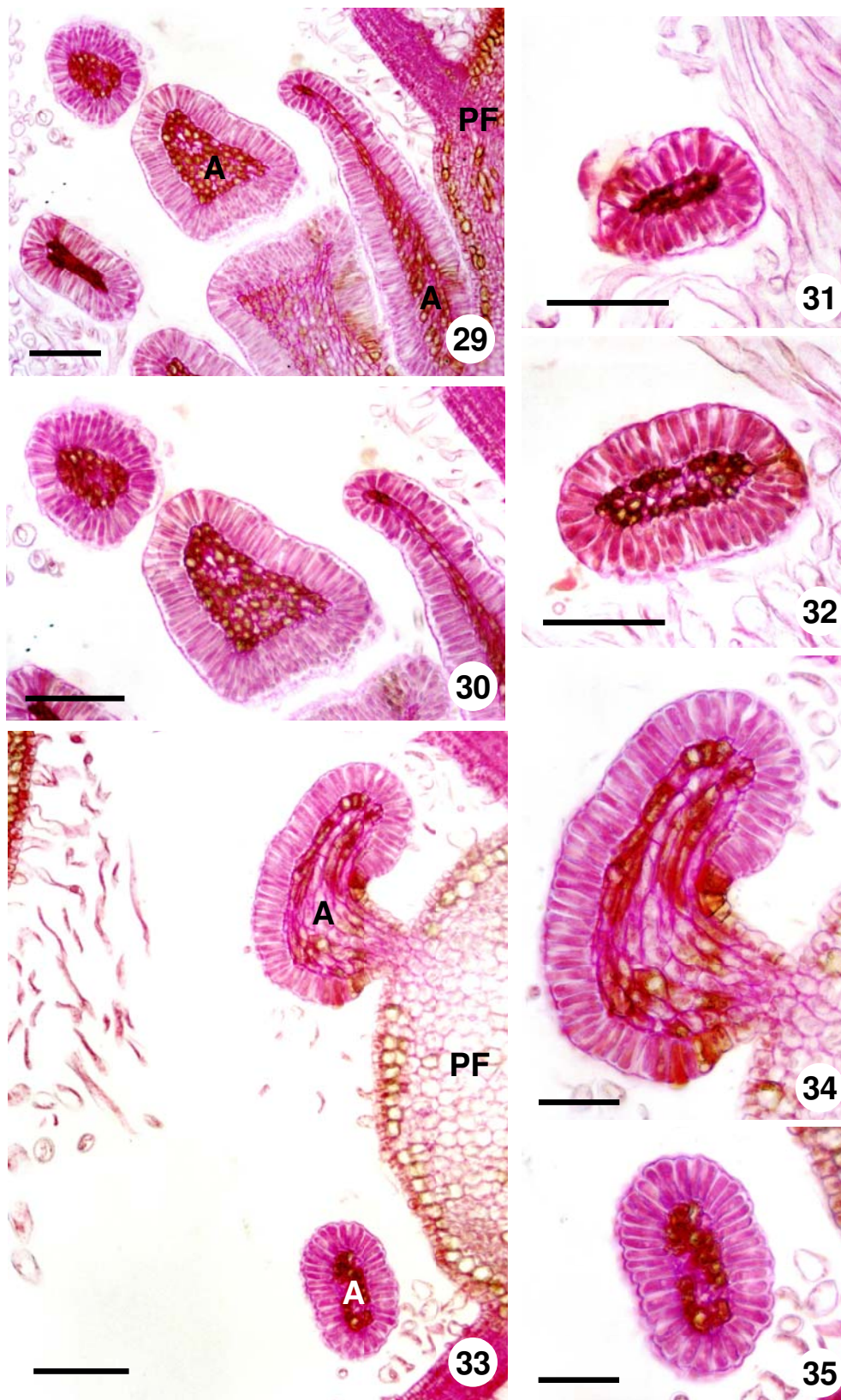
Figuras 7-14. Secções transversais de primórdio foliar (PF) do terceiro nó vegetativo de *F. pubescens*, com coléteres axilares (A). **7.** Ápice dos coléteres. **8.** Detalhe do ápice bifurcado do coléter. **9, 11.** Região mediana dos coléteres. **10.** Detalhe do coléter recém separado. **12.** Detalhe do coléter ainda unido pela epiderme; **13.** Região basal dos coléteres. **14.** Detalhe do coléter unido por células parenquimáticas. **8, 10, 12, 14.** Pormenores das figuras 7, 9, 11 e 13 respectivamente. PF = primórdio foliar; A = coléter axilar. Barras = 200µm (7, 9, 11, 13), 100µm (8, 10, 12, 14).



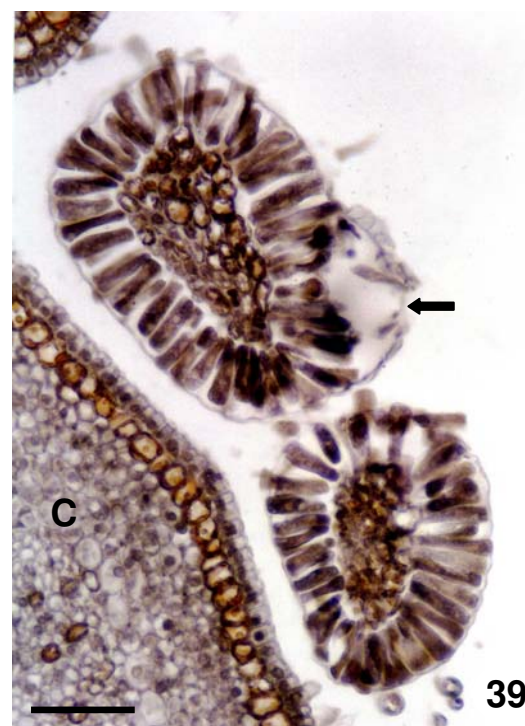
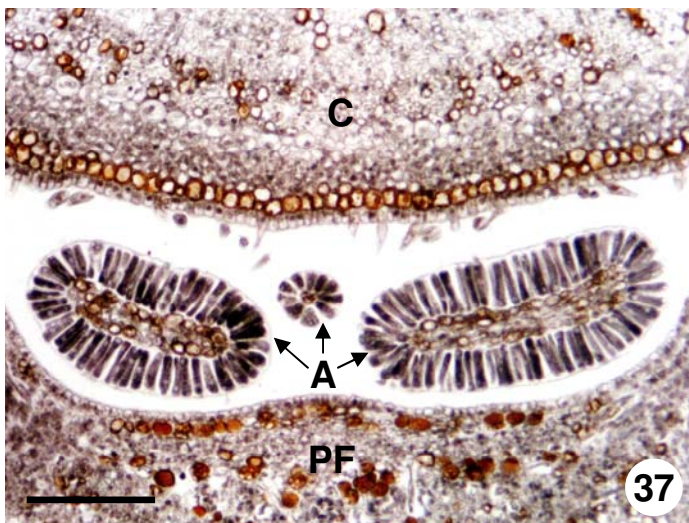
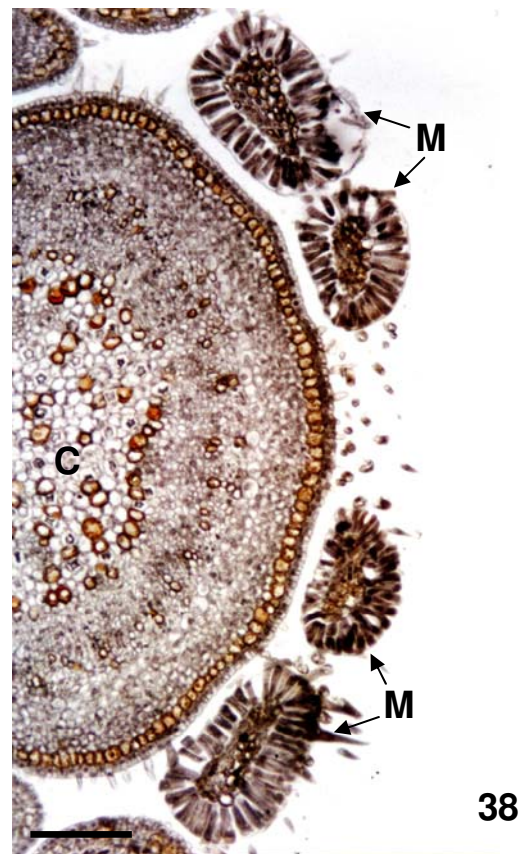
Figuras 15-22. Seções transversais de ápice caulinar vegetativo de *F. thyrsoides*. **15.** Vista geral dos primórdios do primeiro ao quarto nó vegetativo (PF1, PF2, PF3 e PF4), com coléteres marginais. **16.** Detalhe do ápice dos coléteres marginais (M) do terceiro nó e axilar (A) do quarto nó; células epidérmicas dos coléteres marginais com retração do protoplasto. **17-22.** Coléteres foliares, primórdios do terceiro nó (PF3). **17.** Vista geral dos coléteres marginais (M) e axilares (A). **18.** Detalhe da região mediana dos coléteres marginais (M); células com conteúdo fortemente corado. **19.** Vista geral, base dos coléteres axilares e marginais; **20.** Detalhe da base dos coléteres marginais. **21.** Vista geral do caule (C), separação do primórdio foliar. **22.** Detalhe da região correspondente à estípula (E). **16, 18, 20, 22.** Pormenores das figuras 15, 17, 19 e 21 respectivamente. PF = primórdio foliar; C = caule, A = coléter axilar; M = coléter marginal; E = região estipular. Barras = 200µm (15, 17, 19, 21), 100µm (16, 18, 20, 22).



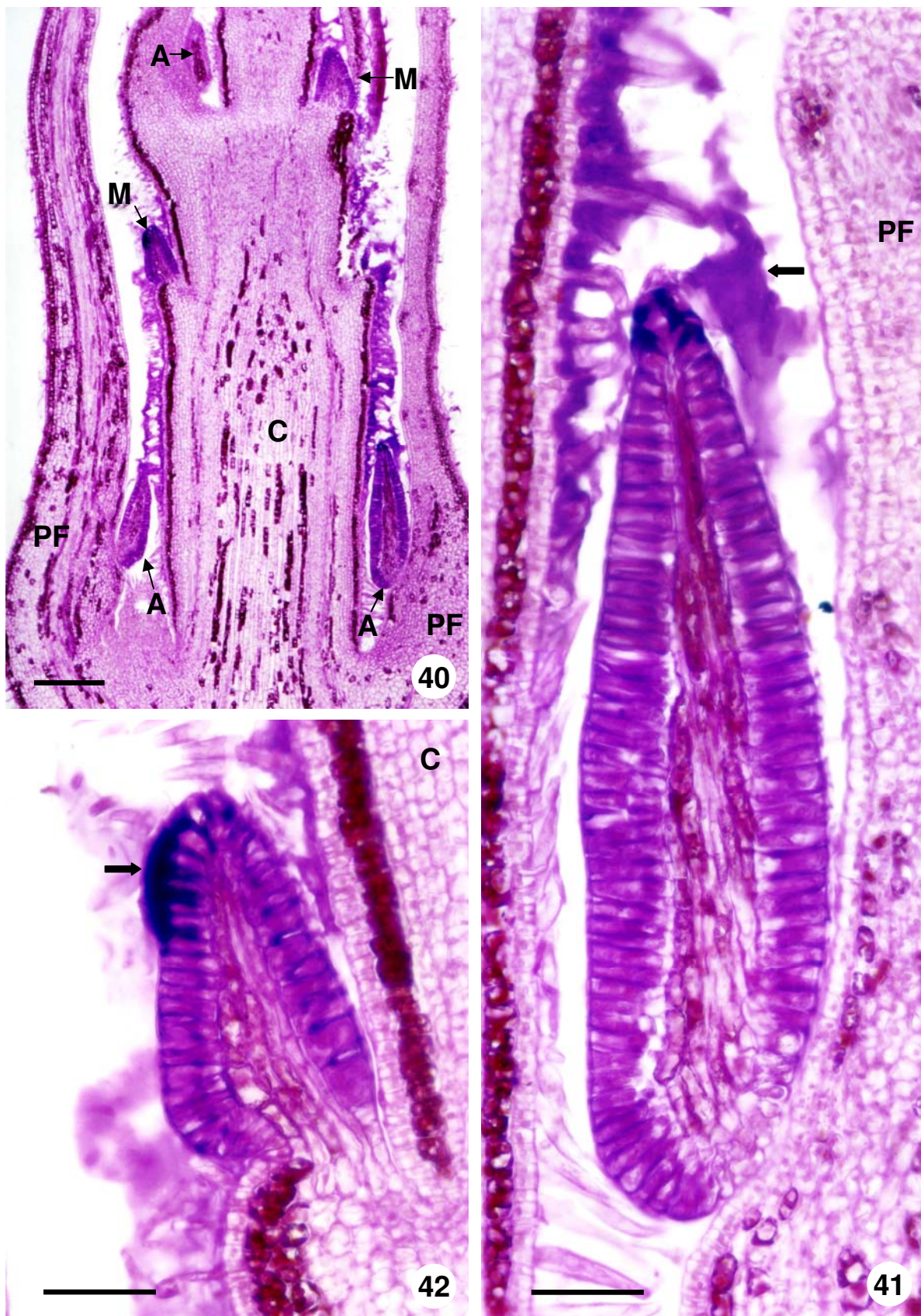
Figuras 23-28. Seções transversais (23, 26-28) e longitudinais (24-25) de coléteres foliares do terceiro nó vegetativo de *F. australis* (23-24) e *F. glabrescens* (25-28). **23-24, 26-28.** Seções coradas com Vermelho de Rutênio, células epidérmicas com resultado positivo para mucilagens ácidas. **25.** Seção corada com Negro de Sudão B, evidenciando a fina cutícula que recobre o coléter (seta). **23.** Coléteres axilares (A). **24.** Epiderme secretora em paliçada; retração do protoplasto de algumas células (seta). **25.** Coléter marginal (M). **26.** Vista geral, dois coléteres marginais (M) e um axilar (A). **27.** Detalhe da base de um coléter axilar, ligada ao primórdio foliar. **28.** Detalhe de um coléter marginal; retração do protoplasto de algumas células epidérmicas (setas). A = coléter axilar; M = coléter marginal; C = caule. Barras = 100µm (26), 50µm (24, 27), 25µm (23, 25, 28).



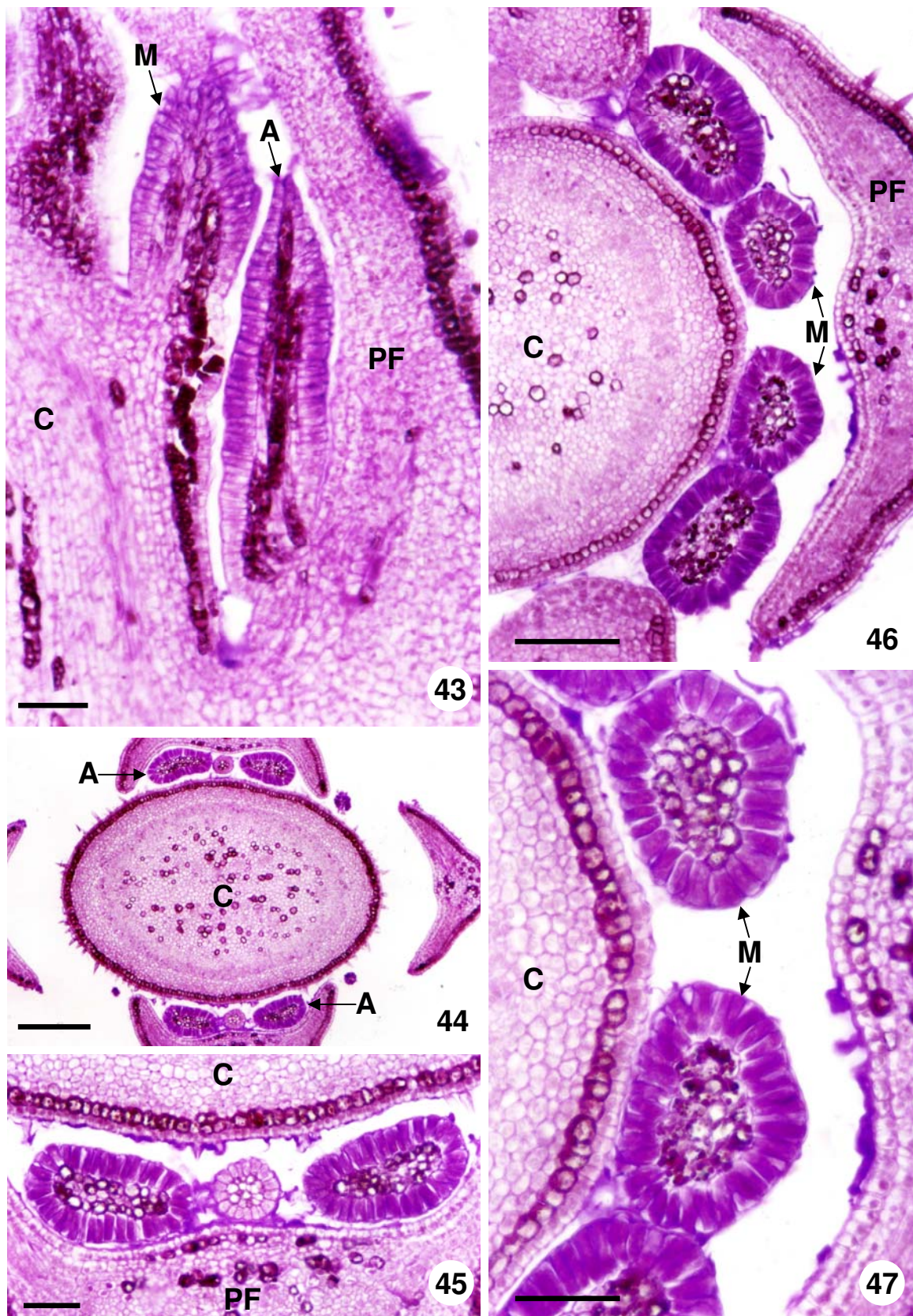
Figuras 29-35. Seções transversais de coléteres axilares (A) do terceiro nó vegetativo de *F. pubescens* (29-32) e *F. thyrsoides* (33-35) coradas com Vermelho de Rutênio; mucilagens ácidas evidenciadas no interior das células epidérmicas. **29.** Vista geral dos coléteres axilares. **30.** Pormenor da figura 29. **31.** Ápice de um coléter. **32.** Base desse coléter. **33.** Vista geral dos coléteres axilares. **34-35.** Pormenores da figura 33; secreção no interior das células epidérmicas. A = coléter axilar; PF = primórdio foliar. Barras = 100 μ m (29-33); 50 μ m (34-35).



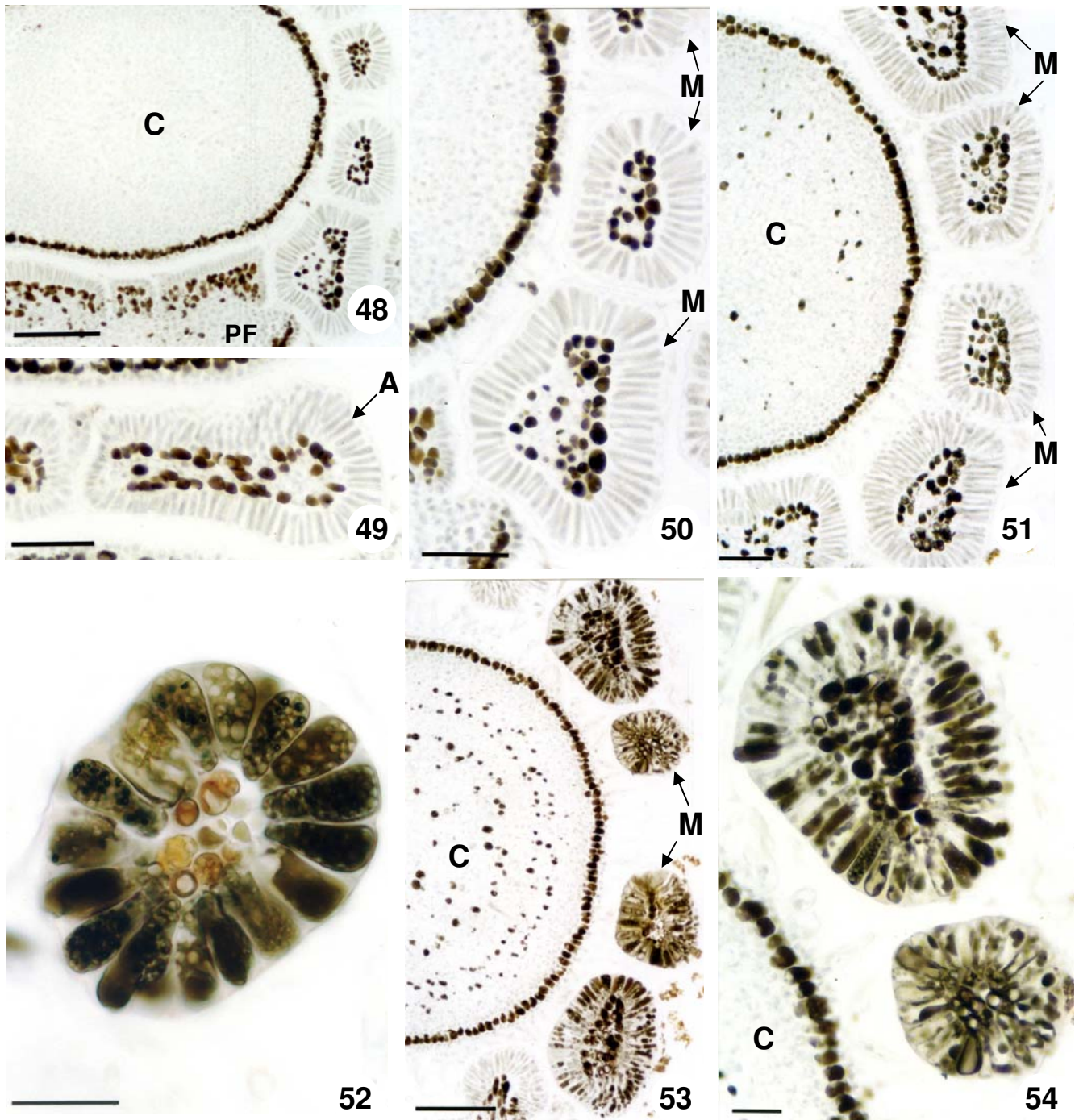
Figuras 36-39. Secções longitudinal (36) e transversais (37-39) de coléteres marginais (M) e axilares (A) do terceiro nó vegetativo de *F. glabrescens* coradas com Ácido Tânico e Cloreto de Ferro III. **36.** Mucilagem evidenciada no interior das células epidérmicas e sob a cutícula (seta). **37-39.** Mucilagem evidenciada no interior das células epidérmicas. **37.** Vista geral, três coléteres axilares (A). **38.** Coléteres marginais (M). **39.** Pormenor da figura 38; detalhe do coléter marginais com cutícula distendida (seta). A = coléter axilar; C= caule; M = coléter marginal; PF = primórdio foliar. Barras = 100 µm (38); 50 µm (36-37, 39).



Figuras 40-42. Secções longitudinais de ápice caulinar vegetativo de *F. glabrescens* submetidas à reação PAS. **40.** Vista geral do ápice, coléteres marginais (M) no primeiro e segundo nós, e axilares (A) nos primórdios foliares (PF) do primeiro e terceiro nós. **41.** Pormenor da figura 40; polissacarídeos totais evidenciados no interior das células e no meio extracelular (seta). **42.** Coléter marginal do segundo nó; secreção acumulada sob a cutícula (seta). A = coléter axilar; C = caule; M = coléter marginal; PF = primórdio foliar. Barras = 200 μ m (40); 50 μ m (41-42).



Figuras 43-47. Seções longitudinal (43) e transversais (44-47) de ápice caulinar vegetativo de *F. glabrescens* submetidas à reação PAS. **43.** Coléter marginal (M) do primeiro nó e axilar (A) do segundo nó; início da fase secretora. **44.** Coléteres axilares (A) do terceiro nó. **45.** Detalhe dos coléteres axilares; polissacarídeos totais evidenciados no interior das células e no meio extracelular. **46.** Coléteres marginais (M) do terceiro nó. **47.** Detalhe dos coléteres marginais (M). **45, 47.** Pormenores da figura 44 e 46 respectivamente. A = coléter axilar; C = caule; M = coléter marginal; PF = primórdio foliar. Barras = 200 µm (44); 100 µm (46); 50 µm (43, 45, 47).



Figuras 48-54. Secções transversais de ápice caulinar vegetativo de *F. glabrescens* fixado em SFF, com coléteres foliares. **48-51.** Células epidérmicas dos coléteres destituídas de compostos fenólicos; segundo (48-50) e terceiro (51) nós. **48.** Coléteres marginais e base dos coléteres axilares unidos ao primórdio foliar. **49.** Detalhe de coléter axilar (A). **50.** Pormenor da figura 48; detalhe dos coléteres marginais (M). **51.** Vista geral, coléteres marginais (M). **52-54.** Células epidérmicas dos coléteres possuem compostos fenólicos; terceiro (52) e quarto (53-54) nós. **52.** Detalhe do ápice de coléter marginal. **53.** Vista geral da região mediana dos coléteres marginais (M). **54.** Pormenor da figura 53; detalhe dos coléteres marginais. A = coléter axilar; C = caule; M = coléter marginal; PF = primórdio foliar. Barras = 100µm (48, 52), 50µm (49-51), 25µm (53-54).

3. CAPÍTULO 3

Histoquímica da hipoderme e de laticíferos de ápice caulinar vegetativo de *Forsteronia glabrescens* Müll.Arg. (Apocynaceae)¹

Introdução

As Apocynaceae são bastante interessantes do ponto de vista fitoquímico pela presença de glicosídeos cardiotônicos, alcalóides e látex em seus representantes (Rizzini & Mors 1976). Alguns desses compostos do metabolismo secundário estão relacionados à presença de estruturas secretoras nos órgãos vegetativos e reprodutivos, sendo que vários tipos já foram mencionados para a família: tricomas, coléteres, idioblastos, cavidades, laticíferos, osmóforos e nectários (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, Metcalfe 1983; Thomas 1991; Stranghetti & Kinoshita 1996; Galetto 1997; Torres & Galetto 1998; Sennblad *et al.* 1998).

Poucos estudos relacionados à ontogênese, estrutura e histoquímica dos laticíferos de espécies de Apocynaceae têm sido efetuados nos últimos anos, destacando-se aqueles realizados por Mahlberg (1961, 1963), Murugan & Inamdar (1987a, b), Thomas & Dave (1994), Appezzato-da-Gloria & Estelita (1997), Sachetti *et al.* (1999), Aguiar (2003) e Demarco (2005). Em geral, eles são descritos como não-articulados (Metcalfe 1967), embora os dois tipos de laticíferos (articulados e não-articulados) já tenham sido encontrados em diversas espécies, com ocorrência concomitante ou não (Wilson & Maxam 1987, Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, Demarco 2005).

Forsteronia é um gênero composto por 46 espécies de distribuição Neotropical, das quais 24 ocorrem no Brasil (Hansen 1985) e nove no Estado de São Paulo. Duas espécies

¹ Trabalho desenvolvido na disciplina NT257C – Tópicos especiais e projetos em Anatomia Vegetal, no período de abril a maio de 2003, ministrada pela Dr^a Lia Ascensão (FAPESP, proc. 02/13532-6).

apresentam importância medicinal e/ou farmacológica: *F. gracilis* (Benth.) Müll.Arg., que é utilizada por comunidades tradicionais da Guiana contra doenças de pele e como inibidor de veneno de sapo (DeFilipps *et al.* 2004), e *F. refracta* Müll.Arg, que possui um flavonóide com atividade contra proliferação de células cancerígenas isolado a partir de extratos de folhas (Smith *et al.* 2005).

Dentre as nove espécies do gênero que ocorrem no Estado de São Paulo, cinco podem ser encontradas em áreas de cerrado (Koch & Kinoshita 2005). Quatro tipos de estruturas secretoras foram identificados em partes vegetativas de espécies de *Forsteronia* de cerrado: idioblastos dispersos em vários tecidos, desde o ápice caulinar até órgãos adultos, incluindo caule e folhas; hipoderme secretora em caules jovens e pecíolos; laticíferos, presentes em praticamente todos os órgãos analisados, com látex branco leitoso; e dois tipos distintos de coléteres foliares, de acordo com a sua origem (Rio *et al.* 2005, capítulo 1; Rio *et al.*, capítulo 2). Tais estruturas secretoras já foram registradas em outras espécies de cerrado: idioblastos e hipoderme secretora, em espécies de Leguminosae (Alvez 2006); laticíferos e coléteres, em espécies de Apocynaceae (Demarco 2006).

Durante o estudo dos coléteres foliares de *Forsteronia glabrescens* Müll.Arg. (Rio *et al.*, capítulo 2), verificou-se a ocorrência de sobreposição de resultados de testes histoquímicos para o conteúdo das células que constituem a hipoderme secretora presente no ápice caulinar vegetativo, que se mostrou positivo para mucilagem, lipídios totais e compostos fenólicos (Rio, observação pessoal).

Diante da sobreposição de resultados para a hipoderme secretora no caule jovem de *F. glabrescens*, propõe-se a aplicação de outros testes histoquímicos, incluindo-se os de microscopia de fluorescência, visando elucidar se a hipoderme é constituída por três tipos de células secretoras considerando-se a natureza química do material secretado – células mucilaginosas, resiníferas e taníferas – ou se tais células produzem conteúdo heterogêneo de natureza mista (mucilagem, lipídios e compostos fenólicos). Além disso, frente à importância

dos laticíferos em Apocynaceae, o estudo histoquímico do conteúdo dos laticíferos presentes no ápice vegetativo será realizado com o objetivo de avaliar a natureza química do látex, contribuindo para o conhecimento dessas estruturas.

Material e métodos

Ramos vegetativos com ápices caulinares em bom estado foram coletados a partir de três indivíduos previamente marcados na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu. As viagens foram realizadas de março a abril de 2004. O material testemunha está depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC): BRASIL: São Paulo: Mogi Guaçu, 22/XI/2001, *M.C.S. do Rio et al. 19* (UEC); Mogi Guaçu, 21/X/2002, *M.C.S. do Rio et al. 24* (UEC); Mogi Guaçu, 21/X/2002, *M.C.S. do Rio et al. 25* (UEC). O material foi coletado com lâmina de aço aquecida, acondicionado em sacos plásticos úmidos no campo e, posteriormente, colocado em recipiente com água no Laboratório de Anatomia Vegetal, para a obtenção de cortes de material fresco. Alguns ápices foram fixados em FAA (formalina:ácido acético:álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24h (Johansen 1940) e em FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato:formalina, 9:1 v/v) por 48h (Lillie 1948 *in* Clark 1973), mantidos em vácuo e estocados em etanol 70%, garantindo assim que os materiais fresco e fixado utilizados no trabalho tenham sido coletados a partir dos mesmos indivíduos e na mesma época do ano.

Para o estudo do material fresco e fixado, os ápices foram isolados dos ramos e seccionados transversalmente à mão livre com o auxílio de lâminas de aço descartáveis, sendo as secções colocadas em água destilada ou etanol 70%.

Cerca de quinze testes histoquímicos foram aplicados às secções de caule jovem:

- a. Vermelho neutro para detecção de lipídios totais através de fluorescência (Kirk 1970);
- b. Negro de Sudão B para detecção de lipídios totais (Pearse 1980);
- c. Sulfato azul do Nilo para diferenciação entre lipídios ácidos e neutros (Cain 1947);
- d. Reagente de NADI para detecção de essências e ácidos resiníferos (David & Carde 1964);

- e. Acetato de cobre/ácido rubeânico para detecção de ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969/1970);
- f. Tricloreto de antimônio para caracterização de esteróides (Hardman & Sofowora 1972, Mace *et al.* 1974);
- g. Cloreto de ferro III (Johansen 1940) e dicromato de potássio (Gabe 1968) para detecção de compostos fenólicos totais;
- h. Vanilina clorídrica para identificação de taninos (Mace & Howell 1974);
- i. Ácido periódico/reagente de Schiff (Reação PAS) para a caracterização de polissacarídeos totais (McManus 1948);
- j. Vermelho de rutênio para detecção de mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989);
- k. Ácido tânico/cloreto de ferro III para detecção de mucilagem (Pizzolato & Lillie 1973);
- l. Reagente de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983) e reagente de Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para a detecção de alcalóides;
- m. Azul de bromofenol para detecção de proteínas (Mazia *et al.* 1953).

Os testes para lipídios e compostos fenólicos foram aplicados em material fixado em FNT, adequado para fixação de compostos lipofílicos, enquanto os testes para polissacarídeos, em material fixado em FAA, considerado um bom fixador para carboidratos, proteínas e compostos fenólicos hidrossolúveis. Para a realização dos controles dos testes para substâncias lipofílicas em material fixado, os ápices inteiros foram submetidos à extração de lipídios com uma mistura de Metanol:Clorofórmio:Água:Ácido Clorídrico (66:33:4:1 v/v; High 1984) por 48h à temperatura ambiente e fixados, posteriormente, em FNT e SFF. Para o material fresco, as secções foram submetidas à mesma solução de extração de lipídios a 60°C por 1h no caso de testes para identificação de substâncias lipofílicas (lipídios ou compostos fenólicos). Para os demais testes, os controles foram realizados de acordo com as instruções contidas nas respectivas técnicas.

Fotomicrografias coloridas das secções que apresentaram resultado positivo para cada teste, assim como de material sem nenhum tratamento (branco) observado em luz branca, luz fluorescente ultravioleta (UV) e luz fluorescente azul, foram obtidas em microscópio Olympus BX51 com uso de filme Kodak ProImage 100 ou Kodak Gold 100. As fotomicrografias foram digitalizadas com alta resolução (600 dpi) e as pranchas de ilustrações montadas em meio digital.

Resultados

Os dados referentes aos testes histoquímicos aplicados às secções frescos e fixados são apresentados na Tabela 1. As ilustrações representam os principais dados obtidos referentes à hipoderme (figuras 1-9) e aos laticíferos (figuras 10-25), estando ilustrados os resultados obtidos em material fresco (figuras 1-5 e 10-22) e fixado (figuras 6-9 e 23-25).

Hipoderme secretora

As células presentes na hipoderme do caule jovem de *Forsteronia glabrescens* possuem conteúdo incolor (figura 1) em material fresco e âmbar (figura 6) no fixado em FNT. O conteúdo destes idioblastos apresentou uma coloração azul (considerada fraco positivo) com o reagente de NADI (figura 2). A reação obtida com o acetato de cobre/ácido rubeânico evidenciou a presença de ácidos graxos no conteúdo das células da hipoderme, tanto no material fresco (figura 3) como no fixado (figura 7). O conteúdo dos idioblastos teve resultado negativo para os testes que evidenciam lipídios totais em material fresco e fixado (tabela 1). O mesmo ocorreu com os testes azul do Nilo e tricloreto de antimônio, o que indica ausência de lipídios neutros ou ácidos e de esteróides respectivamente (tabela 1).

As células da hipoderme foram intensamente coradas pelo cloreto de ferro III em material fresco (figura 4) e fixado (figura 8); o mesmo aconteceu com a aplicação do dicromato de potássio (figuras 5, 9), testes que evidenciam a presença de compostos fenólicos. No entanto, estes fenólicos não são taninos, uma vez que estes não foram detectados pelo teste

com a vanilina clorídrica (tabela 1). Todos os testes utilizados para a detecção de polissacarídeos, alcalóides e proteínas (tabela 1) apresentaram resultado negativo, tanto no material fresco quanto no fixado em FAA.

Laticíferos

Os laticíferos presentes no ápice vegetativo de *F. glabrescens* possuem conteúdo cinza, tanto em material fresco (figura 10) quanto em fixado em FNT (figura 23). Todos os testes realizados para lipídios totais apresentaram resultado positivo (tabela 1). São eles: autofluorescência em material fresco, em luz UV (figura 11) e em luz azul (figura 12); vermelho neutro, através de indução de fluorescência secundária (figura 13); e negro de Sudão (figuras 14-15). O teste com azul do Nilo evidenciou a natureza neutra dos lipídios presentes no conteúdo dos laticíferos (figuras 16-17), enquanto o reagente de NADI evidenciou óleos essenciais no látex, devido à coloração azul obtida (figuras 18-19). A reação com o acetato de cobre/ácido rubeânico detectou ácidos graxos no conteúdo dos laticíferos, tanto no material fresco (figuras 20-21) como no fixado. O teste com o tricloreto de antimônio apresentou resultado negativo para esteróides (tabela 1).

O látex foi fortemente corado de castanho avermelhado pelo dicromato de potássio, tanto no material fresco (figura 22) como no fixado (figura 24), o mesmo aconteceu com o cloreto de ferro III no material fixado (figura 25); estes testes evidenciam a presença de compostos fenólicos totais no conteúdo dos laticíferos (tabela 1). Os compostos fenólicos encontrados não são taninos, uma vez que estes não foram detectados pelo teste com a vanilina clorídrica (tabela 1). Os testes para alcalóides apresentaram resultado fraco positivo (tabela 1). Proteínas e polissacarídeos não foram observados no conteúdo dos laticíferos; todos os testes para estas substâncias resultaram negativo tanto no material fresco quanto no fixado (tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos aplicados às secções de material fresco e fixado de caule jovem de *Forsteronia glabrescens* Müll.Arg. (- = negativo; +: fraco positivo; ++: positivo; /: teste não realizado).

TRATAMENTO (substância a ser evidenciada)	HIPODERME (figura)		LATICIFERO (figura)	
	fresco	fixado	fresco	fixado
branco	incolor (1)	âmbar (6)	cinza (10)	cinza (23)
branco – luz UV	—	/	azul (11)	/
branco – luz Azul	—	/	verde (12)	/
vermelho neutro – luz Azul (lipídios totais)	—	/	++ amarelo (13)	/
negro de Sudão B (lipídios totais)	—	—	++ preto (14, 15)	++ preto
sulfato azul do Nilo (lipídios ácidos e <u>neutros</u>)	—	—	++ púrpura (16,17)	++ púrpura
reagente de NADI (<u>óleos essenciais</u> e ácidos resiníferos)	+ azul (2)	/	++ azul (18,19)	/
acetato de cobre/ácido rubeânico (ácidos graxos)	++ verde escuro (3)	++ preto (7)	++ verde escuro (20, 21)	++ preto
tricloreto de antimônio (esteróides)	—	—	—	—
cloreto de ferro III (compostos fenólicos totais)	++ verde escuro (4)	++ preto (8)	+ castanho	++ preto (25)
dicromato de potássio (compostos fenólicos totais)	++ castanho avermelhado (5)	++ castanho avermelhado (9)	++ castanho avermelhado (22)	++ castanho avermelhado (24)
vanilina clorídrica (taninos)	—	—	—	—
reação PAS (polissacarídeos totais)	—	—	—	—
vermelho de rutênio (mucilagens ácidas)	—	—	—	—
ácido tânico/cloreto de ferro III (mucilagem)	—	—	—	—
reagente de Dragendorff (Alcalóides)	—	—	+ castanho claro	+ castanho claro
reagente de Wagner (Alcalóides)	—	—	+ castanho claro	+ castanho claro
azul de bromofenol mercúrio (proteínas)	—	—	—	—

Discussão

A secreção presente na hipoderme é heterogênea e constituída por uma mistura de ácidos graxos e compostos fenólicos (não incluindo a classe dos taninos). Várias funções dos compostos fenólicos encontrados em plantas já foram propostas e documentadas, como proteção contra radiação ultravioleta e defesa contra patógenos e herbivoria, devido à natureza adstringente e tóxica destes compostos (Beckman 2000, Yoshitama 2000). É provável que a hipoderme encontrada no caule jovem de *Forsteronia glabrescens* desempenhe essas funções, pois trata-se de uma liana de cerrado e os ápices caulinares vegetativos muitas vezes se encontram expostos a altos níveis de radiação solar e ao possível ataque de herbívoros. A ocorrência de hipoderme secretora de compostos fenólicos e substâncias lipofílicas foi registrada em folhas de espécies de cerrado pertencentes à família Leguminosae, como *Acosmium subelegans* (Mohlenbr.) Yakolev e *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Alves 2006); no entanto, essa não é uma característica presente em todas as espécies de cerrado, uma vez que a hipoderme não foi observada em *Aspidosperma australe* Müll.Arg. e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn., espécies de Apocynaceae estudadas por Demarco (2005).

Em *F. glabrescens*, o conteúdo dos laticíferos tem aspecto denso e ocupa todo o espaço intracelular; é provável que o látex seja constituído pelo próprio protoplasto da célula, como foi proposto por Milanez (1946) ao reconhecer a natureza protoplásmica do látex de *Hevea brasiliensis* Müll.Arg. Dessa forma, o látex preenche totalmente o laticífero, sendo que sua secreção só é liberada para o meio extracelular se o tecido for injuriado (Milanez 1946). Frente à ocorrência de laticíferos articulados ou não-articulados nas Apocynaceae (Wilson & Maxan 1987, Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, Demarco 2005), estudos detalhados sobre a ontogênese dos laticíferos de *Forsteronia* são necessários para a determinação do seu tipo estrutural.

Os resultados dos testes histoquímicos indicam que o látex presente nos laticíferos do ápice vegetativo de *Forsteronia glabrescens* é uma emulsão de substâncias lipofílicas, incluindo

lipídios neutros, ácidos graxos e compostos fenólicos; os alcalóides também estão presentes. De acordo com os dados existentes para a família Apocynaceae, a composição do látex varia de acordo com a espécie considerada: além dos compostos fenólicos, lipídios neutros, ácidos graxos e alcalóides presentes no látex de *F. glabrescens*, lipídios de várias classes e proteínas também foram registrados (Appenzato-da-Gloria & Estelita 1997, Aguiar 2003). Nos laticíferos dos frutos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. foram constatados apenas lipídios totais e neutros, enquanto em *Prestonia riedelii* (Müll.Arg.) Markgr., proteínas, lipídios ácidos e fosfolipídios foram evidenciados no látex (Aguiar 2003). Proteínas e lipídios são encontrados nos laticíferos de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e *M. pohliana* (Stadelm.) A.H.Gentry (= *M. velutina* (Mart. Ex Stadelm.) Woodson; Appenzato-da-Gloria & Estelita 1997); nessas espécies, os laticíferos estão presentes no embrião e em todos os órgãos vegetativos, incluindo as raízes tuberosas. Amido e mucilagem não foram detectados no látex de nenhuma das espécies supramencionadas (Appenzato-da-Gloria & Estelita 1997, Aguiar 2003).

O látex tem sido relacionado à defesa contra herbívoros e microorganismos podendo, também, estar envolvido na cicatrização de ferimentos (Fahn 1979, 1990; Farrel *et al.* 1991). Segundo Farrel *et al.* (1991), as plantas produtoras de látex são mais bem sucedidas no meio ambiente do que os grupos relacionados que não o produzem, uma vez que seus órgãos vegetativos e reprodutivos são menos predados, permitindo um melhor estabelecimento nos mais diversos ambientes.

A presença de compostos fenólicos e ácidos graxos no conteúdo das células da hipoderme e dos laticíferos de *F. glabrescens* indica que ambas as estruturas atuam em conjunto, protegendo o ápice vegetativo do ataque de herbívoros no cerrado.

Referências bibliográficas

- AGUIAR, S. 2003. Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do cerrado do estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ALVES, G.M. 2006. Anatomia foliar de leguminosas arbóreas de cerrado com ênfase nas estruturas secretoras. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifer systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66:301-306.
- CAIN, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88:383-392.
- CLARK, G. 1973. Staining procedures. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BECKMAN, C.H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and molecular plant pathology* 57:101-110.
- DAVID, R. & CARDE, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences (Paris), Série D*, 258:1338-1340.
- DeFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L. & CREPIN, J. 2004. Medicinal Plants of the Guianas. (disponível no site <http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/index.html>, acesso em fevereiro de 2005).
- DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FAHN, A. 1979. *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press Inc., London.
- FAHN, A. 1990. *Plant anatomy*. Pergamon Press, Oxford.

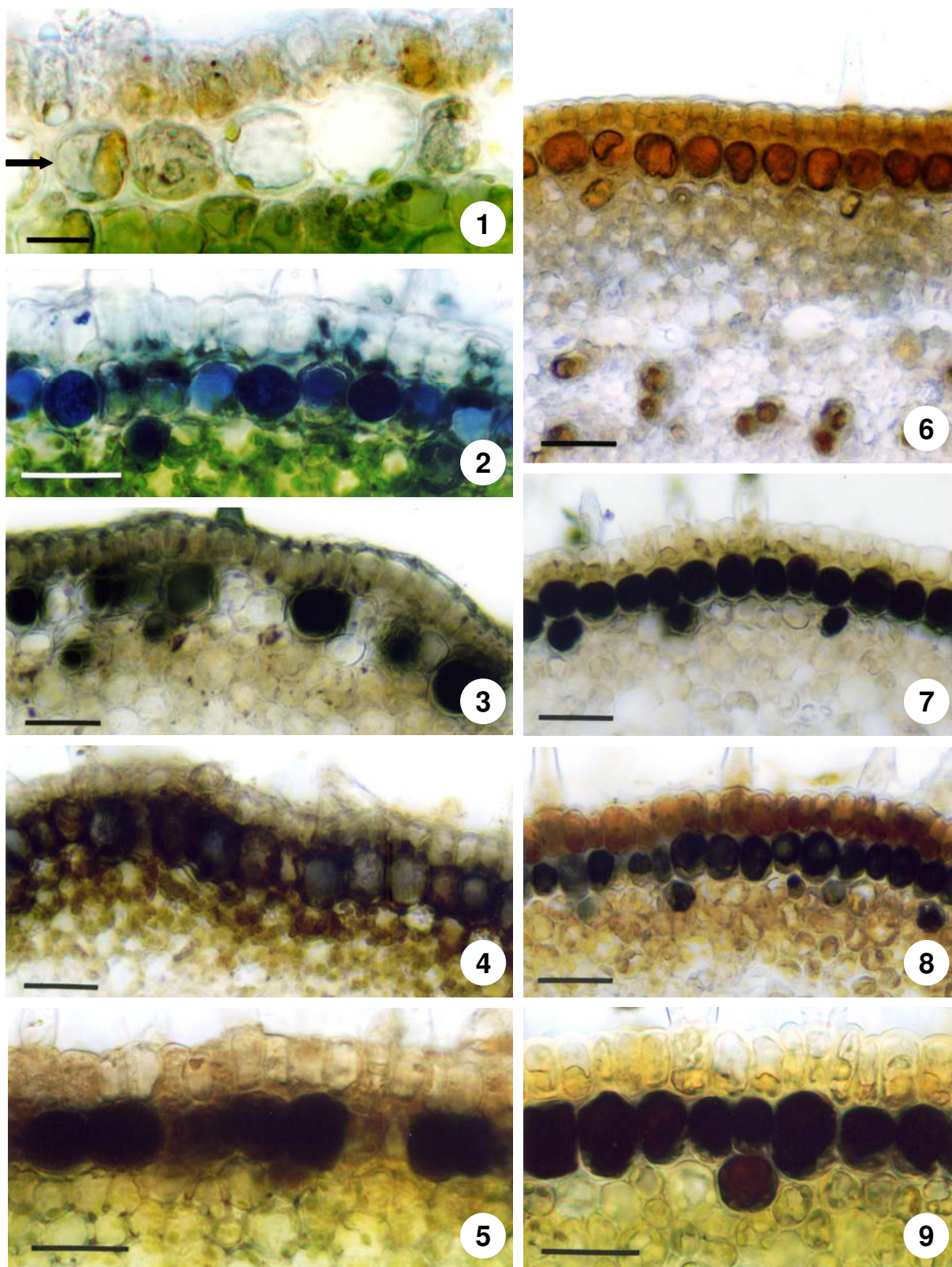
- FARRELL, B.D.; DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138:881-900.
- FURR, M. & MAHLBERG, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159.
- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie, Paris.
- GALETTO, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192:197-207.
- GANTER, P. & JOLLÉS, G. 1969/1970. Histologie normale et pathologique. Vols. I e II. Gauthier – Villars Paris.
- GREGORY, M. & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- HANSEN, B.F. 1985. A monografic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis. University of South Florida, Tampa.
- HARDMAN, R. & SOFOWORA, E.A. 1972. Antimony trichloride as test reagents for steroids, specially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technology* 47:205-208.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- KIRK Jr., P.W. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* 45:1-4.
- MACE, M.E. & HOWELL, C.R. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52:2423-2426.
- MACE, M.E.; BELL, A.A. & STIPANOVIC, R.D. 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* 64:1297-1302.
- MAHLBERG, P.G. 1961. Embriogeny and histogeneis in *Nerium oleander* L.: II. Origin and development of the non-articulated laticifers. *American Journal of Botany* 48:90-99.
- MAHLBERG, P.G. 1963. Development of nonarticulated laticifer in seedling axis of *Nerium oleander*. *Botanical Gazette* 124:224-231.

- MAZIA, D.; BREWER, P.A. & ALFERT M. 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin* 104:57-67.
- MCMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108.
- METCALFE, C.R. 1967. Distribution of latex in the plant kingdom. *Economic Botany* 21:115-127.
- METCALFE, C.R. 1983. Secreted mineral substances. *In* *Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction* (C.R. Metcalfe & L. Chalk, eds.). Clarendon Press, Oxford, v.2, p.82-97.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject*. Clarendon Press, Oxford.
- MILANEZ, F.R. 1946. Nota prévia sobre os laticíferos de *Hevea brasiliensis*. *Arquivos do Serviço Florestal* 2:39-65.
- MURUGAN, V. & INAMDAR, J.A. 1987a. Studies in the laticifers of *Vallaris solanaceae* (Roth) O.Kyze. *Phytomorphology* 37:209-214.
- MURUGAN, V. & INAMDAR, J.A. 1987b. Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba* Linn. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* 97:25-31.
- PEARSE, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. II, 4th ed., Longman Group Limited, London.
- PIZZOLATO, T.D. & LILLIE, R.D. 1973. Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for muvins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21:56-64.
- RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. 1976. *Botânica econômica brasileira*. EPU & USP, São Paulo.

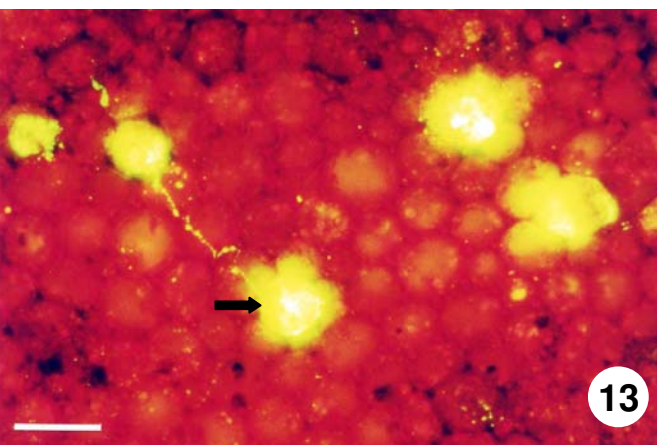
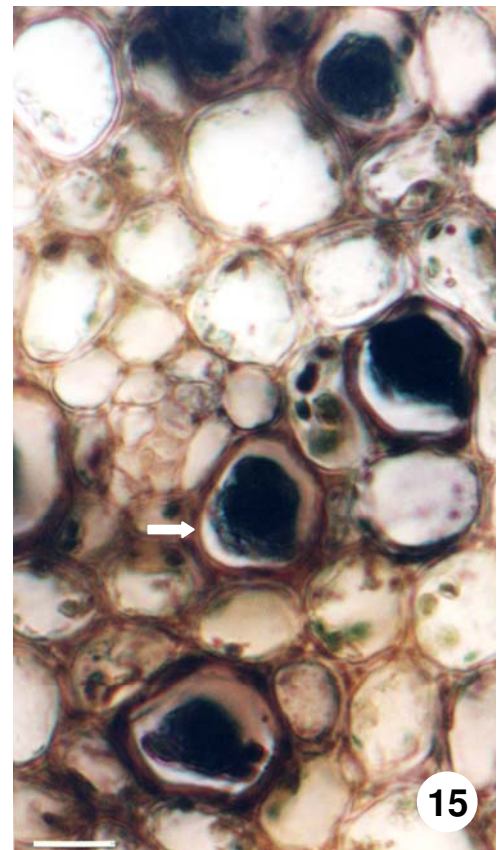
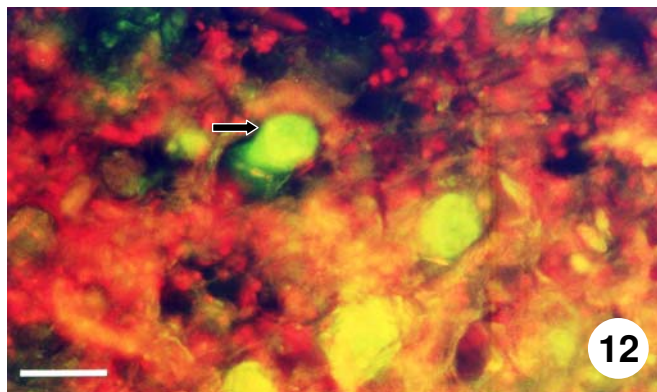
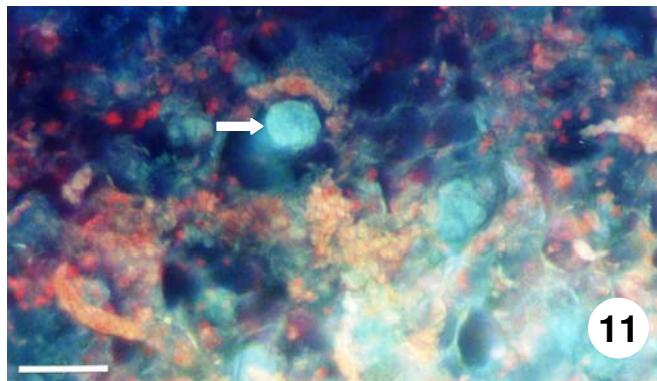
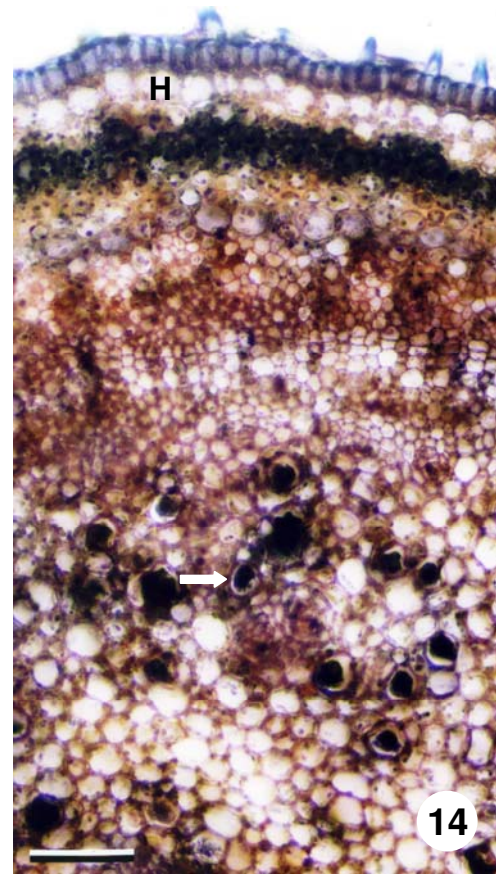
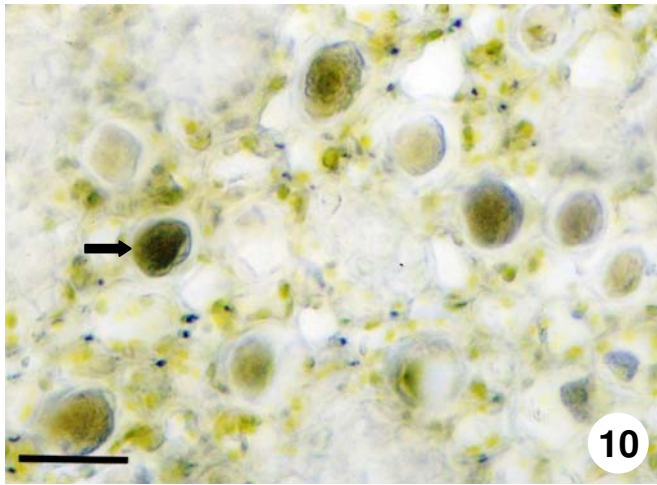
- SACHETTI, G.; BALLERO, M.; SERAFINI, M.; ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A & POLI, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sardoa* (Stearn) Pign. (Apocynaceae), an endemic plant of Sardinia (Italy). *Phyton* 39:265-275.
- SENNBLAD, B.; ENDRESS, M.E. & BREMER, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe *Wrightieae* (Apocynaceae) revisited. *American Journal of Botany* 85:1143-1158.
- SMITH, J.A.; POTEET-SMITH, C.E.; XU, Y.; ERRINGTON, T.M.; HECHT, S.M. & LANNIGAN, D.A. 2005. Identification of the first specific inhibitor of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Research* 65:1027-1034.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- STRANGHETTI, V. & KINOSHITA, L.S. 1996. Reavaliação do gênero monotípico *Rhodocalyx* Müll.Arg. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 19(2): 133-144.
- SVENDSEN, A.B. & VERPOORTE, R. 1983. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1994. Significance of follicle anatomy in Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 63:9-20.
- TORRES, C. & GALETTO, L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 127:207-223.
- WILSON, K.J. & MAXAN, T.E. 1987. Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 74:628-628.

YOSHITAMA, K. 2000. Recent advances in secondary metabolism research: regulation of biosynthesis and physiological functions of flavonoids and some phenolics. Journal of Plant Research 113:285.

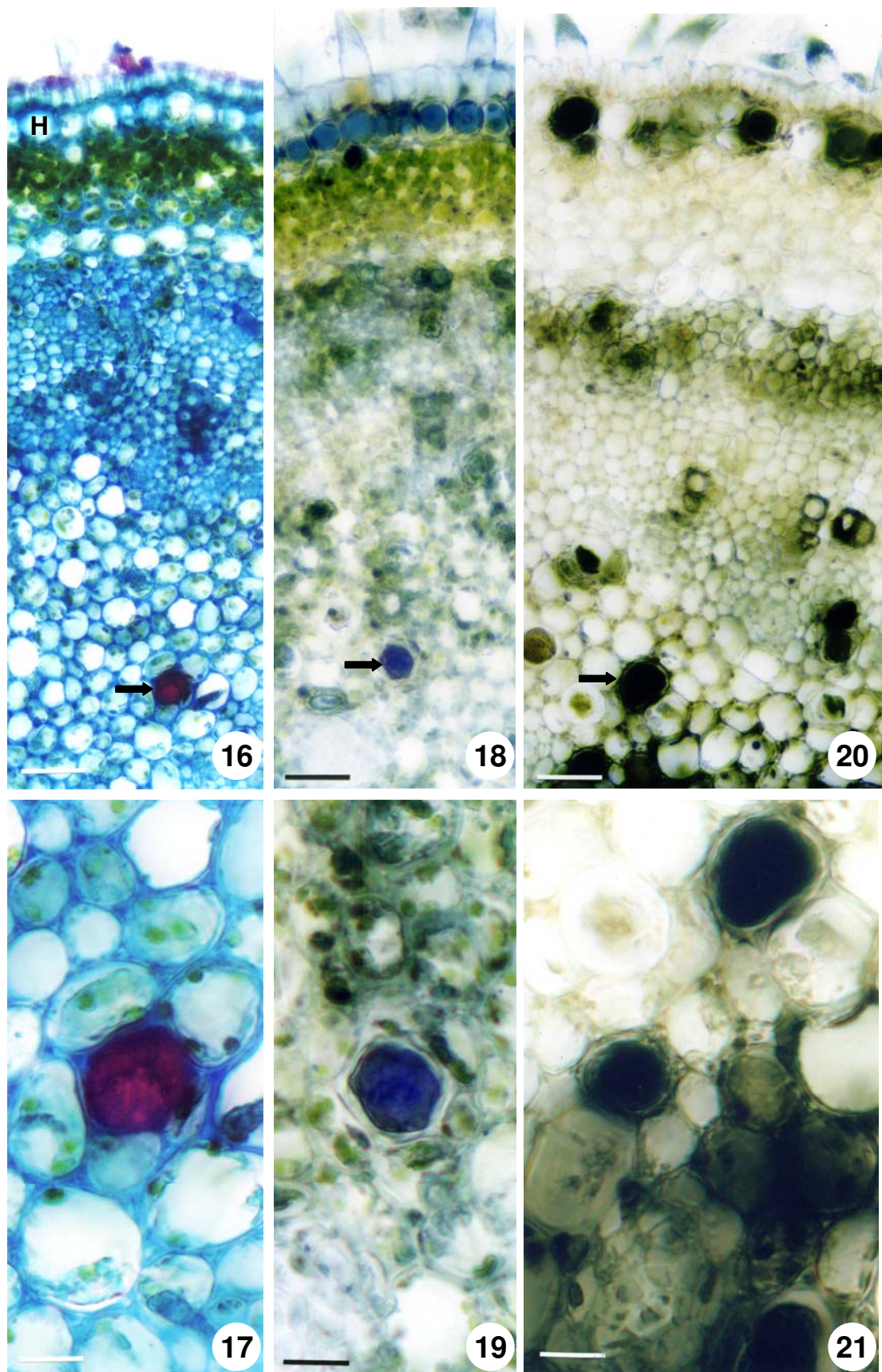
ILUSTRAÇÕES



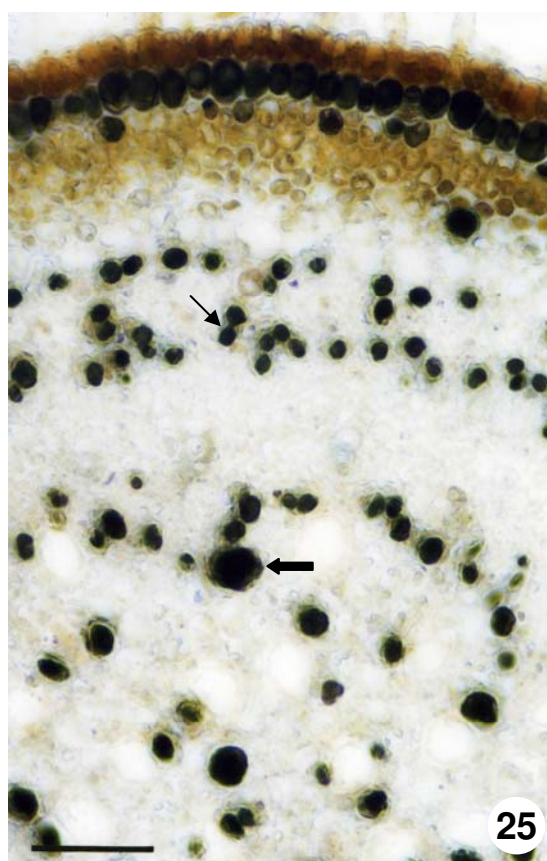
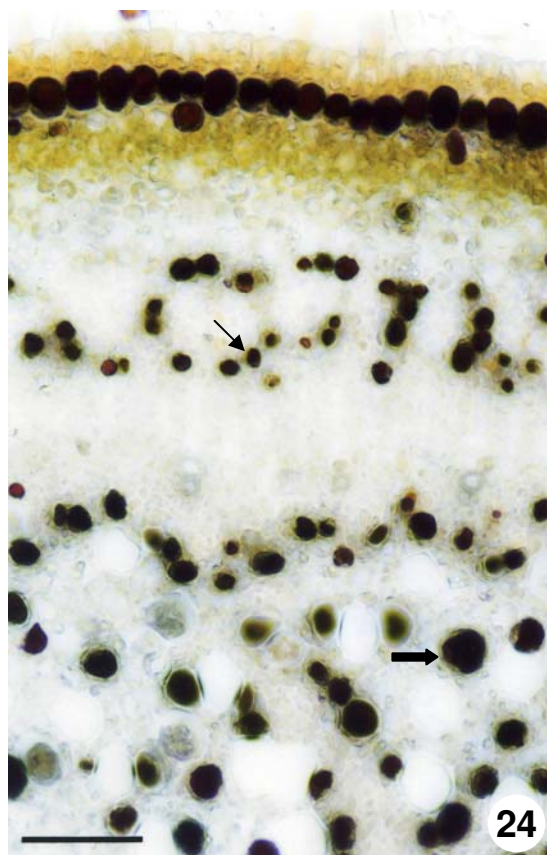
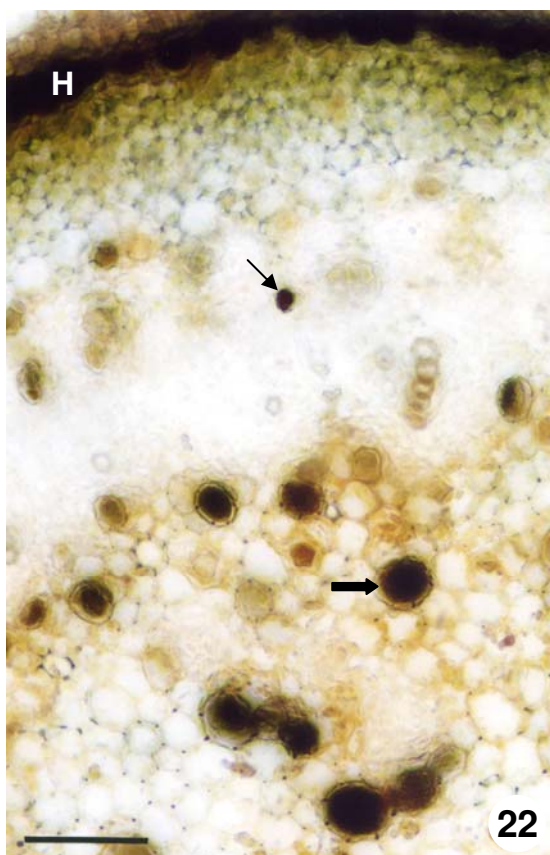
Figuras 1-9. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com hipoderme secretora (seta). **1-5.** Material fresco. **6-9.** Material fixado em FNT **1, 6.** Material sem tratamento (branco); **2.** Reagente de NADI para terpenos; **3, 7.** Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico para ácidos graxos; **4, 8.** Cloreto de Ferro III para compostos fenólicos; **5, 9.** Dicromato de Potássio para compostos fenólicos. Barras = 10µm (1), 20µm (2,5,9), 25µm (3-4, 6-7).



Figuras 10-15. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com laticíferos (setas) e hipoderme (14); material fresco. **10.** Material sem tratamento (branco). **11.** Autofluorescência em luz UV (branco). **12.** Autofluorescência em luz Azul (branco). **13.** Vermelho Neutro para lipídios totais. **14-15.** Negro de Sudão B para lipídios totais; a fig. 15 é um pormenor da fig. 14. Barras = 10µm (15), 25µm (10), 50µm (11-14).



Figuras 16-21. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com laticíferos (setas) e hipoderme (H); material fresco. **16-17.** Sulfato azul do Nilo para lipídios neutros. **18-19.** Reagente de NADI para terpenos. **20-21.** Acetato de cobre/ácido rubeânico para ácidos graxos. **17, 19, 21.** Pormenores das figuras 16, 18 e 20 respectivamente. H = hipoderme. Barras = 50µm (16, 18, 20), 10µm (17, 19, 21).



Figuras 22-23. Secções transversais de caule jovem de *F. glabrescens* com laticíferos (setas largas), idioblastos (setas finas) e hipoderme (H). **22.** Material fresco; dicromato de potássio para compostos fenólicos totais. **23-25.** Material fixado em FNT. **23.** Material sem nenhum tratamento (branco). **24.** Dicromato de potássio para compostos fenólicos totais. **25.** Cloreto de ferro III para compostos fenólicos totais. H = hipoderme. Barras = 25µm (23), 50µm (22, 24-25).

4. CAPÍTULO 4

Caracterização anatômica das glândulas florais de quatro espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado

Introdução

Apocynaceae é uma família relativamente grande e diversa, de distribuição predominantemente tropical (Judd *et al.* 2002), com uma estrutura floral complexa (Fallen 1986). Uma progressão da complexidade floral foi relatada para as subfamílias: Rauvolfioideae Kostel, considerada basal, apresenta as flores menos especializadas, enquanto Asclepiadoideae R.Br. ex Burnett possui as flores mais derivadas da família e dentre todas as dicotiledôneas (Endress 1994, Endress & Bruyns 2000).

Dentre os trabalhos envolvendo a estrutura floral de espécies de Apocynaceae, os mais abrangentes foram aqueles realizados por Woodson & Moore (1938), que estudaram a vascularização e morfologia comparativa das flores de 39 gêneros e 59 espécies, e por Fallen (1986), que avaliou 65 espécies de Apocynaceae *s.str.* e quatro de Asclepiadaceae em termos morfológicos e anatômicos. Destacam-se também os trabalhos de Rao & Ganguli (1963), Galetto (1997), Torres & Galetto (1998), Lin & Bernardello (1999) e, recentemente, os de Simões (2004) e Demarco (2005). Nestes estudos, cinco tipos de estruturas secretoras já foram relatados: epiderme que reveste a cabeça do estilete; coléteres, também conhecidos como glândulas ou “esquamelas” calicinais; nectários, laticíferos e osmóforos.

Os coléteres têm ampla ocorrência na família, porém estão ausentes em algumas espécies (Woodson & Moore 1938, Marcondes-Ferreira 1988, Endress & Bruyns 2000, Demarco 2005); a posição, o número e o aspecto dessas estruturas são suficientemente constantes para serem consideradas taxonomicamente importantes na diferenciação de gêneros e espécies (Woodson & Moore 1938, Koch & Kinoshita 2005, Rio & Kinoshita 2005). Com respeito à posição que ocupam em relação aos lobos do cálice, Woodson & Moore (1938) reconheceram

três categorias de glândulas calicinais: 1. alternas aos lobos, sobre suas margens, em grupos ou solitárias; 2. opostas aos lobos, em grupos ou solitárias; 3. distribuídas indefinidamente, uma franja composta por muitas glândulas posicionadas uniformemente ao longo da base do cálice. Os coléteres calicinais de cinco gêneros brasileiros foram estudados recentemente: *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll.Arg., *Mandevilla pycnantha* (Steud.) Woodson, *M. scabra* (R & S) K.Schum., *M. tenuifolia* (J.C.Mikan) Woodson, *Mesechites mansoana* (A.DC.) Woodson, *Secondatia densiflora* A.DC., *S. floribunda* A.DC. (Simões 2004) e *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. (Demarco 2005).

A ocorrência de nectário não é universal em Apocynaceae; geralmente, apresenta-se como um anel contínuo circundando o ovário na porção basal e partido em lobos (dois a cinco) na porção superior (Woodson & Moore 1938, Rao & Ganguli 1963, Endress & Bruyns 2000), sendo considerado uma estrutura de natureza receptacular (Galletto 1997). Já os laticíferos ocorrem em toda a família (Endress & Bruyns 2000) e estão presentes também em órgãos reprodutivos (Aguiar 2003, Demarco 2005).

Osmóforos são citados para Apocynaceae, que apresenta algumas espécies com flores aromáticas; porém, estas estruturas são apenas mencionadas compondo a estrutura floral das espécies pesquisadas e não foram anatomicamente ilustradas até o momento (Endress 1994, Torres & Galletto 1998, Lin & Bernardello 1999, Demarco 2005).

Espécies de *Forsteronia* foram investigadas em estudos relacionados à anatomia floral de espécies de Apocynaceae; no entanto, apenas dados referentes à vascularização de cálice e corola foram apresentados, com pouca ou nenhuma informação a respeito das glândulas presentes nesse gênero (Woodson & Moore 1938, Rao & Ganguli 1963). Portanto, o objetivo deste trabalho é a caracterização anatômica das estruturas secretoras encontradas nos botões florais e flores em antese de quatro espécies de *Forsteronia* de cerrado, com a finalidade de verificar se os tipos encontrados correspondem aos demais já registrados para a família e contribuir para o conhecimento anatômico das flores de Apocynaceae. Testes histoquímicos

são aplicados a botões e flores de *F. glabrescens*, espécie utilizada como modelo para o estudo histoquímico, para determinar a natureza química dos compostos lipofílicos produzidos por suas glândulas florais.

Material e métodos

Inflorescências de *F. australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC. e *F. velloziana* (A.DC.) Woodson com flores em antese e botões florais de diversos tamanhos foram coletadas em áreas de cerrado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, SP; na Estação Ecológica de Itirapina, SP; em São José do Rio Pardo, SP; ou em Carrancas, MG (tabela 1). Material testemunha para cada indivíduo coletado foi providenciado e incorporado ao herbário UEC. Todas as exsiccatas foram identificadas pela Prof^a Dr^a Luiza Sumiko e pelo Dr. André Olmos Simões.

Material das quatro espécies foi fixado em FAA (formalina:ácido acético:álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940), mantidas em vácuo e estocadas, em seguida, em álcool etílico 70%. Além disso, inflorescências de *F. glabrescens* foram fixadas em FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato:formalina, 9:1 v/v) por 48h (Lillie 1948 *in* Clark 1973) e em SFF (sulfato ferroso em formalina; solução de sulfato ferroso:formalina 9:1 v/v) por 48h (Johansen 1940) para avaliação da natureza química do exsudato das glândulas.

Botões florais em pré-antese e flores em antese foram isolados, transferidos para álcool butílico 70%, desidratados pela série butílica (Johansen 1940) e incluídos em “paraplast”. Secções seriadas longitudinais e transversais foram obtidas com espessura de 10µm com o uso de micrótomo rotativo. As secções foram coradas com safranina alcoólica 0,25% e azul de astra aquoso 1% (Gerlach 1969) para o estudo estrutural, e as lâminas montadas em resina sintética Permunt.

Para o estudo histoquímico de *F. glabrescens*, secções obtidas do material fixado em FAA foram utilizados para os testes que evidenciam polissacarídeos (incluindo mucilagem),

proteínas e compostos fenólicos hidrossolúveis; em FNT (Lillie 1948 *in* Clark 1973), para testes que evidenciam lipídios totais (incluindo ácidos graxos livres) e compostos fenólicos lipossolúveis, e em SFF (Johansen 1940), para confirmar os resultados dos compostos fenólicos.

Os seguintes tratamentos foram efetuados para evidenciar as principais classes de metabólitos produzidos pelas estruturas secretoras de *F. glabrescens*:

- a. Preto de Sudão B para lipídios totais (Pearse 1985);
- b. Sulfato azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947, Jensen 1962);
- c. Acetato de cobre/ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969/1970);
- d. Cloreto de ferro III para compostos fenólicos totais (Johansen 1940);
- e. Dicromato de potássio para compostos fenólicos totais (Gabe 1968).

Flores em antese e botões florais foram submetidos a uma solução de extração de lipídios (metanol:clorofórmio:água:HCl, 66:33:4:1 v/v; High 1984) por 48h à temperatura ambiente, fixados em FNT e SFF por 48h. Posteriormente, esse material recebeu o mesmo tratamento das demais peças para a realização dos controles dos testes para substâncias lipofílicas.

Secções obtidas do material fixado em SFF e do controle submetido a esse fixador foram desparafinizadas, diafanizadas e montadas em resina sintética; as lâminas resultantes dos demais tratamentos foram montadas em gelatina glicerinada.

Após observação e análise do laminário, o registro dos aspectos importantes foi efetuado por fotomicrografias coloridas obtidas em microscópio Olympus BX51 com a utilização de filme Kodak Prolmage 100; as escalas foram obtidas através da projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. As fotomicrografias obtidas foram digitalizadas com alta resolução (600 dpi) e as pranchas de ilustrações, montadas em meio digital. As estruturas florais foram organizadas nas pranchas considerando-se a flor de cima para baixo, para facilitar a visualização.

Tabela 1. Espécies estudadas. Relação do material testemunha: local de coleta, coletores, data e fixadores utilizados (Δ = indivíduo).

espécie	Δ	Local	Data	Coletor	Herbário	Fixadores
<i>F. australis</i>	AUS2	Mogi Guaçu	11-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 26</i>	UEC	FAA
<i>F. glabrescens</i>	GLA2	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 22</i>	UEC	FAA
	GLA4 *	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 24</i>	UEC	FAA, FNT, SFF
	GLA5	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 25</i>	UEC	FAA
	GLA8	Itirapina	8-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 32</i>	UEC	FAA
<i>F. pubescens</i>	PUB94	São José do Rio Pardo	8-XI-1994	<i>LS Kinoshita 94-19 & Sartori</i>	UEC	FAA
<i>F. velloziana</i>	VELM	Mogi Guaçu	14-X-2003	<i>MCS do Rio et al. 29</i>	UEC	FAA
	VELC	Carrancas	13-X-2001	<i>MCS do Rio et al. 17</i>		FAA

* Material utilizado para os testes histoquímicos; coleta em 15-XI-2004.

Resultados

Os dados obtidos referentes à caracterização anatômica das estruturas secretoras encontradas em botões florais e flores em antese de *F. australis* (figuras 1, 5-14), *F. glabrescens* (figuras 2, 15-39), *F. pubescens* (figuras 3, 67-100) e *F. velloziana* (figuras 4, 101-102) são apresentados, bem como os resultados dos testes histoquímicos realizados nas estruturas secretoras florais de *F. glabrescens* (figuras 40-66).

As estruturas secretoras encontradas nas flores e botões florais das espécies estudadas são: apêndices apicais da cabeça do estilete; idioblastos no parênquima de praticamente todas as peças florais (tabela 2); epiderme em lacínias da corola e nectários; hipoderme em estames, cálice, corola, ovário, receptáculo e bractéola (tabela 3), laticíferos em cálice, corola, ovário e receptáculo floral (tabela 4); coléteres calicinais e bracteolares (tabela 5); e nectários. Os resultados referentes à epiderme secretora que reveste a porção mediana da cabeça do estilete serão apresentados juntamente com a caracterização anatômica do ginostégio em espécies de *Forsteronia* de cerrado (Rio, capítulo 5).

Os apêndices do ápice cabeça do estilete são formados por células secretoras com conteúdo de aspecto denso (tabela 3) em *F. australis* (figura 1), *F. glabrescens* (figura 2) e *F. pubescens* (figura 3), e com conteúdo de aspecto granuloso em *F. velloziana* (figura 4). Em *F. glabrescens*, tais células possuem coloração âmbar no material fixado em FNT sem nenhum tratamento (figura 36) e apresentam resultado positivo para ácidos graxos (figura 52) compostos fenólicos (figuras 57, 62). Provavelmente essas células produzem também compostos fenólicos hidrossolúveis, uma vez que estes não foram totalmente extraídos pela solução de extração de lipídios.

Idioblastos secretores com conteúdo de aspecto denso ou granuloso (tabela 2) são encontrados dispersos no parênquima de diversos órgãos florais de *F. australis* (figuras 5-14) e *F. glabrescens* (figuras 15-39): estames (figuras 1-2), lacínias e tubo da corola (figuras 5, 9, 15-16, 18), cálice (figuras 10-14, 20-25), nectário (figuras 6-7, 31, 37), receptáculo (figuras 33-35) e bractéola (figura 35). Em *F. pubescens* (figuras 67-73, 81-91, 95-96) e *F. velloziana* (figuras 101-102), os idioblastos ocorrem nos estames (figura 4), lacínias e tubo da corola (figuras 4, 67-73, 80, 101-102) e ovário (figuras 95, 101); idioblastos no nectário foram observados em *F. pubescens* (figuras 89-93, 95-96).

Epiderme secretora corada de vermelho pela safranina foi registrada apenas na face adaxial das lacínias da corola de *F. pubescens* (figuras 67, 69-70) e *F. velloziana* (figura 4), e nos nectários de *F. australis* (figuras 5-7), *F. glabrescens* (figuras 31, 36-37) e *F. pubescens* (figuras 82-83, 89-96).

Hipoderme secretora foi observada em diversos órgãos florais das quatro espécies estudadas (tabela 3). Em *F. australis*, ela ocorre na face abaxial do cálice e do tubo da corola (figura 5), em ambas as faces das lacínias da corola (figura 9), no ovário (figura 5, 8), no receptáculo e na bractéola. Nessa espécie, as células da hipoderme coram de vermelho ou roxo pela dupla coloração com safranina e azul de astra (figuras 5, 8-9). Em botões florais de *F. glabrescens*, a hipoderme ocorre na face adaxial do cálice (figuras 17, 20, 22, 24) e do tubo da

corola (figuras 17-18); em ambas as faces das lacínias da corola, com células coradas variadamente do azul ao vermelho (figuras 15-18); no ovário (figuras 31, 36, 38-39), no receptáculo (figuras 33-35) e na bractéola. Em *F. pubescens*, a hipoderme está presente na face abaxial do tubo da corola (figuras 71-73), onde é observada interrompida em secções transversais (figuras 81, 83-87); em ambas as faces das lacínias da corola (figuras 67-70) e no ovário (figuras 93-94). Em *F. velloziana*, a hipoderme está presente no ovário (figura 101) e na face abaxial da base do cálice gamossépalo e das lacínias, no início da separação destas (figuras 101-102); a partir da região mediana da lacínia, os idioblastos não são observados nesta espécie.

Tabela 2. Distribuição dos idioblastos secretores e aspecto de seu conteúdo no parênquima de peças florais de espécies de *Forsteronia* (–: hipoderme ausente; D: conteúdo denso; G: conteúdo granuloso).

Peças Florais	<i>F. australis</i>	<i>F. glabrescens</i>	<i>F. pubescens</i>	<i>F. velloziana</i>
Anteras – porção fértil	D	D	D	D
conectivo	D	D	D	D
Cálice	D, G	D, G	–	G
Corola – tubo	D, G	D, G	D, G	D, G
lacínias	D, G	D, G	D, G	D, G
Ovário	D	D	D	D
Nectário	D	D	D	–
Coléteres	D	D	D	D
Receptáculo	D, G	D, G	–	G
Bractéola	D, G	D, G	–	–

Em todas as espécies há uma diferença na distribuição das células secretoras ao longo do tubo e das lacínias da corola. A hipoderme sob a face abaxial não ocorre na região basal do tubo; apenas a hipoderme sob a epiderme externa está presente, corada de azul (figura 17-18). Mais acima, onde as lacínias se encontram separadas, a hipoderme é observada em ambas as

faces das lacínias (figura 18). A epiderme sobre a face adaxial das lacínias da corola de *F. glabrescens* possui células papilosas não-secretoras (figuras 16, 18-19). Há poucos espaços intercelulares nas lacínias dos botões (figura 16); a expansão destas na flor em antese se dá através do aumento de espaços intercelulares, e a hipoderme passa a ser corada apenas de azul (figura 19).

Tabela 3. Distribuição da hipoderme secretora e aspecto do conteúdo de suas células nas peças florais de espécies de *Forsteronia* (–: hipoderme ausente; D: conteúdo denso; G: conteúdo granuloso)

Peças Florais	localização	<i>F. australis</i>	<i>F. glabrescens</i>	<i>F. pubescens</i>	<i>F. velloziana</i>
Anteras – porção fértil	dorsal	D	D	D	D
Conectivo		D	D	D	D
Cálice	abaxial	D, G	D, G	–	G
Corola - tubo	adaxial	–	–	–	–
	abaxial	D, G	D, G	D	D, G
lacínias	adaxial	D	D	D	–
	abaxial	G	D	D, G	–
Ovário	contínua	G	D, G	D, G	G
Receptáculo	contínua	D, G	D, G	–	G
Bractéola	abaxial	D, G	D, G	–	–

Em *F. glabrescens*, o conteúdo dos idioblastos e das células secretoras, que constituem epiderme e hipoderme nos órgãos florais, apresenta coloração âmbar (figuras 41-43) e castanho escuro (figuras 44-46) em material fixado em FNT e SFF respectivamente. Os testes histoquímicos aplicados às secções das flores em antese indicam a presença de lipídios totais (figuras 47-51), especificamente os ácidos graxos (figuras 52-56), e compostos fenólicos (figuras 44-46, 57-66).

Laticíferos ramificados com paredes pecto-celulósicas relativamente espessas coradas pelo azul de astra ocorrem nas lacínias da corola, no mesofilo ovariano e no receptáculo floral

de *F. australis* (figuras 7, 9) e *F. glabrescens* (figuras 36, 38-39); em *F. pubescens* (figuras 68, 89, 93-94) e *F. velloziana* (figura 101), foram registrados nas lacínias da corola, no cálice, no mesofilo ovariano e no receptáculo floral (tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos laticíferos nas peças florais das espécies de *Forsteronia* (++: laticíferos presentes em grande quantidade; +: laticíferos presentes; – : laticíferos ausentes).

Peças Florais	<i>F. australis</i>	<i>F. glabrescens</i>	<i>F. pubescens</i>	<i>F. velloziana</i>
Cabeça do estilete	–	–	–	–
Anteras	–	–	–	–
Ovário (mesofilo)	++	++	++	++
Nectário	–	–	–	–
Cálice	–	–	+	+
Corola	+	+	+	+
Coléteres	–	–	–	–
Receptáculo	+	+	+	+
Bractéola	–	–	–	–

Coléteres calicinais estão presentes em todas as espécies de *Forsteronia* estudadas (figuras 10-14, 20-30, 71, 74-88 e 101-102). Coléteres na bractéola são encontrados apenas em *F. pubescens* (figuras 97-100).

Dois a sete coléteres ocorrem distribuídos uniformemente pela face interna e margem de cada uma das lacínias do cálice, com origem na base do cálice gamossépalo tanto em botões florais quanto em flores em antese de *F. australis* (figuras 10-14, 8), *F. glabrescens* (figuras 20-30), *F. pubescens* (figuras 71, 74-88) e *F. velloziana* (figuras 101-102). Uma sobreposição é observada no número de coléteres por lacínia do cálice dentro de cada espécie, entre diferentes espécies (tabela 5) e em peças diferentes de um mesmo indivíduo.

Três tipos estruturais de coléteres são observados no cálice de *Forsteronia*: padrão, ramificado e sésil. Os coléteres são formados por um núcleo central composto por células parenquimáticas e idioblastos, revestido por uma epiderme em paliçada secretora (figuras 8, 26-30, 71, 74-75). Não é possível diferenciar o pedúnculo dos coléteres de *F. glabrescens* em corte longitudinal (figuras 28-30), o que os caracteriza como sésseis; já em *F. australis* (figura 8) e *F. pubescens* (figuras 74-75), a região do corpo do coléter, onde as células epidérmicas estão em paliçada, diferencia-se do pedúnculo, curto, cujas células da epiderme são cúbicas. Os coléteres são independentes na base (figuras 14-13, 24-25, 27, 78, 87-88), podendo ramificar-se em dois (figuras 10-12, 85-86) ou três (figuras 81-84) ao longo do seu comprimento. Dentre os coléteres com pedúnculo, os que não se ramificam são considerados do tipo padrão; os demais, do tipo ramificado.

Cinco coléteres do tipo padrão, distribuídos uniformemente pela face interna das bractéolas, são encontrados em botões florais de *F. pubescens* (tabela 5; figuras 97-100); os coléteres têm origens independentes (figura 97) e não se encontram em fase de secreção no botão em pré-antese; as células da epiderme secretora em paliçada estão na sua maioria sem conteúdo (figuras 98-100), sendo que apenas algumas delas apresentam um conteúdo fortemente corado de vermelho. Nenhum coléter foi observado nas bractéolas das demais espécies.

Coléteres em fase secretora não são encontrados nos botões florais em pré-antese e nas flores abertas de *Forsteronia*, exceto nas flores em antese de *F. pubescens*, onde conteúdo denso fortemente corado de vermelho ou azul é observado em algumas células epidérmicas (figuras 75, 77, 79). As células da epiderme dos coléteres de flores em antese de *F. glabrescens* apresentam resultado negativo para lipídios totais (figura 51), ácidos graxos (figura 53) e compostos fenólicos (figuras 58, 63).

Tabela 5. Posição, número e tipo dos coléteres florais observados em *Forsteronia*. (-: coléter ausente).

espécie	peça floral	número	tipos
<i>F. australis</i>	cálice	2-5	padrão, ramificado
	bractéola	—	—
<i>F. glabrescens</i>	cálice	3-6	séssil
	bractéola	—	—
<i>F. pubescens</i>	cálice	2-5	padrão, ramificado
	bractéola	5	padrão
<i>F. velloziana</i>	cálice	2-7	padrão
	bractéola	—	—

Cinco nectários livres ou fundidos na base (dois a dois, e um livre) são observados em três espécies: *F. australis* (figuras 5-7), *F. glabrescens* (figuras 31, 36-37) e *F. pubescens* (figuras 89-93, 95-96); são estruturas formadas por um parênquima nectarífero com feixes vasculares e idioblastos, rodeado pela epiderme, onde são encontrados diversos estômatos em maior concentração na região apical (figuras 6-7, 36-37, 89-91). Abaixo dos estômatos, há uma concentração de células com características secretoras: pequenas, com protoplasto denso e núcleo volumoso (figuras 7, 36-37, 89-91); provavelmente estas células estão envolvidas na secreção do néctar, que não é muito profuso nas flores em antese encontradas no campo. Nas três espécies, o conteúdo granuloso ou denso das células epidérmicas dos nectários cora intensamente de vermelho pela Safranina (figuras 6-7, 31, 36-37, 89-96). Em *F. glabrescens*, essas células produzem lipídios totais (figura 50), ácidos graxos (figura 55) e compostos fenólicos (figuras 60, 65). Os nectários de *F. velloziana* apresentam uma estrutura diferente, formando um disco na base, que se torna 5-lobado em direção ao ápice (figura 101). São estruturas carnosas pouco alongadas no eixo longitudinal, ao contrário das anteriormente apresentadas, e não possuem idioblastos secretores.

Discussão

Os idioblastos secretores foram as estruturas mais comuns nas espécies de cerrado de *Forsteronia*, com ocorrência registrada em praticamente todas as peças florais: cabeça do estilete, estames, lacínias e tubo da corola, cálice, nectário, ovário, receptáculo e bractéola. Além deles, uma hipoderme secretora também ocorre em quase todos os órgãos florais das espécies de avaliadas neste trabalho.

Em *F. glabrescens*, testes histoquímicos evidenciaram a presença de compostos fenólicos e ácidos graxos nos idioblastos e hipoderme presentes nas peças florais. Várias funções dos compostos fenólicos presentes em plantas já foram propostas, como proteção contra radiação ultravioleta e defesa contra patógenos e herbivoria, devido à natureza adstringente e tóxica destes compostos (Beckman 2000, Yoshitama 2000). De acordo com o posicionamento das células secretoras de compostos fenólicos em grande concentração na cabeça do estilete, anteras e lobos da corola nas espécies de *Forsteronia*, supõe-se que eles constituam guias de néctar para polinizadores, principalmente abelhas, pela sua capacidade de refletir raios ultravioleta (Thompson *et al.* 1972; Kay *et al.* 1981). É possível que os idioblastos secretores, em associação aos laticíferos registrados predominantemente nos envoltórios florais e no mesofilo ovariano, desempenhem um papel de proteção contra herbivoria das partes florais. Este é o primeiro registro da ocorrência de idioblastos secretores de compostos fenólicos em uma espécie de Apocynaceae.

Nas espécies estudadas de *Forsteronia*, uma sobreposição no número de coléteres encontrados nas partes reprodutivas ocorre entre as espécies, entre indivíduos diferentes e dentro do mesmo indivíduo; em todas as peças, os coléteres encontram-se indefinidamente distribuídos, formando uma franja ao longo da base do cálice. Woodson & Moore (1938), em amplo estudo de anatomia floral, afirmaram que a distribuição, o número e o aspecto das “esquamelas calicinais” têm importância taxonômica em nível de gênero e espécie. Em estudos taxonômicos, a posição, o número e o tipo dos coléteres calicinais foram importantes na

delimitação de espécies semelhantes de *Forsteronia* (Koch & Kinoshita 2005) e *Prestonia* R.Br. (Rio & Kinoshita 2005). No entanto, a sobreposição do número de coléteres e a sua distribuição uniforme no cálice, constante em todas as espécies, dificultam a utilização desse caráter para fins taxonômicos nas espécies de cerrado de *Forsteronia*; estudos quantitativos envolvendo um maior número de indivíduos provenientes de diferentes localidades são necessários para avaliar a plasticidade desse caráter e sua utilidade para a taxonomia desse gênero.

Três tipos estruturais de coléteres ocorrem nas flores das espécies estudadas de *Forsteronia*: padrão, ramificado e sésseis. O tipo padrão (“standard” – S), descrito por Lersten (1974), é caracterizado pela presença de um eixo alongado recoberto por epiderme secretora em paliçada e um pedúnculo curto. O tipo ramificado divide-se em dois ou três ao longo do seu comprimento, enquanto os sésseis não apresentam pedúnculo. Os três tipos foram registrados em órgãos vegetativos de espécies de *Forsteronia* (Rio *et al.* 2005). Coléteres calicinais sésseis foram recentemente descritos para espécies da tribo *Mesechiteae*, sendo caracterizados pela ausência de pedúnculo e pelo discrepante aumento na espessura da paliçada secretora (Simões 2004). Os coléteres sésseis de *Forsteronia* são semelhantes ao tipo proposto por Simões (2004) em corte longitudinal. No entanto, não são estruturas laminares inteiramente fundidas ao cálice e sim cilíndricas, aproximando-se do tipo padrão em corte transversal. Simões (2004) considerou que o número de coléteres calicinais pode ser útil para estudos filogenéticos, se avaliados em conjunto com outras características, como estrutura e posição.

Coléteres em fase secretora de mucilagem não foram encontrados nos botões florais em pré-antese e flores em antese das espécies estudadas de *Forsteronia*. Provavelmente isso ocorreu devido ao estágio avançado de desenvolvimento floral, uma vez que os coléteres são estruturas secretoras que produzem uma substância viscosa que lubrifica e protege gemas em início de desenvolvimento (Fahn 1979). Algumas células com conteúdo acidófilo denso foram registradas na epiderme dos coléteres calicinais e bracteolares de flores em antese de *F. pubescens*. É possível que esses coléteres se encontrem em uma segunda fase de secreção,

de compostos fenólicos, ou em processo de senescência. Apesar de compostos fenólicos não terem sido observados na epiderme de coléteres de flores em antese de *F. glabrescens*, duas fases de secreção foram registrados em coléteres foliares de *F. glabrescens*, uma de mucilagem e outra de compostos fenólicos (Rio *et al.*; capítulo 2). Portanto, estudos mais abrangentes de ontogênese e histoquímica são necessários para determinar com segurança o processo de secreção dos coléteres calicinais e bracteolares em *Forsteronia*.

Os nectários encontrados em *Forsteronia* correspondem ao padrão observado na família, podendo tanto apresentar lobos separados ou unidos dois a dois (e um livre) desde sua base (em *F. australis*, *F. glabrescens* ou *F. pubescens*), quanto formar uma estrutura anelar na base e se dividir em lobos apenas na região superior (*F. velloziana*). Os nectários são descritos como estruturas carnosas, freqüentemente separadas em número de duas a cinco, encontradas ao redor do ovário; ocasionalmente, formam uma estrutura anelar contínua nas Apocynaceae (Woodson & Moore 1938). Nas descrições anatômicas mais recentes para a família, o nectário apresenta-se como um anel contínuo circundando o ovário na porção basal e partido em lobos (dois a cinco) na porção superior (Galetto 1997, Lin & Bernardello 1999), sendo considerado uma estrutura de natureza receptacular (Galetto 1997). No caso de *Aspidosperma quebracho-blanco*, o disco nectarífero presente na base do ovário não tem atividade secretora e o néctar é produzido em nectários que foram encontrados na superfície externa do cálice e da corola (Lin & Bernardello 1999). Woodson & Moore (1938) afirmaram que os nectários têm origem carpelar em Apocynaceae; no entanto, os resultados de presente trabalho concordam com os dados obtidos por Galetto (1997), que indicam que o nectário tem origem receptacular.

Não foi possível identificar as estruturas secretoras dos voláteis responsáveis pelo odor adocicado liberado pelas flores de *Forsteronia*, da mesma forma que em *Aspidosperma australe* Müll.Arg. (Demarco 2005). Isso indica a necessidade de estudos mais abrangentes para garantir a ocorrência e localização dos osmóforos em espécies de Apocynaceae. Osmóforos são estruturas secretoras de compostos lipídicos voláteis responsáveis pelo odor (fragrância)

liberado pela flor, sendo que dois tipos estruturais já foram relatados na literatura: um em que os compostos são produzidos pela epiderme da estrutura, e outro em que são produzidos no mesofilo da estrutura e liberados através de estômatos (Endress 1994). Ao contrário de outros tipos glandulares, a secreção dos osmóforos geralmente não é visível, por ser constituída de compostos altamente voláteis. Apesar dos osmóforos já terem sido relatados para espécies de Apocynaceae (Torres & Galetto 1998, Lin & Bernardello 1999, Demarco 2005), sua estrutura anatômica não foi descrita nem ilustrada.

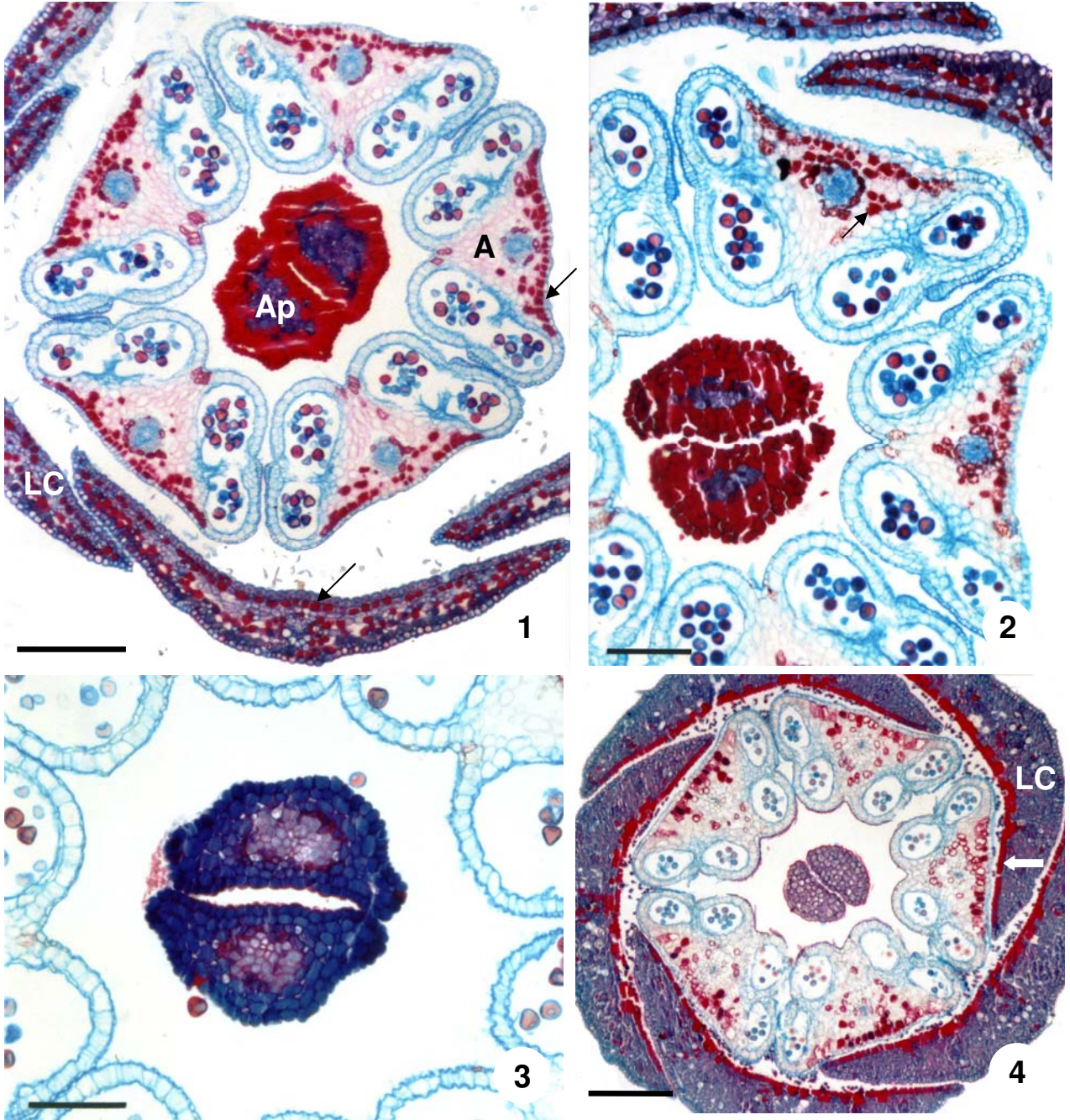
Referências bibliográficas

- AGUIAR, S. 2003. Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do cerrado do estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- BECKMAN, C.H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and molecular plant pathology* 57:101-110.
- CAIN, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88:383-392.
- CLARK, G. 1973. Staining procedures. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ENDRESS, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. University Press, Cambridge.
- ENDRESS, M.E & BRUYNS, P.V. 2000. A Revised Classification of Apocynaceae s.l. *The Botanical Review* 66:1-56.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.

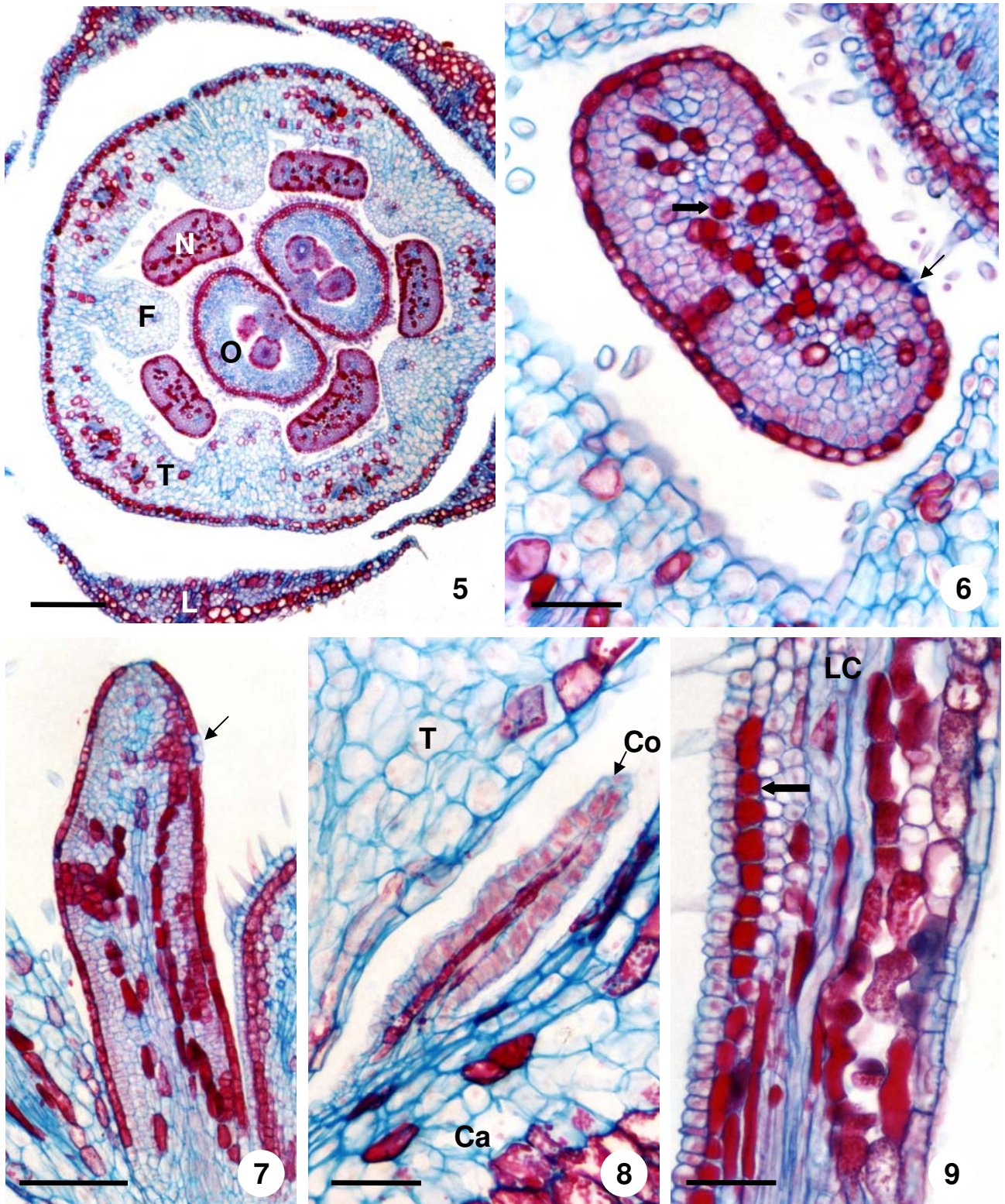
- FALLEN, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: Morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanischer Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 106:245-286.
- GABE, M. 1968. *Techniques histologiques*. Masson & Cie, Paris.
- GALETTO, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192:197-207.
- GANTER, P. & JOLLÉS, G. 1969/1970. *Histologie normale et pathologique*. Vols. I e II. Gauthier – Villars, Paris.
- GERLACH, D. 1969. *Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung*. Georg Thieme, Stuttgart.
- HANSEN, B.F. 1985. A monographic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis. University of South Florida, Tampa.
- HIGH, O.B. 1984. *Lipid histochemistry*. Oxford University Press, New York.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 2002. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- KAY, Q.O.N.; DAOUD, H.S. & STIRTON, C.H. 1981. Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Botanical Journal of Linnean Society* 83:57-84.
- KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae - *Forsteronia* G.Mey. In *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti, coords.). Fapesp, Rima, São Paulo, v.4, p.48-53.
- LERSTEN, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61:973-981.

- LIN, S. & BERNARDELLO, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Science* 160:869-878.
- MARCONDES-FERREIRA, W. 1988. *Aspidosperma* Mart. *nom. cons.* (Apocynaceae): estudos taxonômicos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- PEARSE, A.G.E. 1985. *Histochemistry, theoretical and applied*. Vol. II, 4 ed. C. Livingstone, Edinburgh.
- RAO, V.S. & GANGULI, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42:419-435.
- RIO, M.C.S. & KINOSHITA, L.S. 2005. *Prestonia* R.Br. (Apocynaceae) no Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 32:233-258.
- RIO, M.C.S.; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M.M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Revista Brasileira de Botânica* 28:713-726.
- SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- THOMPSON, J.D.; MEINWALD, J.; ANESHANSLEY, D. & EISNER, T. 1972. Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science* 177:528-30.
- TORRES, C. & GALETTO, L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 127:207-223.
- WOODSON, R.E. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65:135-165.

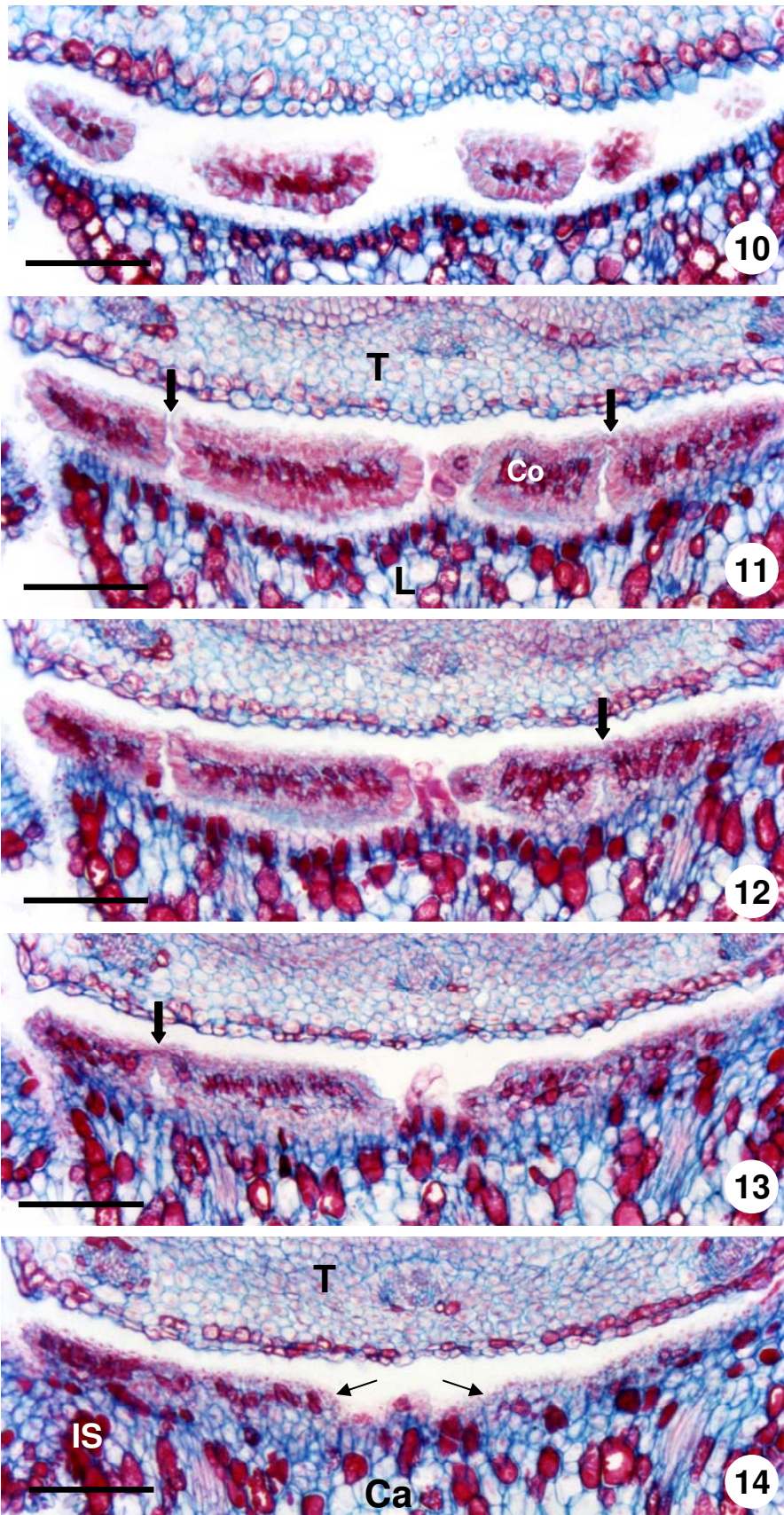
YOSHITAMA, K. 2000. Recent advances in secondary metabolism research: regulation of biosynthesis and physiological functions of flavonoids and some phenolics. *Journal of Plant Research* 113:285.



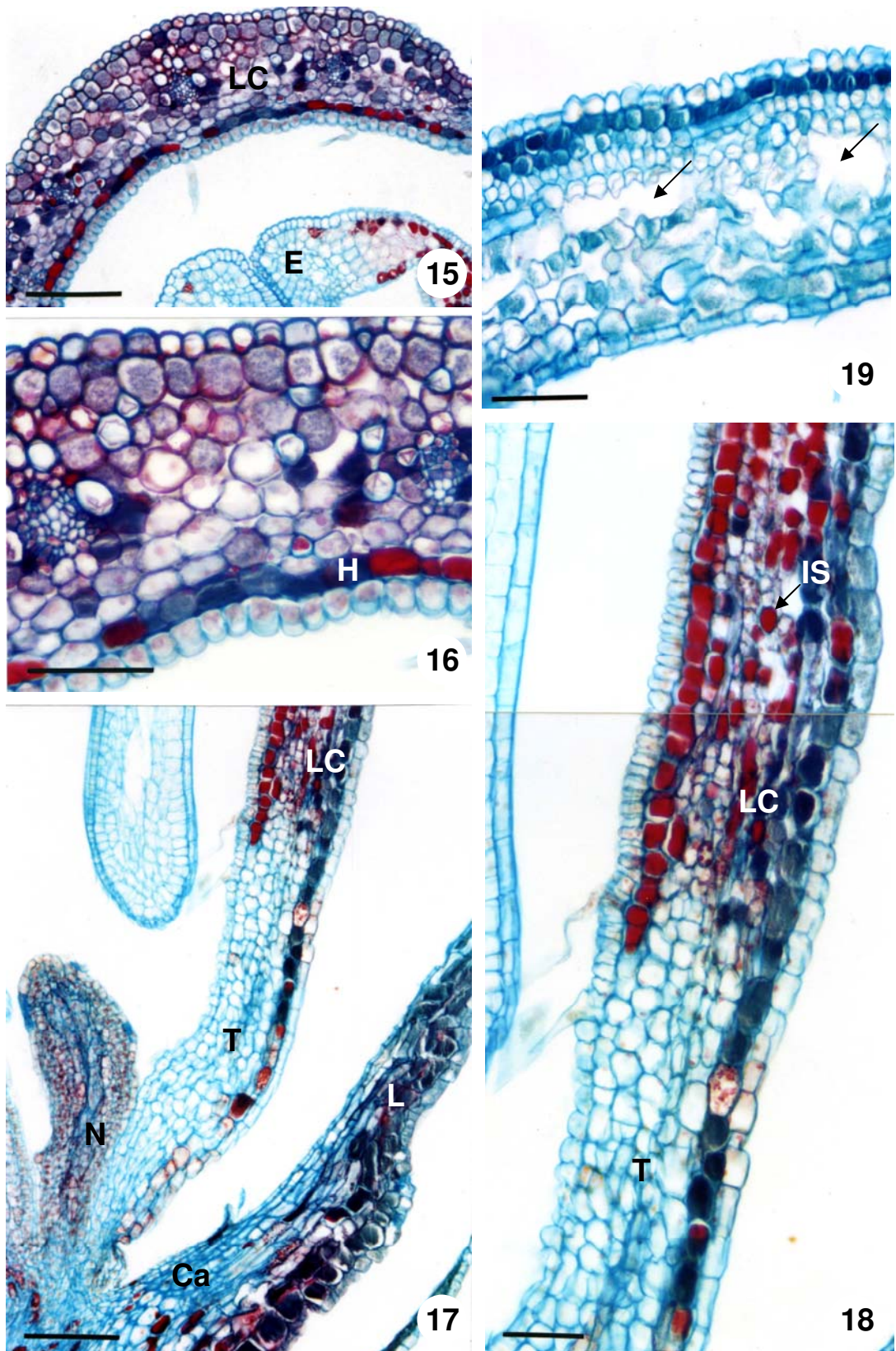
Figuras 1-4. Secções transversais de botões florais de *F. australis* (1), *F. glabrescens* (2), *F. pubescens* (3) e *F. velloziana* (4), destacando os apêndices da cabeça do estilete. 1. Células dos apêndices (Ap) com conteúdo de aspecto denso, hipoderme (seta) no dorso das anteras (A) e nas lacínias da corola (LC). 2. Células dos apêndices com conteúdo denso, hipoderme e idioblastos (seta) nas anteras. 3. Células dos apêndices com conteúdo denso. 4. Células dos apêndices com conteúdo granuloso e epiderme secretora (seta) nas lacínias da corola (LC). A = antera; Ap = apêndice da cabeça do estilete; LC = lacínias da corola. Barras = 200µm (1, 4), 100µm (2-3).



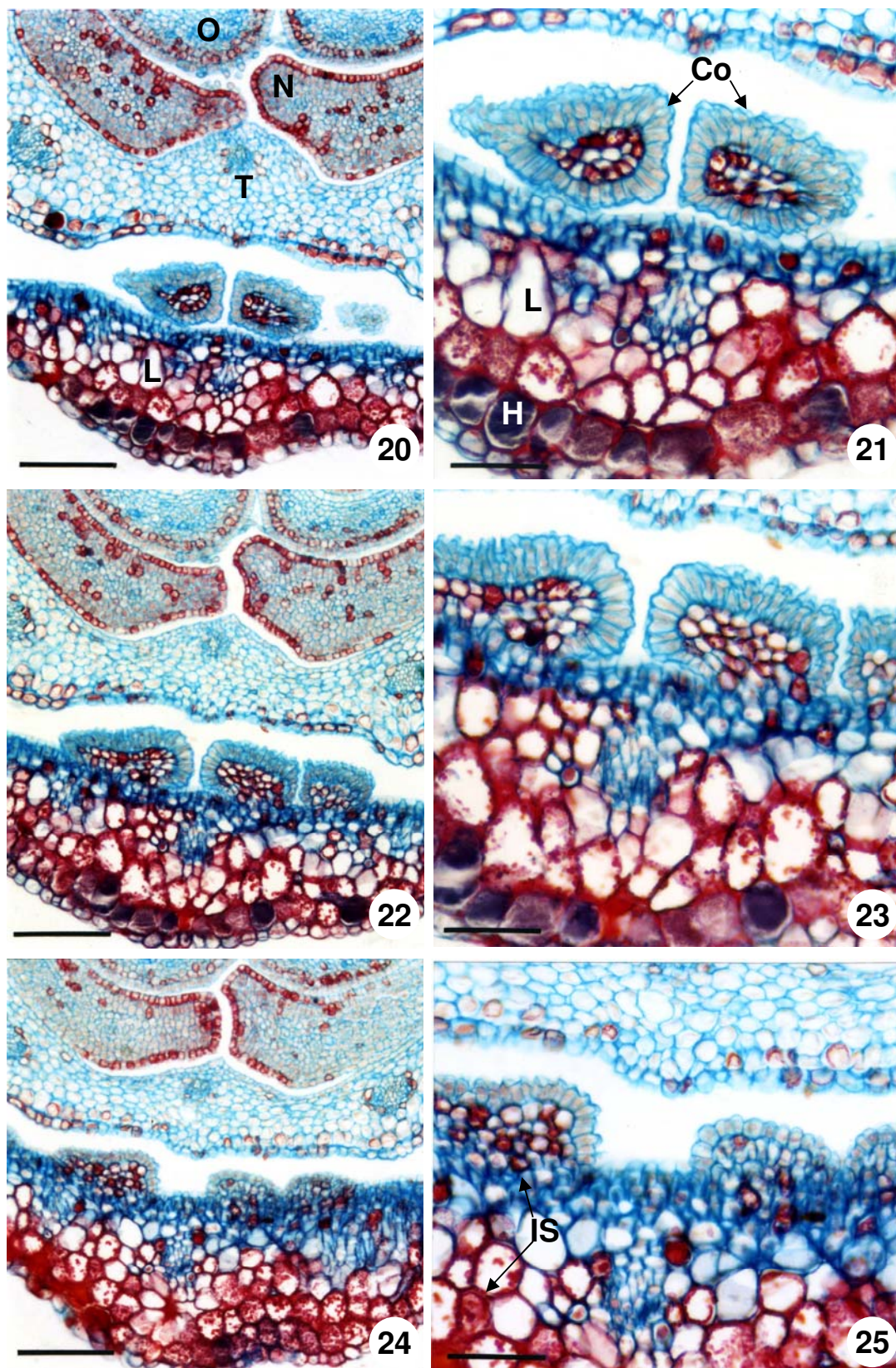
Figuras 5-9. Secções transversais (5-6) e longitudinais (7-9) da região inferior do botão floral de *F. australis*. **5.** Vista geral do ovário (O), nectários (N) alternos aos filetes (F), que estão adnatos ao tubo da corola (T), e lacínias do cálice (L). **6.** Pormenor da figura 5; detalhe do nectário, notar estômato (seta) e idioblastos (seta larga) no parênquima. **7.** Nectário com idioblastos no parênquima e epiderme; notar células parenquimáticas coradas próximas ao estômato (seta). **8.** Coléter calicinal (Co). **10.** Lacínia da corola, com hipoderme na face adaxial (seta larga). F = filetes; L = lacínia do cálice; N = nectário; O = ovário; T = tubo da corola. Barras = 200µm (5); 100µm (7-9); 50µm (6).



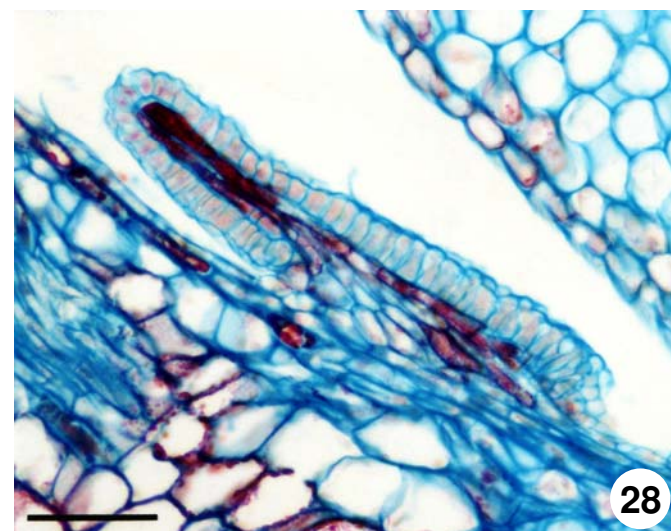
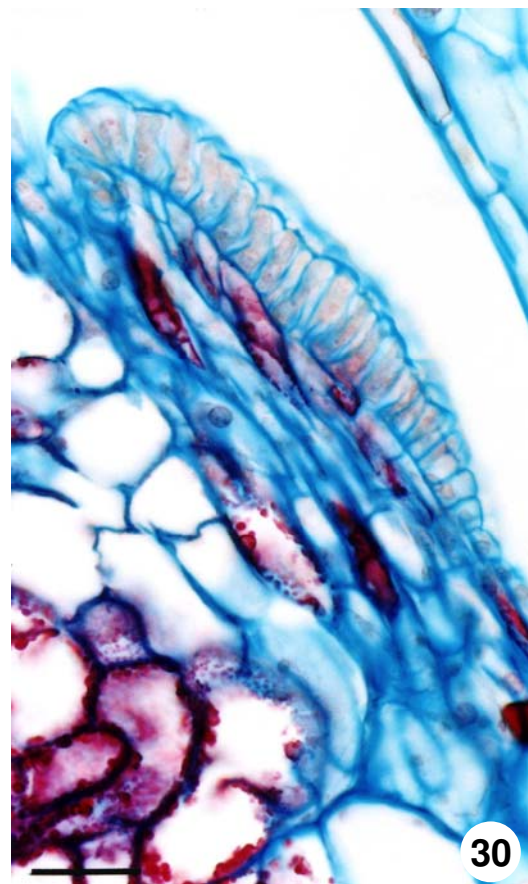
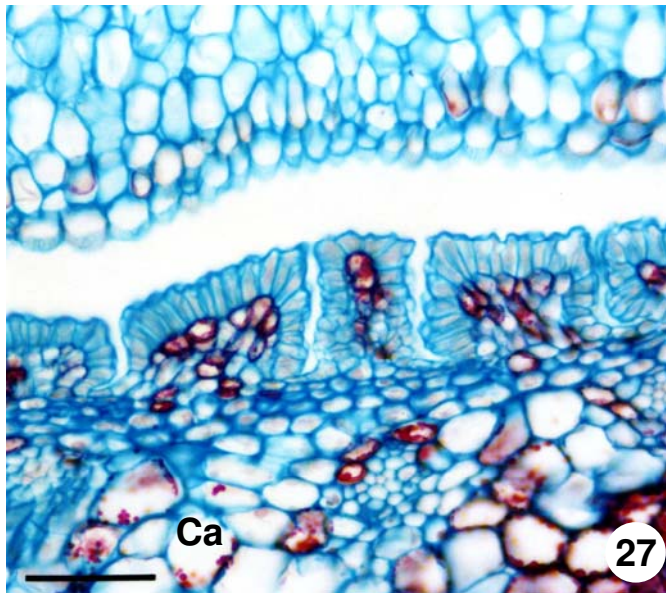
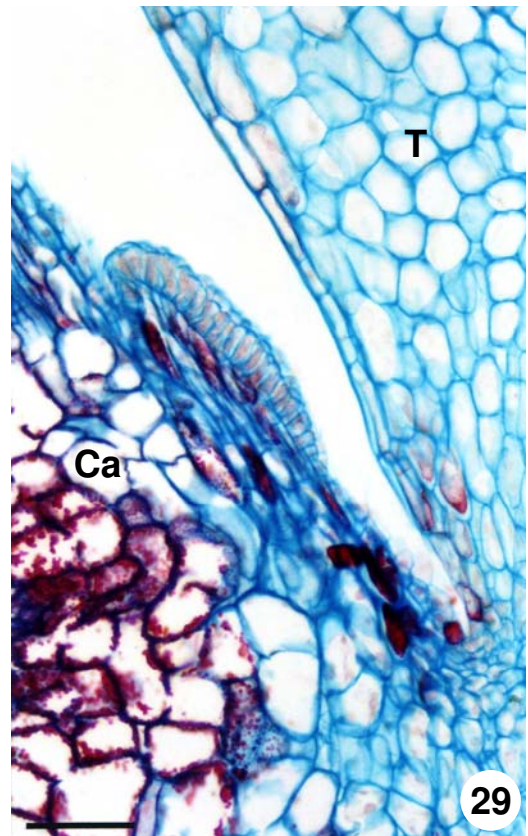
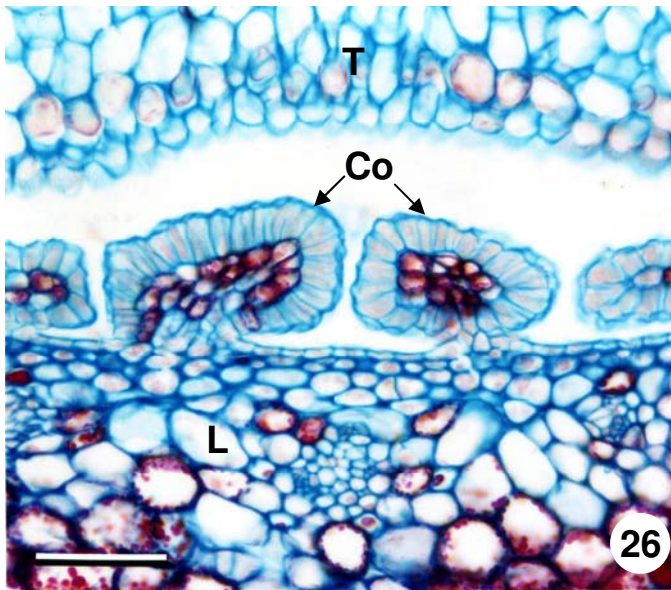
Figuras 10-14. Secções transversais de botão floral de *F. australis* com dois coléteres calicinais ramificados. **10.** Região apical dos coléteres. **11.** Região mediana dos coléteres, onde nota-se a ramificação (seta larga). **12-13.** Início da ramificação (setas largas) dos coléteres. **14.** Base dos coléteres, mostrando sua origem independente (setas finas); notar idioblastos (IS) no cálice. Ca = base do cálice; Co = coléter; I = idioblastos secretores; L = lacínia do cálice; T = tubo da corola. Barras = 100µm (10-14).



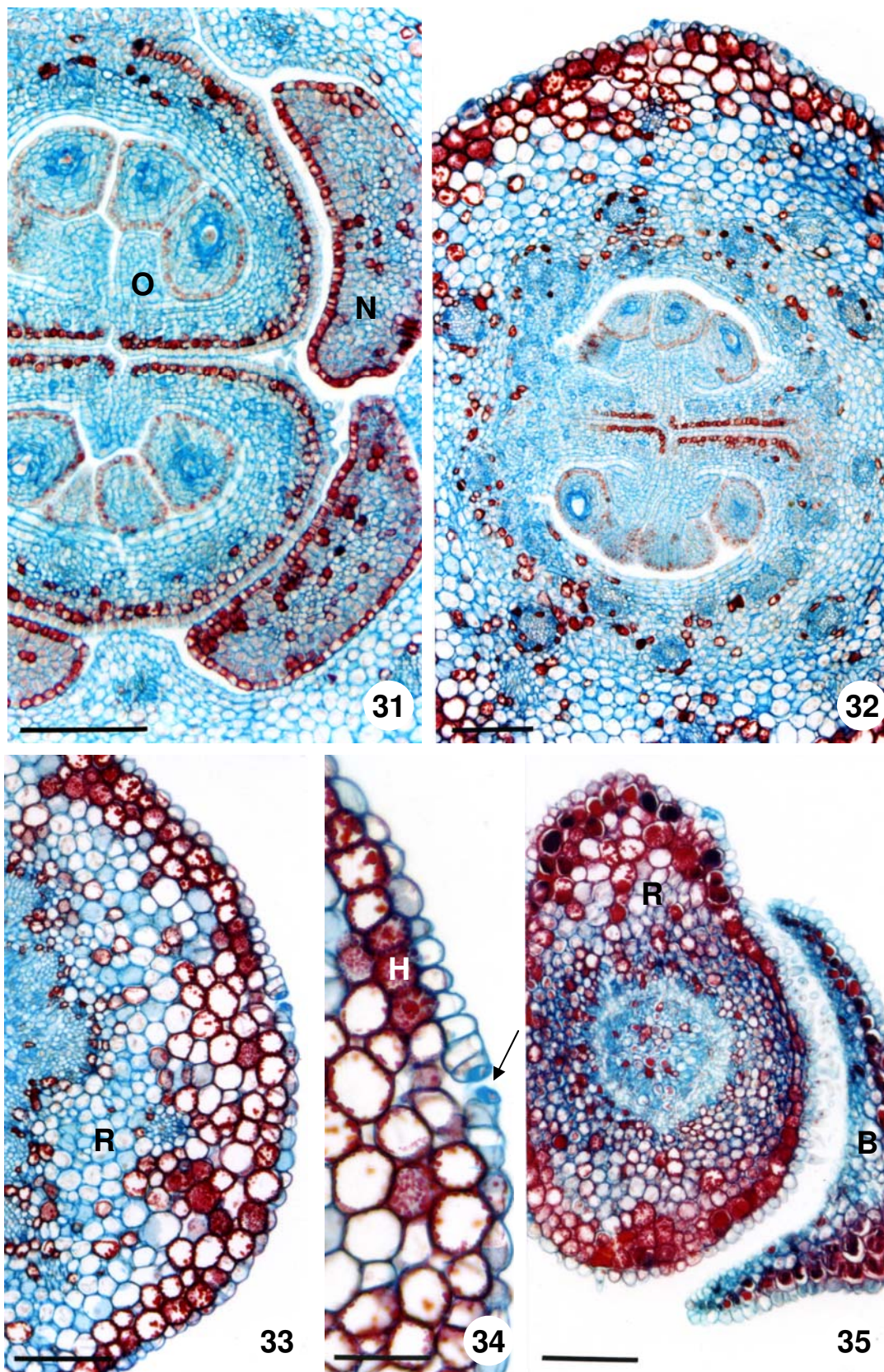
Figuras 15-19. Secções transversais (15-17) e longitudinais (18-19) de botão floral (15-18) e flor em antese (19) de *F. glabrescens*. **15.** Lacínia da corola (LC). **16.** Detalhe da hipoderme (H); a fig. 16 é um pormenor da fig. 15. **17.** Região inferior do botão floral; nectário, tubo da corola (T) e cálice (Ca/L). **18.** Pormenor da figura 17; detalhe da corola, hipoderme sob a superfície abaxial do tubo (T) e sob ambas as faces na lacínia (LC) e idioblastos secretores (IS) no parênquima. **19.** Lacínia da corola com hipoderme e muitos espaços intercelulares (setas). Ca = base do cálice; H = hipoderme; IS = idioblastos secretores; L = lacínia do cálice; LC = lacínia da corola; T = tubo da corola. Barras = 100µm (15,17); 50µm (16, 18-19).



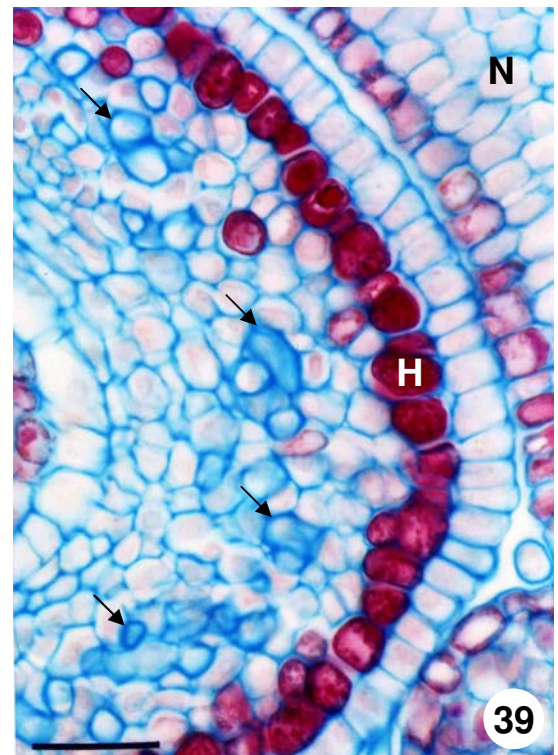
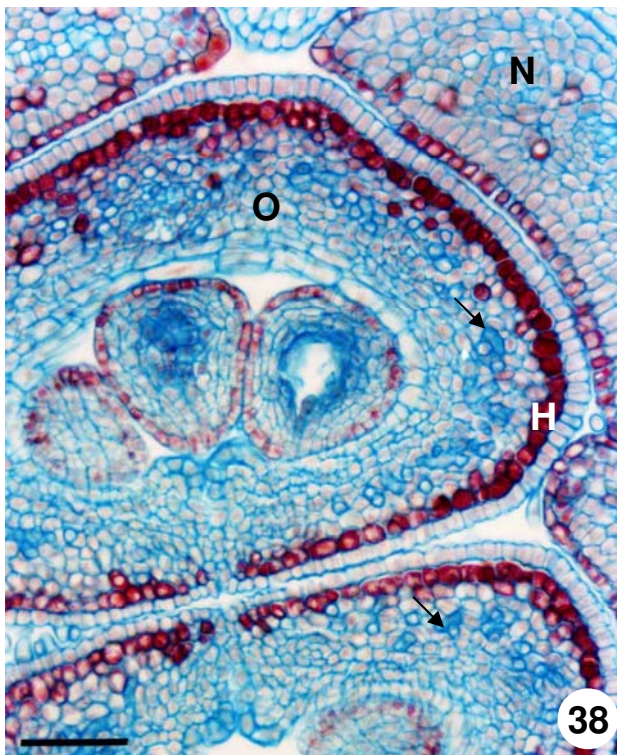
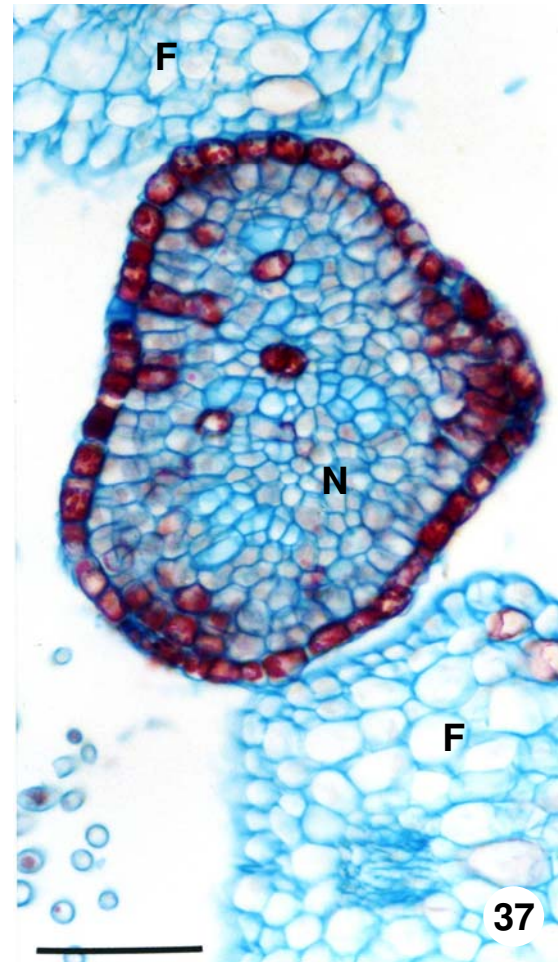
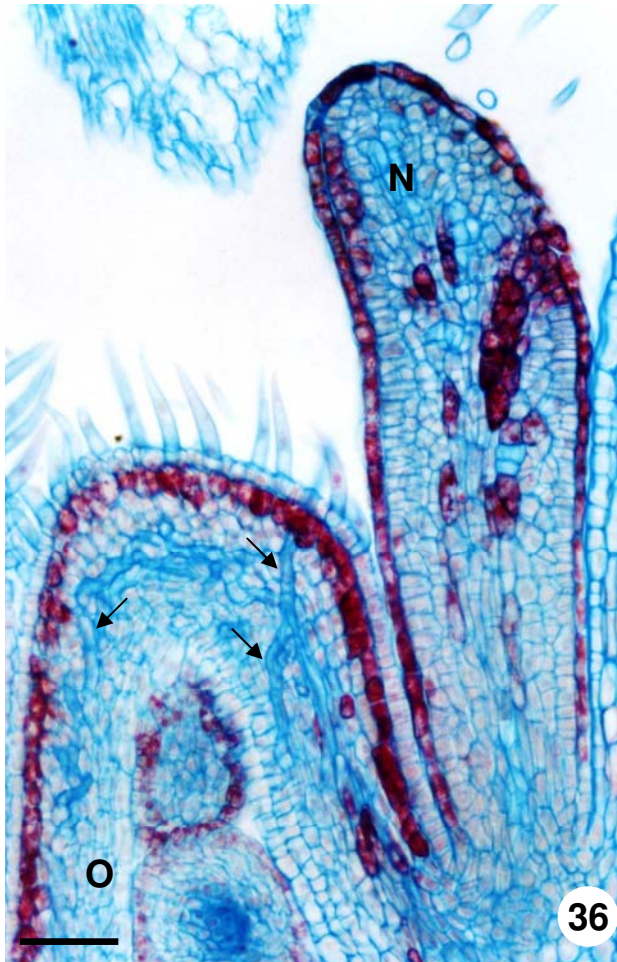
Figuras 20-25. Secções transversais do botão floral de *F. glabrescens* com três coléteres calicinais opostos à lacínia do cálice. **20.** Região apical dos coléteres, livres da lacínia. **21.** Detalhe da lacínia, notar coléteres (Co) e hipoderme (H). **22-23.** Região mediana dos coléteres, fundidos às lacínias do cálice. **24.** Região basal dos coléteres, origens independentes entre si. **25.** Detalhe da lacínia e dos coléteres, notar idioblastos secretores (IS). **21, 23, 25.** Pormenores das figuras 20, 22 e 24 respectivamente. Co = coléter calicinal; H = hipoderme; IS = idioblasto secretor; L = lacínia do cálice; N = nectário; O = ovário. Barras = 100µm (20, 22, 24); 50µm (21, 23, 25).



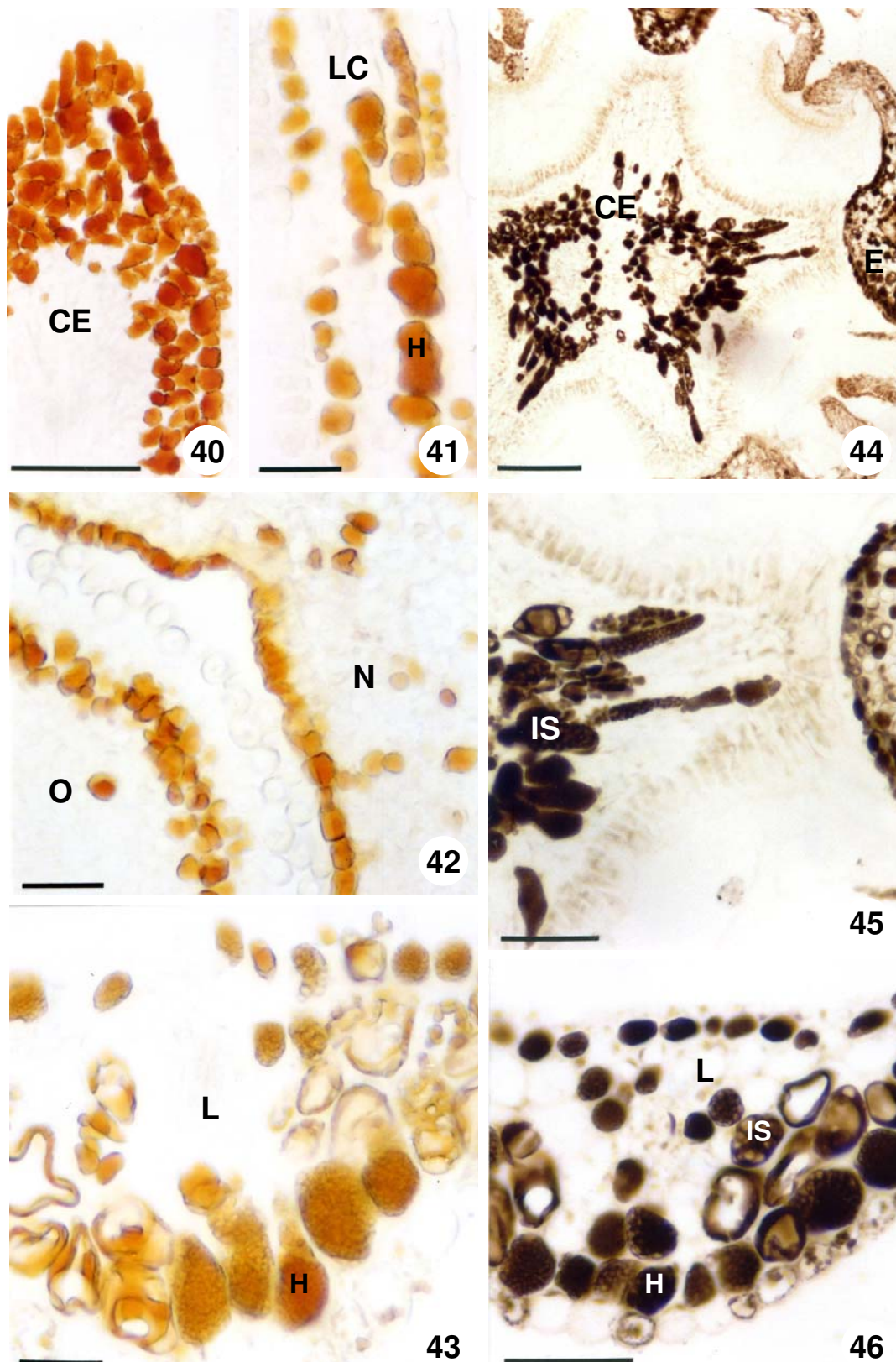
Figuras 26-30. Secções transversais (26-27) e longitudinais (28-30) de flores em antese de *F. glabrescens*, destacando coléteres calicinais. **26.** Região mediana dos coléteres. **27.** Região basal dos coléteres. **28.** Coléter sésil, sem pedúnculo diferenciado. **29.** Coléter reduzido. **30.** Pormenor da figura 29; detalhe do coléter reduzido. Ca = base do cálice; Co = coléter calicinal; T = tubo da corola. Barras = 50µm (26-29); 25µm (30).



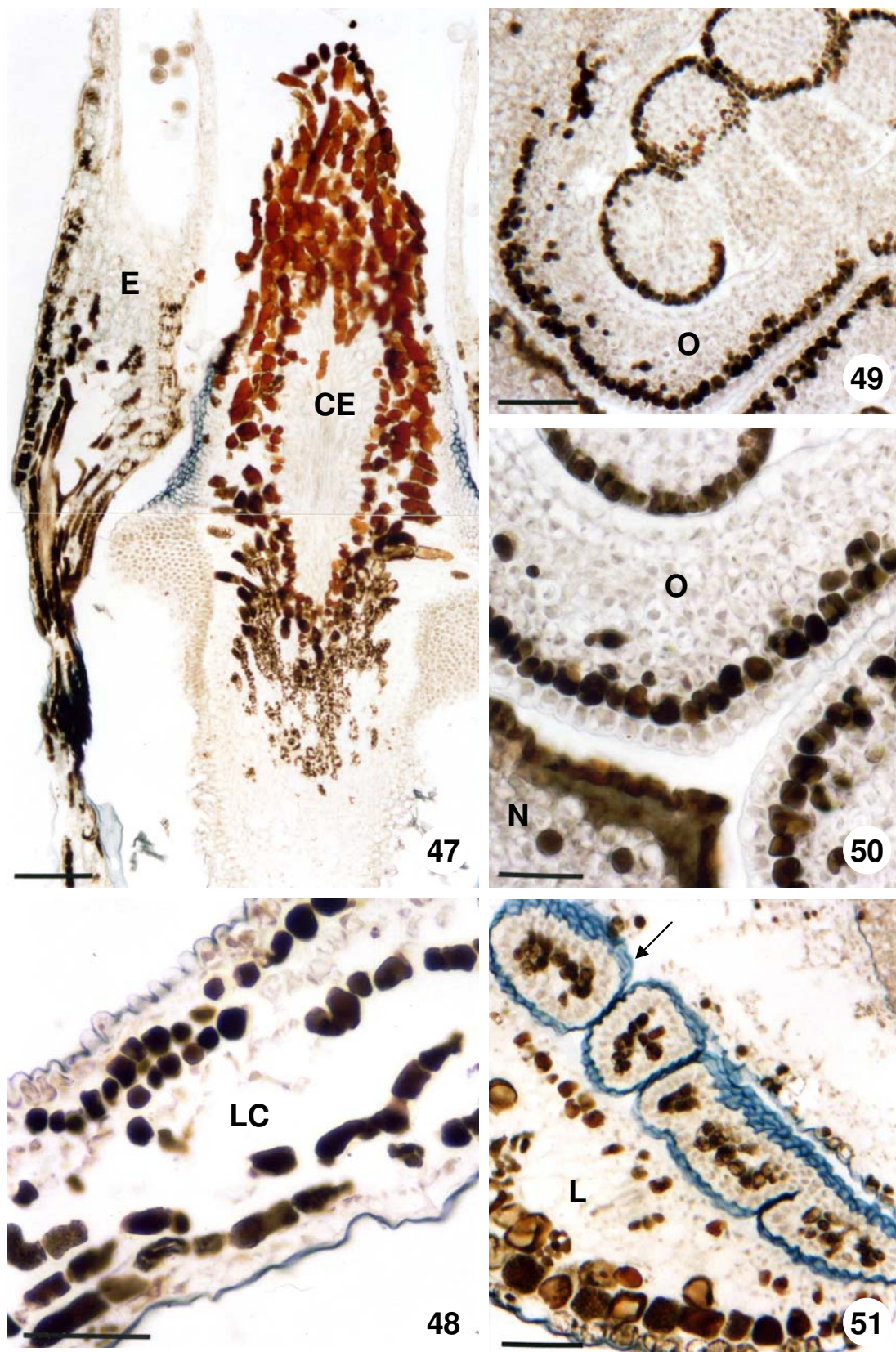
Figuras 31-35. Seções transversais da região inferior do botão floral de *F. glabrescens*. **31.** Ovário (O) e nectários (N). **32.** Região basal do ovário, demais peças florais fundidas. **33.** Receptáculo floral (R), grande quantidade de idioblastos na hipoderme. **34.** Pormenor da figura 33; detalhe da hipoderme secretora (H) e da epiderme com estômato (seta). **35.** Base do receptáculo e bractéola (B); coléteres ausentes. B = bractéola; H = hipoderme; N = nectário; O = ovário; R = receptáculo floral. Barras = 100µm (31-33, 35); 50µm (34).



Figuras 36-39. Secções longitudinal (36) e transversais (37-39) da região inferior da flor em antese de *F. glabrescens*. **36.** Ovário (O) com laticíferos (setas finas), e nectário (N). **37.** Região apical do nectário; epiderme secretora (seta larga). **38.** Ovário com laticíferos (setas finas) e hipoderme secretora (H). **39.** Pormenor da figura 34; detalhe do ovário, destacando a hipoderme (H) e os laticíferos (setas finas). F = filete; H = hipoderme; N = nectário; O = ovário. Barras = 50µm (36-37); 25µm (39).



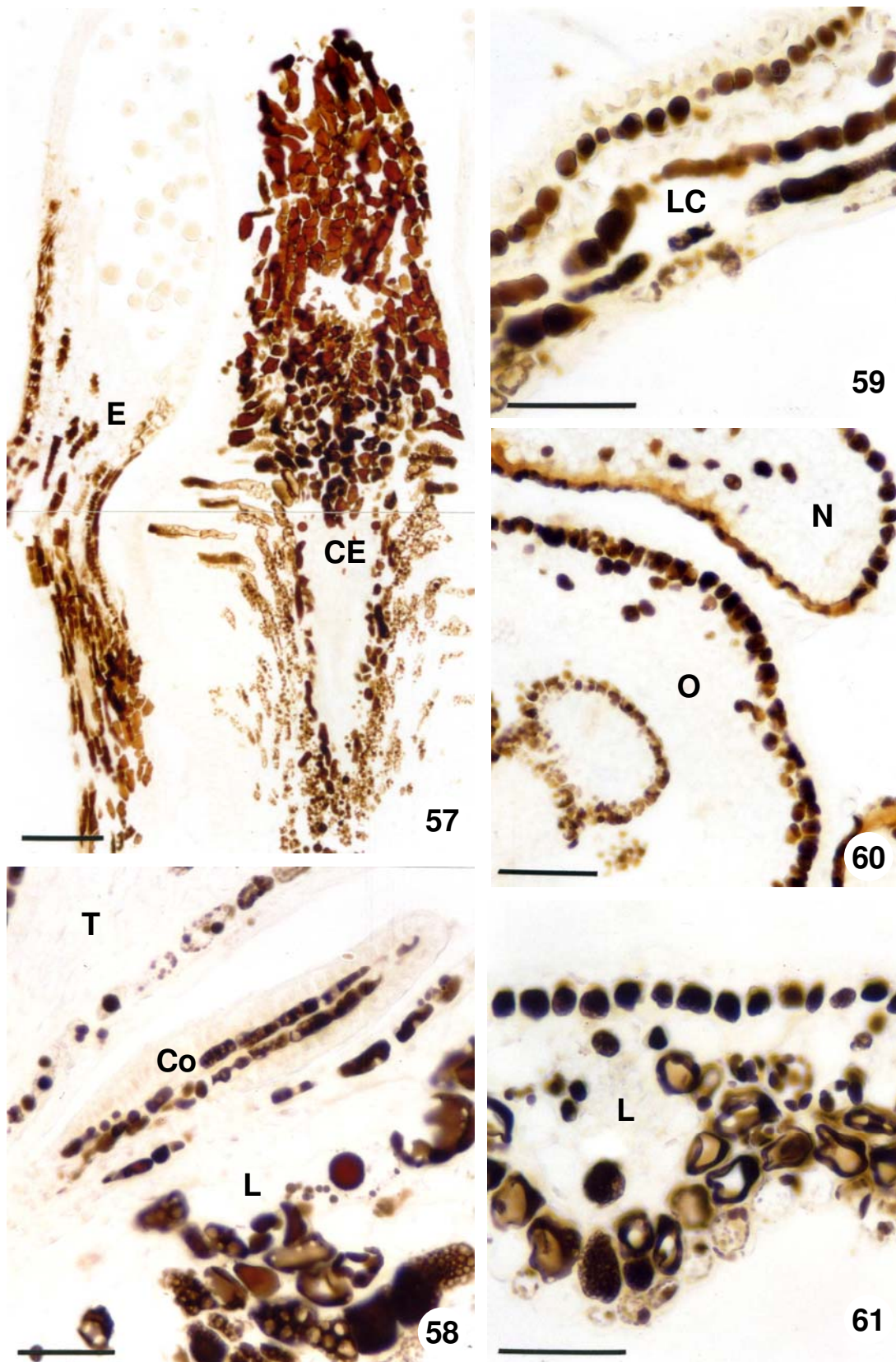
Figuras 40-46. Secções longitudinais (40-41) e transversais (42-46) de flor em antese de *F. glabrescens*. **40-43.** Material fixado em FNT (branco). **44-46.** SFF evidencia compostos fenólicos em hipoderme (H) e idioblastos (IS). **40.** Cabeça do estilete (CE). **41.** Lacínia da corola (LC). **42.** Ovário (O) e nectário (N). **43.** Lacínia do cálice (L). **44.** Cabeça do estilete (CE) e estames (E). **45.** Pormenor da figura 44; detalhe da cabeça do estilete. **46.** Lacínia do cálice (L). CE = cabeça do estilete; E = estame; IS = idioblasto secretor. Barras = 100µm (40, 44); 50µm (45-46); 25µm (41-43).



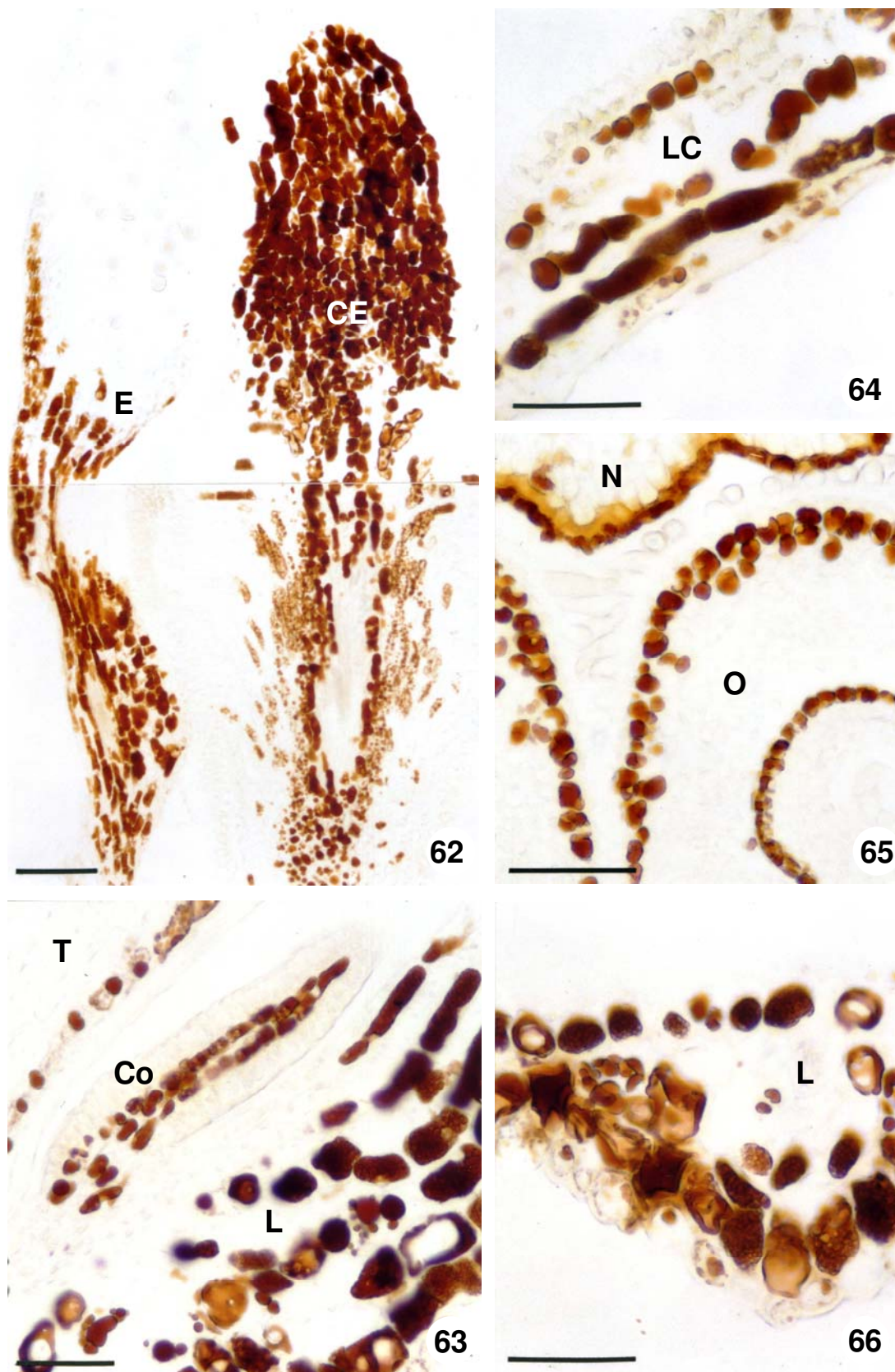
Figuras 47-51. Secções longitudinais (47-48) e transversais (49-51) de flor em antese de *F. glabrescens*; material fixado em FNT e corado pelo negro de Sudão B para evidenciar lipídios totais. **47.** Vista geral da cabeça do estilete (CE) e estames (E). **48.** Lacínia da corola (LC). **49.** Ovário (O) com óvulos. **50.** Pormenor da figura 49; detalhe da hipoderme do ovário (O) e epiderme do nectário (N). **51.** Lacínia do cálice com coléteres; cutícula evidenciada pelo Negro de Sudão B (seta). CE = cabeça do estilete; E = estame; L = lacínia do cálice; LC = lacínia da corola; N = nectário; O = ovário. Barras = 100µm (47); 50µm (48-49, 51); 25µm (50).



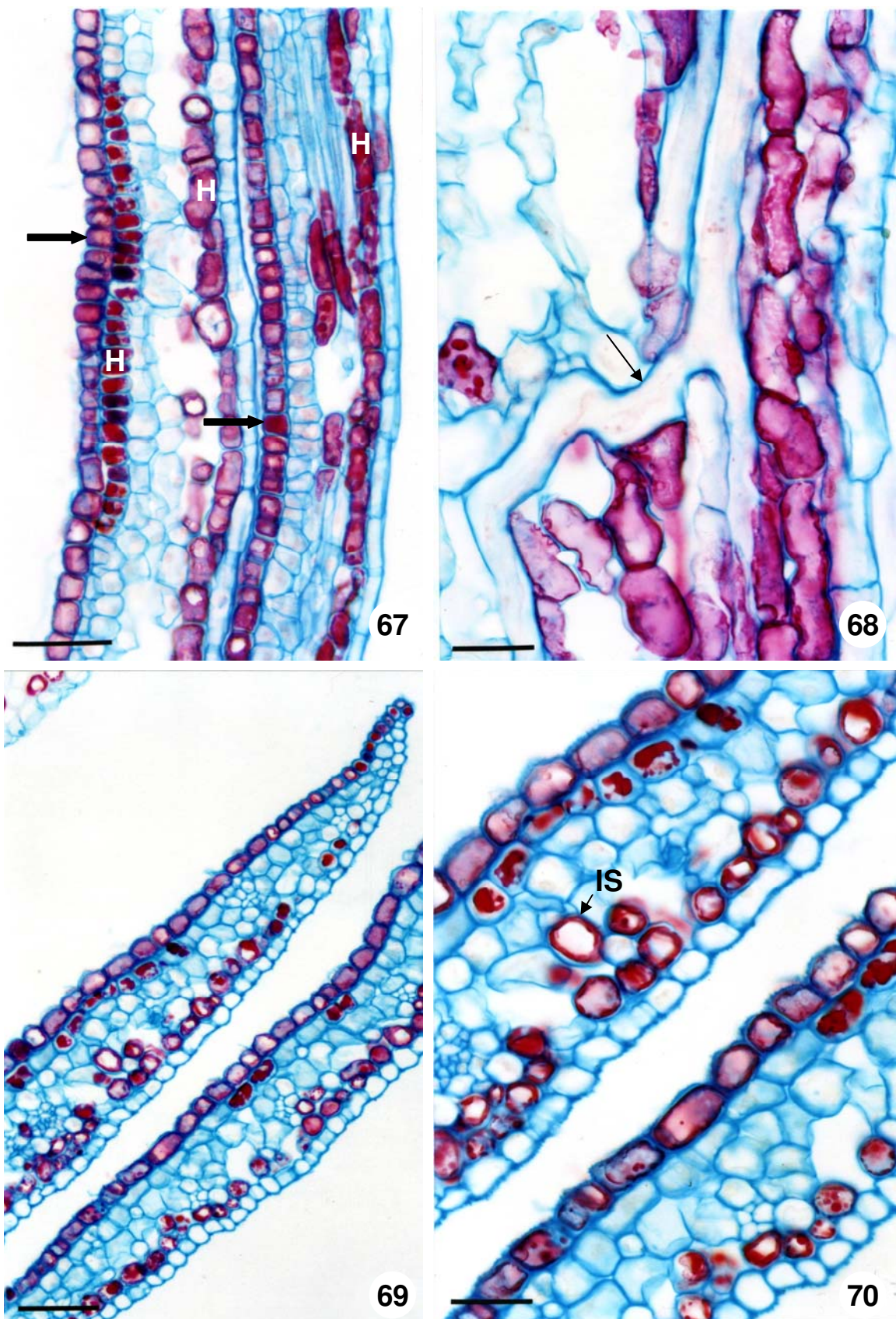
Figuras 52-56. Secções longitudinais (52-55) e transversal (56) de flor em antese de *F. glabrescens*; material fixado em FNT e corado pelo acetato de cobre/ácido rubeânico para evidenciar ácidos graxos. **52.** Vista geral da cabeça do estilete (CE) e estames (E). **53, 56.** Lacínia do cálice (L) com coléter (Co). **54.** Lacínia da corola (LC). **55.** Ovário (O) com óvulos e nectário (N). CE = cabeça do estilete; Co = coléter; E = estame; L = lacínia do cálice; LC = lacínia da corola; N = nectário; O = ovário. Barras = 200µm (52); 100µm (53-56).



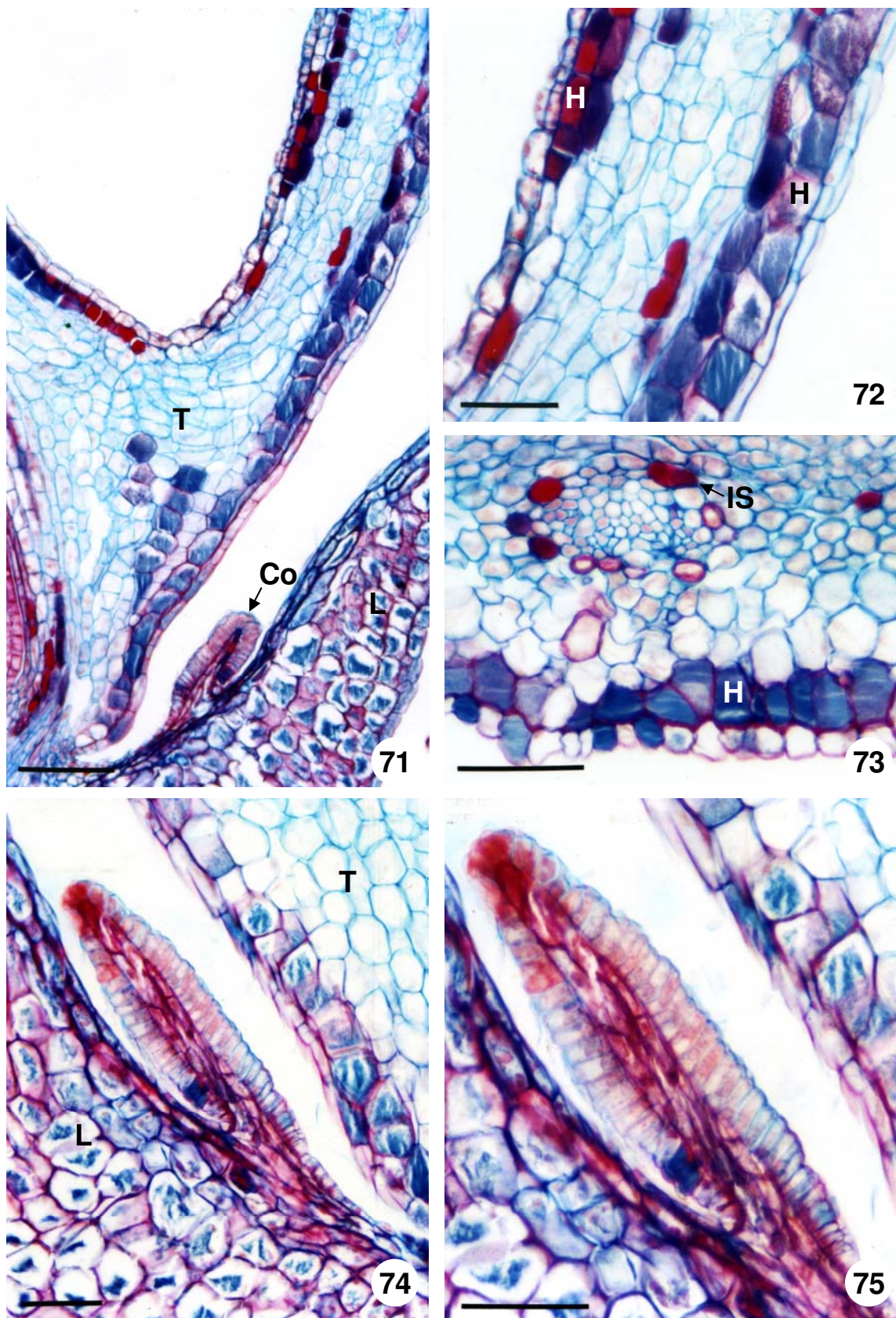
Figuras 57-61. Secções longitudinais (57-59) e transversais (60-61) de flor em antese de *F. glabrescens*; material fixado em FNT e corado pelo cloreto de ferro III para evidenciar compostos fenólicos. **57.** Vista geral da cabeça do estilete (CE) e estame (E). **58.** Lacínia do cálice (L) com coléter (Co). **59.** Lacínia da corola (LC). **60.** Ovário (O) com óvulos e nectário (N). **61.** Lacínia do cálice (L). CE = cabeça do estilete; Co = coléter; E = estame; L = lacínia do cálice; LC = lacínia da corola; N = nectário; O = ovário; T = tubo da corola. Barras = 100µm (57); 50µm (58-61).



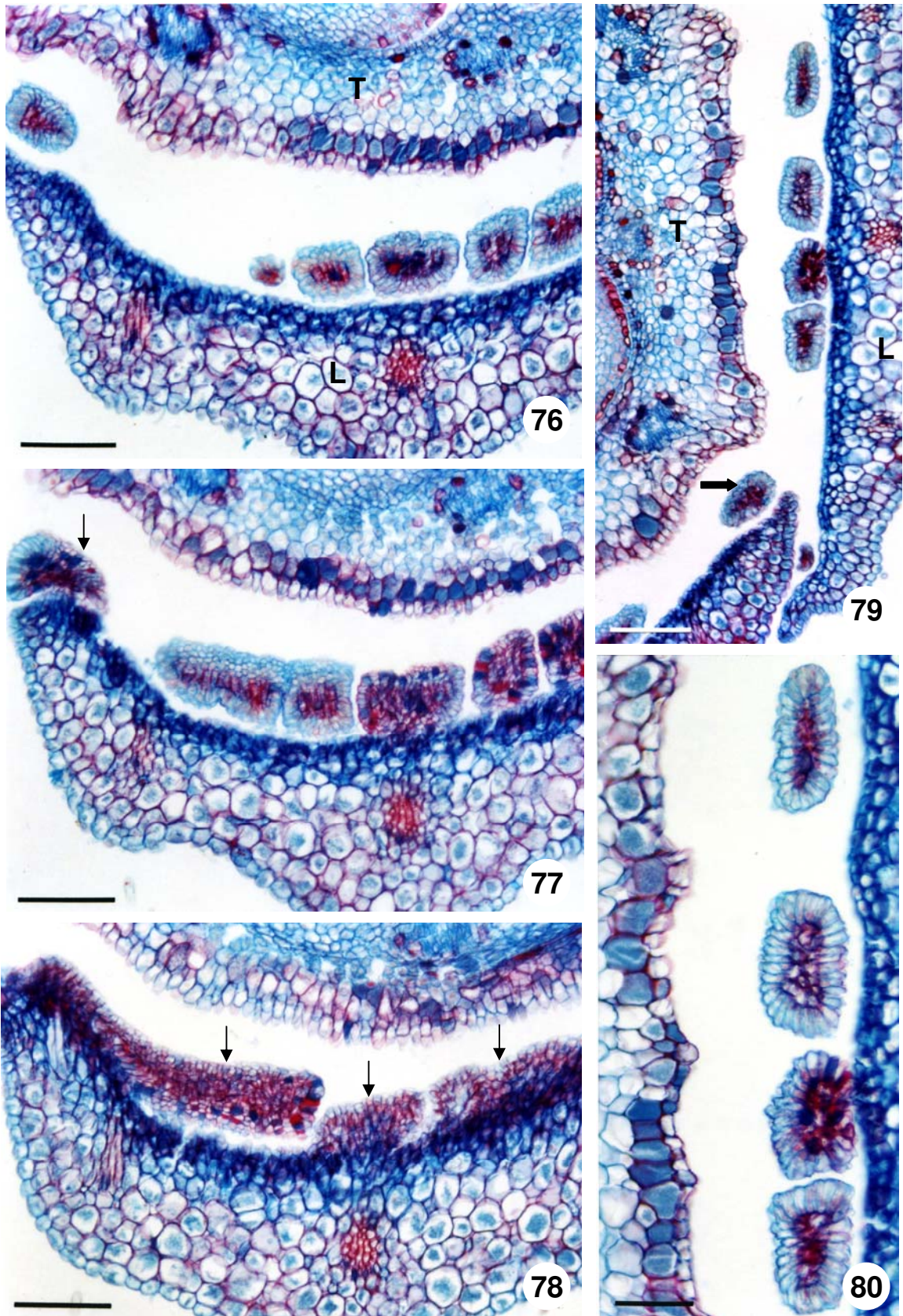
Figuras 62-66. Seções longitudinais (62-64) e transversais (65-66) de flor em antese de *F. glabrescens*; material fixado em FNT e corado pelo dicromato de potássio para evidenciar compostos fenólicos. **53.** Vista geral da cabeça do estilete (CE) e estame (E). **54.** Lacínia do cálice (L) com coléter (Co). **55.** Lacínia da corola (LC). **56.** Ovário (O) com óvulos e nectário (N). **57.** Lacínia do cálice (L). CE = cabeça do estilete; Co = coléter; E = estame; L = lacínia do cálice; LC = lacínia da corola; N = nectário; O = ovário; T = tubo da corola. Barras = 100µm (62); 50µm (63-66).



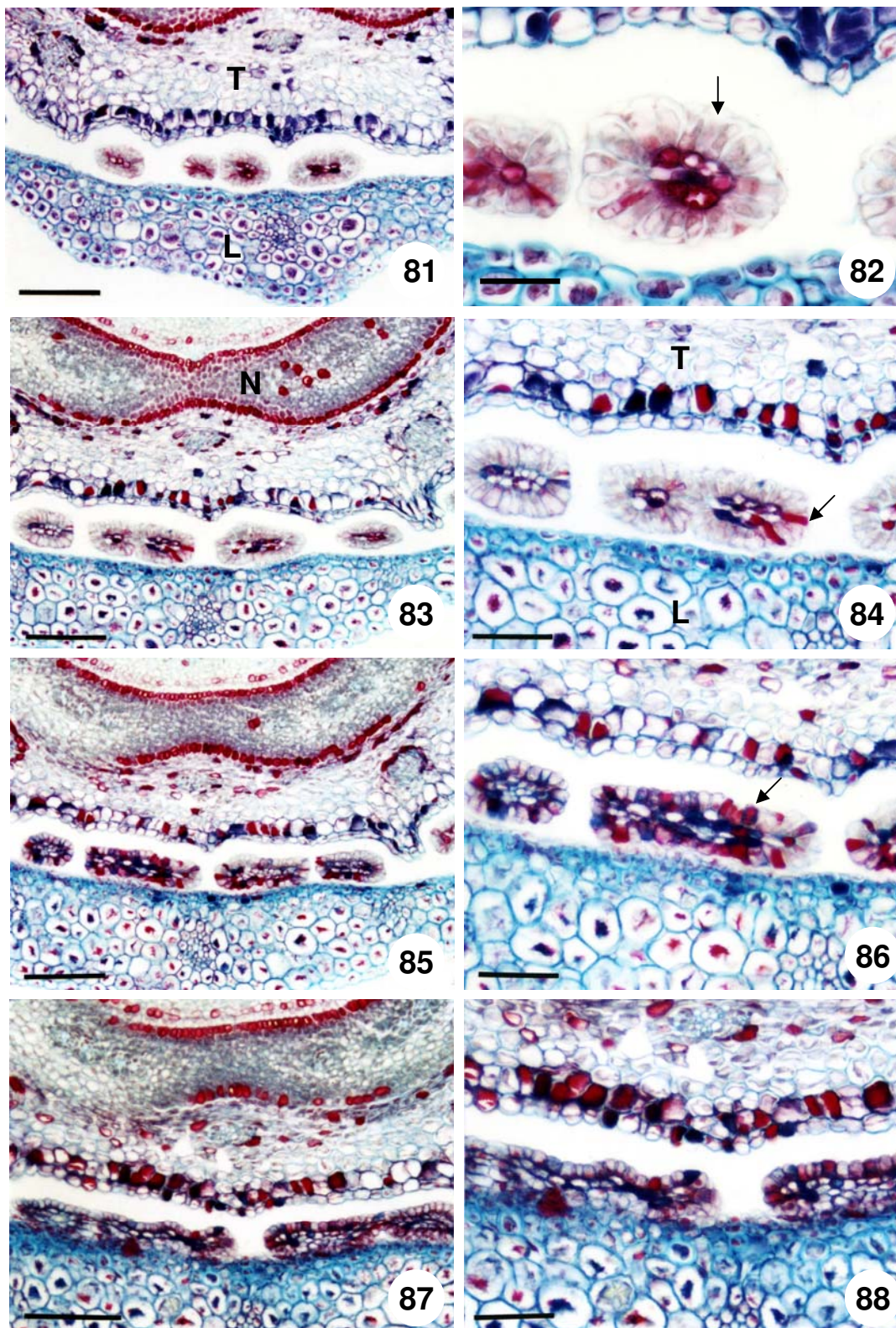
Figuras 67-70. Secções longitudinais (67-68) e transversais (69-70) de lacínias da corola de botão floral de *F. pubescens*. **67.** Epiderme da face adaxial das lacínias com células coradas (setas largas) e hipoderme secretora (H). **68.** Laticífero ramificado (seta fina). **69.** Vista geral das lacínias, epiderme interna e idioblastos corados. **70.** Pormenor da figura 69; detalhe da epiderme, hipoderme e idioblastos (IS). H = hipoderme; IS = idioblasto secretor. Barras = 50µm (58,60); 25µm (59,61).



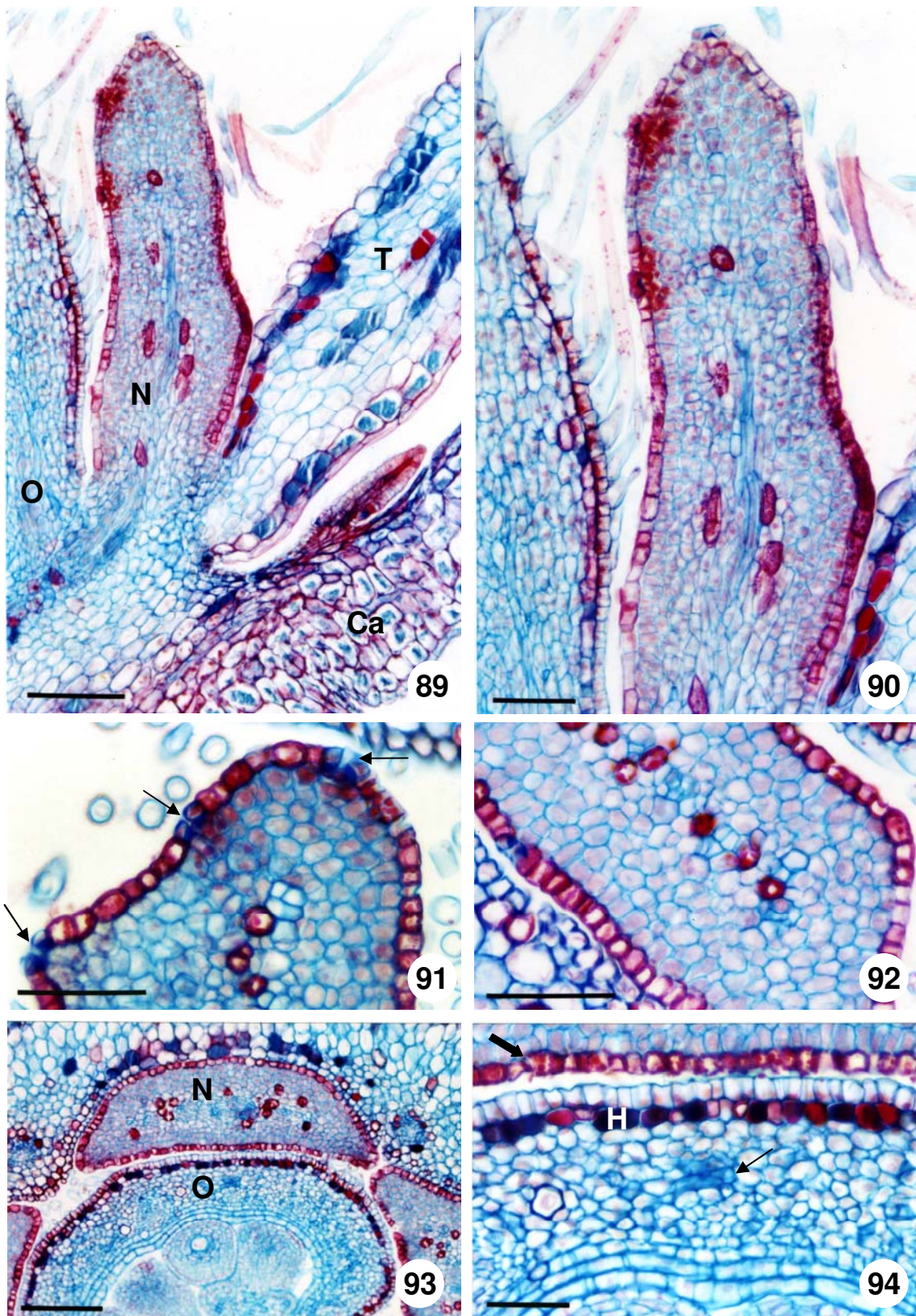
Figuras 71-75. Secções longitudinais (71-72, 74-75) e transversal (73) da região inferior de botão floral de *F. pubescens*. **71.** Tubo da corola (T) com idioblastos e lacínia do cálice (L) com coléter (Co). **72.** Pormenor da figura 71; detalhe da hipoderme (H) no tubo da corola. **73.** Região inferior do tubo da corola, com hipoderme e idioblastos (FV). **74.** Coléter calicinal em seu maior comprimento. **75.** Pormenor da figura 74; detalhe do coléter. Co = coléter; FV = feixe vascular; H = hipoderme; T = tubo da corola. Barras = 100µm (71); 50µm (72-75).



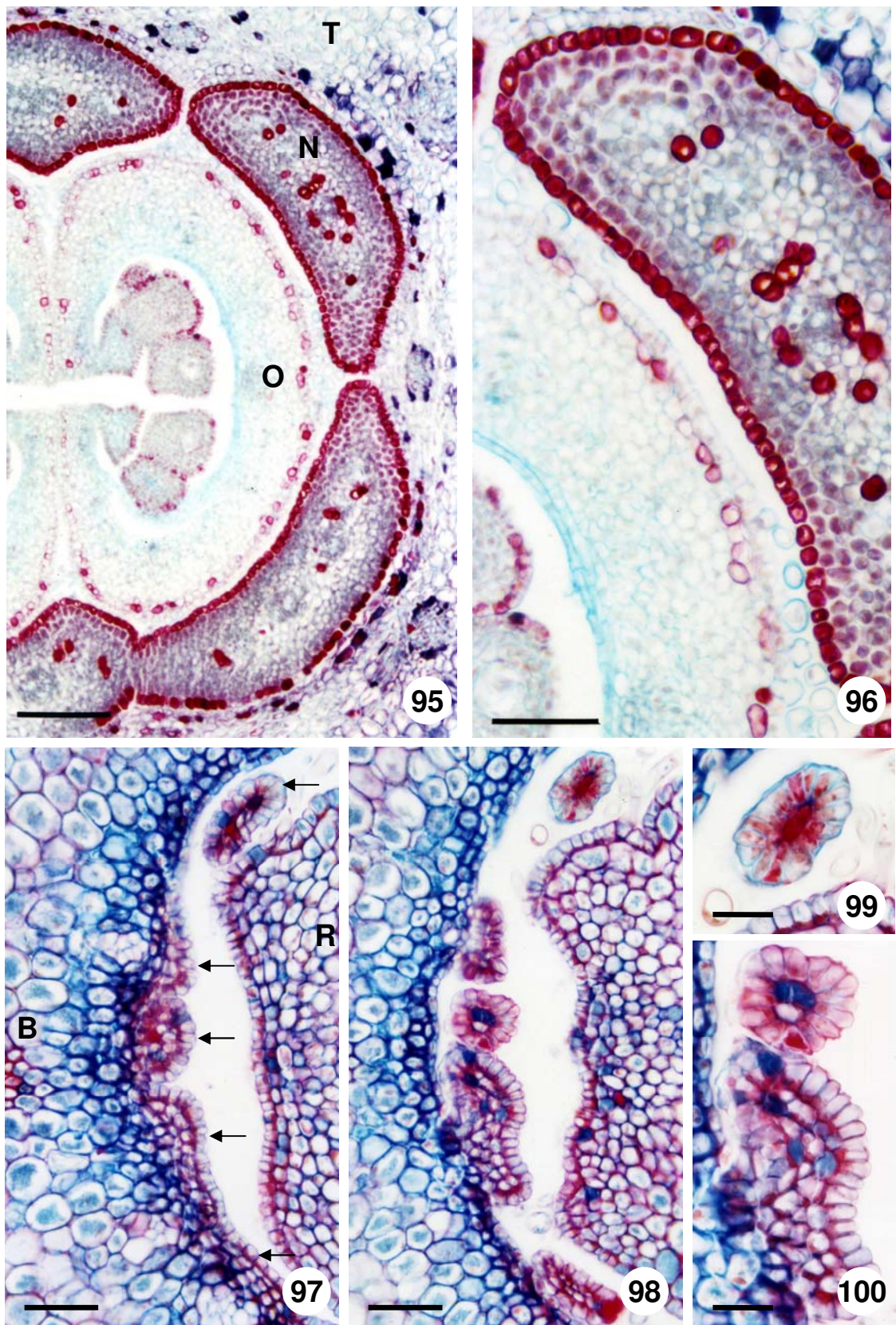
Figuras 76-80. Secções transversais de botão floral de *F. pubescens*, destacando coléteres calicinais. **76.** Região apical dos coléteres. **77.** Região mediana dos coléteres opostos e base do coléter marginal (seta fina). **78.** Base dos coléteres opostos, mostrando origem independente de três deles (setas finas), que se ramificam na região mediana. **79.** Coléteres opostos e marginal (seta larga) de outras lacínias. **80.** Pormenor da figura 79; detalhe dos coléteres opostos. L = lacínia do cálice; T = tubo da corola. Barras = 100µm (76-79); 50µm (80).



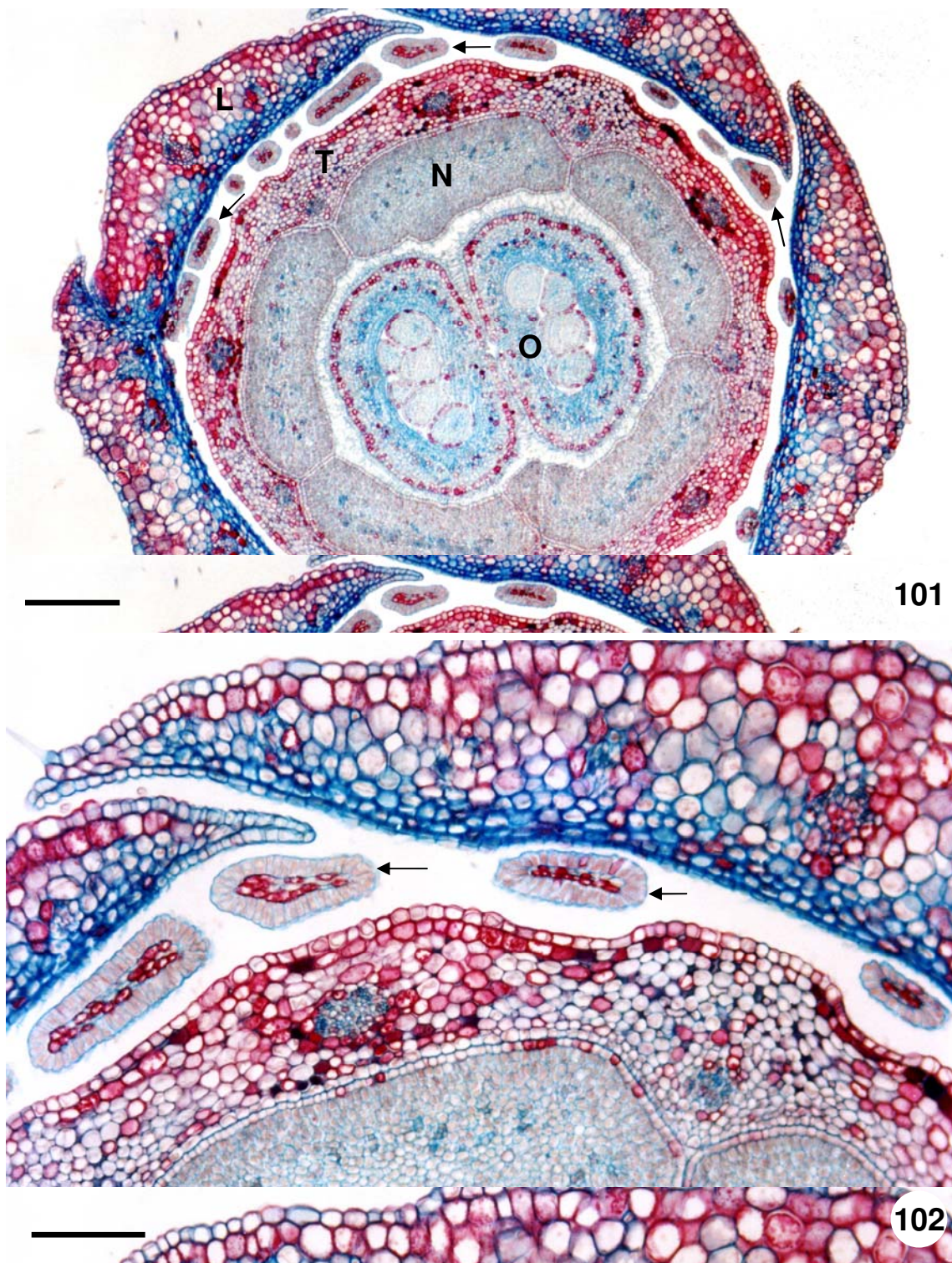
Figuras 81-88. Secções transversais de flor em antese de *F. pubescens*, destacando coléteres calicinais. **81.** Ápice dos coléteres; um deles completamente dividido. **82.** Células epidérmicas do coléter sem conteúdo (seta). **83.** Região apical dos coléteres, início da divisão de um deles. **84, 86.** Células epidérmicas com conteúdo acidófilo denso (setas). **85.** Região mediana dos coléteres. **87.** Base de dois coléteres, que se ramificam em cinco na região mediana e apical. **88.** Detalhe da base dos coléteres. **82, 84, 86, 88.** Pormenores das figuras 81, 83, 85 e 87 respectivamente. L = lacínia do cálice; N = nectário; T = tubo da corola. Barras = 100µm (81, 83, 85, 87); 50µm (84, 86, 88); 25µm (82).



Figuras 89-94. Secções longitudinais (89-90) e transversais (91-94) da região inferior do botão floral de *F. pubescens*. **89.** Nectário (N), tubo da corola (T) e cálice (Ca) com coléter. **90.** Pormenor da figura 89; detalhe do nectário. **91.** Região apical do nectário, diversos estômatos (setas) e epiderme secretora. **92.** Região mediana do nectário, estômato e idioblastos na epiderme. **93.** Nectários (N) e ovário (O), vista geral. **94.** Detalhe do ovário e nectário, destacando a hipoderme (H), um laticífero (seta) no mesofilo ovariano e epiderme (seta larga) do nectário. Ca = base do cálice; H = hipoderme; N = nectário; O = ovário; T = tubo da corola. Barras = 100µm (89, 93); 50µm (90-92, 94).



Figuras 95-100. Secções transversais da região inferior da flor em antese (95-96) e botão floral (97-100) de *F. pubescens*. **95.** Vista geral do ovário (O), nectários (N) e tubo da corola (T). **96.** Pormenor da figura 95; detalhe do nectário. **97.** Base dos coléteres bracteolares (setas), origens independentes. **98.** Região mediana dos coléteres. **99-100.** Pormenores da figura 98; detalhe dos coléteres em fase pós-secretora de mucilagem. B = bractéola; N = nectário; O = ovário; R = receptáculo floral; T = tubo da corola. Barras = 100µm (95); 50µm (96-98); 25µm (99-100).



Figuras 101-102. Seções transversais de botão floral de *F. velloziana*. **101.** Vista geral da região inferior do botão, mostrando ovário (O), nectário (N) 5-lobado, tubo da corola (T), coléteres calicinais indefinidamente distribuídos (setas) e lacínias do cálice (L). **102.** Pormenor da figura 101; detalhe do botão, destacando coléteres calicinais (setas). L = lacínia do cálice; N = nectário; O = ovário; T = tubo da corola. Barras = 200µm (101); 100µm (102).

5. CAPÍTULO 5

Ginostégio em espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) de cerrado

Introdução

A família Apocynaceae, uma das maiores dentre as Angiospermas (Judd *et al.* 2002), foi alvo de uma controvérsia quanto à sua circunscrição nos últimos anos, culminando na proposição de uma nova classificação, baseada em caracteres morfológicos e apoiada por dados moleculares, que inclui Asclepiadaceae (Endress & Bruyns 2000). Dessa forma, Apocynaceae ficou constituída por cinco subfamílias: Rauvolfioideae Kostel. (=Plumerioideae) e Apocynoideae Burnett (=Echitoideae), referentes às antigas Apocynaceae; Periplocoideae R. Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R. Br. ex Burnett, que constituíam as antigas Asclepiadaceae.

A sinorganização progressiva do gineceu e androceu, com diferentes níveis de fusão posgênita entre essas estruturas, formando o ginostégio, é uma das principais tendências evolutivas em Apocynaceae e está presente em quatro das cinco subfamílias circunscritas nas mais recentes propostas de classificação para a família (Endress & Bruyns 2000, Simões 2004).

Fallen (1986) investigou flores de 65 espécies de Apocynaceae e quatro de Asclepiadaceae, e verificou uma evolução progressiva da estrutura da cabeça do estilete, propondo quatro tipos básicos baseados na complexidade morfológica, histológica e funcional. Simões (2004) descreveu anatomicamente o ginostégio de sete espécies pertencentes à tribo *Mesechiteae* Miers *sensu* Endress & Bruyns (2000). A epiderme secretora que reveste a cabeça do estilete produz uma substância viscosa que facilita o transporte do pólen pelo polinizador nos representantes das subfamílias Rauvolfioideae e Apocynoideae (Fallen 1986).

Forsteronia G.Mey. está incluído na tribo *Apocyneae* Rchb., caracterizada por apresentar a cabeça do estilete ovóide a fusiforme, com formato circular em secção transversal, e as anteras ligadas à cabeça do estilete através de tufo de tricomas alongados, sem fusão

celular (Endress & Bruyns 2000). Com base em estudos filogenéticos apoiados por caracteres morfológicos e moleculares, Simões *et al.* (2004) propuseram um rearranjo dos gêneros pertencentes à tribo *Mesechiteae* Miers para torná-la monofilética, pelo qual seriam necessárias a inclusão de *Forsteronia*, a exclusão de *Galactophora* e *Secondatia*, e a manutenção de *Mandevilla*, *Macrosiphonia* e *Mesechites* em sua circunscrição. Essa tribo é caracterizada pela presença de cinco projeções evidentes na cabeça do estilete, que tem um formato pentagonal e se encontra adnata aos conectivos por justaposição de tricomas e fusão celular (Simões *et al.* 2004).

Frente às recentes pesquisas relacionadas ao posicionamento supra-genérico de *Forsteronia*, pretende-se identificar elementos anatômicos que corroborem a proposta de reposicionamento desse gênero na tribo *Mesechiteae*.

Material e métodos

Inflorescências de *F. australis*, *F. glabrescens*, *F. pubescens* e *F. velloziana*, com flores em antese e botões florais de diversos tamanhos, foram coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (SP), na Estação Ecológica e Estação Experimental de Itirapina (SP), em São José do Rio Pardo (SP) ou em Carrancas (MG). Material testemunha para cada indivíduo coletado foi incorporado ao herbário UEC (tabela 1). Todo o material foi fixado em FAA (formalina:ácido acético:álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940), mantidas em vácuo e estocadas, em seguida, em etanol 70%.

Botões florais em pré-antese e flores em antese foram isolados, transferidos para álcool butílico 70%, desidratados pela série butílica (Johansen 1940) e incluídos em “paraplast”. Secções seriadas longitudinais e transversais, com espessura de 10µm, foram obtidas com o auxílio de micrótomo rotativo. As secções foram coradas com safranina alcoólica 0,25% e azul de astra aquoso 1% (Gerlach 1969), e as lâminas montadas em resina sintética Permount.

Para evidenciar a natureza da secreção produzida pela epiderme da cabeça do estilete, os tratamentos citados a seguir foram empregados, sendo as lâminas semipermanentes montadas em gelatina glicerinada:

- a. Vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989);
- b. Ácido tânico/cloreto de ferro III para mucilagem (Pizzolato & Lillie 1973);
- c. Azul de Alcian para mucopolissacarídeos ácidos (Pearse 1985);
- d. Reação PAS (Periodic-Acid-Schiff reagent) para polissacarídeos gerais (McManus 1948).

Após observação e análise do laminário, o registro dos aspectos importantes foi efetuado por fotomicrografias coloridas obtidas em microscópio Olympus BX51 com a utilização de filme Kodak ProImage 100; as escalas foram obtidas pela projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. As fotomicrografias obtidas foram digitalizadas com alta resolução (600 dpi) e as pranchas de ilustrações montadas em meio digital com o uso do software Microsoft Power Point 2003. As figuras foram agrupadas por espécie e as estruturas florais foram organizadas nas pranchas considerando-se a flor de cima para baixo, para facilitar a visualização.

Tabela 1. Dados referentes ao material testemunha das espécies de *Forsteronia*: local de coleta, data, coletores e herbário (Δ – indivíduo).

espécie	Δ	Local	Data	Coletor	Herbário
<i>F. australis</i>	AUS2	Mogi Guaçu	11-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 26</i>	UEC
<i>F. glabrescens</i>	GLA2	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 22</i>	UEC
	GLA4	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 24</i>	UEC
	GLA5	Mogi Guaçu	21-X-2002	<i>MCS do Rio et al. 25</i>	UEC
	GLA8	Itirapina	8-XI-2003	<i>MCS do Rio et al. 32</i>	UEC
<i>F. pubescens</i>	PUB94	São José do Rio Pardo	8-XI-1994	<i>LS Kinoshita 94-19 & Sartori</i>	UEC
<i>F. velloziana</i>	VELM	Mogi Guaçu	14-X-2003	<i>MCS do Rio et al. 29</i>	UEC
	VELC	Carrancas	13-X-2001	<i>MCS do Rio et al. 17</i>	

Resultados

Nas espécies de *Forsteronia*, a cabeça do estilete e os estames estão adnatos, formando um aparato especializado para a polinização por insetos que possuem língua longa.

Há pouca diferença no formato da porção da cabeça do estilete próxima à região fértil das anteras entre as quatro espécies: em *F. glabrescens*, a estrutura pode ser 5-lobada ou 10-lobada (figura 27), enquanto em *F. australis* (figura 2), *F. pubescens* (figuras 33, 35) e *F. velloziana* (figura 45), a cabeça do estilete é 10-lobada, se observada em secção transversal. Em *F. australis* (figuras 3-4) e *F. pubescens* (figuras 37-38), há uma justaposição das células epidérmicas papilosas da cabeça do estilete com a parte fértil da antera, embora elas não estejam adnatas nessa região.

A epiderme que reveste a cabeça do estilete é secretora e assume um aspecto em paliçada logo abaixo da região apical. Nessa região, a cabeça do estilete é 5-lobada em todas as espécies (figuras 4-6, 13, 15, 39, 41, 46) e está justaposta aos conectivos dos estames, uma vez que as tecas com pólen estão restritas à sua porção apical. Células epidérmicas com retração do protoplasto e sem conteúdo são observadas na cabeça do estilete de botões florais de *F. pubescens* (figuras 39-40), embora não tenha sido detectada secreção no meio extracelular. Em botões florais de *F. australis* (figuras 6-9), *F. glabrescens* (figuras 13-16) e *F. velloziana* (figuras 47-48), células epidérmicas com protoplasto retraído e secreção acidófila presente no meio extracelular, corada pela Safranina, são observadas na cabeça do estilete. Em *F. glabrescens*, a secreção das células epidérmicas é constituída por polissacarídeos, como evidenciado pela reação PAS, e foi observada no interior das células (figura 29) e no meio extracelular, acumulada na porção superior do ginostégio (figuras 25-28).

A epiderme continua em paliçada pela região onde a cabeça do estilete é 5-lobada (figuras 18-20), embora não esteja em fase secretora em toda a sua extensão. Observa-se o início da adnação entre as células epidérmicas da cabeça do estilete e do conectivo expandido (figuras 19-20), que vai estar completamente estabelecida cerca de 50µm abaixo, onde verifica-

se a cimentação entre as paredes dessas células (figuras 21-22, 41-42). Em todas as espécies, as células epidérmicas do conectivo do estame têm um aspecto alongado e papiloso na região de adnação à cabeça do estilete, onde esta é levemente 5-lobada. Logo abaixo da região de adnação, a cabeça do estilete torna-se cilíndrica (figura 23) e a cimentação entre as paredes das células epidérmicas da cabeça do estilete e do conectivo expandido não é mais observada (figura 24).

Discussão

A estrutura do ginostégio de *Forsteronia* segue o padrão diagnóstico para a tribo *Mesechiteae* e não o padrão de *Apocynae*, conforme designado por Endress & Bruyns (2000), sendo muito semelhante àquela de espécies de *Mandevilla*, *Macrosiphonia* e *Mesechites* (Simões 2004). A cabeça do estilete das quatro espécies de *Forsteronia* pesquisadas apresenta cinco projeções laterais, formadas pela proliferação de células parenquimáticas do corpo principal, que estão adnatas ao conectivo dos estames. A zona de adesão entre a cabeça do estilete e o estame pode ser dividida em duas regiões, uma envolvida com a produção e acúmulo de secreção e outra com o processo de adnação, onde pode ser observada cimentação entre as paredes das células epidérmicas, da mesma forma que em outros gêneros da tribo (Simões 2004). Essas características do ginostégio, associadas aos tipos e distribuição dos coléteres encontrados em *Forsteronia*, corroboram a exclusão do gênero da tribo *Apocynae* e o seu reposicionamento em *Mesechiteae*.

Nas espécies de *Forsteronia* estudadas, a estrutura do ginostégio, formado pela adnação entre a cabeça do estilete e os estames, constitui um aparato especializado para a polinização. Segundo Hansen (1985), o inseto, à procura de néctar, insere sua probóscide pelo pequeno espaço entre as anteras e atinge primeiro o nectário e a região estigmática, localizada no terço inferior da cabeça do estilete, deixando pólen proveniente de outras flores.

Provavelmente esta é a região estigmática da cabeça do estilete, embora tubos polínicos em germinação não tenham sido observados em nenhuma das espécies.

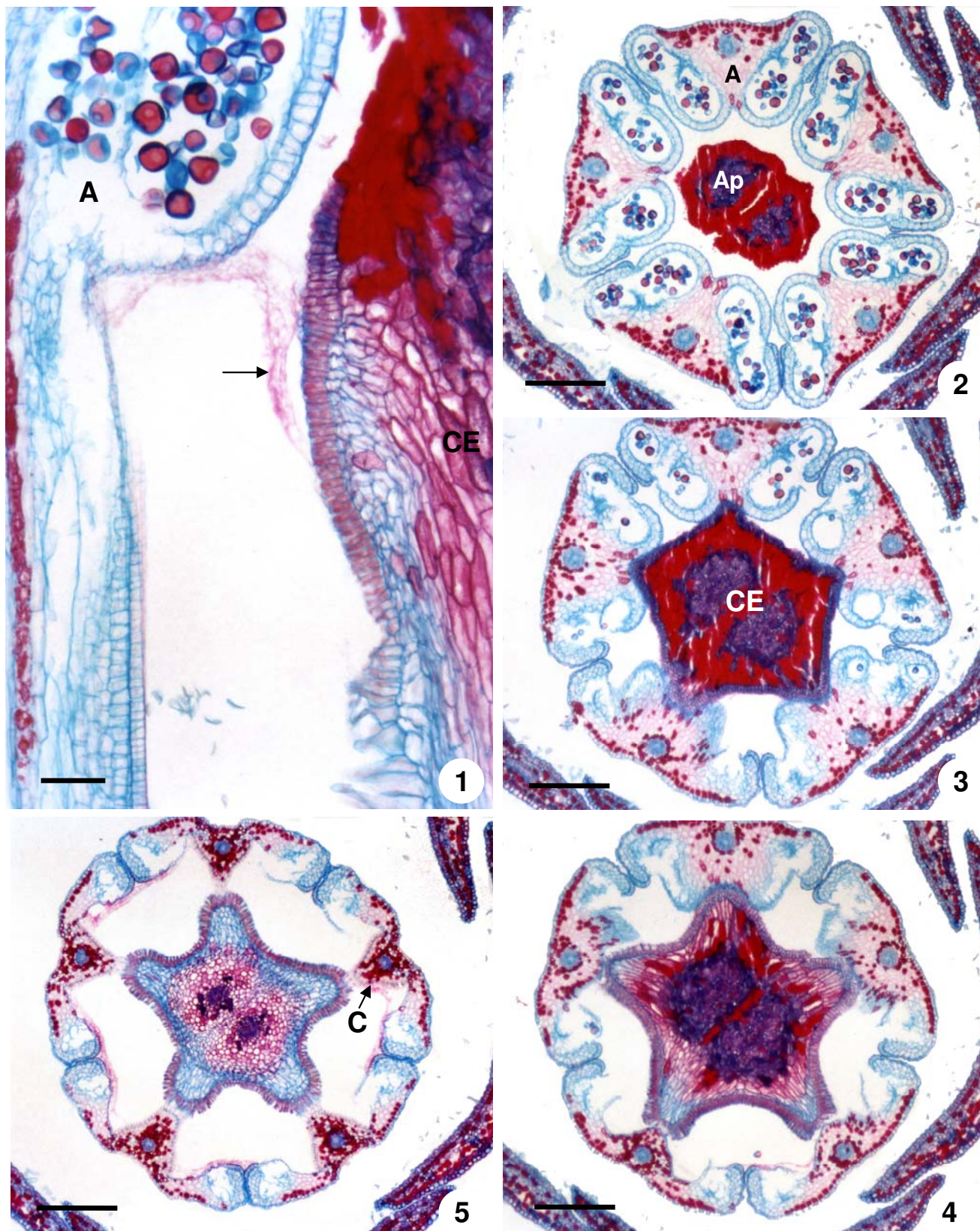
Ao retirar a probóscide, esta passa pelo meio da cabeça do estilete, onde a secreção viscosa produzida pelas células epidérmicas adere-se ao aparelho bucal; finalmente, atinge o terço superior, onde se encontra a porção fértil das anteras, e o pólen dessa flor fica preso, pronto para polinizar outras flores. A estrutura altamente especializada do ginostégio, dessa forma, dificulta a ocorrência de autopolinização nas espécies de *Forsteronia* (Hansen 1985).

Hansen (1985) relatou que as inflorescências de *Forsteronia* posicionam-se eretas no ápice dos ramos laterais da planta e suas flores, com corolas brancas a amareladas, emitem fragrância adocicada; além disso, considerou que as anteras amarelas brilhantes exsertas e conspícuas, em conjunto com as características da corola, tornam a flor um alvo para insetos, principalmente pequenos himenópteros. Isso confere com as observações dos indivíduos de *F. glabrescens* realizadas no campo, onde as plantas foram visitadas predominantemente por pequenas abelhas e vespas durante o dia. No entanto, como Hansen (1985) utiliza freqüentemente o termo probóscide durante a descrição do processo de polinização em *Forsteronia*, sugerindo que ele possa ser efetuado também por lepidópteros, estudos de biologia reprodutiva são necessários para definir o tipo de polinizador em cada uma de suas espécies.

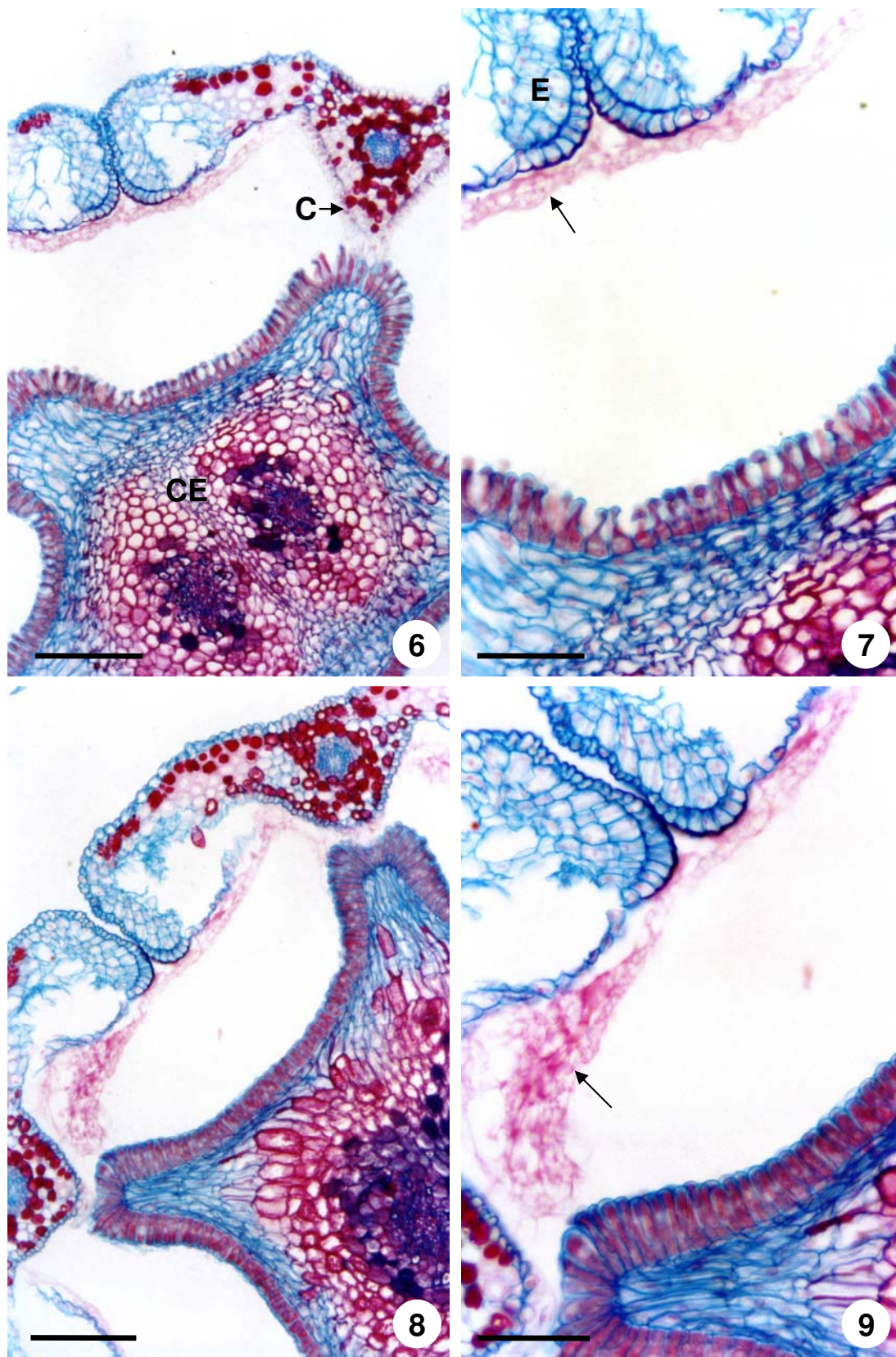
Referências bibliográficas

- ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A Revised Classification of Apocynaceae s.l. The Botanical Review 66:1-56.
- FALLEN, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: Morphological, functional and evolutionary aspects. Botanischer Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 106:245-286.
- GERLACH, D. 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgart.

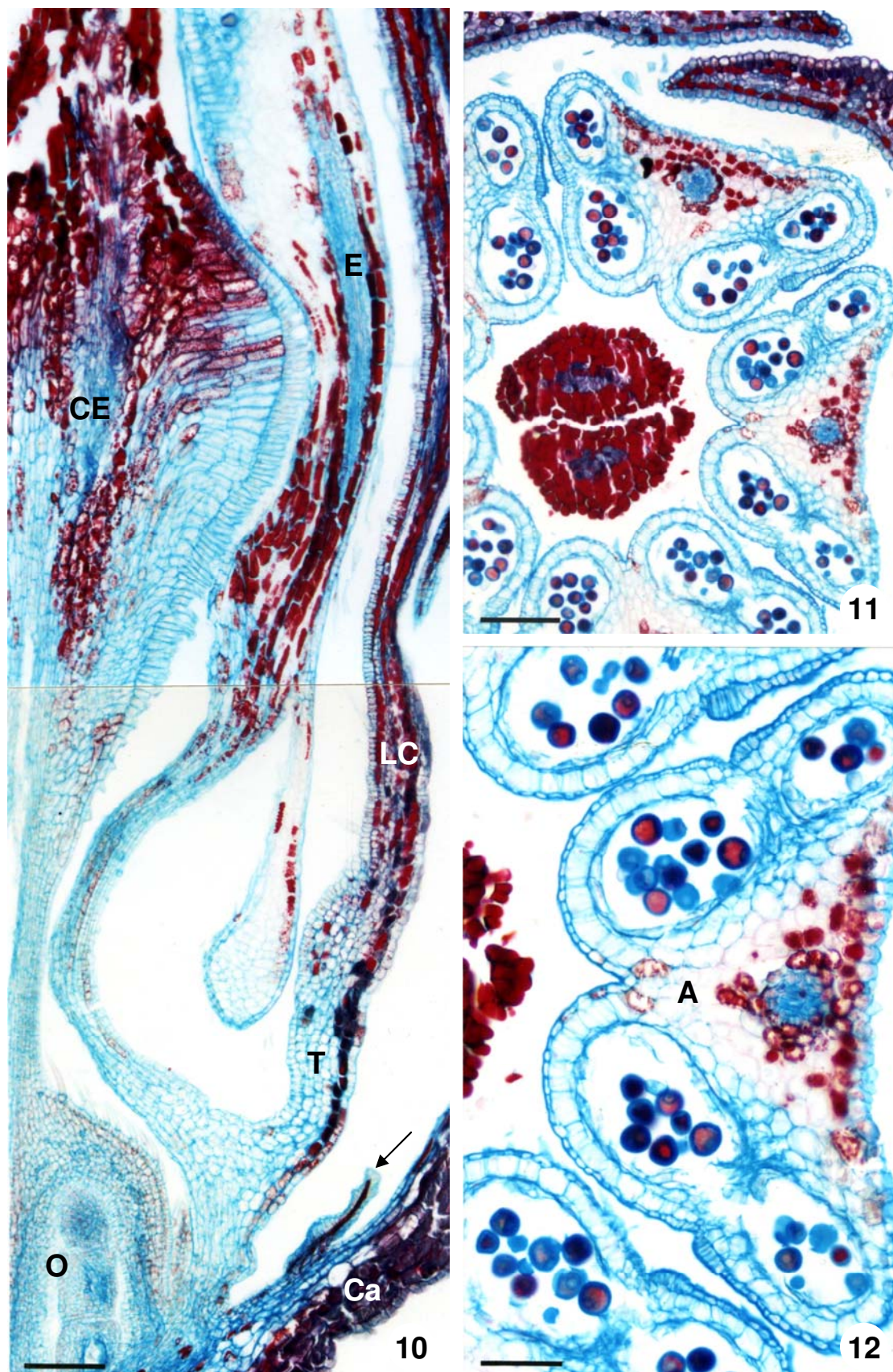
- GREGORY, M. & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- HANSEN, B.F. 1985. A monografic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis. University of South Florida, Tampa.
- JOHANSEN, DA. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 2002. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachussets.
- MCMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23:99-108.
- PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry, theoretical and applied. Vol. II, 4 ed. C. Livingstone, Edinburgh.
- PIZZOLATO, T.D. & LILLIE, R.D. 1973. Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for muvins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21:56-64.
- SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SIMÕES, A.O.; ENDRESS, M.E.; van der NIET, T.; KINOSHITA, L.S. & CONTI, E. 2004. Tribal and intergeneric relationships of Mesechiteae (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence from three noncoding plastid DNA regions and morphology. *American Journal of Botany* 91:1409-1418.



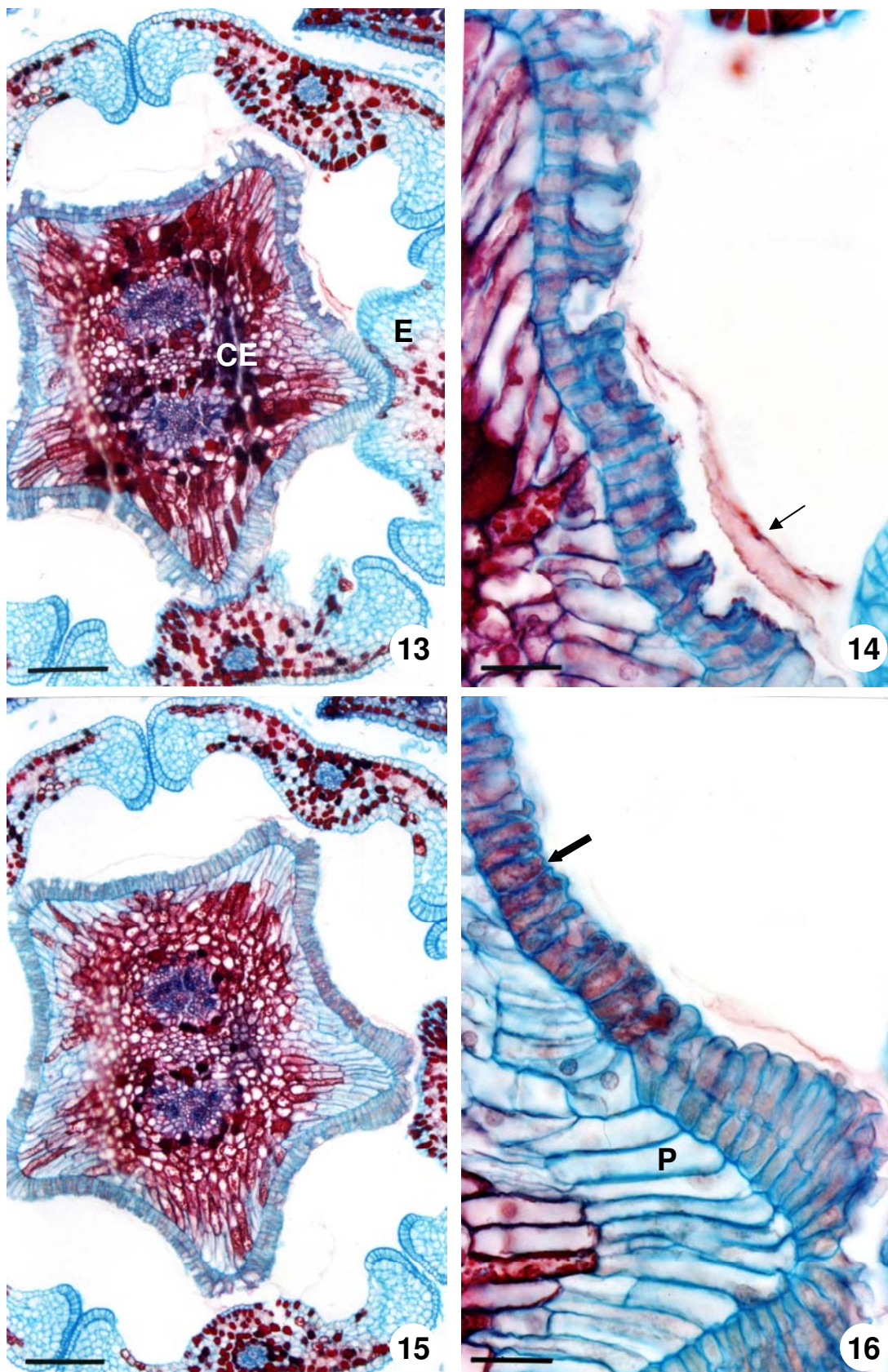
Figuras 1-5. Secções longitudinal (1) e transversais (2-5) de botão floral de *F. australis*, destacando cabeça do estile e estames. **1.** Cabeça do estilete (CE) e antera (A), com grãos de pólen; secreção presente nas células epidérmicas da cabeça do estilete e no meio extracelular (seta). **2.** Apêndices apicais (Ap) e anteras (A). **3.** Base das anteras justapostas à cabeça do estilete (CE), com formato pentagonal. **4.** Região mediana da cabeça do estilete, início da epiderme secretora em paliçada. **5.** Região mediana da cabeça do estilete, células epidérmicas em estágio pós secretor; adnação da cabeça do estilete com conectivo (C). A = antera; Ap = apêndice apical; C = conectivo; CE = cabeça do estilete. Barras = 200µm (2-5); 50µm (1).



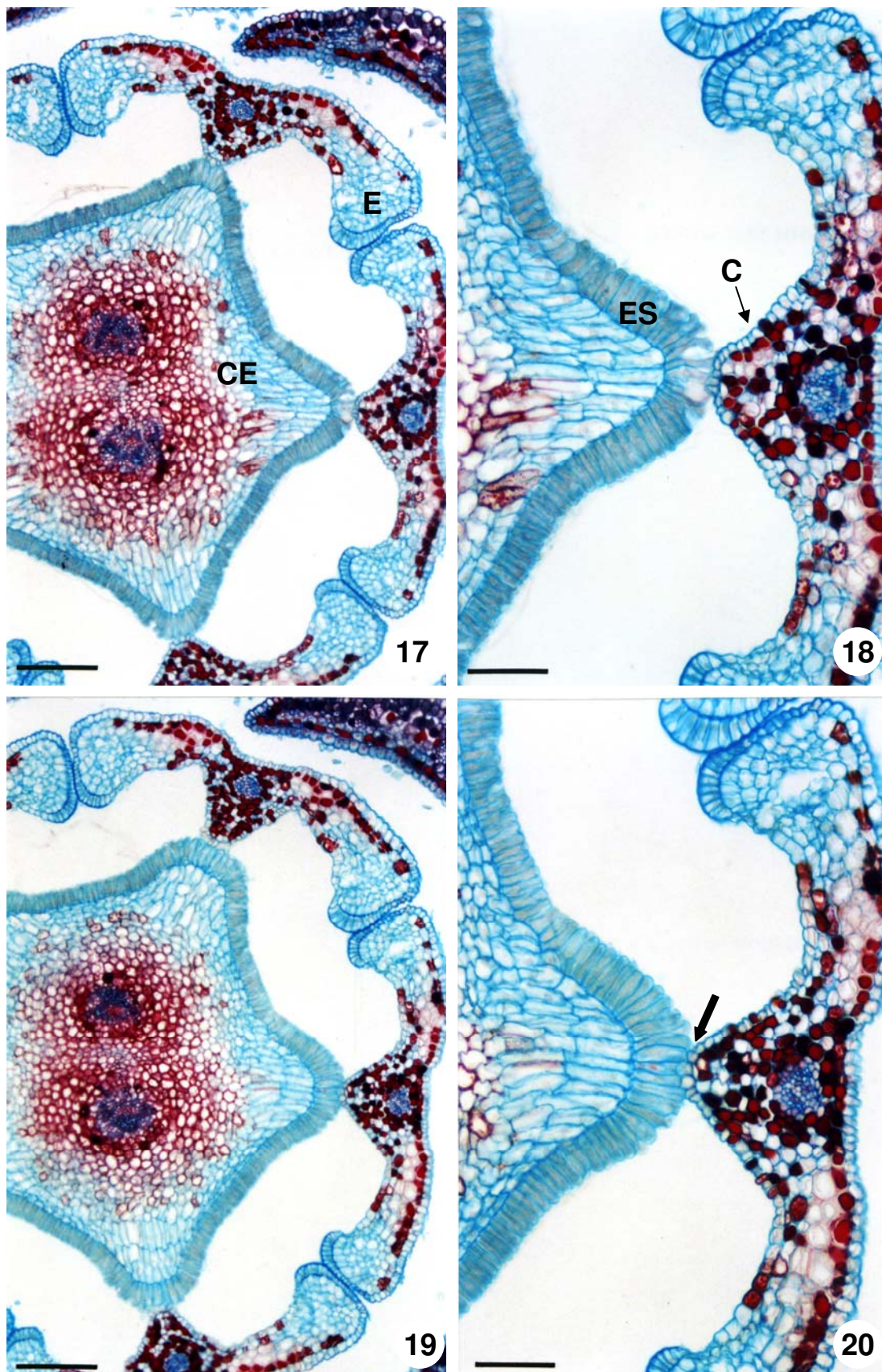
Figuras 6-9. Secções transversais de botão floral de *F. australis*, destacando a cabeça do estile e o conectivo. **6.** Região mediana da cabeça do estilete (CE), células epidérmicas em estágio pós-secretor justapostas ao conectivo (C). **7.** Pormenor da figura 6; detalhe da epiderme, células com retração do protoplasto e secreção no meio extracelular (seta), junto ao estame (E). **8.** Região mediana da cabeça do estilete, células epidérmicas em estágio secretor. **9.** Pormenor da figura 8; detalhe da epiderme, células com conteúdo corado e secreção no meio extracelular (seta). C = conectivo; CE = cabeça do estilete; E = estame. Escalas: 100µm (6,8); 50µm (7,9).



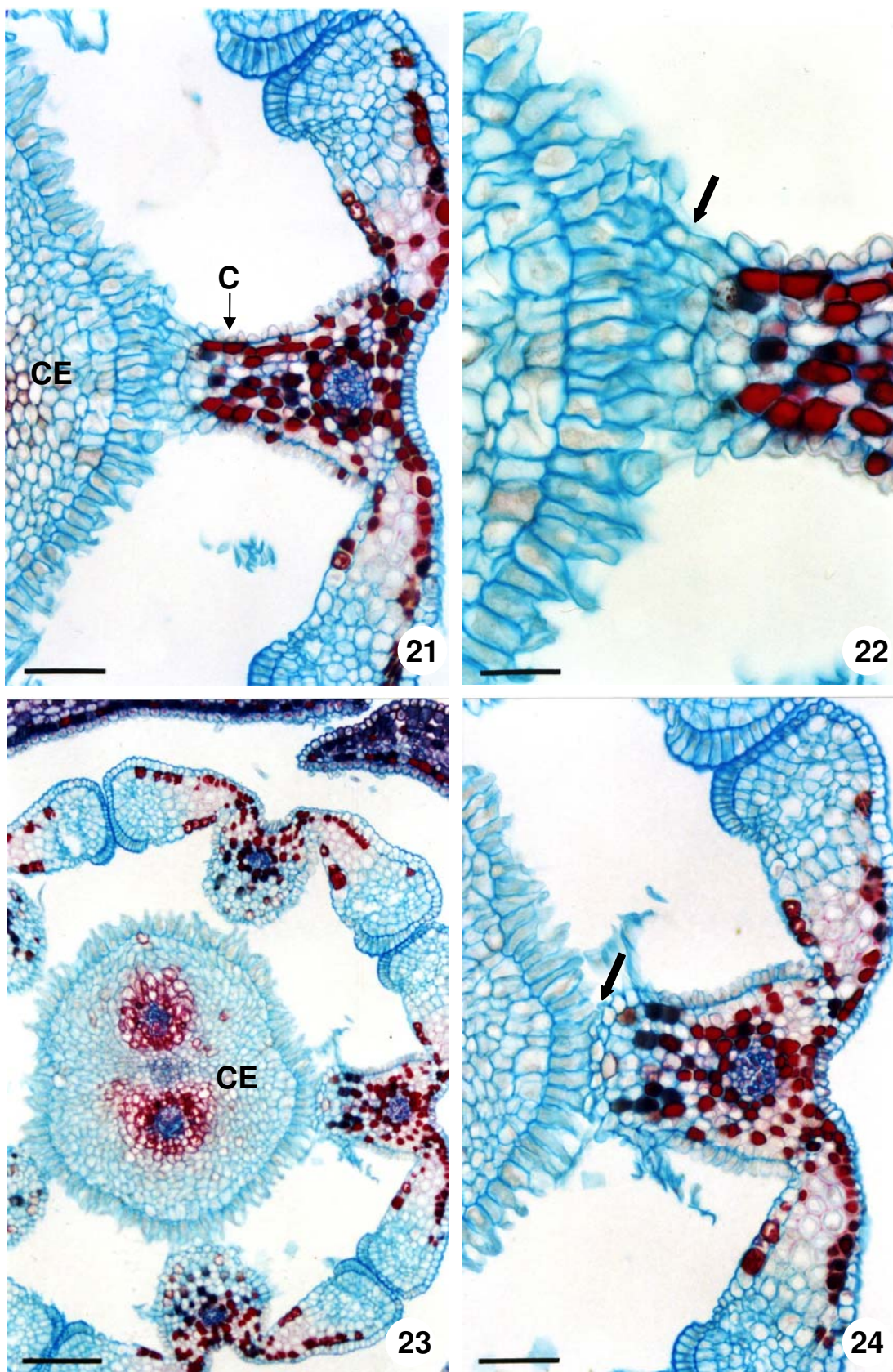
Figuras 10-12. Secções longitudinal (10) e transversais (11-12) de botão floral de *F. glabrescens*. **10.** Vista geral mostrando cabeça do estilete (CE), ovário (O), estame (E), tubo (T) e lacínias (LC) da corola, e cálice (Ca) com coléter (seta). **11.** Região apical da cabeça do estilete e anteras (com grãos de pólen). **12.** Pormenor da figura 11; detalhe da antera (A). A = antera; Ca = base do cálice; CE = cabeça do estilete; E = estame; LC = lacínia da corola; O = ovário; T = tubo da corola; Barras = 100µm (10-11); 50µm (12).



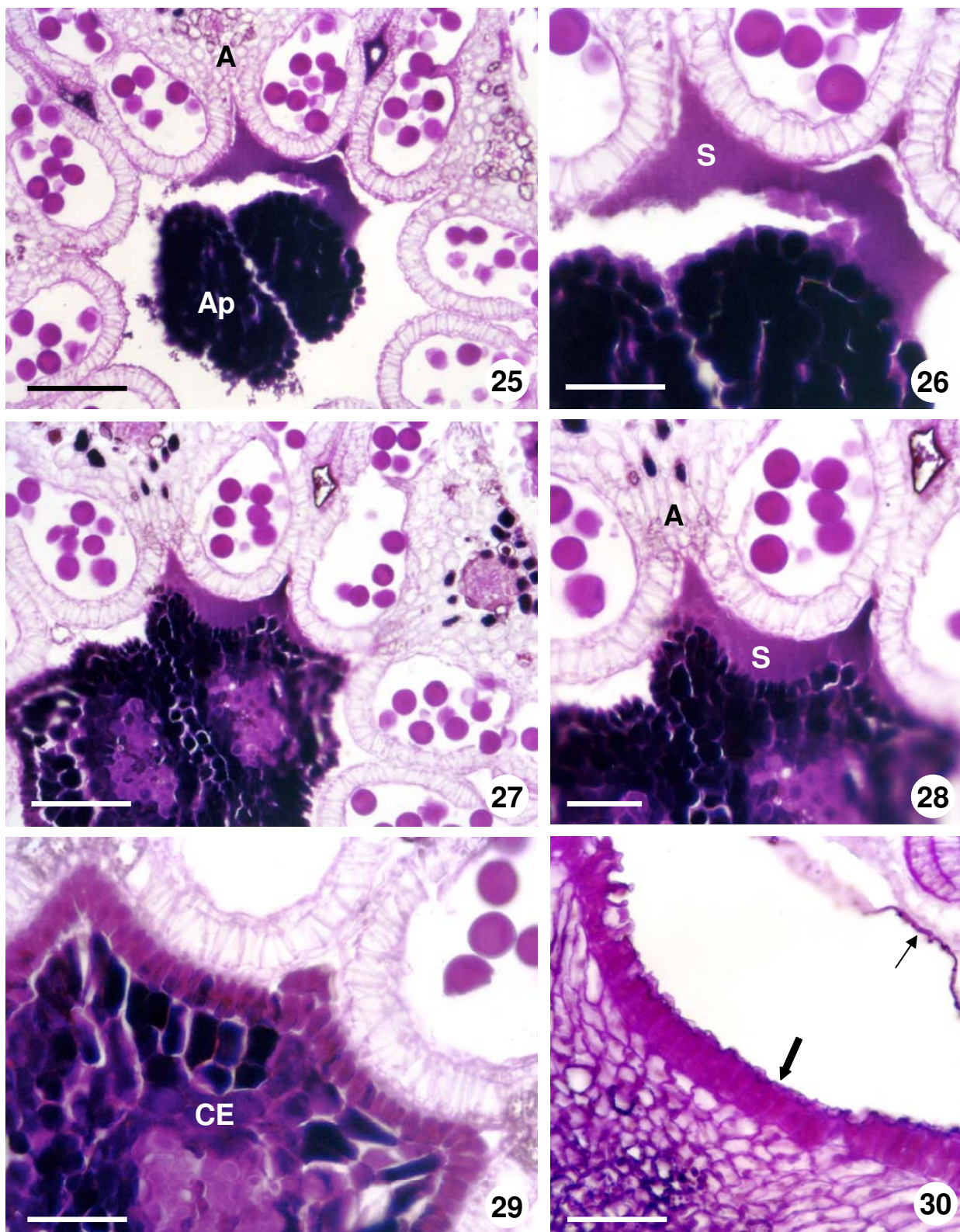
Figuras 13-16. Secções transversais de botão floral de *F. glabrescens*; região superior da cabeça do estilete (CE), 5-lobada, e estames (E). **13.** Epiderme secretora em paliçada em fase pós-secretora. **14.** Pormenor da figura 13; detalhe da epiderme e da secreção acidófila no meio extracelular (seta fina). **15.** Vista geral do ginostégio. **16.** Detalhe da cabeça do estilete; células parenquimáticas (P) alongadas e células epidérmicas com conteúdo (seta larga). CE = cabeça do estilete; E = estame; P = célula parenquimática. Barras = 100µm (13, 15); 25µm (14, 16).



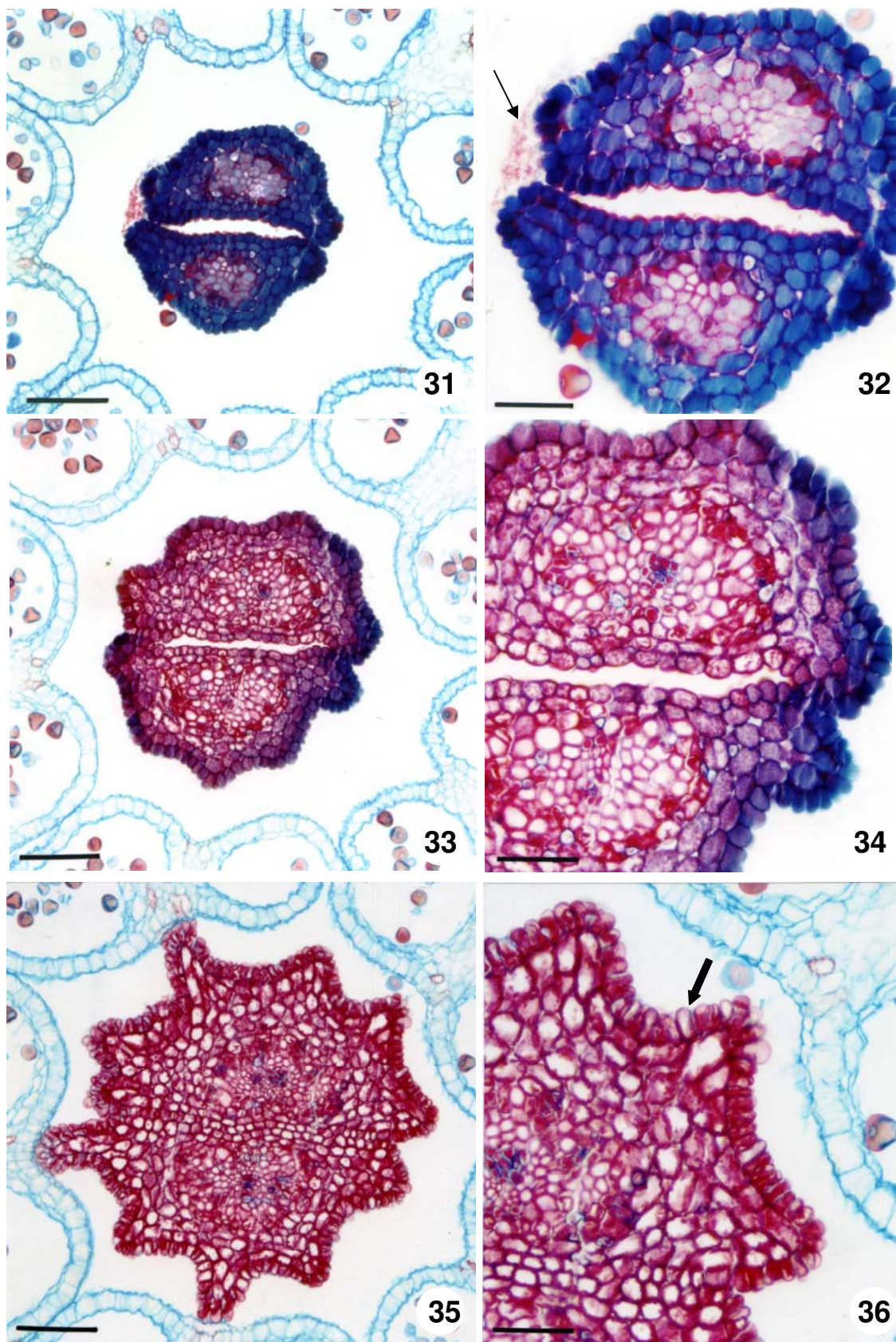
Figuras 17-20. Secções transversais de botão floral de *F. glabrescens* evidenciando o ginostégio. 17, 19. Cabeça do estilete (CE) justaposta aos estames (E). 18. Pormenor da figura 17; epiderme secretora em paliçada (ES) com células justapostas ao conectivo (C). 20. Pormenor da figura 19; Início da adnação (seta larga) entre as células epidérmicas da cabeça do estilete e do conectivo. C = conectivo; CE = cabeça do estilete; E = estame; ES = epiderme secretora. Barras = 100µm (17,19); 50µm (18,20).



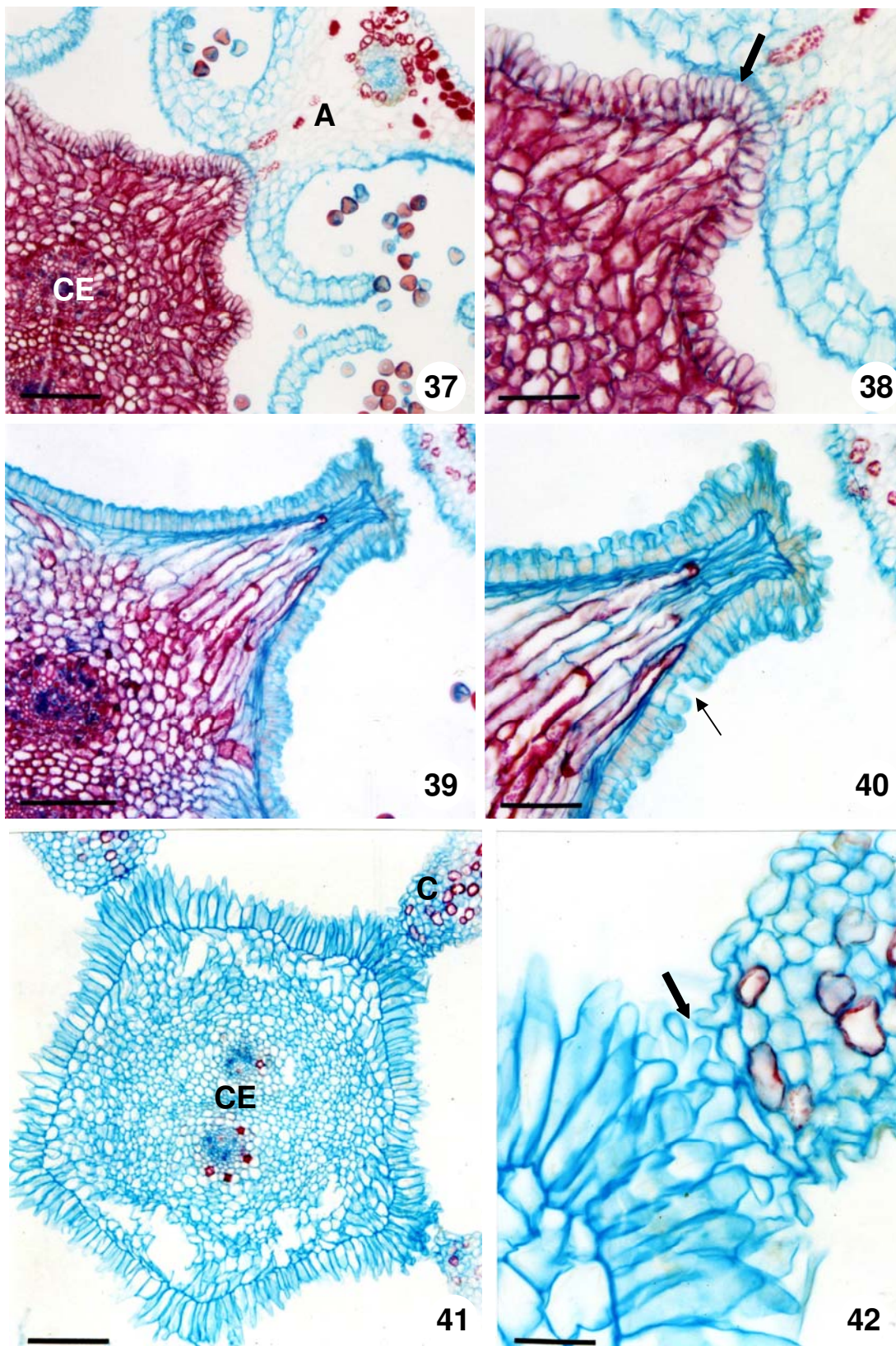
Figuras 21-24. Secções transversais de botão floral de *F. glabrescens* evidenciando o ginostégio. **21.** Células epidérmicas da cabeça do estilete (CE), com aspecto papiloso, adnatas ao conectivo (C). **22.** Pormenor da figura 21; detalhe da adnação, paredes celulares cimentadas (seta larga). **23.** Região basal da cabeça do estilete (CE), com formato cilíndrico; células epidérmicas justapostas ao conectivo. **24.** Pormenor da figura 23; detalhe das células epidérmicas da cabeça do estilete e do conectivo, as paredes celulares não estão cimentadas (seta larga). C = conectivo; CE = cabeça do estilete. Barras = 100µm (23); 50µm (21, 24); 25µm (22).



Figuras 25-30. Secções transversais de botão floral de *F. glabrescens* submetidas à reação PAS; polissacarídeos totais evidenciados na secreção (25-28) e no interior das células (29-30). **25.** Secreção acumulada no meio extracelular, entre os apêndices apicais (Ap) da cabeça do estilete e as anteras (A). **26.** Detalhe da secreção (S). **27.** Secreção entre a região superior da cabeça do estilete, 10-lobada, e as anteras. **28.** Detalhe da secreção (S) e da antera (A); **29.** Células epidérmicas da cabeça do estilete (CE) justapostas às anteras. **30.** Região mediana da cabeça do estilete, células epidérmicas em estágio secretor (seta larga) e cutícula distendida (seta fina). A = antera; Ap = apêndice; CE = cabeça do estilete; S = secreção. Barras = 100µm (25, 27); 50µm (26, 28-30).



Figuras 31-36. Secções transversais de botão floral de *F. pubescens*, destacando a cabeça do estilete e as anteras. **31.** Apêndices apicais da cabeça do estilete e anteras (A). **32.** Detalhe dos apêndices, com secreção acidófica no meio extracelular (seta). **33.** Região superior da cabeça do estilete, 10-lobada. **34.** Detalhe do início da separação dos apêndices apicais. **35.** Região superior da cabeça do estilete (CE), 10-lobada. **36.** Detalhe das células epidérmicas papilosas (seta larga). **32, 34, 36.** Pormenores das figuras 31, 33 e 35 respectivamente. A = antera; CE = cabeça do estilete. Barras = 100µm (31, 33, 35); 50µm (32, 34, 36).



Figuras 37-42. Secções transversais de botão floral de *F. pubescens* evidenciando o ginostégio. **37.** Região superior da cabeça do estilete (CE), 10-lobada;. **38.** Células epidérmicas papilosas justapostas à antera (seta larga). **39.** Região mediana, 5-lobada; células epidérmicas em paliçada. **40.** Detalhe das células epidérmicas com protoplasto retraído (seta fina). **41.** Região basal, levemente 5-lobada; células epidérmicas em paliçada da cabeça do estilete (CE) adnatas ao conectivo (C). **42.** Detalhe da cimentação das paredes celulares (seta larga). **38, 40, 42.** Pormenores das figuras 37, 39 e 41 respectivamente. C = conectivo; CE = cabeça do estilete. Barras = 100µm (37,39,41); 50µm (38,40,42).

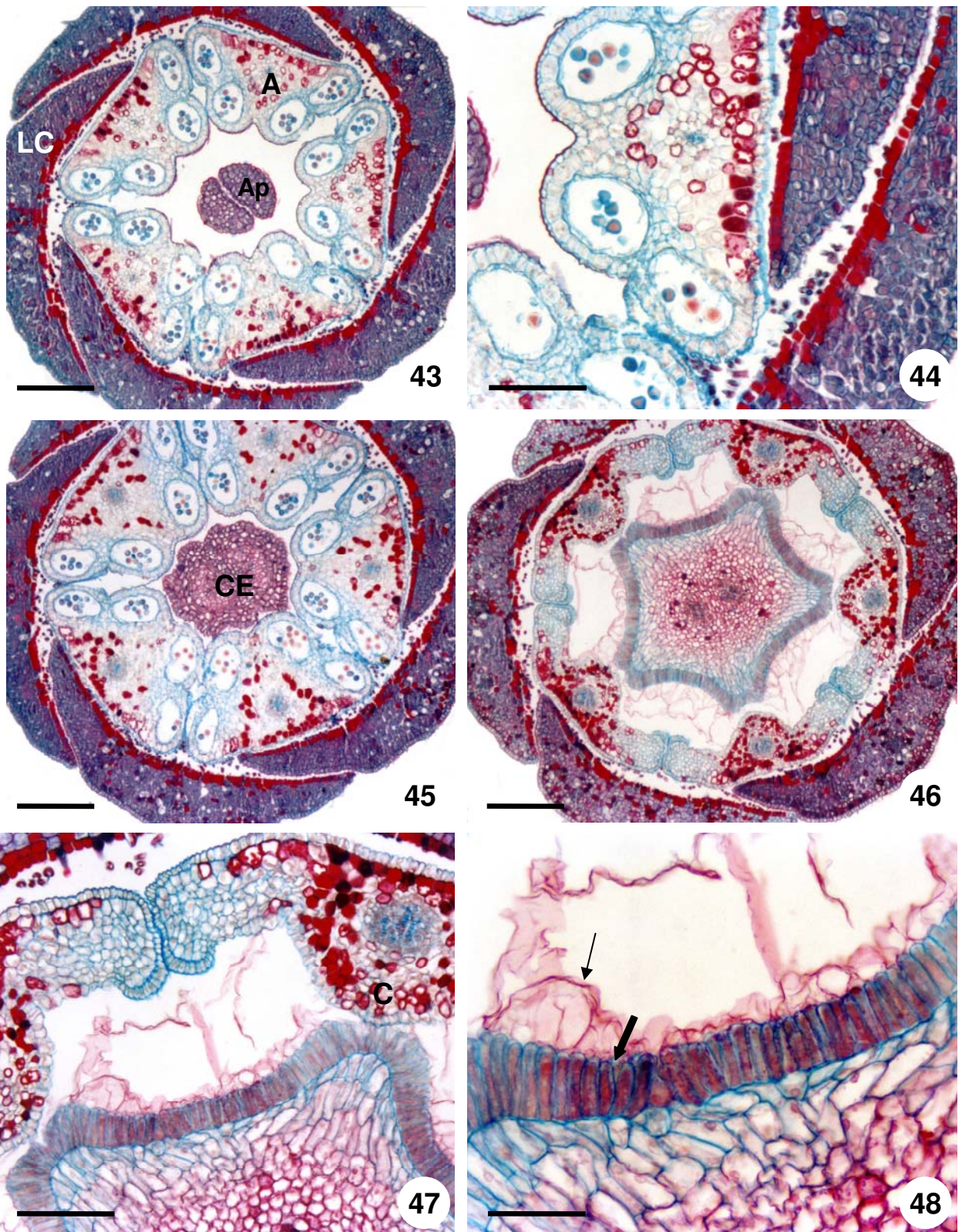


Figura 43-48. Seções transversais de botão floral de *F. velloziana*; região apical (43-46) e mediana (47-48) da cabeça do estilete. **43.** Apêndices apicais (Ap), anteras (A) e lacínias da corola (LC). **44.** Detalhe das anteras e das lacínias da corola. **45.** Vista geral do ginostégio, cabeça do estilete (CE) 10-lobada em sua região superior. **46.** Cabeça do estilete pentagonal, epiderme em paliçada em fase secretora, secreção no meio extracelular. **47.** Detalhe da epiderme da cabeça do estilete e do conectivo (C). **48.** Detalhe da secreção dentro das células (seta larga) e no meio extracelular (seta fina). **44, 46, 48.** Pormenores das figuras 43, 45 e 47 respectivamente. A = anteras; Ap = apêndices da cabeça do estilete; C = conectivo; CE = cabeça do estilete; LC = lacínia da corola. Barras = 200µm (37,39,40); 100µm (38,41); 50µm (42).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento da pesquisa permitiram responder satisfatoriamente as questões inicialmente levantadas; as perguntas e suas respectivas respostas são detalhadas abaixo:

1. *É possível separar as espécies semelhantes que ocorrem em cerrados paulistas através do uso de caracteres morfo-anatômicos vegetativos?*

O estudo de anatomia foliar das espécies de *Forsteronia* encontradas em regiões do cerrado do Estado de São Paulo, apresentado no primeiro capítulo desta tese, identificou uma série de caracteres morfo-anatômicos pelos quais é possível separar as espécies semelhantes em estágio vegetativo. Assim, dois caracteres macromorfológicos e quatro anatômicos diferenciam *F. australis* de *F. glabrescens*: 1. contorno do pecíolo em secção transversal; 2. ocorrência de cordão de floema acima do feixe vascular no pecíolo; 3. ocorrência de hipoderme secretora no pecíolo; 4. ocorrência de indumento nas domácias; 5. ocorrência de idioblastos secretores e aspecto da sua secreção; 6. tipo dos coléteres axilares. *Forsteronia pubescens* distingue-se de *F. thyrsoides* por oito caracteres: 1. contorno do pecíolo em secção transversal; 2. ocorrência de cordões de floema acima do feixe vascular no pecíolo; 3. formato do feixe vascular; 4. posição dos idioblastos secretores no pecíolo; 5. tipo de mesofilo; 6. ocorrência de idioblastos cristalíferos; 7. ocorrência de idioblastos secretores ao redor do feixe vascular mediano; 8. ocorrência de coléter axilar ramificado. Os caracteres levantados têm importância taxonômica e são úteis na identificação das espécies de *Forsteronia*, contribuindo dessa forma para uma melhor delimitação das espécies consideradas semelhantes ocorrentes nos cerrados paulistas.

Tais resultados já foram publicados na Revista Brasileira de Botânica, o que evidencia a relevância da realização de estudos anatômicos para o maior conhecimento das espécies

brasileiras, incluindo o estabelecimento de caracteres que auxiliem a identificação de espécies em estágio vegetativo. No caso dessas espécies de *Forsteronia*, anteriormente diferenciadas apenas por caracteres reprodutivos, como formato e indumento das inflorescências e aspecto dos frutos, restritos a apenas alguns meses, o estudo possibilitará a identificação das espécies de cerrado em qualquer período do ano. Além disso, o estabelecimento de uma técnica adequada para o processamento de material herborizado (inclusão em resina plástica) pode auxiliar a identificação de exsicatas já depositadas em herbários, bem como a utilização desses materiais em diversos tipos de estudos estruturais.

2. As glândulas registradas na região nodal e na base da lâmina foliar são coléteres?

As glândulas secretoras são comumente confundidas entre si pela sua identidade morfológica; dessa forma, pela caracterização histoquímica do seu exsudato é possível garantir a natureza química da secreção produzida e, conseqüentemente, a identificação da estrutura de acordo com a sua função. Na revisão do gênero *Forsteronia* realizada por Hansen (1985), glândulas são registradas na região nodal e na base do cálice das espécies; no entanto, essas estruturas não foram identificadas como coléteres, pois a secreção que produzem não foi avaliada. Em estudos mais recentes com espécies desse gênero, Koch & Kinoshita (2005) consideraram que tais estruturas encontradas em nós vegetativos e nas lacínias do cálice são coléteres, embora também não tenham realizado qualquer tipo de teste para verificar a presença de mucilagem na secreção.

Frente a isso, um estudo estrutural e histoquímico das glândulas foliares de quatro espécies de *Forsteronia* dos cerrados paulistas foi efetuado e apresentado no segundo capítulo desta tese. Os resultados obtidos comprovaram que a diferenciação e a fase secretora das glândulas ocorrem em estádios iniciais do desenvolvimento foliar; a detecção de mucilagem na secreção confirma a identificação dessas estruturas como coléteres. A natureza mucilaginosa da secreção e o estágio de desenvolvimento foliar em que os coléteres são encontrados em

fase secretora estão relacionadas à função de lubrificar e proteger gemas em início de desenvolvimento que essas estruturas desempenham (Fahn 1979).

Todos os coléteres marginais de *Forsteronia* são originados a partir das expansões laterais da base do primórdio foliar, região correspondente às estípulas e ocupam posição interpeciolar em órgãos adultos. Apenas os coléteres axilares têm origem na região axilar do primórdio e posicionam-se sobre a nervura mediana na base da lâmina em folhas totalmente desenvolvidas. Dessa forma, a teoria de que todos os coléteres de Apocynaceae têm origem estipular, proposta por Woodson & Moore (1938), é confirmada no caso dos marginais de *Forsteronia*. Devido à presença de coléteres axilares em *Forsteronia* e em outras espécies de Apocynaceae (Rio *et al.* 2002, Demarco 2005a), o estudo dos coléteres presentes na região nodal deveria ser estendido para outras espécies da família com o objetivo de reavaliar a teoria estipular proposta por Woodson & Moore (1938).

O número de coléteres marginais e axilares sobrepõe-se entre as espécies estudadas; diferentes quantidades são observadas em indivíduos de uma mesma espécie e mesmo em um único indivíduo. Estudos quantitativos, envolvendo a investigação de um maior número de indivíduos provenientes de diferentes localidades, associada a uma análise estatística dos dados, são necessários para avaliar a plasticidade desse caráter nas espécies de *Forsteronia* e definir a sua utilidade para fins taxonômicos.

Coléteres dos tipos padrão, séssil e ramificado foram registrados em *Forsteronia*. Em todos estes tipos, a secreção é produzida por uma epiderme secretora em paliçada que reveste o eixo central parenquimático, seja ele ramificado ou inteiro. Os coléteres marginais de *F. glabrescens* produzem inicialmente mucilagem, passando a secretar compostos fenólicos em uma segunda fase de secreção.

É necessário ressaltar a importância da aplicação de testes histoquímicos para inferir sobre a natureza química da secreção das glândulas, de forma a garantir a identificação dessas estruturas de acordo com a sua função, bem como a da realização de secções seriadas

transversais e longitudinais, para definir o número real de glândulas por peça analisada, a sua localização, para identificar o seu tipo estrutural e para verificar a ocorrência de diferentes fases de secreção que podem ocorrer nos coléteres.

3. Qual a natureza química do exsudato das glândulas secretoras encontradas em *Forsteronia glabrescens*?

Durante o estudo histoquímico dos coléteres em ápices vegetativos de *Forsteronia glabrescens*, a sobreposição de resultados positivos para lipídios totais, mucilagem e compostos fenólicos na hipoderme secretora de caules jovens foi observada em material fixado. Um estudo histoquímico em material fresco e fixado foi realizado em secções obtidas a mão livre dos ápices vegetativos com a finalidade de elucidar a natureza química do conteúdo das células, em colaboração com a Profa. Dra. Lia Ascensão (FCUL – Portugal), durante a visita dessa pesquisadora ao Departamento de Botânica da UNICAMP, financiada pela FAPESP (proc. no. 02/13532-6). A caracterização histoquímica dos laticíferos presentes no ápice vegetativo também foi efetuada, aproveitando-se as mesmas secções utilizadas para o estudo da hipoderme.

A secreção presente nas células da hipoderme é constituída por uma mistura heterogênea de ácidos graxos e compostos fenólicos (não incluindo a classe dos taninos). Várias funções já foram propostas e documentadas para os compostos fenólicos presentes em plantas, como proteção contra radiação ultravioleta e defesa contra patógenos e herbivoria, devido à natureza adstringente e tóxica destes compostos (Beckman 2000, Yoshitama 2000). É provável que a hipoderme encontrada no caule jovem de *Forsteronia glabrescens* desempenhe essas funções, pois trata-se de uma liana de cerrado e os ápices caulinares vegetativos encontram-se expostos a altos níveis de radiação solar e ao possível ataque de herbívoros. Os resultados dos testes histoquímicos indicam que o látex presente nos laticíferos do ápice vegetativo de *Forsteronia glabrescens* é uma emulsão de substâncias lipofílicas, incluindo

lipídios neutros, ácidos graxos e compostos fenólicos; os alcalóides também estão presentes. O látex tem sido relacionado à defesa contra herbivoria podendo, também, estar envolvido na cicatrização de ferimentos.

4. As glândulas florais de *Forsteronia* correspondem aos tipos encontrados em *Apocynaceae*?

Devido à complexidade da estrutura floral das flores de *Apocynaceae*, o objetivo do quarto capítulo desta tese foi a caracterização anatômica das glândulas encontradas nos botões florais e flores em antese de *Forsteronia*, contribuindo assim para o conhecimento das estruturas secretoras presentes nas espécies da família.

As estruturas secretoras encontradas nas flores e botões florais das espécies estudadas foram: idioblastos; epiderme e hipoderme secretoras, laticíferos; apêndices apicais e epiderme secretora na cabeça do estilete; coléteres calicinais, coléteres bracteolares (apenas em *F. pubescens*); e nectários.

Os idioblastos secretores foram as estruturas mais comuns nas espécies de *Forsteronia*, com ocorrência registrada em praticamente todas as peças florais: cabeça do estilete, anteras, lacínias e tubo da corola, cálice, nectário, ovário, receptáculo e bractéola. Hipodermes secretoras também foram observadas em diversas peças florais. Os idioblastos e as células da hipoderme de *F. glabrescens* produzem ácidos graxos e compostos fenólicos. Provavelmente, as células secretoras da cabeça do estilete, anteras e lacínias da corola constituem guias de néctar para polinizadores pela sua propriedade de refletir raios UV (ultravioleta), enquanto os demais têm função protetora contra herbivoria e patógenos.

Laticíferos foram registrados no receptáculo floral, no cálice, no mesofilo ovariano e nas lacínias da corola. É possível que apresentem as funções de proteção contra herbivoria e de selar ferimentos, pela sua localização predominante nos envoltórios florais e no mesofilo ovariano. O grande sucesso evolutivo das *Apocynaceae* pode estar relacionado à presença de

laticíferos em suas espécies; segundo Farrell *et al.* (1991), as plantas produtoras de látex têm sido mais bem sucedidas que os grupos relacionados que não o produzem.

Três tipos estruturais de coléteres (padrão, ramificado e séssil) ocorrem indefinidamente distribuídos no cálice das espécies de *Forsteronia*, com origem na sua base, onde as lacínias estão unidas. A sobreposição no número de coléteres calicinais, da mesma forma que o observado para os coléteres foliares, torna necessária a realização de estudos quantitativos, envolvendo a investigação de um maior número de indivíduos provenientes de diferentes localidades, associada a uma análise estatística dos dados, para avaliar a plasticidade desse caráter nas espécies de *Forsteronia* e definir a sua utilidade para fins taxonômicos.

Os nectários observados nas espécies de *Forsteronia* correspondem ao padrão registrado para a família; apresentam lobos separados ou unidos dois a dois, com um livre (*F. australis*, *F. glabrescens* e *F. pubescens*), ou são uma estrutura anelar na base e dividem-se em lobos apenas na porção superior (*F. velloziana*). Em todos os casos, os nectários originam-se no receptáculo floral.

Não foi possível identificar as regiões estruturais responsáveis pela secreção dos voláteis responsáveis pelo odor adocicado liberado pelas flores de *Forsteronia*, da mesma forma que em *Aspidosperma australe* Müll.Arg. (Demarco 2005). Isso indica a necessidade de estudos mais abrangentes, envolvendo a observação detalhada das espécies no campo, o acompanhamento de sua fenologia e dos seus polinizadores, para garantir a ocorrência e localização dos osmóforos em espécies de Apocynaceae.

Os coléteres calicinais serão publicados juntamente com os resultados obtidos para os coléteres de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Rio 2001), de forma a estabelecer uma comparação estrutural entre os coléteres florais de espécies pertencentes a diferentes tribos.

5. A caracterização anatômica do ginostégio de *Forsteronia* confirma o recente posicionamento do gênero na tribo *Mesechiteae*?

Frente ao reposicionamento do gênero na tribo *Mesechiteae*, procurou-se identificar elementos anatômicos florais que corroborassem essa alteração em sua classificação supra-genérica.

A estrutura do ginostégio constitui um aparato especializado para a polinização por insetos com língua longa nas espécies de *Forsteronia*. A epiderme em paliçada que reveste a cabeça do estilete, 5-lobada, produz uma substância viscosa que facilita o transporte do pólen pelo polinizador. A estrutura do ginostégio provavelmente dificulta a ocorrência de autopolinização em *Forsteronia*.

A cabeça do estilete das espécies de *Forsteronia* apresenta cinco projeções laterais, formadas pela proliferação das células parenquimáticas do corpo principal, que estão adnatas ao conectivo dos estames através de cimentação das paredes das células epidérmicas de ambas as estruturas. A zona de adesão entre a cabeça do estilete e os estames é dividida em duas partes, uma envolvida com a produção e acúmulo da secreção e outra com o processo de adnação. Essas características do ginostégio, associadas à ocorrência de coléteres calicinais sésseis em *Forsteronia*, corroboram a exclusão do gênero da tribo *Apocynae* e o seu reposicionamento em *Mesechiteae*.

Os dados anatômicos são de grande importância para a confirmação dos resultados obtidos em estudos filogenéticos com base em dados moleculares. Esses estudos adquirem maior consistência quando realizados em conjunto com uma matriz de dados morfológicos e anatômicos, o que evidencia a relevância do conhecimento gerado pelos estudos estruturais. Além disso, é possível estudar a evolução de caracteres anatômicos em grupos onde estudos filogenéticos baseados em dados moleculares já foram realizados.

Os resultados referentes à estrutura da cabeça do estilete serão publicados em conjunto com aqueles obtidos pelo Dr. André Olmos Simões para as demais espécies da tribo

Mesechiteae, de forma a corroborar a inclusão de *Forsteronia* nessa tribo, como já foi indicado pelo estudo filogenético (Simões *et al.* 2004).

6. Perspectivas

Uma abordagem química associada à estrutural seria muito interessante para o prosseguimento das pesquisas envolvendo espécies de *Forsteronia*. Uma grande quantidade de idioblastos secretores de compostos fenólicos foi observada em praticamente todos os órgãos vegetativos e florais analisados das espécies de *Forsteronia*. Esse tipo de idioblasto é comum nas espécies da tribo *Mesechiteae* (Simões 2004, Demarco 2005).

Dentre os vários compostos químicos provenientes do metabolismo secundário recentemente indicados como substâncias biologicamente ativas e/ou isolados a partir de extratos de folhas, cascas e raízes de diferentes espécies de Apocynaceae, os compostos fenólicos, em especial os flavonóides, são importantes do ponto de vista farmacológico. Uma série de utilidades populares e atividades funcionais já comprovadas em testes laboratoriais tiveram sua eficiência atribuída à presença desses compostos em diversas espécies, entre elas *Forsteronia refracta* (tabela 1).

Tabela 1. Utilidades e atividades funcionais atribuídas à presença de compostos fenólicos em espécies de Apocynaceae.

espécie	compostos isolados	utilidades e/ou atividades	referência
<i>Alstonia bonei</i>	flavonóides	antioxidante	Oke & Hamburger (2002)
<i>Apocynum vernetum</i>	fenólicos totais e	supressão de tumores, redução da	Ma <i>et al.</i> (2003)
<i>Pocynum hendersonii</i>	flavonóides	pressão arterial e recrutamento de radicais livres	
<i>Carissa carandas</i>	ácidos fenólicos e flavonóides	anti-escorbuto, digestivo, anti-helmíntico, adstringente e carditônico	Siddiqui <i>et al.</i> (2003)
<i>Carissa edulis</i>	fenólicos solúveis e lignanas	diurética	Nedi <i>et al.</i> (2004)
<i>Forsteronia refracta</i>	flavonóides	inibidor da proliferação de células cancerígenas	Smith <i>et al.</i> (2005)
<i>Peltastes peltatus</i>	flavonóides e taninos	anti-mutagênica	Horn & Vargas (2003)
<i>Tabernaemontana divaricata</i>	ácidos fenólicos e taninos	remédios anti-câncer, aplicação em feridas e partes inflamadas do corpo; antiinflamatória	Henriques <i>et al.</i> (1996)
<i>Trachelospermum jasminoides</i>	lignanas	anti-bronquite, anti-reumático e anti-câncer	Nishibe (1994)

Há poucos dados sobre os compostos químicos presentes em espécies de *Forsteronia* na literatura especializada consultada. Uma única referência ao uso popular de uma planta pertencente a esse gênero, *Forsteronia* cf. *gracilis*, foi obtida na Flora Medicinal das Guianas; no entanto, percebe-se que a determinação da espécie em questão é imprecisa e não há detalhamento sobre os compostos ativos responsáveis pelo efeito descrito (DeFilipps *et al.* 2004). Recentemente, um flavonóide (kaempferol) com atividade inibitória específica contra um ativador da mitose celular foi isolado a partir de extratos de *Forsteronia refracta* Müll.Arg., revelando uma propriedade contra proliferação de células cancerígenas (Smith *et al.* 2005). Fica evidente a importância de investigar a presença de flavonóides em outras espécies de *Forsteronia*, frente à possibilidade de identificar compostos com funções biológicas importantes. Além disso, faltam dados químicos sobre quase todas as espécies pertencentes à tribo *Mesechiteae* (Endress & Bruyns 2000), onde o gênero foi recém posicionado (Simões *et al.* 2004). Dessa forma, a análise de extratos obtidos de espécies de *Forsteronia* poderia também contribuir para o conhecimento dos metabólitos secundários encontrados na tribo *Mesechiteae*.

Considerando-se a identificação prévia da presença de compostos fenólicos nas folhas de espécies de *Forsteronia*, seria interessante realizar uma estimativa da quantidade desses idioblastos nas folhas das diferentes espécies e verificar se esse valor é correspondente à quantidade de fenólicos totais e de flavonóides encontrada em extratos obtidos a partir das mesmas plantas. Além disso, tendo em vista que a concentração desses compostos pode variar ao longo das estações do ano (Ma *et al.* 2003), um estudo envolvendo coletas em todas as estações poderia definir em qual época a concentração de compostos nos extratos é maior e, assim, direcionar futuras coletas para experimentos químicos e farmacológicos.

A comprovação da existência de uma relação entre os compostos identificados em análises estruturais e a concentração de compostos em extratos levaria ao estabelecimento de uma nova abordagem para a seleção de espécies-alvo para estudos químicos e

farmacológicos, além de uma nova aplicação para os produtos gerados por estudos anatômicos e histoquímicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, S. 2003. Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do cerrado do estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- AGUIAR, S. 2004. Moroflogia e anatomia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae. Projeto de Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA-TEIXEIRA, M.E.M. 1992. Anatomia do sistema aéreo vegetativo de *Mandevilla pohliana* (Stadelm.) A. Gentry (Apocynaceae). *Hoehnea* 19:39-50.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifer systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66:301-306.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23:113-120.
- BECKMAN, C.H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and molecular plant pathology* 57:101-110.
- DAVE, Y. & KURIACHEN, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G. Don. *Pakistan Journal of Botany* 19:243-248.
- DeFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L. & CREPIN, J. 2004. Medicinal Plants of the Guianas. (disponível no site <http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/index.html>, acesso em fevereiro de 2005).

- DEMARCO, D. 2005a. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DEMARCO, D. 2005b. Glândulas de órgãos vegetativos e florais de espécies de Asclepiadoieae R.Br. ex Burnett (Apocynaceae s.l.) de mata de restinga do Estado de São Paulo. Projeto de Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A Revised Classification of Apocynaceae s.l. The Botanical Review 66:1-56.
- FAHN, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press Inc., London.
- FALLEN, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: Morphological, functional and evolutionary aspects. Botanische Jahrbücher für Systematik 106:245-286.
- FARRELL, B.D.; DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.
- FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.
- GALETTO, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. Flora 192:197-207.
- GOMES, S.M. 2006. Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae s.l. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas
- HANSEN, B.F. 1985. A monografic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis. University of South Florida, Tampa.
- HENRIQUES, A.T.; MELO, A.A.; MORENO, P.R.H.; ENE, L.L.; HENRIQUES, J.A.P & SCHAPOVAL E.E.S. 1996. *Ervatamia coronaria*: chemical constituents and some pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology 50:19-25.
- HORN, R.C. & VARGAS, V.M.F. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. Mutagenesis 18:113-118.

- KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae - *Forsteronia* G.Mey. In Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti, coords.). Fapesp, Rima, São Paulo, v.4, p.48-53.
- LIN, S. & BERNARDELLO, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Science 160:869-878.
- MA, M.; HONG, C.; AN, S. & LI, B. 2003. Seasonal, spatial, and interspecific variation in quercetin in *Apocynum venetum* and *Poacynum hendersonii*, Chinese tradicional herbal teas. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:2390-2393.
- MARASCA, R.M. 2005. Anatomia de *Rauvolfia selowii* e *R. weddelliana*. Projeto de tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MARTINS, F.M. 2003. Glândulas foliares e calicinais em Apocynaceae. Projeto de tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v. 2, Claredon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. 2^a. ed., v. 1, Claredon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1983. Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction. 2^a. ed., v. 2, Claredon Press, Oxford.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1982. Leaf architecture of Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy of Science (Plant Science) 91:189-200.
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.
- NEDI, T.; MEKONNEM, N. & URGU, K. 2004. Diuretic effect of the crude extract of *Carissa edulis* in rats. Journal of Ethnopharmacology 95:57-61.

- NISHIBE, S. 1994. Bioactive phenolic compounds in tradicional medicines. *Pure & Applied Chemistry* 66:2263-2266.
- OKE, J.M. & HAMBURGER, M.O. 2002. Screening of some Nigerian medicinal plants for antioxidant activity using 2,2-diiphenil-picryl-hyrazyl radical. *African Journal of Biochemical Research* 5:77-79.
- RIO, M.C.S. 2001. Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R.Br. *nom. cons.* (Apocynaceae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RIO, M.C.S; CASTRO, M.M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:339-349.
- RIO, M.C.S. & KINOSHITA, L.S. 2005. *Prestonia* R.Br. (Apocynaceae) no Sul e Sudeste do Brasil. *Hoehnea* 32:233-258.
- RIO, M.C.S.; KINHOSHITA, L.S. & CASTRO, M.M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Revista Brasileira de Botânica* 28:713-726.
- RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. 1976. Botânica econômica brasileira. EPU & USP, São Paulo.
- SENNBLAD, B.; ENDRESS, M.E. & BREMER, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. *American Journal of Botany* 85:1143-1158.
- SIDDIQUI, B.S.; GHANI, U.; ALI, S.T.; USMANI, S.B. & BEGUM, S. 2003. Triterpenoidal constituents of the leaves of *Carissa carandas*. *Natural Product Research* 17:153-158.
- SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de doutorado, Campinas.
- SIMÕES, A.O.; ENDRESS, M.E.; van der NIET, T.; KINOSHITA, L.S. & CONTI, E. 2004. Tribal and intergeneric relationships of Mesechiteae (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence

- from three noncoding plastid DNA regions and morphology. *American Journal of Botany* 91:1409-1418.
- SIMÕES, A.O. & KINOSHITA, L.S. 2002. The Apocynaceae s.str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. *Darwiniana* 40:127-169.
- SMITH, J.A.; POTEET-SMITH, C.E.; XU, Y.; ERRINGTON, T.M.; HECHT, S.M. & LANNIGAN, D.A. 2005. Identification of the first specific inhibitor of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Research* 65:1027-1034.
- SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Translated by L.A. Boodle & F.G. Fritsch, v.2, Claredon Press, Oxford.
- STRANGHETTI, V. & KINOSHITA, L.S. 1996. Reavaliação do gênero monotípico *Rhodocalyx* Müll.Arg. (Apocynaceae). *Revista brasileira de Botânica* 19:133-144.
- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleters. *Annals of Botany* 68:287-305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64:201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contactor* 6:25-29.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32:163-172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1990. Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton* 30:209-212.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. *Feddes Repertorium* 102:23-28.

- THOMAS, V.; DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleter in *Roupelia grata* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- TORRES, C. & GALETTO, L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 127:207-223.
- WOODSON, R.E. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65:135-165.
- YOSHITAMA, K. 2000. Recent advances in secondary metabolism research: regulation of biosynthesis and physiological functions of flavonoids and some phenolics. *Journal of Plant Research* 113:285.