



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SUZANE MARGARET FANK DE CARVALHO

**“CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA ANATOMIA,
MICROMORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA FOLIAR DE
AMARANTHACEAE DO CERRADO”**

Sônia Nair Bão

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Suzane Margaret</i> <i>Fank de Carvalho</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F216c

Fank-de-Carvalho, Suzane Margaret
Contribuição ao conhecimento da anatomia,
micromorfologia e ultraestrutura foliar de Amaranthaceae do
Cerrado / Suzane Margaret Fank-de-Carvalho. – Campinas,
SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Sônia Nair Bão.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Amaranthaceae. 2. Folhas - Anatomia. 3.
Ultraestrutura (Biologia). 4. Plantas - Metabolismo. I.
Bão, Sônia Nair. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Contribution to the knowledge of the anatomy, micromorphology and ultrastructure of the leaves of the Cerrado's Amaranthaceae.

Palavras-chave em inglês: Amaranthaceae; Leaves - Anatomy; Ultrastructure (Biology); Plants - Metabolism.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Sônia Nair Bão, Mary Anne Heidi Dolder, Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, Marcos José Salvador, Simone de Pádua Teixeira.

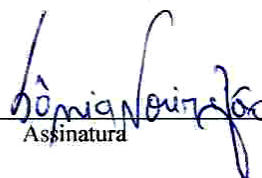
Data da defesa: 14/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 14 de janeiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

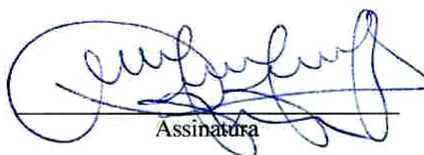
Profa. Dra. Sônia Nair Bão (Orientadora)


Assinatura

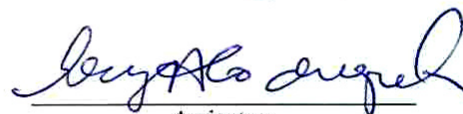
Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira


Assinatura

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira


Assinatura

Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado

Assinatura

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Assinatura

Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

Assinatura

Dedico esta tese

Ao meu amado esposo e maior amigo André e às nossas famílias e amigos, pelo amor, compreensão e carinho. À minha mãe Jenny, que sempre acreditou que este sonho seria possível! Ao sonho que inspira, à dedicação que gera resultados, à diversidade da flora do Cerrado!

AGRADECIMENTOS

A Deus e à vida, inclusive a das plantas que sacrifiquei ao longo do caminho, por permitir a realização deste trabalho.

À Dra. Sônia Nair Bão pela oportunidade, consideração, amizade e apoio. Seu exemplo como professora e sua abertura para novos projetos é que propiciaram o desenvolvimento dessa tese. Obrigada pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, em especial à Dra. Laurecir Gomes, coordenadora durante a maior parte do tempo em que fui aluna, pelo apoio, carinho e, principalmente, pelo incentivo para finalizar a tese.

À Liliam Panagio, por toda a atenção, orientação, incentivos e paciência durante o curso. Profissionais como Liliam são motivo de orgulho para a Unicamp.

À CAPES, pela bolsa usufruída no início do programa, e à CAPES/PROEX pelo auxílio financeiro/taxa de bancada.

Aos colegas da turma NC716A de Biologia Celular, do primeiro semestre de 2006: Danielle Lucon, Ana Paula, André, Andréa, Bruno, Davi, Evandro, Luiz Gustavo, Pedro e Thiago, foi um privilégio conhecê-los e conviver com vocês! A todos os professores do curso, obrigada pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos meus ex-alunos da Engenharia Florestal da Universidade de Brasília (UnB), que também foram, eventualmente, estagiários voluntários ou acompanhantes em coletas, especialmente Pedro Ítalo Tanno da Silva, Raquel Fernandes, Mariana Santos, Iugo Galhardo, Mateus B.S. Campos. Foi uma alegria muito grande poder participar da vida de vocês, assim como contar com a jovialidade e disposição de vocês e de Eduarda, Hugo, Larissa, Leonardo, Rafael e Taiana! Apreendi muito com vocês!

Às estagiárias voluntárias do Curso de Biologia à Distância, da UnB, Misléia Gomes e Lorraine Zanela. Obrigada pela disposição em ajudar e aprender! Misléia, agradecimentos especiais pela sua dedicação e perseverança no apoio técnico ao projeto.

Ao corpo técnico e colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, onde a tese foi desenvolvida: muito obrigada! Obrigada especial à Leonora Bastos e à Khesller Name, pela amizade e colaboração, no laboratório e no campo.

Ao Chefe do Laboratório de Anatomia Vegetal de Universidade de Brasília e seus colaboradores, pela cessão do laboratório, equipamentos e reagentes em alguns momentos da tese, para meus estagiários e para mim.

Ao Dr. João Kleber (UnB) e Drs. Dijalma, Roberto Vieira, Rosa de Belém e Taciana Cavalcanti (Embrapa/CENARGEN e Herbário CEN), pela cessão de mudas e/ou amostras de plantas.

Ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de Brasília e aos técnicos da Reserva Ecológica do Roncador, em especial à Marina, curadora do Herbário IBGE, pela autorização de pesquisa na área e suporte técnico indispensável.

Ao Sr. Paulo Maluhy e aos colaboradores da Oca Brasil, pela autorização de coleta na Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, e pelo incentivo e apoio.

À Dra. Maria Salete Marchioretto, curadora do Herbário PACA da UNISINOS: sua colaboração e apoio foram fundamentais ao longo da execução do projeto. Sua amizade foi um presente adicional, pelo qual sou muito grata.

Ao CNPq, em especial aos meus chefes Raquel de Andrade Lima Coelho e Alexandre Rodrigues de Oliveira, por fazerem o possível para facilitar a minha participação no programa de doutorado, ao mesmo tempo em que buscava atender minhas obrigações como servidora pública. Muito obrigada aos meus colegas de trabalho na Coordenação de Biociências, pela tolerância e consideração. Obrigada, Eduardo Emery, pelo incentivo e pela companhia nas coletas.

A cada um dos consultores e revisores dos manuscritos, artigos e da tese, na pré-banca e na banca, pelo auxílio na construção de uma melhor forma de expressar o que pude depreender dos estudos dos últimos anos, muito obrigada! A todos que não nomeiei, mas que sabem da importância de sua colaboração, mesmo que restrita a um pensamento positivo e de incentivo, fundamentais para o sucesso de qualquer trabalho. Muito obrigada!!!!

“A ciência avança por meio de respostas provisórias até uma série de questões cada vez mais sutis, que se aprofundam cada vez mais na essência dos fenômenos naturais”.

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Taxonomia e Sistemática	1
1.2 Importância Econômica	2
1.3 Estudos realizados em espécies brasileiras	3
1.4 O Bioma de Estudo	5
1.5 O metabolismo fotossintético e a estrutura foliar	7
1.6 Hipótese e Objetivos	9
1.6.1 Objetivo Geral	11
1.6.2 Objetivos Específicos	11
2. ARTIGOS	12
2.1 “Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, Goiás, Brasil” - Biota Neotropica Out/Dez 2010 vol.10, no. 4	12
2.2 “Leaf surfaces of <i>Gomphrena</i> spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome” - Biocell/Mendoza , 2010, 34(1): 23-35	25
2.3 “Natural colonization by fungus in plant leaves of Amaranthaceae species in the Cerrado” – manuscrito em andamento	39
2.4 “C ₃ , intermediary and C ₄ metabolism in Amaranthaceae of tropical savannah” – manuscrito em andamento	60
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	83
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	90
5. APÊNDICES	
Anexo 1 – Publicações realizadas de 2006-2010	100
Anexo 2 – Protocolo de infiltração com Spurr	104
Anexo 3 – Protocolo de infiltração com Poly Bed812	105
Anexo 4 – Tabela com Vouchers das espécies depositado no Herbário PACA ...	106
Anexo 5 – Declaração relativa à Bioética e Biossegurança	107

RESUMO

A família Amaranthaceae no *sensu lato*, incluindo Chenopodiaceae, é formada por cerca de 2.360 espécies, 145 delas encontradas no Brasil; 94 espécies subsistem em diversas fitofisionomias do Bioma Cerrado, 71 são endêmicas de diferentes regiões e biomas brasileiros e 27 aparecem em listas regionais de espécies ameaçadas de extinção. Visando contribuir para o conhecimento das espécies dessa família, foram estudados aspectos ecológicos, micromorfológicos, anatômicos e ultraestruturais de folhas de Amaranthaceae nativas do Brasil, com ênfase nos gêneros *Alternanthera*, *Gomphrena*, *Froelichiella*, *Hebanthe* e *Pfaffia*. As espécies nativas de regiões abertas de cerrado apresentam adaptações que favorecem a sobrevivência em condições adversas (seca e fogo), tais como raízes tuberosas ou lenhosas e xilopódios, hábito herbáceo e/ou subarbustivo, pilosidade densa nas porções aéreas, senescência de ramos aéreos durante as fases mais secas, dependência de fogo ou chuva para rebrotação e/ou floração, frutificação rápida seguida de dispersão anemocórica, epidermes com cutículas bem desenvolvidas e metabolismo fotossintético C₄. O comportamento pirofítico das espécies favorece o estabelecimento pioneiro das mesmas, principalmente nas áreas abertas do Cerrado. As superfícies foliares de algumas espécies do gênero *Gomphrena* apresentam cristais de cera epicuticular do tipo plaquetas, orientadas paralelamente, aspecto anteriormente descrito apenas em espécies de Chenopodiaceae. Em duas espécies foram encontrados fungos Ascomyceto colonizando folhas, cujos aspectos ultraestruturais foram descritos. A anatomia Kranz foi caracterizada em seis espécies do gênero *Gomphrena*, que também possuem cloroplastos dimórficos, demonstrando estrutura foliar compatível com o metabolismo fotossintético C₄. Na análise das duas espécies do gênero *Alternanthera* (uma C₃ e outra intermediária C₃-C₄) verificou-se que a posição das organelas nas células da bainha pode ser um elemento chave na determinação do tipo metabólico. As espécies de *Froelichiella*, *Hebanthe* e *Pfaffia* possuem anatomia e ultraestrutura compatíveis com o metabolismo C₃. A anatomia foliar e a ultraestrutura das espécies estudadas apresentam um padrão já descrito para outras espécies da família Amaranthaceae, exceto para os gêneros *Hebanthe* e *Froelichiella*, cuja descrição anatômica e ultraestrutural foi realizada pela primeira vez. A evolução do metabolismo C₄ pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao desenvolvimento da anfiestomia associada à maior espessura do limbo foliar em espécies herbáceas. Plastoglóbulo bem desenvolvido foram encontrados em cloroplastos de algumas das espécies do Cerrado e parecem associados aos mecanismos de defesa, além do metabolismo de lipídios. A família Amaranthaceae pode ser um bom marcador da biodiversidade de dicotiledôneas de pequeno porte e da capacidade de regeneração das áreas de campos rupestres, campos úmidos e outros tipos de vegetação aberta dos cerrados. A riqueza de informações obtidas durante o estudo de espécies dessa família ilustram a importância da ampliação das pesquisas básicas e aplicadas em suas espécies, especialmente as que ocorrem naturalmente no Cerrado. A ampliação do conhecimento relativo à anatomia e à especialização das organelas de diferentes gêneros para o metabolismo fotossintético pode contribuir para o entendimento da evolução da via C₄ e do ambiente onde as plantas se especializaram. O estudo do Bioma Cerrado pretende ampliar as justificativas para esforços de preservação de sua biodiversidade.

ABSTRACT

The Amaranthaceae family *sensu lato*, including Chenopodiaceae, is comprised of approximately 2,360 species, 145 of them found in Brazil. 94 species exist in various vegetation types of the Cerrado, 71 are endemic to different regions and Brazilian biomes, and 27 appear in regional lists of endangered species. To contribute to the knowledge of this family species the ecological aspects, micromorphology, anatomy and ultrastructure of leaves of Brazilian Amaranthaceae were studied, with emphasis on the genera *Alternanthera*, *Gomphrena*, *Froelichiella*, *Hebanthe* and *Pfaffia*. The native species of open areas of Cerrado (a savannah-like vegetation) exhibit adaptations that promote survival in adverse conditions (drought and fire), such as tuberous or woody roots, xylopodium, herbaceous or subshrub habit, dense pubescence in aerial portions, senescence of shoots and leaves during the driest season, dependence on rain or fire to resprout and/or flowering, fruiting followed by rapid wind dispersion, thick cuticle on epidermis and C₄ photosynthetic metabolism. The species' fire behavior favors their establishment as pioneers, especially in open areas of the Cerrado. Leaf surfaces of some species of the genus *Gomphrena* present epicuticular wax crystals in platelet form, oriented in parallel, an aspect previously described only in Chenopodiaceae species. In two of the species studied Ascomycete fungi were found colonizing its leaves, and ultrastructural aspects were described. Kranz anatomy was found in six species of the genus *Gomphrena*, which also have dimorphic chloroplasts, showing leaf structure compatible with the C₄ photosynthetic metabolism. In the analysis of two species of *Alternanthera* (a C₃ and a C₃-C₄ intermediate) showed that besides the Kranz anatomy, the position of organelles in bundle sheath cells can be a key element in determining the metabolic type. The *Froelichiella*, *Hebanthe* and *Pfaffia* species have leaf anatomy and ultrastructure consistent with C₃ metabolism. The leaf anatomy and ultrastructure have a pattern already described for other species of the Amaranthaceae family, except for the genera *Hebanthe* and *Froelichiella*, whose anatomical and ultrastructural aspects were described for the first time. The evolution of C₄ metabolism may be related, at least in part, to the development of amphistomy associated with increased leaf thickness in herbaceous species. Large plastoglobuli were found in chloroplasts of some Cerrado species and appear associated with defense mechanisms, and lipid metabolism. The Amaranthaceae family can be a good marker of the biodiversity of nonwoody Eudicotyledons with ability to regenerate areas of rocky fields, wet grasslands and other open vegetation of the cerrado. These results illustrate the importance of expansion of basic and applied research in Amaranthaceae species, especially those that occur naturally in Brazilian cerrados. The expansion of knowledge concerning the anatomy and the specialization of organelles of different genera to perform its photosynthetic metabolism may contribute to understanding of the evolution of C₄ pathway and the environment where plants specialize. The study of Cerrado Biome aims to broaden the justification for efforts to preserve its biodiversity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Taxonomia e Sistemática

A família Amaranthaceae é predominantemente tropical e subtropical, não sendo encontrada somente nas regiões mais frias do Hemisfério Norte (Souza & Lorenzi, 2008). A família é especialmente característica de habitats perturbados, áridos ou salinos (Judd *et al.*, 2002). Várias espécies são consideradas pioneiras e crescem, principalmente, em áreas úmidas com solo areno-argiloso, freqüentemente entre pedras (Ribeiro *et al.*, 1999). Suas flores possuem, habitualmente, 5 tépalas e ovário com placentação basal, usualmente com apenas um óvulo, formando frutos secos do tipo aquênio ou utrículo (Judd *et al.*, 2002). De hábito caracteristicamente herbáceo, as plantas da família Amaranthaceae *sensu stricto* apresentam ramos estriados e folhas inteiras, simples, de disposição espiralada ou opostas cruzadas (Joly, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999; Judd *et al.*, 2002). A maioria das espécies da família apresenta flores secas, reunidas em inflorescências capituliformes, em espiga ou cacho, monoclamídeas, geralmente hermafroditas e de simetria radial (Joly, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999). A coloração vermelha ou amarelada de folhas e flores é devida à presença de betalaínas, enquanto nas demais ordens tal coloração é devida a pigmentos do tipo antocianinas. Esse pigmento está restrito à ordem Caryophyllales (Kimler *et al.*, 1970; Harborne, 1984; Judd *et al.*, 2002) e é utilizado principalmente para coloração de alimentos, por ser solúvel em água e devido aos benefícios à saúde e segurança alimentar (Cai *et al.*, 2005). A polinização é feita pelo vento e por insetos e a dispersão, pela água e pelo vento (Joly, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999; Judd *et al.*, 2002).

De acordo com a classificação filogenética e molecular, a família Amaranthaceae pertence ao grupo “core” (principal) das Eudicotiledôneas, ordem Caryophyllales, subclasse Caryophyllidae (Bremer *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999; Judd *et al.*, 2002). Chenopodiaceae e Amaranthaceae eram consideradas, tradicionalmente, duas famílias distintas, principalmente em função das diferenças nos estames (separados em uma família e conados em diferentes graus em outra) e das tépalas (esverdeadas e membranosas em uma família e secas e coloridas – de branco a rosa ou vermelhas em outra) (Judd *et al.*, 2002). A proposição da união das duas famílias foi feita a partir de estudos de filogenia, baseando-se

em caracteres moleculares (sítios de restrição de DNA de cloroplastos, sequências *rbcL*, sequências ORF2280) e morfológicos (Judd *et al.*, 2002). Atualmente, a família é tratada no *sensu lato* e inclui a família Chenopodiaceae (Judd *et al.*, 2002; Souza & Lorenzi, 2008), sendo considerado o grupo monofilético mais rico em espécies dentro da ordem Caryophyllales (Müller & Borsch, 2005).

Amaranthaceae é formada por 169-180 gêneros e cerca de 2.360-2.500 espécies, sendo os maiores gêneros *Atriplex* L.(300 spp.), *Gomphrena* L. (120 spp.), *Salsola* L. (120 spp.), *Alternanthera* Forssk. (100 spp.), *Chenopodium* L.(100 spp.), *Ptilotus* R. Br. (100 spp.), *Suaeda* Forssk. ex J.F.Gmelin (100 spp.), *Iresine* R. Browne (80 spp.), *Amaranthus* L. (60 spp.), *Corispermum* L. (60 spp.) e *Celosia* L. (50 spp.) (Judd *et al.* 2002; Müller & Borsch 2005; IPNI 2009).

No Brasil são encontradas 145 espécies da família, distribuídas em 19 gêneros, sendo 71 espécies endêmicas de diferentes regiões e biomas brasileiros (Marchioretto *et al.*, 2010). No Bioma Cerrado são encontrados 16 gêneros: *Achyranthes* L., *Alternanthera* Forssk., *Amaranthus* L., *Blutaparon* Raf., *Celosia* L., *Chamissoa* Kunth, *Chenopodium* L., *Cyathula* Blume, *Froelichia* Moench, *Froelichiella* R.E.FR., *Gomphrena* L., *Hebanthe* Mart., *Iresine* P.Browne, *Pfaffia* Mart., *Quaternella* Pedersen e *Xerosiphon* Turcz., entre eles algumas espécies cujo hábitat não foi identificado (Mendonça *et al.* 1998, Marchioretto *et al.*, 2010). A espécie *Froelichiella grisea* (Lopr.) R.E. Fries é monotípica para o gênero e só ocorre nos campos rupestres da Chapada dos Veadeiros (GO, Brasil) (Marchioretto *et al.*, 2002). Entre as 94 espécies encontradas no Bioma Cerrado, 31 pertencem ao gênero *Gomphrena* e 19 são do gênero *Pfaffia* (Marchioretto *et al.*, 2010).

1.2 Importância Econômica

A família Amaranthaceae tem importância econômica direta e indireta, no Brasil e no Mundo. Pertencem à família as espécies medicinais conhecidas como *ginseng*-brasileiro (*Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen), além de diversas outras citadas em levantamentos etnobotânicos e listas de espécies úteis e prioritárias para estudos (Barros, 1981/1982; Siqueira, 1981, 1987 e 1988; Almeida *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2002; Agra *et al.*, 2007).

As espécies alimentícias beterraba (*Beta vulgaris*) e espinafre (*Spinacia oleracea*), as espécies ornamentais conhecidas como perpétua (*Gomphrena globosa* L.), crista-de-galo (*Celosia argentea*) e periquito (*Alternanthera tenella*), entre outras, também são membros da família Amaranthaceae. Há, ainda, espécies não cultivadas de potencial ornamental inexplorado, como *G. arborescens* (Almeida *et al.*, 1998; Fank-de-Carvalho *et al.*, 2009).

Algumas espécies do gênero *Amaranthus* (*A. reflexus*, *A. quitensis*, *A. spinosus* e *A. viridis*) são consideradas tóxicas para animais de criação (gado, ovelhas, suínos). Todas são conhecidas como caruru e causam doença abdominal e mortalidade acima de 50% (Timm & Riet-Correa, 1997; Peixoto *et al.*, 2003). *A. spinosus*, descrita como tóxica e causadora de doenças renais em ovelhas, também é utilizada popularmente como medicinal, inclusive contra inflamações urinárias (Agra *et al.*, 2007).

Além dos usos econômicos diretos, citados acima, a família também apresenta potencial econômico de uso indireto, como os benefícios ecológicos das plantas em suas condições nativas. Estima-se que as plantas com metabolismo fotossintético C₄ sejam responsáveis por 20-30% da produtividade global terrestre, embora elas representem apenas 3% das angiospermas, sendo principalmente espécies herbáceas e subarbustivas (Edwards *et al.*, 2004). A família Amaranthaceae é a que apresenta maior número de espécies C₄ já identificadas entre as dicotiledôneas, o que a torna interessante para estudos no sentido de compreender a evolução dos diferentes metabolismos fotossintéticos; entre os fatores considerados importantes nessa evolução estão as condições associadas ao clima e distúrbios ecológicos (fogo, habitats abertos e com alta luminosidade) (Edwards *et al.*, 2004). Os fatores climáticos e ecológicos citados são características encontradas no Bioma Cerrado.

1.3 Estudos realizados em espécies brasileiras

As espécies brasileiras dessa família têm sido exploradas em algumas revisões taxonômicas e estudos fitogeográficos, particularmente os gêneros *Gomphrena*, *Froelichia* e *Froelichiella*, *Hebanthe* e *Pfaffia* (Siqueira, 1992; Marchioretto *et al.* 2002, 2004, 2008, 2009; Marchioretto, 2008). Algumas publicações manifestam preocupações também sobre a conservação das espécies (Marchioretto *et al.*, 2005; Siqueira, 2007).

A família é citada em listas de espécies vasculares (Mendonça *et al.*, 1998; Cavalcanti & Ramos, 2001; Siqueira, 2002; Batalha & Martins, 2004). Vinte e nove espécies de Amaranthaceae aparecem em listas regionais de espécies ameaçadas de extinção (23 na lista do Rio Grande do Sul, quatro na lista de São Paulo, duas na lista do Espírito Santo) (Biodiversitas, 2010) e oito espécies estão citadas na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, objeto da Instrução Normativa número seis, de 23/09/2008, do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2010). Metade das espécies dessa última lista é oriunda do Bioma Cerrado. Sobre as espécies ameaçadas ainda pairam dúvidas acerca do real *status* de classificação como ameaçadas, pois não há dados suficientes disponíveis para estabelecer tal condição (MMA, 2010).

Há dois estudos publicados sobre a morfologia polínica de Amaranthaceae (Laboriau, 1961; Handro, 1965) e foram realizados alguns estudos sobre morfologia e anatomia de folhas e outros órgãos (Handro 1964, 1967; Monteiro-Scanavacca, 1971; Gavilanes, 1999; Duarte & Debur, 2004; Fank-de-Carvalho & Graciano Ribeiro, 2005). Poucas espécies medicinais já foram estudadas sob os aspectos farmacognóstico e fitoquímico, especialmente as mais conhecidas (ginseng-brasileiros), além de outras também cultivadas para fins medicinais e/ou ornamentais.

Há somente um estudo brasileiro sobre a micromorfologia das espécies de Amaranthaceae, iniciado durante o programa de mestrado (Fank-de-Carvalho, 2004). Salatino e colaboradores (1986) indicam que o surgimento das esculturas nas superfícies ocorre como adaptação ao ambiente físico, auxiliando plantas com alta velocidade de transpiração na reflexão da luz e na impermeabilização da epiderme, tanto para reduzir as perdas de água quanto para auxiliar na defesa contra infecção por fungos. A microscopia eletrônica de varredura não é considerada um bom método para a detecção dos filmes de cera epicuticular que devem recobrir todas as plantas, mas é indicada para determinar o formato e localização de projeções da cera epicuticular, bem como para a obtenção de detalhes das superfícies (Wilkinson, 1979; Engel & Barthlott, 1988). Quando a cera epicuticular se apresenta como cristalóides, sua forma individual, distribuição e orientação podem ser importantes para caracterizar a superfície e possuem valor taxonômico (Engel & Barthlott, 1988; Barthlott *et al.*, 1998). São raros os estudos sobre a micromorfologia das

folhas de espécies da família, mesmo na literatura estrangeira. Há um estudo para espécies não brasileiras que indica a ausência de cristalóides de cera epicuticular nas espécies dos gêneros *Aerva*, *Allmania*, *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Celosia*, *Deeringia*, *Gomphrena*, *Iresine* e *Ptilotus*, todos pertencentes à família *Amaranthaceae sensu stricto* (Engel & Barthlott, 1988). O mesmo estudo relata que membros da antiga família *Chenopodiaceae* possuem projeções cristalóides do tipo plaquetas, de dimensões pequenas (menor do que 2 µm), com orientação paralela e localização não restrita às vizinhanças dos estômatos (Engel & Barthlott, 1988).

Os estudos anatômicos das folhas de espécies da família *Amaranthaceae* indicaram a presença de uma bainha vascular bem desenvolvida nas espécies dos gêneros *Gomphrena* e *Froelichia*, mas não nas dos gêneros *Alternanthera* e *Pfaffia* (Handro, 1964, 1967; Gavilanes, 1999; Duarte & Debur, 2004; Fank-de-Carvalho & Graciano Ribeiro, 2005).

Em relação à ultraestrutura, foram analisados aspectos das folhas de algumas espécies do Cerrado brasileiro (Estelita-Teixeira & Handro, 1984; Fank-de-Carvalho, 2004; Antonucci, 2010). Para as espécies *Gomphrena macrocephala*, *G. prostrata*, *G. decipiens* e *Pfaffia jubata* foi determinado que o polimorfismo gradual dos cloroplastos seria típico para a utilização da via fotossintética C_4 do subtipo NADP-ME pelas espécies de *Gomphrena* e que a ultraestrutura dos cloroplastos de *Pfaffia* seria similar à das plantas C_3 (Estelita-Teixeira & Handro, 1984). Em *G. arborescens* foi encontrada uma ultraestrutura compatível com o metabolismo C_4 do subtipo NADP-ME (Fank-de-Carvalho, 2004; Antonucci, 2010), da mesma forma que em *G. scapigera* (Antonucci, 2010). Entretanto, esse metabolismo não foi confirmado pelo ensaio enzimático realizado contra as enzimas NAD-ME, NADP-ME e PEP-CK, tanto em *G. arborescens* quanto em *G. scapigera* (Antonucci, 2010). Esses resultados são compatíveis com os encontrados por Carolin *et al.* (1978) para as espécies *Gomphrena celosioides*, *G. globosa*, *G. conica*, *G. brachystylis*, *G. brownii*, *G. flaccida* e *G. canescens*, algumas cultivadas também no Brasil.

1.4 Bioma de Estudo

O Distrito Federal está localizado entre os 15°31' - 16°3' de latitude Sul e os 47°21' - 48°15' de longitude Oeste, sendo a vegetação de cerrado (*sensu lato*) a predominante, com

uma flora própria e típica do Bioma Cerrado (Eiten, 2001). Estima-se que 40% do Cerrado original já tenham sido convertidos em áreas antropizadas (Ratter *et al.*, 2000). A riqueza do Cerrado em fauna e flora é notável, com altas taxas de espécies endêmicas, tornando-o um dos *hotspots* para a conservação da biodiversidade mundial (Myers *et al.*, 2000). O Cerrado tem cerca de 4.400 espécies de plantas endêmicas, o que equivale a 1,5% do total das 300 mil espécies de plantas do planeta (Myers *et al.*, 2000). Coutinho (1980) considera que a freqüente ocorrência de queimadas é um fator importante na determinação da vegetação do Cerrado, como uma força regenerativa capaz de alternar comunidades e manter a diversidade. Estima-se que cerca de 80% das espécies endêmicas ou ameaçadas estão em áreas protegidas; entretanto, as taxas de desmatamento do Cerrado têm sido superiores à da Amazônia e apenas 30% de sua biodiversidade foi estudada em um nível razoável (Paiva, 2000; Klink & Machado, 2005).

A conversão do Cerrado em agroecossistemas, principalmente a expansão das pastagens de gramíneas de origem africana e as monoculturas para exportação (soja) ou para as agroindústrias do Sul e Sudeste do país (milho) tem gerado fragmentação dos habitats naturais, extinção local da biodiversidade, introdução de espécies exóticas, erosão do solo, poluição de aquíferos, uso inadequado de pesticidas e herbicidas, alteração dos estoques de carbono no solo e na vegetação e modificação das funções biogeoquímicas e hidrológicas do Cerrado (Conservation International *et al.*, 1999; Miranda & Miranda, 2000; Klink & Machado, 2005). Essa situação torna urgente a ampliação dos estudos das espécies vegetais nativas do Bioma, buscando compreender a ecologia das mesmas e fornecer subsídios para valorizar a conservação de áreas representativas do Cerrado.

Apenas no Distrito Federal podem ser encontradas 20 espécies da família Amaranthaceae, distribuídas entre os gêneros *Alternanthera* (2), *Amaranthus* (2), *Gomphrena* (7), *Herbante* (1), *Pfaffia* (7) e *Xerosiphon* (1), todas de hábito subarbustivo ou herbáceo (*Herbante* é trepadeira), em diferentes unidades de conservação (Cavalcanti & Ramos, 2001). Não há dados de literatura disponíveis com relação à flora específica dos demais Estados que compreendem o Bioma Cerrado.

1.5 O metabolismo fotossintético e a estrutura foliar

A evolução das plantas levou ao desenvolvimento de diferentes mecanismos fotossintéticos, sendo reconhecidas, de maneira geral, as vias C_3 (Ciclo de Calvin ou de 3 carbonos), C_4 (ciclo de 4 carbono) e MAC (metabolismo ácido das crassuláceas) (Raven *et al.* 2001). A fotossíntese C_4 foi relatada entre 1954 e 1965, através de estudos em cana-de-açúcar e milho (Hatch 2002). Essa via permite um aumento das taxas de fotossíntese e ocorre em plantas tropicais, principalmente, que toleram temperaturas mais elevadas e condições mais secas do que as plantas C_3 (Salisbury & Ross 1992; Stryer 1996; Malkin & Niyogi 2000; Raven *et al.* 2001). As espécies C_4 são, principalmente, ervas ou subarbustos, raramente árvores, e representam cerca de 3% das Anthophyta (Edwards *et al.* 2004).

A via C_4 de fotossíntese é caracterizada pela fixação do CO_2 atmosférico em ácidos com quatro carbonos, nas células do mesofilo, com a assimilação do carbono ocorrendo nas células da bainha vascular. Nas células do mesofilo, a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) apresenta níveis mais altos que em plantas com metabolismo C_3 , onde a enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxigenase (RuBisCO) é a responsável pela fixação primária do CO_2 em 3-fosfoglicerato (Lehninger *et al.* 2000; Edwards *et al.* 2001). Nas células do mesofilo das plantas C_4 , a enzima PEPC faz a fixação primária do CO_2 em oxaloacetato, que é reduzido a L-malato às expensas de NADPH ou a L-aspartato por transaminação (Lehninger *et al.* 2000). Esses dois últimos produtos são transferidos para as células da bainha vascular, onde serão oxidados e descarboxilados por duas diferentes enzimas málicas: *nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malic enzyme* (NADP-ME) e *nicotinamide-adenine dinucleotide-malic enzyme* (NAD-ME) ou pela ação inicial da enzima *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEP-CK) conjugada a uma enzima málica (Lehninger *et al.* 2000; Edwards *et al.* 2001). O CO_2 liberado pela ação enzimática é novamente fixado pela enzima RuBisCO, formando também o 3-fosfoglicerato, que segue todas as reações subsequente do ciclo C_3 de fotossíntese (Lehninger *et al.* 2000). Outra enzima importante para a regeneração do fosfoenol-piruvato é a enzima *pyruvate orthophosphate dikinase* (PPDK) (Ueno 1998).

A presença de PEPC nas células do mesofilo e de RuBisCO nas células da bainha vascular é a regra para a maioria das plantas C_4 ; entretanto, em *Gomphrena globosa* e em

algumas espécies de *Flaveria* (Asteraceae) foi verificada a presença de RuBisCO nos dois tipos celulares (Ueno 1998).

Os estudos de parâmetros fisiológicos de níveis de fotossíntese demonstraram a importância da temperatura para o desenvolvimento do metabolismo C₄, cujas espécies dominam entre os 30 graus de latitude ao Norte e ao Sul do Equador (Edwards *et al.* 2004). Essa via fotossintética é taxonomicamente incomum e largamente dispersa entre as famílias de dicotiledôneas; entretanto, parece haver coordenação entre um determinado ambiente e a relativa abundância de um subtipo de fotossíntese C₄ (Press 1999). Laetsch (1974) indicou a distribuição da via C₄ nas famílias Amaranthaceae, Aizoaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Poaceae, Nyctaginaceae, Portulacaceae e Zygophyllaceae.

A via C₄ é altamente dependente da coordenação das estruturas anatômicas e ultraestrutura celular das folhas (Press 1999). A bainha parenquimática envolvendo o feixe vascular e o arranjo do mesofilo adjacente são os caracteres anatômicos mais usuais para a determinação da via fotossintética C₄ (Gutschick 1999). Entretanto, o alto grau de convergência evolutiva não garante um único padrão em nível bioquímico ou em organização celular e subcelular (Press 1999).

A compartimentalização anatômica da via C₄ envolve dois tipos diferentes de células do tecido clorenquimático: células da bainha vascular e células do mesofilo (Malkin & Niyogi 2000). Em nível ultraestrutural, o número e a concentração de cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos nas células da bainha parenquimática são os critérios mais confiáveis para determinar a capacidade fotossintética de uma espécie (Black & Mollenhauer 1971). O tipo estrutural das folhas (Kranz ou não-Kranz), a posição dos cloroplastos, a distribuição dos tilacóides (grana com pequeno ou grande número de tilacóides empilhadas) e o número de mitocôndrias são caracteres importantes para o conhecimento do metabolismo das espécies, de acordo com estudos em folhas das famílias Nyctaginaceae, Amaranthaceae, Aizoaceae, Caryophyllaceae, Portulacaceae (Carolin *et al.* 1978).

Estudos realizados em monocotiledônea do gênero *Orcuttia* e nas Chenopodiaceae *Borszczowia aralocaspica* e *Bienertia cycloptera* demonstram a via C₄ operando através de

uma compartimentalização espacial realizada apenas pela especialização dos cloroplastos localizados em diferentes regiões da mesma célula (Press 1999; Sage 2002). A existência de uma bainha vascular rica em cloroplastos e mitocôndrias, e com duas a três camadas de células no mesofilo em *Salsola arbusculiformis* (Chenopodiaceae) determinou um tipo fotossintético intermediário, com a fixação de CO₂ inicial operando, em níveis muito baixos, no ciclo C₄ (Voznesenskaya *et al.* 2001).

Os estudos estruturais e ultraestruturais nas espécies *Gomphrena celosioides*, *G. globosa*, *G. conica*, *G. brachystylis*, *G. brownii*, *G. flaccida* e *G. canescens* indicaram a presença de um mesofilo adaxial radial e um mesofilo abaxial com espaços intercelulares, além de camadas adicionais de parênquima lacunoso até a epiderme; nessas espécies também ocorre uma bainha parenquimática completa, com cloroplastos centrípetos apresentando grana rudimentar e retículo periférico (Carolin *et al.* 1978).

O estudo ultraestrutural das folhas é importante para o conhecimento e investigação do metabolismo das espécies. Somente a anatomia Kranz já não é considerada um requisito universal para a operação da via C₄ de fotossíntese, já que essa via também pode ser operada através de uma compartimentalização espacial caracterizada pela especialização dos cloroplastos (dimorfismo) localizados em diferentes regiões dentro de uma mesma célula (Edwards *et al.*, 2001, 2004; Sage, 2002; Voznesenskaya *et al.*, 2003).

1.6 Hipótese, Justificativa e Objetivos

O desenvolvimento deste trabalho baseia-se na hipótese de que variações no comportamento ecológico, fenológicos, na anatomia foliar e na fisiologia, favorecem o estabelecimento e sobrevivência das espécies de Amaranthaceae em áreas abertas do Cerrado, justificando a maior concentração de espécies nesse Bioma em relação às demais áreas brasileiras.

Para testar essa hipótese, pretende-se investigar os seguintes aspectos:

- a) Há dados suficientes, disponíveis na literatura e nos herbários, para compreender as estratégias de adaptação, sobrevivência e reprodução de Amaranthaceae no Cerrado?
- b) Considerando que os ambientes abertos do Cerrado estão sujeitos a alta luminosidade e a variações estacionais nos índices pluviométricos, as espécies da mesma família (Amaranthaceae) desenvolveram estratégias ecológicas similares para adaptar-se a eles?
- c) As espécies da família Amaranthaceae desenvolveram variações morfológicas e anatômicas para sobreviver e adaptar-se ao clima fortemente estacional e à ocorrência natural de fogo no Bioma Cerrado?
- d) Se a evolução do metabolismo C₄ está associada ao clima e a distúrbios ecológicos, como o fogo, estudar a anatomia e a ultraestrutura das folhas de Amaranthaceae que ocorrem no Cerrado pode elucidar as variações estruturais associadas a essa evolução?

Esse trabalho justifica-se pela baixa quantidade de estudos realizados em espécies brasileiras desta família. Embora algumas espécies de Amaranthaceae sejam consideradas endêmicas de diferentes regiões do país (portanto, com distribuição restrita) e outras tantas sejam ameaçadas, ainda são necessários estudos básicos (morfologia, anatomia, ultraestrutura, fenologia, relações interespecíficas) nos diferentes gêneros e espécies da família. Ainda há muito a se estudar em relação à potencialidade e/ou uso medicinal das espécies nativas e coletadas pela população diretamente do ambiente. Faltam estudos, até mesmo, para garantir a identificação correta das espécies, uma vez que os aspectos morfológicos, especialmente em estágio vegetativo, são similares entre as espécies da família e, inclusive, podem ser confundidos com os de outras famílias botânicas, como Asteraceae (folhas opostas e/ou rosuladas na base, pilosidade hirsuta, etc.), por exemplo.

O gênero *Gomphrena* é considerado um dos mais representativos da família Amaranthaceae. Entretanto, somente as folhas de *G. arborescens*, *G. celosioides*, *G. decipiens*, *G. macrocephala*, *G. pohlii* e *G. prostrata* foram analisadas em nível anatômico (Handro, 1964; Estelita-Teixeira & Handro, 1984; Gavilanes, 1999; Fank-de-Carvalho &

Graciano-Ribeiro, 2005). Entre as espécies de *Pfaffia* do Cerrado, somente *P. jubata* foi estudada em nível anatômico (Handro, 1967). A maioria das espécies de *Amaranthaceae* listadas na Flora do DF (Cavalcanti & Ramos, 2001) é apenas citada em levantamentos de flora e/ou estudos etnobotânicos, não sendo encontrado registro de estudos anatômicos e/ou ultraestruturais das folhas.

A ampliação do conhecimento relativo à ultraestrutura e, conseqüentemente, à especialização das organelas de diferentes gêneros para o metabolismo, pode auxiliar no entendimento da evolução do metabolismo C_4 , bem como do ambiente onde as plantas se especializaram, contribuindo para o conhecimento do Bioma Cerrado e, conseqüentemente, para ampliar as justificativas para esforços de preservação de sua biodiversidade.

1.6.1 Objetivo Geral

Analisar aspectos vinculados ao comportamento ecológico e ao metabolismo fotossintético dos gêneros *Alternanthera*, *Gomphrena*, *Froelichiella*, *Hebanthe* e *Pfaffia*, através de estudos em campo (localização, acompanhamento da floração, coleta e identificação) e laboratoriais (micromorfologia, anatomia e ultraestrutura das folhas) de espécies que ocorrem no Bioma Cerrado.

1.6.2 Objetivos Específicos

1.6.2.1 Analisar e descrever o comportamento de algumas espécies na natureza e de suas interações com o ambiente.

1.6.2.2 Analisar o padrão de superfície foliar das espécies, através de um estudo inicial em espécies do gênero *Gomphrena*.

1.6.2.3 Descrever e discutir interações naturais com microorganismos e as alterações estruturais relacionadas às mesmas.

1.6.2.4 Descrever e analisar a anatomia foliar e ultraestrutura das espécies dos diferentes gêneros, estabelecendo as bases estruturais para aprofundar os estudos sobre o metabolismo das espécies.

2. ARTIGOS

Em consequência dos estudos realizados durante o desenvolvimento da tese, foram publicados dois artigos (item 2.1 e 2.2).

O terceiro manuscrito sofreu uma avaliação após submissão a uma revista brasileira especializada em Microbiologia e necessita de análises complementares para nova submissão à publicação (item 2.3). A realização dessas análises depende de estabelecimento de colaboração com pesquisadores da área de Fitopatologia, que tenham interesse em interações de fungos com espécies vegetais nativas do Cerrado.

Está em produção o quarto manuscrito (item 2.4), que compila os aspectos de anatomia e ultraestrutura foliar de 12 espécies da família Amaranthaceae, sendo que os resultados preliminares de todos eles já foram publicados em Simpósios e Congressos Nacionais e Internacionais, conforme lista de publicações decorrentes do desenvolvimento da tese (Anexo 1).

Desta maneira, todos os resultados estão apresentados no formato de artigo. Os artigos estão apresentados na língua aceita pelas Revistas escolhidas para a publicação e seguem os formatos prescritos pelas mesmas.

2.1 Artigo publicado em 04/10//2010 na revista Biota Neotropica

Publicado no volume *on line* número 10 (4), Out/Dez 2010, ISSN 1676-0603, disponível em <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n4/pt/fullpaper?bn01310042010+pt>

O artigo foi escrito em colaboração com a Dra. Maria Salete Marchioretto, taxonomista especializada na família Amaranthaceae, curadora do Herbário PACA da Universidade Vale dos Sinos/UNISINOS, em São Leopoldo/RS. Dra. Maria Salete fez a determinação final das espécies utilizadas no desenvolvimento do doutorado, com o depósito de pelo menos uma exsicata de cada espécie no Herbário PACA, servindo como material-testemunha do trabalho realizado.

Este artigo aborda aspectos relativos ao objetivo específico 1.6.2.1, contendo a análise e a descrição do comportamento ecológico de algumas espécies na natureza, além de descrever as variações morfológicas e anatomia foliar, parcialmente decorrentes das interações das espécies com o ambiente.

Os dados obtidos indicam que a pesquisa em literatura e em herbário não é suficiente para garantir o encontro de algumas espécies de *Amaranthaceae*, embora sejam bons indicadores de que as áreas de coleta devam ser visitadas com maior frequência. Depreende-se, das dificuldades no encontro e coleta das espécies, que as amostras depositadas em Herbários, decorrentes de estudos diversos e de levantamentos de flora, não são muito representativas. Isto é decorrente da fenologia pouco usual da maioria das espécies observadas na RPPN Cara Preta e de sua dependência direta do fogo para eventos de floração e rebrotação/floração/frutificação.

Também não é possível depreender, da literatura e dos herbários, a gama de estratégias de comportamento ecológico e fenologia das espécies para sobreviver nas áreas abertas de Cerrado. Nosso estudo deixa mais evidente que as estratégias reprodutivas de algumas espécies dessa família estão vinculadas ao aproveitamento das condições pós-fogo para tornar mais eficiente a distribuição de seus frutos, evidentemente anemocórica. Ainda, foi possível depreender que as estratégias desenvolvidas por diferentes membros da mesma família, em gêneros diferentes ou dentro do mesmo gênero, não são necessariamente similares. Desta forma, estudar a família *Amaranthaceae* é um desafio e exige dedicação e constância. O estudo de suas espécies pode revelar comportamentos diferenciados e, ao mesmo tempo, típicos de espécies completamente adaptadas ao ambiente onde sobrevivem, além de demonstrar dados morfológicos e anatômicos decorrentes, possivelmente, da evolução das espécies nas áreas abertas do Cerrado.

**Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das
espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do
Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil**

Fank-de-Carvalho, S.M. et al.

Biota Neotrop. 2010, 10(4): 000-000.

On line version of this paper is available from:

<http://www.biotaneotropica.org.br/v10n4/en/abstract?article+bn01310042010>

A versão on-line completa deste artigo está disponível em:

<http://www.biotaneotropica.org.br/v10n4/pt/abstract?article+bn01310042010>

Received/ Recebido em 26/02/2010 -

Revised/ Versão reformulada recebida em 17/06/2010 - Accepted/ Publicado em 04/10/2010

ISSN 1676-0603 (on-line)

Biota Neotropica is an electronic, peer-reviewed journal edited by the Program BIOTA/FAPESP: The Virtual Institute of Biodiversity. This journal's aim is to disseminate the results of original research work, associated or not to the program, concerned with characterization, conservation and sustainable use of biodiversity within the Neotropical region.

Biota Neotropica é uma revista do Programa BIOTA/FAPESP - O Instituto Virtual da Biodiversidade, que publica resultados de pesquisa original, vinculada ou não ao programa, que abordem a temática caracterização, conservação e uso sustentável da biodiversidade na região Neotropical.

Biota Neotropica is an eletronic journal which is available free at the following site
<http://www.biotaneotropica.org.br>

A **Biota Neotropica** é uma revista eletrônica e está integral e gratuitamente disponível no endereço
<http://www.biotaneotropica.org.br>

Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil

Suzane Margaret Fank-de-Carvalho^{1,3,4}, Maria Salete Marchioretto² & Sônia Nair Bão³

¹Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Prédio da PG-IB, Bloco O, CP 6109, Av. Bertrand Russel, s/n., CEP 13083-865, Campinas, SP, Brasil

²Herbarium Anchieta - PACA Instituto Anchietano de Pesquisas, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Rua Brasil, 725, CP 275, CEP 93001-970, São Leopoldo, RS, Brasil

³Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70919-970, Brasília, DF, Brasil

⁴Autora para correspondência: Suzane Margaret Fank-de-Carvalho, e-mail: suzifankcarvalho@gmail.com

FANK-DE-CARVALHO, S.M., MARCHIORETTO, M.S. & BÃO, S.N. **Leaf anatomy, morphology and ecological aspects of Amaranthaceae species from Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, in Alto Paraíso, GO, Brazil.** Biota Neotrop. 10(4): <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n4/en/abstract?article+bn01310042010>.

Abstract: The Amaranthaceae family is composed of 2,360 species of which 145 are found in Brazilian vegetation. About 94 species of this family subsist in different phytosionomies of the Cerrado Biome (a savanna-like vegetation) and 27 species are cited in Brazilian regional lists of endangered species. This work aimed to inventory and to study the leaf anatomy and morphology of the Amaranthaceae species found in one Conservation Area in Alto Paraíso, GO, relating them to the species' photosynthetic metabolism. It was found one subshrub species (*Pfaffia townsendii*) and five herbaceous species (*Froelichiella grisea*, *Gomphrena hermogenesii*, *G. lanigera*, *G. prostrata* and *P. gnaphalioides*), most of them showing pirophytic and anemocoric behavior and well developed subterranean systems associated with leaf amphistomy. The Kranz anatomy was verified in three species (all *Gomphrena* genus), which indicates the C₄ pathway of photosynthesis. Two species are endemic of the area (Chapada dos Veadeiros) and two are considered endangered species. The anatomy and morphology aspects are discussed in relation to the species habit, ecological behavior, life span of the aerial organs and functional data. The results indicate the Amaranthaceae importance as biodiversity indicator of open vegetation areas of Cerrado and the necessity of further research in Chapada dos Veadeiros, which has the potential to register new plant species, including endemic ones, since this work displays the seasonal behavior of some dicotyledonean herbaceous species and the difficulties to locate, identify and collect them.

Keywords: Cerrado, kranz anatomy, morphology, *Froelichiella*, *Gomphrena*, *Pfaffia*.

FANK-DE-CARVALHO, S.M., MARCHIORETTO, M.S. & BÃO, S.N. **Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil.** Biota Neotrop. 10(4): <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n4/pt/abstract?article+bn01310042010>.

Resumo: A família Amaranthaceae é formada por cerca de 2.360 espécies, 145 delas encontradas no Brasil. Cerca de 94 espécies da família subsistem em diversas fitofisionomias do Bioma Cerrado e 27 espécies aparecem em listas regionais de espécies ameaçadas de extinção. O objetivo deste trabalho foi inventariar e estudar a anatomia foliar e a morfologia de espécies da família Amaranthaceae de uma Unidade de Conservação de Alto Paraíso, GO, relacionando-as ao metabolismo fotossintético. Foram localizadas uma espécie de hábito subarborescente (*Pfaffia townsendii*) e cinco espécies herbáceas (*Froelichiella grisea*, *Gomphrena hermogenesii*, *G. lanigera*, *G. prostrata* e *P. gnaphalioides*), a maioria demonstrando comportamento pirofítico e anemocoria, bem como sistemas subterrâneos bem desenvolvidos associados com anfiestomia foliar. A anatomia Kranz foi caracterizada em três espécies (todas do gênero *Gomphrena*), indicando o metabolismo fotossintético C₄. Duas espécies são endêmicas da área e duas espécies são consideradas ameaçadas de extinção. Aspectos de anatomia e morfologia são discutidos em relação ao hábito das espécies, comportamento ecológico, duração das porções aéreas e significado funcional. Os dados demonstram a importância da família como indicadora da biodiversidade das áreas abertas dos cerrados e da importância da ampliação das pesquisas na Chapada dos Veadeiros, que tem potencial para o registro de novas espécies, inclusive endêmicas, dado o comportamento sazonal de algumas dicotiledôneas herbáceas e as dificuldades para localizá-las, identificá-las e coletá-las.

Palavras-chave: Cerrado, anatomia kranz, morfologia, *Froelichiella*, *Gomphrena*, *Pfaffia*.

Introdução

A família Amaranthaceae no sensu lato tem 169 gêneros e cerca de 2.360 espécies e inclui a família Chenopodiaceae, sendo os maiores gêneros *Atriplex* L. (300 spp.), *Gomphrena* L. (120 spp.), *Salsola* L. (120 spp.), *Alternanthera* Forssk. (100 spp.), *Chenopodium* L. (100 spp.), *Ptilotus* R. Br. (100 spp.), *Suaeda* Forssk. ex J.F.Gmelin (100 spp.), *Iresine* R. Browne (80 spp.), *Amaranthus* L. (60 spp.), *Corispermum* L. (60 spp.) e *Celosia* L. (50 spp.) (Judd et al. 2002; The International... 2009). No Brasil são encontradas 145 espécies, distribuídas em 19 gêneros, sendo 71 espécies endêmicas de diferentes regiões e biomas brasileiros (Marchioretto et al. 2010).

Amaranthaceae apresenta predominância de ervas e subarbustos tropicais. No Bioma Cerrado são encontrados 16 gêneros: *Achyranthes* L., *Alternanthera* Forssk., *Amaranthus* L., *Blutaparon* Raf., *Celosia* L., *Chamissoa* Kunth, *Chenopodium* L., *Cyathula* Blume, *Froelichia* Moench, *Froelichiella* R.E.Fr., *Gomphrena* L., *Hebanthe* Mart., *Iresine* P.Browne, *Pfaffia* Mart., *Quaternella* Pedersen e *Xerosiphon* Turcz., entre eles algumas espécies cujo hábitat não foi identificado (Mendonça et al. 1998, Marchioretto et al. 2010). Entre as 94 espécies encontradas no Bioma Cerrado, 31 pertencem ao gênero *Gomphrena* e 19 são do gênero *Pfaffia* (Marchioretto et al. 2010). Exemplos de representantes da família são duas plantas conhecidas como *ginseng* brasileiro (*Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). Cerca de 20 espécies têm uso alimentício e/ou medicinal, principalmente espécies dos gêneros *Alternanthera*, *Amaranthus* e *Gomphrena* (Siqueira 1987).

Os estudos realizados nas espécies brasileiras dessa família se concentram nas revisões taxonômicas e estudos fitogeográficos dos gêneros *Gomphrena*, *Froelichia* e *Froelichiella*, *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* (Siqueira 1992, Marchioretto et al. 2002, 2004, 2008, 2009, Marchioretto 2008). A família é citada em listas de espécies vasculares (Mendonça et al. 1998, Cavalcanti & Ramos 2001, Siqueira 2002, Batalha & Martins 2004), conta com um estudo de sua morfologia polínica (Laboriau 1961), outros sobre morfologia e anatomia foliar e de outros órgãos (Handro 1964, 1967, Monteiro-Scanavacca 1971, Gavilanes 1999, Fank-de-Carvalho & Graciano Ribeiro 2005) e alguns estudos de farmacognosia e fitoquímica de espécies medicinais.

Embora 27 espécies de Amaranthaceae apareçam em listas regionais de espécies ameaçadas de extinção (23 na lista do Rio Grande do Sul e quatro na lista de São Paulo) (Biodiversitas 2009), ainda são necessários estudos básicos (morfologia, anatomia, ultraestrutura, ecologia) em seus diferentes gêneros e espécies. Os poucos estudos anatômicos das folhas de espécies da família Amaranthaceae do Cerrado indicaram a presença de uma bainha vascular bem desenvolvida nas espécies dos gêneros *Gomphrena* e *Froelichia*, mas não nas dos gêneros *Alternanthera* e *Pfaffia* (Handro 1964, 1967, Fank-de-Carvalho & Graciano Ribeiro 2005).

Estima-se que as plantas com metabolismo fotossintético C_4 sejam responsáveis por 20-30% da produtividade global terrestre, embora elas representem apenas 3% das angiospermas, sendo principalmente espécies herbáceas e subarborescentes (Edwards et al. 2004). Junto com Chenopodiaceae, a família Amaranthaceae é a que apresenta maior número de espécies C_4 já identificadas entre as dicotiledôneas, o que a torna interessante para estudos no sentido de compreender a evolução dos diferentes metabolismos fotossintéticos; entre os fatores considerados importantes nessa evolução estão as condições associadas ao clima e distúrbios ecológicos (fogo, habitats abertos e com alta luminosidade) (Edwards et al. 2004). Os fatores climáticos e ecológicos citados são características encontradas no Bioma Cerrado.

Entretanto, a conversão do Cerrado em agroecossistemas, principalmente a expansão das pastagens de gramíneas de origem africana e as monoculturas para exportação (soja) ou para as agro-indústrias do Sul e Sudeste do país (milho) tem gerado fragmentação dos habitats naturais, extinção local da biodiversidade, introdução de espécies exóticas, erosão do solo, poluição de aquíferos, uso inadequado de pesticidas e herbicidas, alteração dos estoques de carbono no solo e na vegetação e modificação das funções biogeoquímicas e hidrológicas do Cerrado (Conservation International et al. 1999, Miranda & Miranda 2000, Klink & Machado 2005). Essa situação torna urgente a ampliação dos estudos das espécies vegetais nativas do Bioma, buscando compreender a ecologia das mesmas e fornecer subsídios para valorizar a conservação de áreas representativas do Cerrado.

Assim, visando ampliar o conhecimento sobre a anatomia foliar e do metabolismo das espécies de Amaranthaceae do Bioma Cerrado, realizamos pesquisas preliminares em herbários brasileiros, que apontaram a ocorrência do gênero *Froelichiella* R.E.Fr., monoespecífico, na antiga fazenda Cara Preta, em Alto Paraíso, GO. *Froelichiella grisea* R.E.Fr. é pouco conhecida, não estudada sob o ponto de vista anatômico e ocorre restritamente em campos rupestres da Chapada dos Veadeiros e apresenta problemas de conservação (Marchioretto et al. 2005). Atualmente, a área está protegida e é denominada Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cara Preta. Criada em 1999, a RPPN possui 975 ha e se localiza próxima ao Parque Nacional (PARNA) Chapada dos Veadeiros, protegendo as nascentes do Rio Cara Preta e áreas de Cerrado de altitude. Siqueira (2007) ressalta a persistência de apenas cerca de 15% da cobertura vegetal de remanescentes de cerrado em Goiás (dados de 2002), uma vegetação que cobria cerca de 50% do território do estado. De acordo com essa pesquisa, estima-se que, a continuar a velocidade de desmatamento ora observada, em 100 anos restarão apenas unidades de conservação com esta cobertura vegetal.

Desta forma, esse trabalho visou localizar o gênero *Froelichiella* e demais representantes da família Amaranthaceae na RPPN Cara Preta, inventariando essas ocorrências, realizar o estudo da anatomia foliar, além de descrever a morfologia e os aspectos ecológicos das espécies. Essas informações serão discutidas em relação aos dados disponíveis no Plano de Manejo da área, disponibilizado pela ONG Oca Brasil (oca@ocabrasil.org), visando gerar subsídios para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade vegetal da área e do Bioma Cerrado.

Material e Métodos

O acesso à RPPN Cara Preta foi obtido através de autorização da ONG Oca Brasil. Foram realizadas caminhadas não sistematizadas para localizar, observar, fotografar, coletar e herborizar espécies (Filgueiras et al. 1994 apud Farias et al. 2002), desde setembro de 2006 até março de 2009. As espécies suspeitas ou diagnosticadas como membros da família Amaranthaceae foram fotografadas e suas localizações marcadas com GPS (Global Positioning System). Indivíduos não férteis foram marcados e revisitados até o florescimento, a fim confirmar a identificação como membro da família Amaranthaceae, cujas flores pequenas são tipicamente dispostas em inflorescências capituliformes e possuem sépalas escariosas e secas. Ramos vegetativos e reprodutivos, bem como exemplares completos das espécies de Amaranthaceae em estágio reprodutivo, foram coletados para a confecção de exsicatas, sendo prensados imediatamente e submetidos à dessecação em estufa. Em laboratório, as espécies foram pré-identificadas com base em literatura e encaminhadas ao herbário PACA para determinação final das espécies encontradas na área, bem como para a descrição morfológica. Todas as exsicatas foram

tombadas em herbários indexados, relacionados a seguir pelas siglas, de acordo com Thiers (2010): IBGE, PACA, UB, UEC e CEN. O voucher dos exemplares depositados no herbário PACA encontra-se identificado na Tabela 1.

Para análise anatômica, folhas do 3º ao 5º nó, a partir do ápice, de 2-6 indivíduos de cada espécie, foram coletadas e fracionadas, com a escolha do terço médio para fixação em FAA-70 (Kraus & Arduin 1997), uma mistura de etanol, ácido acético e formaldeído, por 24 horas e em uma mistura de glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2% e sacarose a 3%, diluídas em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, por 12-24 horas (Karnovsky 1965, Souza 1998).

O material fixado em FAA foi mantido em etanol 70%, até o processamento, sendo seccionado à mão livre e utilizado para a descrição anatômica e realização de testes para identificação de amido (lugol) e composição de cristais (dissolução ácida), de acordo com protocolos de Kraus & Arduin (1997).

O material fixado em mistura com glutaraldeído foi pós-fixado em ferrocianeto de potássio 1,6% e tetróxido de ósmio 2% 1:1 (v/v), contrastado com acetato de uranila aquoso 0,5%, desidratado em série crescente de acetona (30-100%), infiltrado lentamente em resina epóxi do tipo "Spurr" e incluído na resina pura, sendo levado à polimerização em estufa a 60 °C. Os blocos obtidos foram submetidos a cortes semi-finos com facas de vidro, utilizando ultramicrotomo, e corados com solução aquosa de azul de toluidina 1% com borato de sódio 1%. Os cortes histológicos foram analisados e fotografados sob um microscópio óptico Axiophot, utilizando o programa AxioVision® e câmera digital acoplada.

As medidas de espessura de limbo foliar, cutícula e paredes foram realizadas em pelo menos 3 cortes semi-finos de diferentes folhas de cada espécie, todos originários de material emblocado em resina Spurr, utilizando-se o programa AxioVision® (Zeiss). As medidas da espessura das paredes correspondem às duas paredes adjacentes de 10 células: para o parênquima, considera-se a medida entre duas células de parênquima (palicádico ou lacunoso); para a bainha, considera-se a medida entre uma célula da bainha e uma célula do parênquima adjacente (palicádico ou lacunoso). Esta estratégia reflete a dificuldade em definir os limites entre as paredes adjacentes na técnica adotada. Para a cutícula, foram medidas a espessura da parede periclinal externa de 10 células não-vizinhas, excluindo-se a medida na região de aderência à célula vizinha, próxima à parede anticlinal (naturalmente mais espessa).

Resultados

A vegetação da RPPN Cara Preta é tipicamente de cerrado, com altitude média de 1.500 m, onde ocorrem seis espécies de Amaranthaceae (três gêneros): *Froelichiella grisea*, *Gomphrena hermogenesii*, *G. lanigera*, *G. prostrata*, *Pfaffia gnaphalioides* e *P. townsendii*. As espécies são listadas, com aspectos de sua morfologia, georreferência e voucher de material testemunha depositado no Herbário PACA (Tabela 1). O gênero *Pfaffia* ocorre em um morro rochoso (até 1.525 m de altitude) (Figura 1). As demais espécies ocorrem nas áreas de campo limpo e rupestres, predominantemente em solo de quartzo arenoso, em relevo plano (Figura 2). A altitude média de coletas foi acima de 1500 m.

A localização das espécies no campo foi difícil e altamente dependente de observações frequentes e de um evento fortuito: o incêndio da vegetação da área, ocorrido no final de agosto/2008. Apenas uma das espécies (*Pfaffia townsendii* Pedersen), de hábito subarborescente, tem suas partes aéreas persistentes e apresenta-se em floração o ano inteiro (Figura 3). Outra espécie, *Gomphrena hermogenesii* J.C. Siqueira, uma herbácea endêmica da Chapada dos Veadeiros, também apresenta partes aéreas persistentes (cerca de 10-20 cm de altura), sendo geralmente encontrada em estágio vegetativo, sob as folhas das gramíneas e ciperáceas que predominam em antigas áreas de pastagens (Figura 2). A floração dessa espécie, *Gomphrena hermogenesii* J.C. Siqueira, foi estimulada por ocorrência de fogo na área (Figura 4). As demais espécies - *Froelichiella grisea* R.E. Fr. (Figura 5), também endêmica da área, *Gomphrena lanigera* Pohl. ex Moq. (Figura 6), *Gomphrena prostrata* Mart. (Figura 7), *Pfaffia gnaphalioides* (L.f.) Mart. (Figura 8) - só foram registradas na área entre 20-25 dias após a ocorrência de fogo, evidenciando o comportamento pirofítico da maioria das espécies encontradas (Tabela 1).

Considerando-se que morfologia é uma ferramenta importante para o reconhecimento e identificação das espécies no campo, apresentamos uma breve descrição das seis espécies de Amaranthaceae coletadas na área e algumas anotações de coleta:

Froelichiella grisea (Lopr.) R.E. Fr. (Figura 5)

Ervas eretas vilosas ou tomentosas branco-acinzentadas. Sistema subterrâneo fusiforme e axial. Folhas cartáceas opostas a raro adensadas na base, lanceoladas, linear-lanceoladas ou obovaladas, ápice acuminado, base atenuada, face adaxial glabra,

Tabela 1. Espécies da família Amaranthaceae encontradas na área da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil.

Table 1. Amaranthaceae family species found at Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cara Preta, in Alto Paraíso, GO, Brazil.

Espécie	nºs coleta*	Hábito	Sistema subterrâneo	Habitat	Coordenadas	Altitude (m)	Voucher PACA**
<i>Froelichiella grisea</i> R.E. Fr.	119	herbácea	tuberoso, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	14° 00' S e 47° 31' W	1.508	103386
<i>Gomphrena hermogenesii</i> J.C. Siqueira	114, 118 e 123	herbácea	tuberoso, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	14° 00' S e 47° 31' W	1.509	103384
<i>Gomphrena lanigera</i> Pohl. ex Moq.	126	herbácea	tuberoso, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	14° 00' S e 47° 30' W	1.520	103387
<i>Gomphrena prostrata</i> Mart.	127	herbácea	tuberoso e lignificado, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	14° 00' S e 47° 31' W	1.508	103388
<i>Pfaffia gnaphalioides</i> (L.f.) Mart.	125	herbácea	tuberoso	base de morro, solo rochoso	14° 00' S e 47° 30' W	1.525	103379
<i>Pfaffia townsendii</i> Pedersen	102, 112 e 113	subarborescente	tuberoso	morro pedregoso, solo rochoso	14° 00' S e 47° 30' W	1.525	103374, 103381, 103382

(*) Coletor: S.M. Fank-de-Carvalho et al. **PACA = Herbário da Universidade do Vale dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brasil.



Figuras 1-8. Fotografias do ambiente e das espécies de Amaranthaceae encontradas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cara Preta, Alto Paraíso, GO, Brasil. 1). Morro rochoso com a presença das espécies *Pfaffia townsendii* Pedersen e *P. gnaphalioides* (L. f.) Mart. 2) Campo limpo úmido e rupestre onde são encontradas as espécies *Froelichiella grisea* R.E.Fr., *Gomphrena hermogenesii* J.C. Siqueira, *Gomphrena lanigera* Pohl. ex Moq. e *Gomphrena prostrata* Mart. 3) *P. townsendii*. 4) *G. hermogenesii*. 5) *F. grisea* coletada, com raiz tuberosa à mostra. 6) *G. lanigera*. 7) *G. prostrata*. 8) *P. gnaphalioides*.

Figures 1-8. Photographs of the environment and of the studied species at Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cara Preta, Alto Paraíso, GO, Brazil. 1) Rocky slope where were found the species *Pfaffia townsendii* Pedersen and *P. gnaphalioides* (L. f.) Mart. 2) Humid rocky grassland where were found the species *Froelichiella grisea* R.E.Fr., *Gomphrena hermogenesii* J.C. Siqueira, *G. lanigera* Pohl. ex Moq. and *G. prostrata* Mart. 3) *P. townsendii*. 4) *G. hermogenesii*. 5) *F. grisea*. 6) *G. lanigera*. 7) *G. prostrata*. 8) *P. gnaphalioides*.

pilosa ou raro vilosa e face abaxial densamente tomentosa, branco-acinzentada. Inflorescências espiciformes, terminais, pedúnculos longos, vilosos a tomentosos, acinzentados; bráctea mediana triangular, glabra; brácteas laterais ovado-cônicas ou orbiculares, margens levemente onduladas. Flores amarelado-claras, sépalas lanceoladas soldadas na base; estames com anteras elípticas na margem do tubo, sésseis e estaminódios interpostos às anteras, truncados; ovário oblongo, estilete quase nulo, estigma penicilado. Raros exemplares foram encontrados em estágio vegetativo em junho/2008 e a espécie foi encontrada em abundância após a ocorrência da queimada na área da RPPN, em setembro/2008, em floração.

Gomphrena hermogenesii J. C. Siqueira (Figura 4)

Ervas a subarbustos eretos, pilosos ou vilosos, alvos. Sistema subterrâneo tuberiforme e axial, bem desenvolvido. Folhas subcoriáceas opostas cruzadas na base e opostas no ápice, lanceoladas ou obovalado-lanceoladas, ápice mucronado e base atenuada, face adaxial escabrosa e face abaxial vilosa, alvo-amarelada. Inflorescências capituliformes, terminais, pedúnculos longos e pilosos (tricomas adpressos), amarelados; bráctea mediana ovalo-lanceolada, glabra; brácteas laterais lanceoladas, dorso cristado-serrilhado, glabras. Flores amareladas, sépalas linear-lanceoladas de nervura central proeminente, pilosas; tubo estaminal igual ao comprimento das sépalas, anteras oblongas; ovário turbinado, estilete cilíndrico alongado ou semi-alongado, estigma bifido, piloso. A espécie foi encontrada o ano todo, em estágio vegetativo, entre gramíneas e ciperáceas, e sua floração foi estimulada pela ocorrência de queimada na área da RPPN.

Gomphrena lanigera Pohl ex Moq. (Figura 6)

Ervas a subarbustos eretos pilosos, lanuginosos, ferrugíneos. Sistema subterrâneo tuberoso, fusiforme, pouco desenvolvido. Folhas basais rosuladas, oblongas ou obovaladas, pilosas ou hispídas ferrugíneas; folhas superiores alternas, lineares, lanadas, ferrugíneas, ápice acuminado e base atenuada, face adaxial pilosa, ferrugínea, face abaxial lanosa, ferrugínea. Inflorescências espiciformes, terminais, pedúnculos semi-alongados, lanosos; brácteas mediana e laterais lanceoladas, pilosas. Flores amarelado-rufescentes ou alaranjadas, sépalas linear-lanceoladas, pilosas; tubo estaminal maior que o comprimento das sépalas, anteras oblongas; ovário oblongo-ovalado, estilete curto, estigma linear, papiloso. Espécie que apresentou o ciclo de vida aéreo mais rápido (rebrotagem, crescimento vegetativo, floração e frutificação), já que a maioria dos indivíduos da espécie se encontrava em fase de frutificação 20-25 dias após a ocorrência de fogo na RPPN, antes mesmo da recuperação das gramíneas e ciperáceas que predominam no local.

Gomphrena prostrata Mart. (Figura 7)

Ervas a subarbustos prostrados ou semi-prostrados, semi-erectos, pilosos, lanosos ou vilosos, alvecentes. Sistema subterrâneo tuberiforme ou fusiforme, lenhoso, bem desenvolvido. Folhas alternas, ovaladas, ovalado-lanceoladas ou lanceoladas, ápice mucronado, subsésseis, face adaxial pilosa ou hispida ferrugínea e face abaxial lanosa ou vilosa, alvecente. Inflorescências capituliformes, terminais, pedúnculos semi-alongados, pilosos; bráctea mediana ovalado-lanceolada, vilosa e brácteas laterais ovaladas, glabras. Flores alvecentes ou amarelo-claras, sépalas lanceoladas lanuginosas; tubo estaminal menor que o comprimento das sépalas, anteras oblongas; ovário globoso, oblongo, estilete curto, estigma papiloso. Espécie de comportamento pirofítico, foi encontrada em plena floração apenas após a ocorrência do fogo na RPPN.

Pfaffia gnaphalioides (L.f.) Mart. (Figura 8)

Ervas a subarbustos eretos, lanosos, alvecentes. Sistema subterrâneo tuberoso fusiforme e axial, pouco desenvolvido. Folhas cartáceas, alternas ovaladas, elípticas, lanceoladas, oblongo-lanceoladas ou linear-lanceoladas, ápice agudo a acuminado e base atenuada, face adaxial denso lanosa verde-acinzentada e face abaxial denso tomentosa, alvo-acinzentada. Inflorescências capituliformes, terminais, pedúnculos curto a longos, lanosos; bráctea mediana ovalada a oblonga, nervura central proeminente, extremidade do dorso pilosa ou hispida e brácteas laterais oblongas a ovaladas, extremidade do dorso pilosa ou hispida. Flores alvas ou amareladas, sépalas ovalado-lanceoladas a oblongo-lanceoladas, densamente pilosas ou vilosas; tubo estaminal menor que o comprimento das sépalas ou quase do mesmo tamanho, anteras linear-oblongas; ovário oblongo, estigma capitado levemente bilobado. A rebrotação e floração da espécie foram estimuladas pela ocorrência de fogo na RPPN, ao final da estação seca, com persistência de hastes aéreas pelo menos até o final da estação chuvosa (final de março/2009).

Pfaffia townsendii Pedersen (Figura 3)

Subarbustos a arbustos eretos e ramificados, tomentosos, acinzentados. Sistema subterrâneo tuberiforme. Folhas cartáceas alternas, oblongo, oblongo-ovaladas a ovaladas, ápice agudo a acuminado e base rotunda, face adaxial tomentosa verde-acinzentada e face abaxial lanosa a tomentosa, alvo-acinzentada. Inflorescências capituliformes ou em espigas, pedúnculos longos, lanosos; bráctea mediana ovalada a ovalado-lanceolada, glabra e brácteas laterais ovaladas, pilosas no dorso; tubo estaminal unido na base e mais da metade estreitado, anteras oblongas; ovário oblongo, estigma capitado emarginado. A espécie foi encontrada na área da RPPN o ano todo, sempre em floração.

Além das características morfológicas distintivas (hábito, filotaxia, pilosidade e coloração das folhas, formato e coloração das inflorescências), as folhas das espécies estudadas evidenciam variações anatômicas entre os gêneros e uma relativa homogeneidade da anatomia foliar entre as espécies do mesmo gênero.

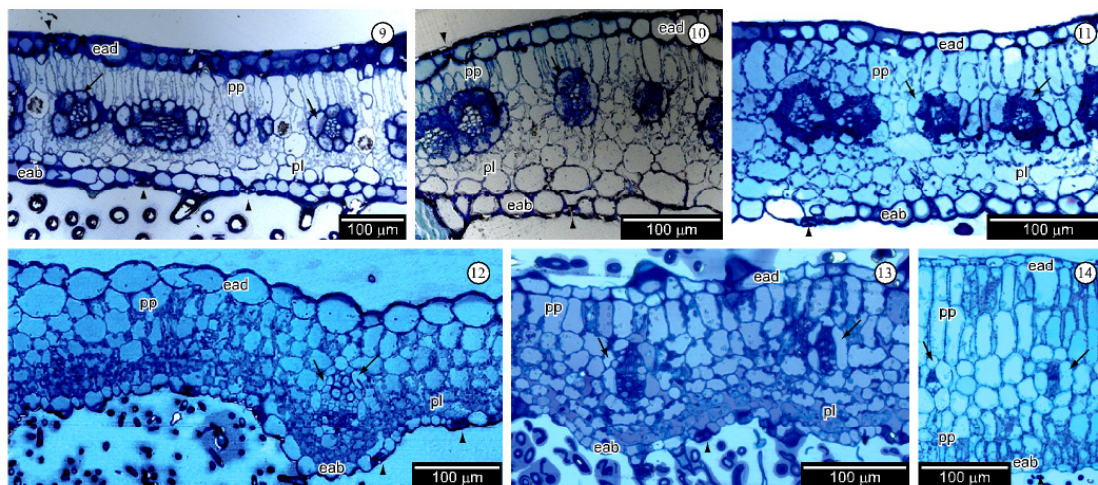
As espécies *G. hermogenesii* (Figura 9), *G. lanigera* (Figura 10) e *G. prostrata* (Figura 11) possuem folhas anfiestomáticas, com mesófilo dorsiventral e bainha parenquimática completa e bem desenvolvida, envolvendo completamente os feixes colaterais de menor porte (excluindo-se a nervura principal). O mesófilo é composto por 1-2 camadas de parênquima paliádico adaxial, feixes vasculares de menor porte envoltos por bainha parenquimática completa e 2-5 camadas de parênquima lacunoso abaxial (Figuras 9, 10 e 11). O limbo das espécies mede de 195,94 a 504 µm de espessura, em regiões entre a nervura principal e o bordo. O limbo mais espesso é o de *G. hermogenesii* (268 a 504 µm) e o mais fino é o de *G. prostrata* (195,94 a 300,25 µm) (Tabela 2). Nas três espécies, a bainha parenquimática possui paredes mais espessas em relação às células do mesófilo, podendo apresentar de 2,11 a 5,55 µm de espessura. A bainha possui parede mais espessa em *G. lanigera* (3,26 a 5,55 µm) e é mais fina em *G. prostrata* (2,11 a 3,44 µm) (Tabela 2).

As organelas das células da bainha (ou células Kranz) posicionam-se centripetamente, próximas ao feixe vascular, e a reação para amido concentra-se nessas células, em relação às demais do mesófilo. Ao redor das células da bainha parenquimática, as células tendem a apresentar padrão radial, com espaços intercelulares maiores na região abaxial. A epiderme uni-estratificada das folhas é formada por células com superfície externa plana, com estômatos nivelados na face adaxial e tendendo a se elevar na face abaxial. A cutícula adaxial dessas espécies é geralmente mais espessa do que na face abaxial, podendo

apresentar de 4,72 a 13,04 μm de espessura. A cutícula adaxial é mais espessa em *G. lanigera* (8,84 a 13,04 μm) e é mais fina em *G. prostrata* (4,72 a 6,52 μm) (Tabela 2). Os bordos foliares de *G. prostrata* são recurvados em direção abaxial (nas outras duas espécies, os bordos também são planos em corte transversal). Nesse gênero, os tricomas que recobrem as folhas apresentam maior densidade à medida que o

tamanho da área foliar se reduz (como as folhas de *G. lanigera*), em relação às folhas mais expandidas das outras duas espécies. Essas espécies de *Gomphrena* apresentam grande quantidade de drusas no mesofilo foliar, cuja composição é oxalato de cálcio.

As espécies *P. gnaphalioides* (Figura 12) e *P. townsendii* (Figura 13) possuem folhas com superfície mais ondulada,



Figuras 9-14. Micrografias de seções transversais do terço médio das folhas das espécies de Amaranthaceae em estudo. 9) *Gomphrena hermogenesii* - limbo médio a espesso, mesofilo dorsiventral e bainha parenquimática completa, com paredes celulares espessas e feixes vasculares colaterais. 10) *G. lanigera* - limbo médio, mesofilo dorsiventral e bainha parenquimática completa, com paredes celulares espessas e feixes vasculares colaterais. 11) *G. prostrata* - limbo fino a médio, mesofilo dorsiventral e bainha parenquimática completa, com paredes celulares espessas e feixes vasculares colaterais. 12) *Pfaffia gnaphalioides* - limbo fino, mesofilo dorsiventral, bainha parenquimática pouco evidente e feixes vasculares colaterais. 13) *P. townsendii* - única espécie hipoestomática, limbo fino, mesofilo dorsiventral, bainha parenquimática pouco evidente, feixes vasculares colaterais. 14) *Froelichiella grisea* - limbo espesso, mesofilo isobilateral, parênquima paliádico de células mais alongadas sob a epiderme adaxial, bainha parenquimática pouco evidente e feixes vasculares colaterais.

Legenda. eab = epiderme abaxial; ead = epiderme adaxial; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliádico; cabeça de seta = estômato; círculo = drusa; seta = bainha parenquimática.

Figures 9-14. Microphotographies of the middle leaf transversal sections of the studied Amaranthaceae species. 9) *Gomphrena hermogenesii* - leaf blade thickness from medium to thick, dorsiventral mesophyll and complete parenchymatous bundle sheath, with thick cell walls and collateral vascular bundles. 10) *G. lanigera* - medium leaf blade, dorsiventral mesophyll and complete parenchymatous bundle sheath, with thick cell walls and collateral vascular bundles. 11) *G. prostrata* - thin to medium leaf blade, dorsiventral mesophyll and complete parenchymatous bundle sheath, with thick cell walls and collateral vascular bundles. 12) *Pfaffia gnaphalioides* - thin leaf blade, dorsiventral mesophyll, less defined parenchymatous bundle sheath and collateral vascular bundles. 13) *P. townsendii* - only hypostomatous leaf species, thin leaf blade, dorsiventral mesophyll, less defined parenchymatous bundle sheath and collateral vascular bundles. 14) *Froelichiella grisea* - thick leaf blade, isobilateral mesophyll with elongated palisade parenchyma under the adaxial epidermis, less defined bundle sheath and collateral vascular bundles.

Legend. eab = abaxial epidermis; ead = adaxial epidermis; pl = spongy parenchyma; pp = palisade parenchyma; arrowhead = stoma; circle = druse; arrow = parenchymatous bundle sheath.

Tabela 2. Dados morfométricos das folhas de Amaranthaceae da RPPN Cara Preta, Alto Paraíso, GO, Brasil.

Table 2. Leaf morphometric data of Amaranthaceae species found at RPPN Cara Preta, Alto Paraíso, GO, Brazil.

Parâmetro	<i>Froelichiella grisea</i> (μm)	<i>Gomphrena hermogenesii</i> (μm)	<i>G. lanigera</i> (μm)	<i>G. prostrata</i> (μm)	<i>Pfaffia gnaphalioides</i> (μm)	<i>P. townsendii</i> (μm)
Limbo Foliar - espessura desde a epiderme adaxial até epiderme abaxial	462.12 $\pm$ 46.00	363.56 $\pm$ 73.6	341.28 $\pm$ 22.09	247.77 $\pm$ 35.34	157.00 $\pm$ 25.26	168.95 $\pm$ 17.75
Cutícula adaxial - espessura	6.62 $\pm$ 1.75	6.07 $\pm$ 0.49	10.73 $\pm$ 1.5	5.47 $\pm$ 0.63	5.81 $\pm$ 0.73	2.94 $\pm$ 0.97
Mesofilo - espessura de parede entre células adjacentes	4.21 $\pm$ 0.70	1.66 $\pm$ 0.39	2.41 $\pm$ 0.50	1.73 $\pm$ 0.41	1.92 $\pm$ 0.30	1.70 $\pm$ 0.46
Bainha - espessura de parede entre uma célula da bainha e uma célula de parênquima adjacente	5.60 $\pm$ 0.86	2.93 $\pm$ 0.39	4.22 $\pm$ 0.73	2.58 $\pm$ 0.38	1.86 $\pm$ 0.24	1.52 $\pm$ 0.29

marcadamente na face abaxial, com a espessura do limbo foliar variando entre 135,49 e 204,32 µm de espessura (Tabela 2). A epiderme é uni-estratificada e a cutícula adaxial é fina, variando de 1,51 a 6,66 µm de espessura, sendo que a cutícula de *P. townsendii* é mais fina das espécies estudadas. Nessas espécies a pilosidade é mais densa que nas *Gomphrena* spp., e o formato alongado e sinuoso dos tricomas unisseriados e nodosos não permite a visualização da superfície epidérmica das folhas sob lupa. O mesofilo das espécies também é dorsiventral, mas a bainha parenquimática é pouco evidente (Figuras 12 e 13), com paredes celulares de mesma espessura ou mais finas que as demais células do mesofilo (Tabela 2), envolvendo feixes colaterais. O mesofilo é composto por 1-2 camadas de parênquima paliádico adaxial de células pouco alongadas, feixes vasculares colaterais e 2-6 camadas de células mais arredondadas formando um parênquima lacunoso abaxial de pequenos espaços intercelulares (Figuras 12 e 13). Só foram encontrados estômatos na superfície abaxial de *P. townsendii*, enquanto em *P. gnaphalioides* foram observados estômatos tanto na superfície adaxial (mais raros e nivelados às demais células) quanto na superfície abaxial da epiderme. Os estômatos de ambas as espécies, na superfície abaxial, são elevados em relação às demais células epidérmicas. O teste histoquímico indica amido amplamente distribuído nas células do mesofilo. A anatomia dessas espécies é compatível com o metabolismo fotossintético C₃.

A espécie *F. grisea* possui folhas com superfície plana e tricomas unisseriados longos, marcadamente na face abaxial. A epiderme é uni-estratificada, formada por células pequenas e com cutícula de espessura mediana (Figura 14), variando entre de 3,61 a 8,4 µm na face adaxial. A densidade dos tricomas não permite a visualização da superfície epidérmica abaxial das folhas sob lupa. O limbo foliar apresenta de 415,19 a 549,45 µm de espessura. O mesofilo da espécie é isobilateral e a bainha parenquimática é pouco evidente (Figura 14), embora suas paredes celulares apresentem espessura ligeiramente superior às demais células do mesofilo (Tabela 2). As organelas na bainha vascular estão posicionadas centrifugamente (da mesma forma que nas demais células do mesofilo) e os feixes vasculares também são colaterais. O mesofilo é composto por 2-4 camadas de parênquima paliádico adaxial, formado por células longas, feixes vasculares colaterais e 2-3 camadas de parênquima paliádico abaxial, formado por células mais curtas (Figura 14). No espaço intervenal, os feixes vasculares são substituídos por 2-5 camadas de células parenquimáticas arredondadas. Foram encontrados estômatos tanto na superfície adaxial quanto na superfície abaxial da epiderme, geralmente nivelados com as demais células epidérmicas. As drusas se concentram na região próxima à nervura principal das folhas desta espécie e são compostas de oxalato de cálcio. Amido é encontrado na maioria das células do mesofilo. A anatomia dessa espécie é compatível com o metabolismo fotossintético C₃.

Discussão

O monitoramento da área por longo espaço de tempo, com visitas periódicas (intervalos de cerca de dois meses) e a ocorrência de fogo foram determinantes para a localização e identificação de *Froelichiella grisea*, *Gomphrena lanigera* e *G. prostrata*, bem como para o registro da floração de *G. hermogenesii* e *Pfaffia gnaphalioides*. O fogo deve quebrar a dormência dessas espécies, estimulando tanto a rebrotação das porções aéreas quanto a floração/frutificação. Essas observações são compatíveis com as observações realizadas para outras espécies dessa família (Siqueira 1992, Marchioretto 2008).

O único levantamento de flora registrado para a área não cita espécies da família Amaranthaceae. De acordo com o Plano de Utilização da RPPN Cara Preta (de Souza 2004), os levantamentos de flora efetuados na área registraram a presença de 239 espécies

vegetais, distribuídas em 46 famílias (137 gêneros). Acompanhando o registro de predominância de fitofisionomias campestres na RPPN (campos rupestres, campos limpos e campo sujo), o maior número de espécies vegetais pertence à família Poaceae (=Gramineae) (30 spp.), seguido de Asteraceae (=Compositae) com 21 espécies, Cyperaceae, Orchidaceae, Fabaceae (=Leguminosae) e Eriocaulaceae (16 espécies cada família) e Xyridaceae (10 espécies). De acordo com os autores do Plano de Utilização, estão protegidas na área da RPPN cerca de 38% das famílias vegetais registradas para o município de Alto Paraíso, GO. Três espécies vegetais foram apontadas como prováveis endemismos da área (*Xyris paradisiaca* Wand., *Cambessedesia glaziovi* Cogn. ex A.B. Martins e *Mimosa regina* Barneby).

Considerando-se que o presente trabalho de campo acrescentou mais seis espécies, três gêneros e uma família ao levantamento florístico da área, a RPPN Cara Preta passa a registrar 245 espécies vegetais distribuídas em 47 famílias e 140 gêneros, em uma área de 975 ha. Entre as espécies de Amaranthaceae encontradas na área, 33% são endêmicas da Chapada dos Veadeiros: *G. hermogenesii* e *F. grisea*. Essa última espécie é citada na "Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção" como uma das espécies com dados de registros considerados deficientes, não permitindo enquadrá-las com segurança na situação de ameaçada (Brasil 2008) e com problemas de conservação (Marchioretto et al. 2005). Estudos mais específicos e ampliados (Marchioretto et al. 2005, Biodiversitas 2009) consideram que *F. grisea*, monoespecífica para o gênero *Froelichiella* e de ocorrência restrita aos campos rupestres da Chapada dos Veadeiros, se enquadraria na categoria "vulnerável" da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), correndo alto risco de extinção a médio prazo. Além dessa espécie, *P. townsendii*, também encontrada na área, se enquadra na mesma categoria de ameaça (Biodiversitas 2009) e sua distribuição é restrita aos cerrados e campos rupestres dos Estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais (Marchioretto 2008). Essas informações tornam a RPPN Cara Preta particularmente importante como local de preservação dessas espécies da família Amaranthaceae para estudos futuros (genética, biogeografia e outros) e para fins de educação ambiental.

A área da RPPN Cara Preta representa apenas 1,5% da área do Parque Nacional (PARNA) Chapada dos Veadeiros, mas possui 9,2% do número de espécies vegetais registradas para a Chapada dos Veadeiros. Somente em relação à família Amaranthaceae, na RPPN Cara Preta são encontradas 23 a 25% das espécies ocorrentes na Chapada dos Veadeiros. Das 27 espécies de Amaranthaceae da Chapada, três podem ser consideradas invasoras, o que eleva ainda mais o percentual de representantes nativos encontrados na RPPN. A lista de espécies vegetais da Chapada dos Veadeiros (Felfili et al. 2007) inclui pesquisas realizadas nos 65.038 ha do Parque Nacional Chapada dos Veadeiros, uma área fronteiriça com a RPPN Cara Preta, no município de Alto Paraíso e na Vila Propício, registrando um total de 2.661 espécies, distribuídas em 150 famílias e 731 gêneros.

Considerando que os dados de endemismo constantes do Plano de Utilização da RPPN sejam confirmados (três espécies), somadas às espécies endêmicas de Amaranthaceae (duas espécies) registradas para a área, chega-se à taxa de endemismo de 2%, bem representativo para o Bioma Cerrado. O Cerrado consta da lista de *Hotspots* de prioridades para a conservação (Myers et al. 2000) por conter, entre outras, 4.400 espécies de plantas endêmicas – ou 1,5% do total das 300 mil espécies de plantas do planeta.

O Brasil é um reduto de riqueza e endemismos de espécies de Amaranthaceae, com alguns táxons já identificados como ameaçados e outros com potencial ornamental, medicinal e/ou alimentício ainda inexplorado. As condições de coleta citadas no Plano de Utilização da RPPN Cara Preta (de Souza 2004) e as observações de campo deste trabalho indicam que a flora da área ainda se encontra sub-registrada,

havendo necessidade de ampliação dos estudos florísticos na área. Este estudo sugere que a ampliação do trabalho de monitoramento e coletas de plantas nessa RPPN pode resultar em registros de espécies novas para a ciência, inclusive endêmicas, dado o comportamento sazonal das dicotiledôneas herbáceas, exemplificado pelo atual registro da família *Amaranthaceae*.

A anatomia foliar das espécies é compatível com o encontrado na literatura para outras espécies dos gêneros *Gomphrena* e *Pfaffia* (Handro 1964, 1967, Carolin et al. 1978, Estelita-Teixeira & Handro 1984, Gavilanes 1999, Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro 2005). Pela primeira vez, descreveu-se a anatomia do gênero *Froelichiella*. De acordo com Mauseth (2009), plantas de ambientes quentes e secos apresentam anatomia foliar padrão, com parênquima paliádico adaxial e parênquima lacunoso abaxial, geralmente reduzindo os espaços intercelulares e compactando as células para evitar perdas de água. Essa configuração de tecidos poderia reduzir a fotossíntese, pois as células ficariam menos expostas ao dióxido de carbono, mas modificações enzimáticas e ultraestruturais propiciaram a resolução deste problema, através do surgimento de diferentes vias fotossintéticas (Mauseth 2009).

A anatomia das folhas das espécies de *Gomphrena* encontradas na RPPN indica a realização da via C_4 de fotossíntese, especialmente em razão da presença de uma bainha vascular completa, com paredes celulares espessas envolvendo os feixes vasculares, além de organelas em posição centrípeta e concentração da produção de amido nestas células. Essas espécies apresentam o tipo *Gomphrena* de anatomia Kranz (Kadereit et al. 2003), onde a porção adaxial do mesófilo adjacente à bainha vascular se organiza radialmente e a porção abaxial é formada por células menores e nem sempre distintamente radiais. Essas são espécies com maior capacidade de captura e fixação de gás carbônico em biomassa subterrânea, garantindo o crescimento rápido das partes aéreas sob condições ambientais favoráveis. A anatomia foliar dessas espécies de *Gomphrena* corrobora apenas parcialmente um estudo recente sobre o metabolismo das espécies, baseado na análise de isótopos de carbono (Sage et al. 2007), que indica duas dessas espécies como C_4 e reporta que *G. hermogenesii* seria uma espécie C_3 .

As demais espécies estudadas, dos gêneros *Froelichiella* e *Pfaffia*, devem realizar apenas a via C_3 de fotossíntese, uma vez que a bainha vascular é menos distinta e as paredes celulares são tão finas quanto as das demais células do mesófilo, as organelas estão posicionadas centrifugamente no mesófilo e na bainha e o amido é produzido tanto no mesófilo quanto na bainha, concordando com os resultados de Sage et al. (2007) através da análise de isótopos de carbono.

Dentre as *Gomphrena*, o ciclo de vida aéreo mais rápido (rebrotagem, crescimento vegetativo, floração e frutificação) ocorreu na espécie *G. lanigera*. Essa espécie é a que apresenta a cutícula adaxial mais espessa (Tabela 2), característica anatômica não relacionada com a duração da folha no tempo, já que a maioria dos indivíduos da espécie se encontrava em fase de frutificação 20-25 dias após a ocorrência de fogo, antes mesmo da recuperação das gramíneas que predominam no local. Da mesma forma, o espessamento das paredes celulares na bainha vascular também não parece um evento de longo prazo, pois *G. lanigera* é a espécie que apresentou maior espessamento nessas paredes (Tabela 2). Sugere-se, assim, que tanto o desenvolvimento de cutícula quanto das paredes celulares seja um evento mais correlacionado à genética da espécie e, possivelmente, ao metabolismo fotossintético (em relação às células da bainha). O comportamento pirofítico de *G. lanigera* também foi enfatizado por Siqueira (1992), que informa a ocorrência da espécie em áreas de cerrados e campos rupestres de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal, aparecendo frequentemente após queimadas.

Embora as três espécies de *Gomphrena* sejam subarborescentes ou herbáceas de pequeno porte (menos de 30 cm de altura), apenas duas delas possuem sistemas subterrâneos bem desenvolvidos e perenes (*G. hermogenesii* e *G. prostrata*), aparentemente com xilopódio, indicando a alocação preferencial da biomassa em estruturas persistentes. *G. lanigera* possui raiz tuberosa, mas com menor desenvolvimento em relação às outras duas espécies de *Gomphrena*. Isto pode ser explicado pelo curto espaço de tempo para a produção de carboidratos e alocação no sistema subterrâneo, somado ao limbo reduzido e baixa quantidade de folhas disponíveis em cada indivíduo (Figura 6). A rebrotação das porções aéreas e floração de *G. prostrata* também foram estimuladas pelo fogo, mas essa espécie possui maior quantidade de tecido fotossintetizante do que *G. lanigera*.

Entre as espécies de *Gomphrena*, apenas *G. hermogenesii* apresenta porções aéreas (caule e folhas) persistentes ao longo do ano (independentemente de ser período seco ou chuvoso) e o limbo foliar mais espesso foi encontrado em amostras coletadas ao longo do estágio vegetativo. Durante cerca de um ano e meio de acompanhamento da área, antes da ocorrência do fogo e após a localização da espécie no campo, não houve registro de floração. A floração desta espécie também foi estimulada pela ocorrência da queimada, um aspecto importante de seu comportamento ecológico ainda não descrito na literatura.

A rápida floração das espécies herbáceas de *Amaranthaceae*, que fazem a dispersão anemocórica dos frutos, favorece o estabelecimento pioneiro em áreas mais distantes, antes mesmo da recuperação integral do restante da vegetação rasteira, composta especialmente por gramíneas e ciperáceas. O estudo da ecologia das espécies dessa camada da vegetação é importante para ampliar o conhecimento sobre a vegetação que recobre as áreas abertas de Cerrado. Nas plantas, o sistema subterrâneo desenvolvido, a dispersão anemocórica e o pirofitismo são adaptações consideradas importantes para a sobrevivência das espécies (Siqueira 2007). A camada rasteira possui diversidade de cerca de quatro a sete vezes o número das espécies lenhosas (arbustos maiores e árvores), sendo mais importantes as famílias Compositae, Gramineae, Leguminosae e Rubiaceae (Ratter et al. 1997). Nos campos úmidos, a flutuação no nível de disponibilidade de água nas estações chuvosa e seca não permite o crescimento de árvores (Ratter et al. 1997).

O limbo foliar das duas espécies do gênero *Pfaffia* encontradas na área são os menos espessos dentre as espécies deste estudo (Tabela 2). Entretanto, a organização interna dos tecidos é marcadamente dorsiventral em *P. townsendii* (Figura 13), que possui porções aéreas persistentes ao longo do ano, enquanto em *P. gnaphalioides* (Figura 12) o parênquima lacunoso é mais compactado e o parênquima paliádico é menos alongado. A maior especialização dos tecidos pode ser decorrente da longevidade das folhas – que são de curta duração na segunda espécie. A maior compactação das células em *P. gnaphalioides* pode estar relacionada à aparente menor densidade de tricomas. A cutícula mais fina foi encontrada em *P. townsendii*, provavelmente em função da densa pilosidade e da trama fechada que os tricomas lanuginosos formam sobre a epiderme foliar. A pilosidade densa é considerada fundamental para reduzir a temperatura e a perda de água transpiracional em ambientes quentes e secos, durante o dia, bem como para a manutenção da temperatura foliar à noite (Press 1999). A pilosidade mais densa nas folhas das duas espécies de *Pfaffia* pode estar ligada à ocorrência das mesmas em áreas acidentadas e rochosas do cerrado de altitude, sujeitas a ventanias.

A anfiestomia pode não estar diretamente relacionada com a ocorrência do metabolismo C_4 , uma vez que ela é comum a cinco das seis espécies estudadas e apenas três delas possuem anatomia compatível com a realização da via C_4 de fotossíntese. Entretanto, pode estar diretamente relacionada à espessura do limbo foliar, pelo

menos em parte, e também à evolução do metabolismo C_4 , uma vez que aumenta a exposição dos tecidos internos ao dióxido de carbono. Embora a diferença entre a espessura das folhas de *Pfaffia* seja similar, *P. townsendii* é a única espécie arbustiva e suas folhas perenes têm o limbo mais fino entre as espécies deste estudo, com estômatos restritos à face abaxial. Este dado corrobora com os de Parkhurst (1978), que afirma que para o mesmo ambiente, as folhas mais espessas tendem a ser anfiestomáticas e as folhas mais finas tendem a ser hipoestomáticas. Entretanto, uma pesquisa em larga escala, conduzida por Mott et al. (1982), indica que a espessura foliar deve ser um caráter secundário em relação à anfiestomia, necessitando-se de mais algum parâmetro independente, uma vez que folhas de muitas plantas herbáceas com 100-500 μm de espessura podem apresentar anfiestomia, enquanto muitas plantas lenhosas com folhas de mesma espessura tendem a ser hipoestomáticas. Neste sentido, o hábito arbustivo de *P. townsendii*, conjugado às folhas de menor espessura, reflete o caráter hipostômico típico de espécies lenhosas.

À exceção de *P. townsendii*, todas as demais espécies deste estudo são herbáceas de pequeno porte e anfiestomáticas. Três das seis espécies deste estudo possuem estrutura foliar compatível com o metabolismo C_4 , o que concorda com a afirmação de Mott et al. (1982) de que espécies de plantas com metabolismo C_4 são adaptadas a ambientes de alta luminosidade e são anfiestomáticas. Também corrobora com Parkhurst (1978), que afirma que, em relação à captura de gás carbônico, folhas anfiestomáticas parecem melhor adaptadas para a maioria das condições ambientais e, especialmente, às condições de baixo estresse hídrico. Afinal, todas as espécies de provável metabolismo C_4 (*Gomphrena* spp.) foram encontradas na região de campo limpo úmido, onde seus sistemas subterrâneos bem desenvolvidos e o lençol freático superficial atuam na manutenção do suprimento de água durante o período de persistência de suas porções aéreas, não havendo necessidade de restrição transpiracional.

Desta maneira, as variações anatômicas das folhas das espécies são parcialmente decorrentes da genética, da adaptação ao ambiente e também podem estar relacionadas ao hábito, comportamento ecológico e duração das folhas durante o ciclo de vida da planta. O entendimento do significado funcional da estrutura foliar em nível ecológico é complexo e envolve muitas variantes, sendo dependente do ambiente, não intuitivo e frequentemente indica que há mais do que uma solução estrutural para a obtenção do mesmo resultado fisiológico (Press 1999).

Portanto, considerando-se alta a taxa de endemismo dos cerrados e sua importância como centro de biodiversidade (Ratter et al. 1997), é necessário ampliar os estudos de biologia básica (taxonomia, ecologia, anatomia, ultra-estrutura e biogeografia) em espécies dessa e de outras famílias vegetais nativas do Bioma Cerrado. Assim, além de descrever algumas espécies do Cerrado em aspectos comportamentais e anatômicos inéditos, esse trabalho indica que a família Amaranthaceae também pode ser um bom marcador da biodiversidade de dicotiledôneas de pequeno porte e da capacidade de regeneração das áreas de campos rupestres, campos úmidos e outros tipos de vegetação aberta dos cerrados. O monitoramento constante das áreas preservadas e disponíveis para a pesquisa científica pode revelar dados inesperados e ampliar a motivação para as pesquisas e conservação do mosaico de ecossistemas que formam o Bioma Cerrado.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro; aos Herbários IBGE, UB e PACA e à ONG Oca Brasil pela infraestrutura e apoio; aos coletores adicionais pelo acompanhamento nas buscas e coletas das espécies.

Parte da tese de Doutorado da primeira autora.

Referências Bibliográficas

- BATALHA, M.A. & MARTINS, F.R. 2004. Reproductive fenology of the cerrado plant community in Emas National Park (Central Brazil). *Aust. J. Bot.* 52:149-161.
- BIODIVERSITAS. 2009. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção. <http://www.biodiversitas.org.br/> (último acesso em 11/09/2009).
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. <http://www.mma.gov.br> (último acesso em 11/09/2009).
- CAROLIN, R.C., JACOBS, S.W.L. & VESK, M. 1978. Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. *Aust. J. Bot.* 26:683-698.
- CAVALCANTI, T.B. & RAMOS, A.E. (org.). 2001. Flora do Distrito Federal, Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.
- CONSERVATION INTERNATIONAL, FUNATURA, FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS & UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. 1999. Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. www.bdt.org.br/bdt/workcerrado (último acesso em 19/05/2005).
- DE SOUZA, A. 2004. Relatório plano de utilização RPPN Cara Preta. Nativa Proteção Ambiental, Alto Paraíso, 327p.
- EDWARDS, G.E., FRANCESCHI, V.R. & VOZNESENSKAYA, H.V. 2004. Single-cell C_4 photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55:173-196.
- ESTELITA-TEIXEIRA, M.E. & HANDRO, W. 1984. Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Can. J. Bot.* 62:812-817.
- FANK-DE-CARVALHO, S.M., GRACIANO-RIBEIRO, D. 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborens* L.f. (Amaranthaceae). *Acta Bot. Bras.* 19(2):379-392.
- FARIAS, R., ALVES, E.R., MARTINS, R.C., BARBOZA, M.A., ZANENGA-GODOY, R., SILVA, J.B. & RODRIGUES-DA-SILVA, R. 2002. Caminhando pelo cerrado. Planta herbácea-arbustiva – caracteres vegetativos e organolépticos. Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- FELFILI, J.M., REZENDE, A.V. & SILVA JÚNIOR, M.D. (org.). 2007. Biogeografia do Bioma Cerrado – vegetação e solos da Chapada dos Veadeiros. Editora Universidade de Brasília/FINATEC, Brasília.
- GAVILANES, M.L. 1999. Estudo anatômico do eixo vegetativo de plantas daninhas que ocorrem em Minas Gerais. 1. Anatomia foliar de *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae). *Ciênc. e Agrotecn.* 23(4):881-898.
- HANDRO, W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das amarantáceas dos cerrados. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 36(4):479-499.
- HANDRO, W. 1967. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das amarantáceas dos cerrados. II – Gênero *Pfaffia*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 39(3-4):495-506.
- THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX - IPNI. 2009. <http://www.ipni.org/index.html> (último acesso em 11/09/2009).
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOG, E.A. & STEVENS, P.F. 2002. Plant Systematics – a phylogenetic approach. 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- KADEREIT, G., BORSH, T., WEISING, K. & FREITAG, H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of the C_4 Photosynthesis. *Int. J. Plant Sci.* 164/6:959-986.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy Abstracts Fifth Annual Meeting American Society for Cell Biology. *J. Cell. Biol.* 27:137-138A.
- KLINK, C.A. & MACHADO, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1(1):147-155.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Rio de Janeiro.
- LABORIAU, M.L.S. 1961. Pollen grains of plants of the “Cerrado” - I. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 33(1):119-130.

- MARCHIORETTO, M.S. 2008. Os gêneros *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MARCHIORETTO, M.S., MIOTTO, S.T.S. & SIQUEIRA, J.C. 2008. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Hebanthe* Mart. (Amaranthaceae). *Pesq. Bot.* 59:159-170.
- MARCHIORETTO, M.S., MIOTTO, S.T.S. & SIQUEIRA, J.C. 2009. Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Rodriguésia* 60(3):667-681.
- MARCHIORETTO, M.S., SENNA, L. & SIQUEIRA, J.C. 2010. *Amaranthaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000042> (último acesso em 12/06/2010).
- MARCHIORETTO, M.S., WINDISCH, P.G. & SIQUEIRA, J.C. 2002. Os gêneros *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R.E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. *Pesq. Bot.* 52:7-46.
- MARCHIORETTO, M.S., WINDISCH, P.G. & SIQUEIRA, J.C. 2004. Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R. E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. *Iheringia, Sér. Bot.* 2:149-159.
- MARCHIORETTO, M.S., WINDISCH, P.G. & SIQUEIRA, J.C. 2005. Problemas de conservação das espécies dos gêneros *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R. E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. *Acta Bot. Bras.* 19(2):215-219.
- MAUSETH, J.D. 2009. Botany – an introduction to plant biology. 4th ed. Jones & Bartlett Pub., Sudbury.
- MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA, M.C., REZENDE, A.R., FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E. 1998. Flora vascular do Cerrado. In Cerrado: ambiente e flora (S.M. Sano & S.P. Almeida, ed.). Embrapa CPAC, Planaltina, p.286-556.
- MIRANDA, H. & MIRANDA, A.C. 2000. Queimadas e estoques de carbono no Cerrado. In As mudanças climáticas e os ecossistemas brasileiros (A.G. Moreira & S. Schwartzman, ed.). Foco, Brasília, p.75-81.
- MONTEIRO-SCANAVACCA, W.R. 1971. Vascularização floral em Amaranthaceae. *Ciênc. e Cult.* 23(3):339-349.
- MOTT, K.A., GIBSON, A.C. & O'LEARY, J.W. 1982. The adaptive significance of amphistomatic leaves. *Plant Cell Environ.* 5:455-460.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- PARKHURST, D.F. 1978. The adaptive significance of stomatal occurrence on one or both surfaces of leaves. *J. Ecol.* 66:367-383.
- PRESS, M.C. 1999. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations. *New Phytol.* 143:213-219.
- RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 80:223-230.
- SAGE, R.F., SAGE, T.L., PEARCY, R.W. & BORSCH, T. 2007. The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis in Amaranthaceae *sensu stricto*. *Am. J. Bot.* 94(12):1992-2003.
- SIQUEIRA, J.C. 1987. Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. *Acta Biol. Leopold.* 9(1):99-110.
- SIQUEIRA, J.C. 1992. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. *Pesq. Bot.* 43:5-197.
- SIQUEIRA, J.C. 2002. Amaranthaceae. In Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo, vol. II. (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, A.N. Giulietti, T.S.A. Melhem, V. Dittrich & C. Kameyama). HUCITEC, São Paulo, p.11-30.
- SIQUEIRA, J.C. 2007. O Bioma Cerrado e a preservação de grupos taxonômicos: um olhar sobre as Amaranthaceae. *Pesq. Bot.* 58:389-394.
- SOUZA, W. (ED). 1998. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro.
- THIERS, B. 2010. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Continuously updated. <http://sweetgum.nybg.org/ih> (último acesso em 06/2010).

Recebido em 26/02/2010

Versão reformulada recebida em 17/06/2010

Publicado em 04/10/2010

2.2 - Artigo Publicado na revista Biocell (Mendoza), em 2010.

Este artigo conta com a co-autoria de Pedro Ítalo Tanno da Silva, atualmente graduado em Engenharia Florestal pela Universidade de Brasília, que participou do desenvolvimento inicial do projeto de doutoramento, como estagiário voluntário. Conta também com a co-autoria de Misléia Rodrigues de Aguiar Gomes, aluna do curso à distância de Licenciatura em Biologia da Universidade de Brasília, que também atuou como estagiária voluntária.

Nesse artigo são avaliados alguns aspectos da superfície das folhas de três espécies de *Gomphrena* nativas do Cerrado, em comparação com uma espécie subespontânea do ambiente. O objetivo principal era contribuir para a taxonomia das espécies, tanto com a descrição da superfície quanto pela busca de elementos de diagnóstico diferencial das mesmas. Outro objetivo foi analisar a densidade estomática, com vistas a correlacionar esse aspecto ao metabolismo C_4 , esperado para as espécies do Cerrado e já descrito para *G. globosa*, a espécie controle. Além disso, visava descrever as estruturas de cera epicuticular encontradas nas espécies do Cerrado, partindo-se de um estudo inicial realizado durante o período de mestrado em *G. arborescens*, onde foram encontradas plaquetas, consideradas, na literatura, como inexistentes em espécies de *Amaranthaceae* e indicadas como estrutura diferenciadora entre *Amaranthaceae* (sem plaquetas) e *Chenopodiaceae* (com plaquetas).

O artigo corresponde ao desenvolvimento do objetivo 1.6.2.2 e indica que espécies desse gênero podem ter desenvolvido plaquetas em razão de adaptação ao clima fortemente estacional do Cerrado e como uma forma de barreira contra fungos, amplamente encontrados nas superfícies foliares das espécies nativas. Ceras epicuticulares são consideradas eficientes para aumentar a reflexão da luminosidade excessiva, comum nas áreas abertas de cerrado. Além disso, revela que a metodologia de estudo de cera epicuticular em espécies nativas necessita de um controle, uma vez que os solventes utilizados nas técnicas usuais de microscopia eletrônica de varredura podem dissolver as ceras. Demonstrou, ainda, que a composição química das ceras das diferentes espécies deve variar, uma vez que essas estruturas são afetadas diferentemente pelos diferentes solventes usuais (etanol e acetona).

Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome

SUZANE MARGARET FANK-DE-CARVALHO, MISLÉIA RODRIGUES DE AGUIAR GOMES, PEDRO ÍTALO TANNO SILVA, SÔNIA NAIR BÃO

Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Ciências Biológicas. CEP 70919-970, Brasília/DF, Brasil.

Key words: anatomy, epicuticular wax, platelets, trichomes, stomata

ABSTRACT: The leaf structure and micromorphology characterize plant species and reflex its interactions with the environment. Leaf epidermis sculptures aid high transpiration plants on light reflection. The form and distribution of epicuticular wax crystalloids are important to characterize the surface. Aiming to know the micromorphology and the ultrastructure of *G. arborescens*, *G. pohlii* and *G. virgata*, leaves of these Cerrado native species were collected in Brasília, Distrito Federal, Brazil, at the Olympic Center of the Universidade de Brasília and at Reserva Ecológica do Roncador. Leaves of *G. globosa*, an Indian native species, were also studied for comparison. Leaves were fractionated, fixed and treated for observation under optical and scanning electron microscope. A description of the leaf epidermis is provided, along with some quantitative data to help the species taxonomy and support future studies on their physiology: all species are amphistomatic and have Stomatal Index between 7.27 and 18.99. The *Gomphrena* spp. studied have epicuticular wax platelets and wax sculptures over their larger trichome, which are relevant for their taxonomy. Over the Cerrado species cuticle, epicuticular wax is damaged by fungi hyphae development. The presence of epicuticular wax on *Gomphrena* spp. leaves corroborates the phylogenetical alliance between Amaranthaceae and Chenopodiaceae.

Introduction

The Amaranthaceae is a cosmopolite family and occurs at disturbed, arid or saline areas; one of the characteristics that ensure its survival in adverse environments is the operation of C_4 pathway of photosynthesis (Judd *et al.*, 1999; Borsch *et al.*, 2001), with the presence of the Kranz syndrome and the characteristic ultrastructure (Carolin *et al.*, 1978; Estelita-Teixeira and Handro, 1984). Other characters could collaborate on the wide distribution of the Amaranthaceae, like lifespan, plants habit and leaf structure, indumentum and venation types (Judd *et al.*, 1999).

A broad definition of the Amaranthaceae family

includes Chenopodiaceae, which is supported by morphology, *rbcL* and ORF2280 sequences, chloroplast structure and its DNA restriction sites, in a total of 2000 species and 170 genera, from which 100 spp. and 20 genera are native of Brazil (Judd *et al.*, 1999; Souza and Lorenzi, 2008). Leaves and roots of some species of the family are edible (*Chenopodium* spp., *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris* and *Amaranthus* spp.) (Judd *et al.*, 1999). Seeds of South American species of *Chenopodium* and *Amaranthus* (quinoa) are used to make flour and others are ornamental, such as *Celosia* spp., *Gomphrena* spp. and *Iresine* spp. (Judd *et al.*, 1999). From a total of 120 spp. of the *Gomphrena* gender, 46 species occur in Brazil and 41% of it is found in the Cerrado biome (Siqueira, 1992 and 2002; Marchioreto *et al.*, 2002). This biome raises species of the genera *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Chamissoa*, *Froelichia*, *Froelichiella*, *Hebanthe*, *Pfaffia* and *Xerosiphon*

*Address correspondence to: Sônia Nair Bão.

E-mail: snbao@unb.br

Received: September 9, 2009. Revised version received: January 27, 2010. Accepted: January 28, 2010.

(Siqueira, 1992; Mendonça *et al.*, 1998; Cavalcanti and Ramos, 2001; Marchioreto *et al.*, 2002; Marchioreto, 2008). Twenty species of the family are used in Brazil as food or as popular medicine plant, mostly species from *Alternanthera*, *Amaranthus* and *Gomphrena* genera (Siqueira, 1987). Amaranthaceae species present striated stem and entire alternate or opposite leaves and a great number of them are considered pioneer, growing in clay or sandy soil, frequently among rocks (Joly, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999).

The Cerrado biome has a landscape that varies from tall savanna woodland to low open grassland with no woody plants and supports the richest flora among the world's savannas and has a high degree of endemism (Simon and Proença, 2000; Klink and Machado, 2005). This Brazilian biome is considered one of the hotspots for the conservation of global biodiversity, with 10,000 plants species (almost 50% of it are endemic), completely adapted to survive adverse conditions of soil and climate, and only 30% of its biodiversity is reasonably known (Myers *et al.*, 2000; Paiva, 2000; Klink and Machado, 2005). Coutinho (1980) believes that frequent fire is one of the most important factors to determine this biome vegetation, alternating communities and maintaining its biodiversity. The expansion of crops at Cerrado biome, which occupies around 40% of its area, has accelerated the natural habitat fragmentation, leading to local biodiversity extinction, introduction of exotic species, soil erosion, water pollution and alterations in vegetation and hydrologic conditions (Miranda and Miranda, 2000; Ratter *et al.*, 2000; Klink and Machado, 2005).

The leaves are the most plastic structures of the plant and their modifications helps to understand how structure, function and metabolism are related, since leaves play a vital role in photosynthesis (Mauseth, 2008). The outermost layer of the leaf is the cuticle, which recovers the epidermis and act as a barrier against mechanical damages, insects, excessive light and loss of water (Bird and Gray, 2003). The cuticle is a film of soluble and polymerized lipids (cutin and suberin) and the wax sculptures that rise from the cuticle plant are influenced by the environment, helping the species to reflect excessive light and to waterproof the epidermis, retaining water and improving the defenses against fungi (Salatino *et al.*, 1986; Rudall, 2007; Mauseth, 2008). Plants can reach the same adaptation pattern by different character combinations. The leaves epidermis is influenced by the plant needs for performing efficient photosynthesis, which includes the compact arrangement of cells and the absence or presence of some epi-

dermal characters, like cuticle and stomata (Esau, 1977; Rudall, 2007; Mauseth, 2008).

Scanning electron microscopy methods are not suitable to detect the thin wax films that are probably present in all terrestrial angiosperms but are good for determining local wax projections and detailed views of the surfaces (Wilkinson, 1979; Engel and Barthlott, 1988). When appears as crystalloids, the individual form, distribution and orientation of the epicuticular wax can be important to characterize the surface as a valuable systematic character (Engel and Barthlott, 1988; Barthlott *et al.*, 1998). The first survey on Amaranthaceae *stricto sensu* family did not find epicuticular wax on species of the genera *Aerva*, *Allmania*, *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Celosia*, *Deeringia*, *Gomphrena*, *Iresine* and *Ptilotus*, while Chenopodiaceae members presented small epicuticular platelets (minor than 2 μm) with parallel orientation and not restricted to stomata neighbourhood (Engel and Barthlott, 1988).

In order to improve the knowledge of the biodiversity of the Cerrado biome and to understand the structural characteristics plants developed on evolutionary adaptations to this environment, the leaf epidermis of three Cerrado native species (*Gomphrena arborescens* L.f., *G. pohlii* Moq. and *G. virgata* Mart.) and of one cultivated plant - *G. globosa* L. - where structurally described under optical and scanning electron microscopy in search for taxonomically and environmentally relevant characteristics.

Material and Methods

Data research on native species and sample collection

Along with a survey on Herbaria data (Herbarium of the Universidade de Brasília/UB, Herbarium of Reserva Ecológica do Roncador/IBGE, Herbarium of the Universidade Vale dos Sinos/PACA and Herbarium of Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/CEN), numerous field searches were carried out in cerrado *sensu stricto* areas of Distrito Federal (Parque Ecológico Olhos D'água, Reserva Ecológica do Roncador, Centro Olímpico of Universidade de Brasília and other areas on road vicinities of Park Way and Jardim Botânico) in order to locate the native species in the Cerrado biome.

The Cerrado biome is a tropical savanna-like ecosystem that occupies about 2 millions of km^2 (from 3-24° S and from 41-43° W), presenting a hot, semi-humid, and notably seasonal climate, with a dry winter season and a rainy summer, raising typical vegetation

(Dias, 1992; Simon and Proença, 2000; Eiten, 2001).

Leaves of the 3rd to 5th nodes of the Cerrado native adult species were collected in the cerrado *sensu stricto* areas of the Olympic Center of the Universidade de Brasília (*G. arborescens*, *G. pohlii* and *G. virgata*) near the coordinates 15°45.936' S and 047°51.187' W and at the Reserva Ecológica do Roncador - RECOR/IBGE (*G. arborescens* and *G. virgata*), both in Brasília/DF, while the similar material of *G. globosa* was harvest from public gardens, in Brasília/DF, near 15°45.950' S and 047°53.006' W coordinates. Testimony material was deposited at the IBGE, PACA and UB Herbaria. Leaves of the 3rd to 5th nodes of *G. arborescens* juvenile species (6-9 months old), cultivated from seeds at vegetation house conditions were also collected and submitted to the same treatment as the adult ones.

Sample and methodology

The species leaves were fractionated and the middle part of them was fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965) and in FAA70 or FPA solutions (Kraus and Arduin, 1997) for 24 h. The Karnovsky fixed sample was post fixed in 1% osmium tetroxide in 0.05M sodium cacodylate buffer pH 7.2 for 1 h. Small pieces of fresh tissue were directly fixed over a stub for scanning electron microscopy and air dried without any preparation, as control pieces (Paiva, 2005). Part of the material of both fixatives were dehydrated in a series of ascending acetone and/or ethanol gradient (30%-100%) and critical point dried to the in a Critical Point Drier CPD 030 (Balzers) and, along with air dried samples, were gold sputtered in a SCD 050 (Balzers), followed by the observation under the scanning electron microscope JEOL JSM 840-A.

Part of the material of FAA70 fixative was hand free sliced and submitted to a Sudan III histochemical test to detect lipids, cutin and suberin on the epidermis of the leaves and to a solution of acid floroglucin to detect lignin (Kraus and Arduin, 1997). Other leaf rectangular pieces were washed in distilled water and submitted to 50% nitric acid solution and boiled until the mesophyll was dissolved, sparing the adaxial and abaxial epidermis apart. Then, the epidermis was washed again, stained with safranin and mounted between histological slides and cover slips with Kayser's glycerinated gelatin (Kraus and Arduin, 1997). As this technique was not good enough for all the studied species, some pieces of the leaves were cleared with a sequence of sodium hydroxide and sodium hypochlorite solutions, followed by safranin staining (Kraus and Arduin, 1997) and mounted between glass pieces with Verniz Vitral Incolor

of Acrilex™ (Paiva *et al.*, 2006). All samples were observed under a Zeiss Axiophot equipped with AxioCam and the AxioVision software.

Stomata and trichome density were determined by counting random areas of cleared leaves and expressed as the medium number by mm² plus the standard deviation on adaxial and abaxial epidermis surfaces of at least three leaves. The Stomatal Index were determined for all the four species on the middle adaxial and abaxial epidermis of the same leaf surfaces, calculating the percentage of stomata in relation of the other epidermal cells as $SI = [S/(E+S)] * 100$, where SI is the Stomatal Index, S is the number of Stomata per unit area and E is the number of Epidermal cells (including basal cells of trichomes) per same unit area (Metcalf and Chalk, 1979).

The areas occupied by the ordinary epidermal cells, by the basal cell of the largest trichome and by the stomata complex (formed only by the 2 guard cells) were measured with the AxioVision software, on the adaxial epidermis surface at the middle part of the leaves, in 25 cells of each type. The results were expressed as the µm² medium area plus standard deviation. The larger trichome length of each species was measured at 25 of these epidermis appendices, and length was expressed in µm plus standard deviation (Theobald *et al.*, 1979).

Results

Species origin, morphology and phenology

Three of the *Gomphrena* species used in this study are Brazilian Cerrado native species: *Gomphrena arborescens* L.f., *G. pohlii* Moq. and *G. virgata* Mart. The fourth species, *Gomphrena globosa* L., is an annual species, native from India and cultivated as ornamental. All the Cerrado *Gomphrena* species can be classified as hemicryptophytes as they are perennial, the renewal buds are located on top of storage roots, the aerial parts dry out in the dry season (Fahn and Cutler, 1992) and the morphology of the subterranean organs suggest they have xylopodia. Leaves are opposite and hairy, with mucronate apex and entire margins. Cerrado species have sessile leaves, while *G. globosa* leaves are petiolate. During the dry season the seeds of the Cerrado species are dispersed, what seems appropriate since all of them are dispersed by the wind.

Gomphrena arborescens L.f. (Fig. 1A) is known as *paratudo-do-campo* and is a subshrub of 50 cm high, with coriaceous leaves of 10 cm long and 7 cm wide, found in the mid-west and southeast regions of Brazil

and in Paraguay and used in folk medicine and in dried flowers arrangements (Barros, 1982; Pio Corrêa, 1984; Siqueira, 1987, 1992, 2002; Salles and Lima, 1990; Lorenzi and Matos, 2002). The species was found at bloom time at RECOR/IBGE and at the Olympic Cen-

ter of Universidade de Brasília, in Brasília/DF, usually in the rainy station (from November to April) and at vegetative stage from August to October. Some variations of the leaf position were found on *G. arborescens*, from alternated just below the apical inflorescence to

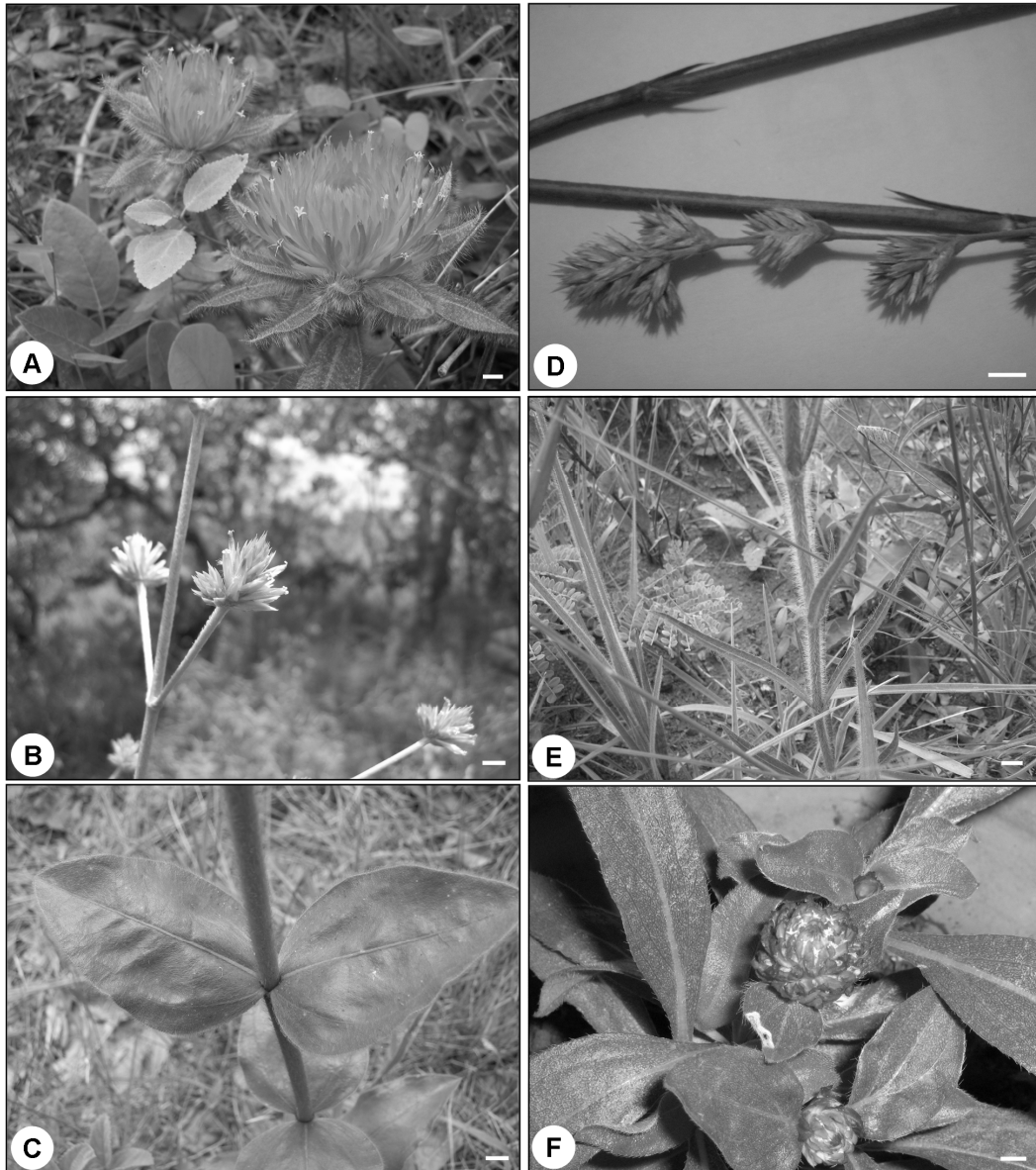


FIGURE 1. Studied species. Figures 1A to 1E: Brazilian Cerrado native species. Figure 1F: Indian native species, cultivated in Brazil. **1A:** *Gomphrena arborescens* L.f., known as *paratudo-do-campo*, is a subshrub of 50 cm high, with coriaceous leaves. **1B:** Inflorescence of *G. pohlii* Moq., known as *paratudinho*, a subshrub of 180 cm high. **1C:** *G. pohlii* Moq. coriaceous leaves. **1D:** Inflorescence of *G. virgata* Mart., known as *cangussu-branco*, a subshrub of 200 cm high. **1E:** *G. virgata* linear coriaceous leaves. **1F:** *G. globosa* L., known as *perpétua*, is a ornamental herb with membranaceous leaves. Bar = 1 cm.

opposite towards the base in adult Cerrado native plants, tending to be decussate. The leaves of a young plant growing at a vegetation house were always decussate. In this species, leaves are always attached to the stem at the same time as the flowers and fruits. Usually, during mostly of the dry season its aerial parts dry out.

G. pohlii Moq. (Fig. 1B – flowers and Fig. 1C – leaves) is a subshrub of 180 cm high with coriaceous leaves of 10 cm long and 7 cm wide, found in the mid-west and southeast regions of Brazil and in Paraguay and known as *paratudinho*, also used in folk medicine (Siqueira, 1988, 1992). The species was found only at the Olympic Center of Universidade de Brasília, in

Brasília/DF, at the same time as *G. arborescens*. The phenologies of both species are related and leaves are always attached to the stem, at the same time as the flowers and fruits. The bloom time occurs from December to April and the species was found at vegetative stage from August to November. During the dry season the aerial parts of the plant dry out.

G. virgata Mart. (Fig. 1D – flowers and Fig. 1E – leaves) is a subshrub of 200 cm high with linear coriaceous leaves of 15 cm long and 1 cm wide, broadly distributed in Brazil and known as *cangussu-branco*, also used in folk medicine (Pio Corrêa, 1984; Siqueira, 1992). The species was found at RECOR/IBGE and at

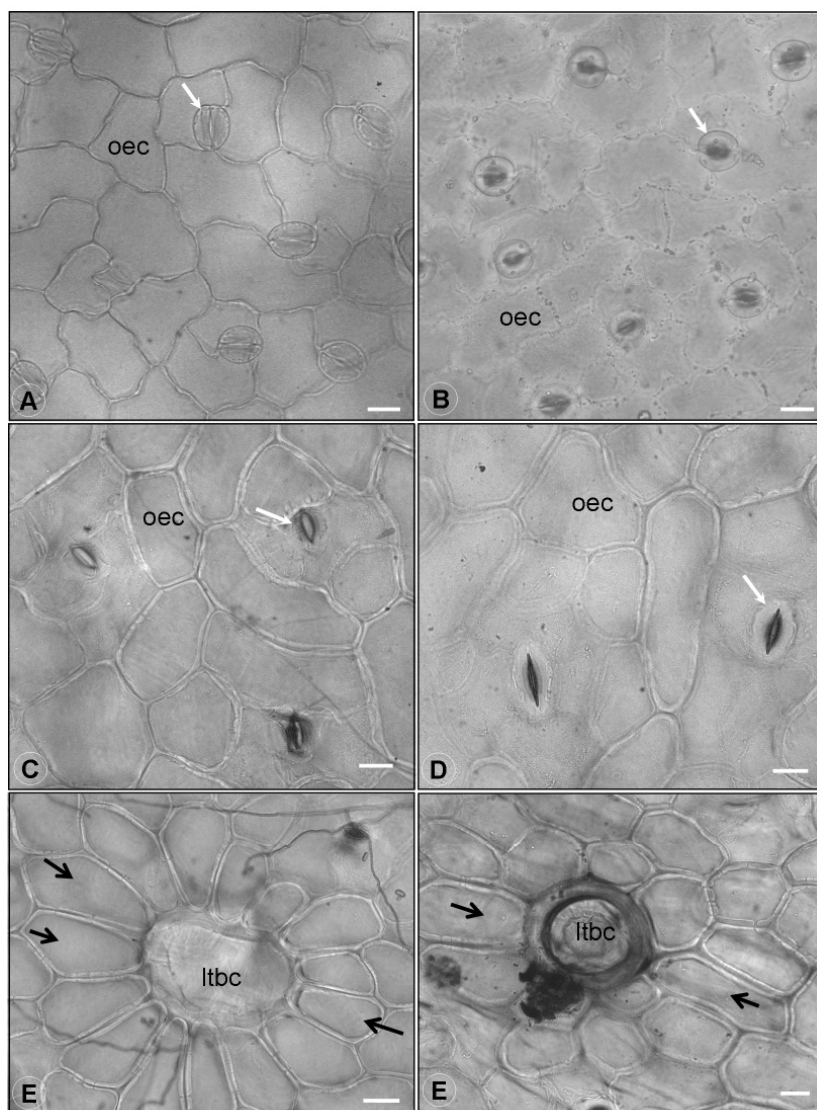


FIGURE 2. Leaf epidermal surfaces under optical microscope. **2A:** Abaxial surface of *G. globosa* leaf. **2B:** Abaxial surface of *G. arborescens* leaf. **2C:** Abaxial surface of *G. pohlii* leaf. **2D:** Abaxial surface of *G. virgata* leaf. **2E:** Long trichome basal cell and subsidiary ones on *G. pohlii* leaves. **2F:** Long trichome basal cell and subsidiary ones on *G. virgata* leaves. **Legend:** ltbc: long trichome basal cell; oec: ordinary epidermal cell; black arrow: trichome subsidiary cell; white arrow: stoma. Bar = 20 μ m.

the Olympic Center of Universidade de Brasília, in Brasília/DF, from March (end of the rainy season) to July in vegetative stage. The bloom time of the species begins at July (middle of the dry season) and fructification goes until September (end of the dry season). During the bloom period, leaves enter in a senescence process and are disposed by the stem. After the blooming and dispersing the seeds, the aerial parts of the species also dry out, until almost the end of the rainy season (around March), when they re-sprout.

G. globosa L. (Fig. 1F) is a small herb with membranaceous leaves about 10 cm long and 4 cm wide, native of India and known in Brazil as *perpétua*, cultivated as ornamental (Siqueira, 1992; Lorenzi and Souza, 1995), including in Brasília squares and gardens, at the core region of the Cerrado biome. The species was collected in January, during the rainy season, when it is cultivated in public gardens of Brasília.

Anatomy

The studied species have uniseriate epidermis and tomentose amphistomatic leaves, with anomocytic stomata dispersed over the whole adaxial surface, except over the midrib and on the leaf ledges, where cells are elongated. Trichomes are always nonglandular and have at least two sizes and shapes. On the abaxial surface, stomata do not occur over the midrib and secondary veins, where cells are elongated, as well as over elongated cells that reinforce the leaves edges. All the studied species present stomata surrounded by three to five cells, but these cells are not different from other ordi-

nary epidermal cells, so they were not considered as stoma subsidiary cells.

On paradermal view, *G. globosa* (Fig. 2A) presents the highest stomatal index of all the studied species (Table 1), followed by *G. arborescens* (Fig. 2B), *G. pohlii* (Fig. 2C) and *G. virgata* (Fig. 2D). *G. arborescens* and *G. pohlii* presents the highest number of cell per area unit (Table 1), but *G. arborescens* presents the largest area occupied by just one epidermal cell (Table 2). *G. virgata* presents the minor number of cells by area (Table 1), and the major medium area occupied by each ordinary epidermal cell and stomata complexes (Table 2).

The ordinary epidermal cells are polygonal in all four species, but their anticlinal walls are thicker and have a straight path on both epidermis surfaces of *G. virgata* (Fig. 2D, F) and *G. pohlii* (Fig. 2C, E) leaves. *G. virgata* also presents elongated epidermal cells around the basal cells of its trichomes. The epidermis leaves of *G. arborescens* have more sinuous anticlinal walls on ordinary epidermal cells of abaxial surface (Fig. 2B), while the same cells on adaxial surface have straight anticlinal walls. Thicker anticlinal walls are restricted to the elongated cells that recover the edges and the major veins on *G. globosa* epidermis and this species also tends to have more sinuous anticlinal walls on ordinary epidermal cells towards the edges of both surfaces (Fig. 2A) and more straight anticlinal walls towards the mid vein.

Around the longer nonglandular trichomes of *G. arborescens*, *G. pohlii* (Fig. 2E) and *G. virgata* (Fig. 2F), the epidermal cells have rectangular gross shape, thicker

TABLE 1.

Quantitative data on trichome and stomata density and Stomatal Index (SI) of both surfaces of the studied leaves.

Species	Leaf Surface	Number of Trichomes/ mm ² ± SD	Number of Stomata/ mm ² ± SD	Number of Cells/ mm ² ± SD	SI
<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Adaxial	5±0	138±17	905±49	15.23
<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Abaxial	5±0	140±25	1020±92	13.71
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Adaxial	16.50±1.42	136±30	771±70	18.99
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Abaxial	28.05±2.85	126±24	675±162	18.7
<i>Gomphrena pohlii</i> Moq.	Adaxial	5.9 ± 1.5	137±38	1109±107	12.35
<i>Gomphrena pohlii</i> Moq.	Abaxial	6.22 ± 1.5	113±41	844±310	13.35
<i>Gomphrena virgata</i> Mart.	Adaxial	2.6 ± 0.4	32±11	442±14	7.27
<i>Gomphrena virgata</i> Mart.	Abaxial	1.4 ± 0.6	45±26	394±89	11.53

anticlinal cell walls and are lignified, what could characterize a kind of trichome subsidiary cells, specially in *G. arborescens* and *G. pohlii*, which are very similar in shape and disposition. This aspect was not found on *G. globosa* leaves.

Analyzing leaf transversal sections (data not showed), the Cerrado native species *G. arborescens*, *G. pohlii* and *G. virgata* have a thicker cuticle than the

cultivated species *G. globosa* and than a juvenile sample (6-9 months old) of *G. arborescens* cultivated under vegetation house conditions. The two stoma guard cells have prominent outer and small inner ledges. Cutin and suberin are restricted to the periclinal external wall of most of the epidermal cells, except at *G. virgata* epidermis, where the water proof cuticle extends itself towards to the inner sub-stomatal chamber, covering also the

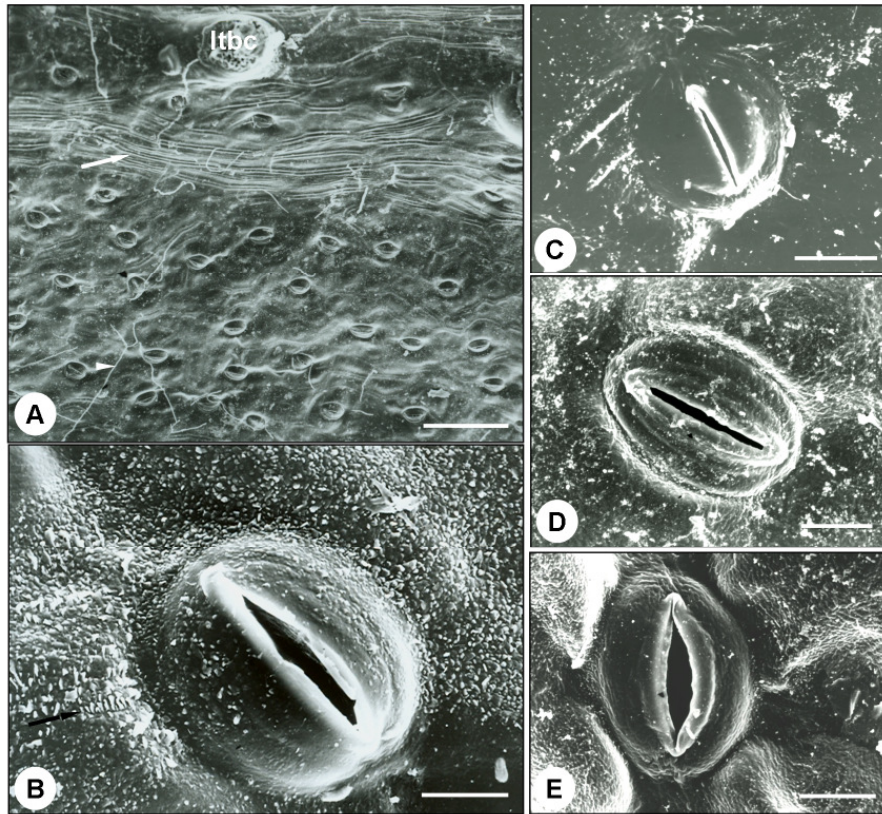


FIGURE 3. Leaf epidermis and stomata under scanning electron microscopy. **3A:** *G. virgata* adaxial epidermis with striae also over the secondary order vein (white arrow) and fungi hyphae (arrow head). **3B:** *G. arborescens* stoma and epicuticular wax (black arrow). **3C:** *G. pohlii* stoma. **3D:** *G. virgata* stoma. **3E:** *G. globosa* stoma. **Legend:** ltbc: long trichome basal cell. Bars: 3A = 100 μm ; 3B to 3E = 10 μm .

TABLE 2.

Quantitative data on area occupied by each kind of epidermis cell and size of stoma and large trichome of the studied leaves.

Species	OEC area: $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$	Stoma cell area: $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$	LTBC area: $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$	Stoma length (μm) $\pm \text{SD}$	Large trichome length (μm) $\pm \text{SD}$
<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	1,681.93 $\pm$ 328.66	541.46 $\pm$ 46.56	17,654.04 $\pm$ 8,400.06	26.56 $\pm$ 2.46	3,060.00 $\pm$ 880.00
<i>Gomphrena globosa</i> L.	2,416.53 $\pm$ 492.70	490.08 $\pm$ 48.19	3,836.13 $\pm$ 1,213.15	27.03 $\pm$ 2.83	676.78 $\pm$ 274.32
<i>Gomphrena pohlii</i> Moq.	2,717.98 $\pm$ 641.02	522.35 $\pm$ 103.09	6,819.26 $\pm$ 3,453.07	31.12 $\pm$ 3.61	817.84 $\pm$ 357.69
<i>Gomphrena virgata</i> Mart.	3,036.77 $\pm$ 840.42	840.82 $\pm$ 180.00	7,374.09 $\pm$ 3,677.23	38.43 $\pm$ 5.37	1,076.25 $\pm$ 313.22

Note: LTBC: long trichome basal cell; OEC: ordinary epidermal cell; SD: standard deviation. Expressed as medium value of 25 elements of adaxial surface.

anticlinal wall of the guard cell and the proximal cells on both epidermis surfaces (adaxial and abaxial).

Micromorphology

All the studied species present a thin film of wax covering the cuticle of the outermost wall of the epider-

mal cells and appendixes, sometimes superimposed by crystalloids of epicuticular wax. The cuticle has striations over the first and second order veins and on the edge of the leaves (abaxial surface) and over the mid vein (adaxial surface) of all species, markedly on Cerrado species (Fig. 3A).

In the studied species the stomata guard cells are

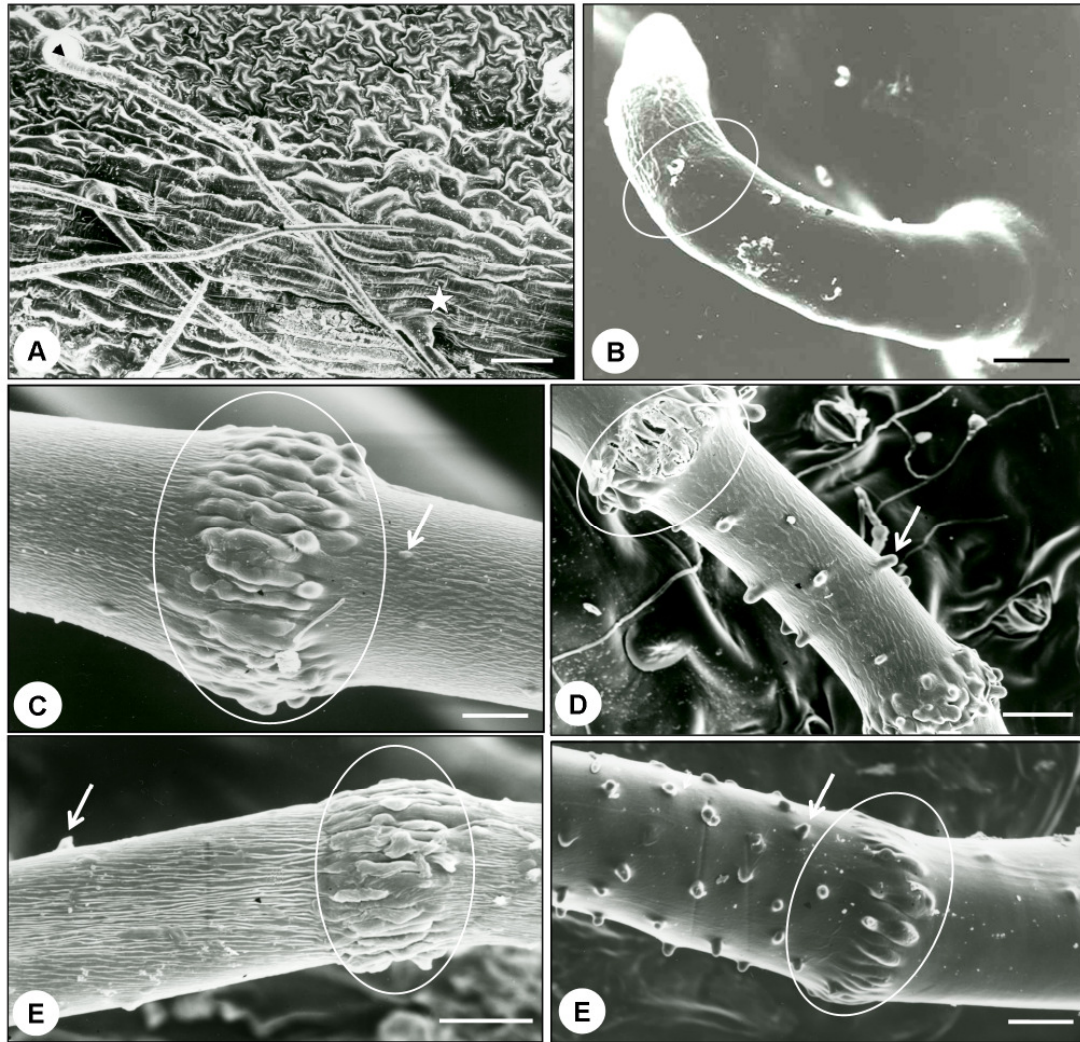


FIGURE 4. Leaf trichomes under scanning electron microscopy. **4A:** *G. globosa* abaxial surface showing a large trichome (arrow head) and elongated cells over the veins (star). Sample fixed in Karnovsky mix and dehydrated in ethanol. **4B:** Short trichome of *G. arborescens* with no wax ornamentation and non nodose articulation (ellipsis). Sample fixed in FAA70 and dehydrated in ethanol. **4C:** *G. arborescens* long trichome epicuticular wax ornamentation near a nodose articulation (ellipsis) and the smallest teichodes (arrow). Sample not fixed. **4D:** *G. pohlii* long trichome epicuticular wax scarce striation, the largest teichodes (arrow) and a nodose articulation (ellipsis). Sample not fixed. **4E:** *G. virgata* long trichome densely ornamented by epicuticular wax striations, few intermediary sized teichodes (arrow) and a nodose articulation (ellipsis). Sample not fixed. **4F:** *G. globosa* long trichome presents only few intermediary sized teichodes (arrow) and nodose articulation (ellipsis). Sample not fixed. Bars: 4A = 100 μ m; 4B to 4F = 10 μ m.

leveled to the surrounding cells (Fig. 3A-D), tending to be more elevated on abaxial surface. The anomocytic stomata of the four species have guard-cells with prominent outer ledges (Fig. 3B-D). Only on *G. virgata* adaxial surface the stomata are slightly depressed between the ordinary epidermal cells. The guard cells of *G. arborescens* have ledges with thin and irregular borders (Fig. 3B) and there are some particles of epicuticular wax nearby, some recognizable as platelets. The ledge borders of *G. pohlii* guard cells are thin and regular and near its stomata some perpendicular ridges and crystals of epicuticular wax can be found (Fig. 3C). The stoma of *G. virgata* has ledges with regular and thick borders and processing artifacts do not allow epicuticular waxes to be observed (Fig. 3D). The ledges of the stoma guard cells of *G. globosa* have thick and regular borders and it is possible to see that the epidermal outer cell walls of neighbors' cells are convex (Fig. 3E). This last feature was not observed for any other of the studied species, which epidermal outer cell walls tend to be flat.

Over the elongated epidermal cells, that reinforces the leaf edges and veins, both types of trichomes are more frequent and there are no stomata (Fig. 4A). There are two types of nonglandular trichomes: a long uniseriate hair with osteolate thick cell walls and acuminate apex (Fig. 4A, Table 2) and a short uniseriate recurved hair with thin cell walls and a soft (not acuminate) apex (Fig. 4B).

The longest trichomes of the four species have similar morphology: round basal cells, pustulate osteolate intermediate cells with nodose articulation and acuminate apical cell (Fig. 4A). This trichome type usually has live basal cells (all the 2-3 round ones and at least one of the elongated intermediate cells) and these cells are translucent. The intermediate and apical cells give the trichome color: white in *G. globosa* and rusty (brown-orange) in the three Cerrado species.

The short trichomes present smaller and usually collapsed cell walls and there is no epicuticular wax ornamentation (Fig. 4B) over it or on either of the other

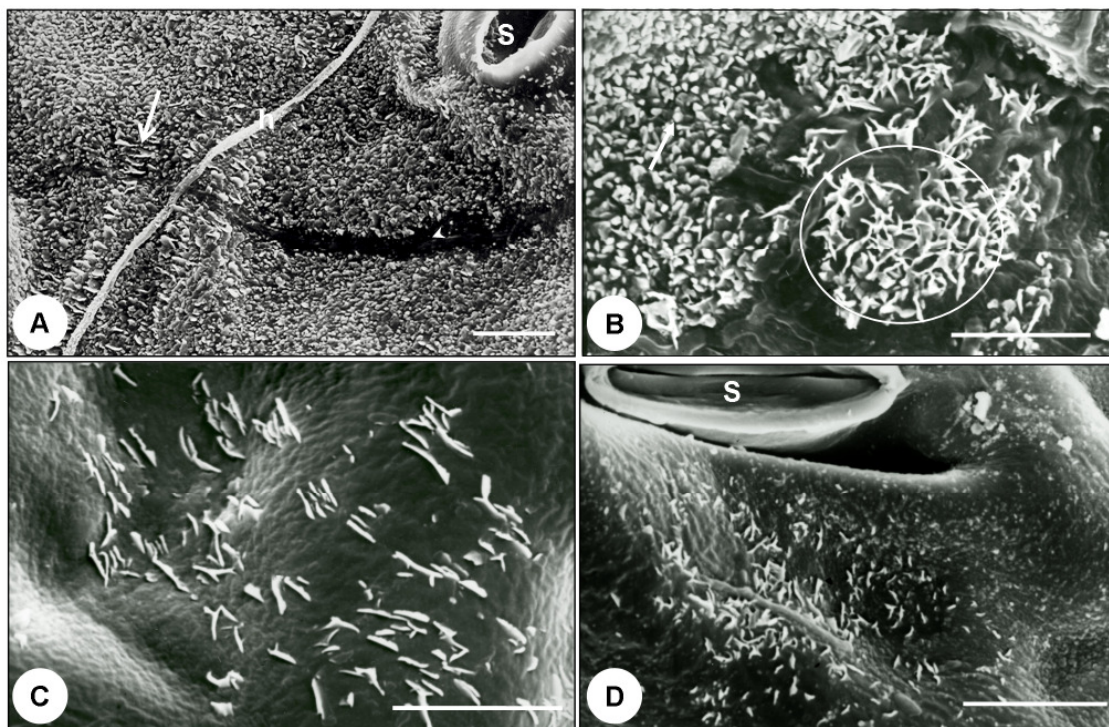


FIGURE 5. Epicuticular waxes over leaf cuticles under scanning electron microscopy. **5A:** *G. arborescens* abaxial surface with fungi hyphae (h) and epicuticular wax organized as a row of parallel platelets (arrow) near a stoma (s) and damaged by a detached hyphae (arrow head) on sample fixed with FPA and dehydrated with ethanol. **5B:** *G. arborescens* adaxial surface epicuticular wax granules (arrow) and rosettes (ellipses) on control sample (not fixed). **5C:** *G. pohlii* epicuticular waxes on adaxial surface a control sample (not fixed). **5D:** *G. virgata* epicuticular waxes near the stoma (s) on adaxial surface of a control sample (not fixed). Bar = 10 µm.

species. This kind of trichome is formed only by living and thin walls translucent cells and is usually destroyed by fungi hyphae when the plant is living at the Cerrado biome. The articulation of the uniseriate cells is always simple, not nodose (Fig. 4B).

The large trichome presents no epicuticular wax ornamentation over the basal and round cells. However, over the anticlinal walls of the osteolate intermediate and apical cells a network of epicuticular wax streaks and teichodes can be present. This can be useful to discriminate species, because the morphology and ornamentation is slightly different in each one of them. The osteolate cells of the larger trichome of *G. arborescens* have dense epicuticular wax striations with small and rare teichodes (Fig. 4C). These cells in *G. pohlii* trichome have a few epicuticular wax striations and well developed but scarce teichodes of around 10 µm long (Fig. 4D). The same cells in *G. virgata* trichome have dense epicuticular wax striations and rare small teichodes (Fig. 4E). *G. globosa* cells have no epicuticular wax striations and have the greatest amount of teichodes of intermediate size (Fig. 4F). In all the four species, the articulation between the intermediate osteolate cells is nodose, characterized by the interlaced digitorum projections of the periclinal cell walls of neighboring cells (Fig. 4C-F).

G. arborescens leaves present the greatest amount of epicuticular wax particles over the ordinary epidermal cells, normally as entire parallel platelets (Fig. 5A), all over the leaves. Typically, over the subsidiary cells of the largest trichome and sometimes near or over stomata, the platelets can be disposed as single arrows radiating to the adjacent cells (Fig. 5A). This epicuticular wax disposition was not found in any of the other species of the study. Non entire platelets, granules and rosettes were also found (Fig. 5B). Epicuticular wax over guard cells of *G. arborescens* stoma is less concentrated and can be disposed in different arrangements. Platelets also can have irregular margins. *G. arborescens* epicuticular waxes had been damaged by fungi hyphae (Fig. 5A).

G. pohlii leaves present rare platelets of epicuticular wax (Fig. 5C), more frequently over the ordinary epidermal cells near the stomata and over the guard-cells. On *G. virgata* ordinary epidermal cells, the rare epicuticular wax crystals were restricted to the stomata neighbor cells of the adaxial surface of the leaf epidermis (Fig. 5D). Epicuticular wax particles are very rare over *G. globosa* leaf cuticles (data not shown).

The three species of the Brazilian Cerrado presented high fungal contamination (Fig. 4A and 5A) while *G. globosa* did not.

Discussion

Although all the *Gomphrena* Cerrado species have coriaceous leaves and share the same seasonally dry habitat, the anatomical data suggest no water restriction in these organs. All the *Gomphrena* Cerrado species vegetate under full sunlight, in open environment and tend to have from medium to large stomata, leveled to the other epidermal cells. According to Wilkinson (1979) larger stomata are coincidental with full sunlight and drier conditions while smaller stomata are coincidental with shade, humid atmosphere and moist soil conditions.

The Cerrado *Gomphrena* spp. present xeromorphic features as thick cuticle and a kind of hypodermis under the larger trichomes, as verified in *G. arborescens* L.f. leaves (Fank-de-Carvalho and Graciano-Ribeiro, 2005). Only in *G. virgata* the stomata are slightly sunken while on the other species it is leveled to the other epidermal cells on adaxial surface. *G. virgata* has narrower leaves and aerial parts that vegetate longer during the Cerrado dry season. Sunken stomata are considered important to minimize water loss while the thick cuticle and hypodermis diminish the intensity of light to the photosynthetic tissue (Rudall, 2007), although in *G. arborescens* it was suggested this tissue could help the light diffusion under the large trichome basal cells and to reinforce the epidermis to maintain this appendix (Fank-de-Carvalho and Graciano-Ribeiro, 2005).

The Amaranthaceae species of this study present similar Stomatal Index (SI) and number of cells per unit of area of the ones studied by Padmini and Rao (1995). Although they found SI of 19,5 on abaxial surface and 18,2 on adaxial surface and our data corresponds to 18,7 and 18,99 for the same surfaces (Table 1). This variation could be explained by the differences of the surrounding environment that plants cultivated in Brazil and in India are subjected to.

The difference between the *G. arborescens* and *G. pohlii* are smaller than the difference between both species and *G. virgata* on the SI and number of cells per area. When these data are related to the size and shape as well as the duration of the leaves of the Cerrado species, they could suggest that the briefer is the lifetime of the organ and smaller the width of the leaf, smaller the number of epidermal cells per square millimeter and the stomatal index (Table 1), leading to increase the area occupied by each cell. So, if larger cell area implies in bigger water loss (Fahn and Cutler, 1992), it is important to add to this relation the morphology of the roots of these species: all of them have well developed sub-

terranean systems (Siqueira, 1992) which guarantee water supply during the aerial re-sprout and flowering for *G. arborescens* and *G. pohlii* and re-sprout of *G. virgata* (since the latter species loses leaves during the bloom dry period). Even for *G. globosa*, that has a shorter lifetime and is not perennial, as the other species, this statement can be verified: it has the highest Stomatal Index, the second smaller leaf width, and the second medium number of epidermal cells per area.

All the *Gomphrena* species studied presented anomocytic stoma. There is a literature controversy about which stomata type is primitive and which is derivate (Wilkinson, 1979) so this classification was used only for diagnostic purposes. The stoma size is medium for most of the species (*G. arborescens*, *G.*

ordinary epidermal cells and the thicker anticlinal walls of the same cells.

When studying Cerrado species, sometimes it can be necessary to cultivate them in a controlled environment to get a better description of the epicuticular wax patterning, since fungi hyphae can difficult this objective. The Cerrado environment, moist and hot during the rainy season, favors the fungi development over leaves. The micromorphology of juvenile and adult *G. arborescens* leaves was very similar. As the individual form of the epicuticular wax crystalloids, their distribution and orientation can characterize the surface of the species (Engel and Barthlott, 1988; Barthlott *et al.*, 1998), the juvenile leaves were chosen to study the distribution pattern of epicuticular waxes. Engel

Brazilian *Gomphrena* spp. species will be studied in the future to verify if there are other anatomical shared features, as for the trichome types. According to Theobald *et al.* (1979), the trichome type is often valuable for taxonomic purposes, and the provided electron scanning microscopy figures and descriptions can be useful to identify the species.

The foliar surface studies under the scanning electron microscope revealed the existence of crystalloid wax projections on both foliar surfaces of *G. arborescens*, with greater concentration on the adaxial one. All the four species presented platelets of epicuticular wax over the periclinal outer wall of the leaf epidermal cells, although in different patterns and density. The streaked cuticle over the first degree venation and borders of Cerrado *Gomphrena* spp. leaves must represent a way to guarantee the integrity of its epidermis on great tension zones, the same way as the elongated shape of some

The use of control sample must be complementary to the use of fixated sample, because there is no preservation of the shape of the ordinary epidermal cells and stomata. There was found no significant difference only due to the fixative used on our sample.

The presence of epicuticular wax did not prevent the development of fungi hyphae on leaves of none of the three Cerrado native species. There were hyphae all over the epidermis, sometimes penetrating into the mesophyll through some epidermal cells, walls of the smallest trichomes and stomata pores. Usually the epidermis is damaged near the fungi infected areas and, under the hyphae, the epicuticular wax can loose its shape or melt (Fig. 5A). The leaf surface sculptures should improve the protection of the surface against fungi infections (Salatino *et al.*, 1986), and maybe this is one of the strategies of the Cerrado species, which present more sculptures and epicuticular waxes in relation to *G. globosa*.

Cerrado *Gomphrena* spp. must have adapted to the Cerrado environment through the strategy of enhancement of the photosynthesis process since they do not present a significative reduction on the leaf area or on the epidermal cells sizes. Besides, the indumentum of these species is not so dense. They present amphistomatic leaves and Stomatal Index or stomatal density similar or higher than other species of higher photosynthetic rates, like the C4 *G. globosa* (Padmini and Rao, 1995) and *Zea mays* (Mauseth, 2008). Photosynthesizing organs can present two strategies of adaptation to arid conditions and the second strategy would be the reduction in the transpiration rate (Fahn and Cutler, 1992), what implicates in the study of the mesophyll structure, which is on development. On the other hand, these species have well developed cuticle and thick anticlinal walls and the structure of the epicuticular wax tends to be of thin plates, features considered xeromorphic and inducible by drought (Fahn and Cutler, 1992).

Conclusions

Two of the Cerrado species can be misidentified during the very early vegetative stage (*G. arborescens* and *G. pohlii*), due to the similarity of their stem and leaves. This study shows differences between the epidermal cells and other anatomic and micromorphology features of the epidermis that can be useful to better identify the species. The quantitative data for all four studied species complete the description and can represent good indicatives for the physiology of the species.

The finding of epicuticular wax in all the *Gomphrena* spp. leaves studied reinforces the phylogenetical relationship between Chenopodiaceae and Amaranthaceae families, which has been treated as Amaranthaceae *sensu lato*. The platelets over the cuticle did not represent an effective barrier against fungi hyphae penetration, although it must have improved it. These results indicate the need of increasing studies on other species of the Amaranthaceae *sensu lato* family, especially the Cerrado native ones, to improve the understanding of the taxonomy value of the sculptures arising from the leaf surfaces and its relationship with the plant adjustment to the environment.

This study shows that the Brazilian Cerrado biome raises unique vegetation with different strategies to adapt themselves to the environment, not only structural but also phenological. All the studied Cerrado species vegetate under full sunlight (open environments of the Cerrado biome) and present leaves only during

the rainy season, even though stem and flowers can be found still green during the dry season. So, all the leaves have a good supply of water, even though the atmosphere is not always humid during these days, because the rainy season coincides with the warmer tropical and sunny days. Plant life strategy must be correlated with the morphology and the structural data, as Stomatal Index, so these data can be correlated with the species physiology.

Aknowledgments

The authors wish to thank the staff of the Electronic Microscopy Laboratory of the Universidade de Brasília, where the work was carried out, and to CNPq, CAPES, FINEP, RECOR/IBGE and Herbaria IBGE, PACA, UB and CEN. S. M. Fank-de-Carvalho is a student of the Programa de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

References

- Barros MGAE (1982). Plantas medicinais – usos e tradições em Brasília – DF. *Oréades* **8**: 140-149.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelm H (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **126**: 237-260.
- Bird SM, Gray JE (2003). Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytologist* **157**: 9-23.
- Borsch T, Clemants S, Mosyakin S (2001). Symposium: Biology of the Amaranthaceae-Chenopodiaceae alliance. *Journal of the Torrey Botanical Society* **128**: 234-235.
- Carolin RC, Jacobs SWL, Vesik M (1978). Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. *Australian Journal of Botany* **26**: 683-698.
- Cavalcanti TB, Ramos AE (orgs.) (2001). *Flora do Distrito Federal, Brasil*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.
- Coutinho LM (1980). As queimadas e seu papel ecológico. *Brasil Florestal* **10**: 7-23.
- Dias BFS (coord.) (1992). *Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis*. FUNATURA/IBAMA, Brasília.
- Eiten G (2001). *Vegetação natural do Distrito Federal*. SEBRAE/UnB, Brasília.
- Engel T, Barthlott W (1988). Micromorphology of epicuticular waxes in Centrosperms. *Plant Systematics and Evolution* **161**: 71-85.
- Estelita-Teixeira ME, Handro W (1984). Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Canadian Journal of Botany* **62**: 812-817.
- Esau K (1977). *Anatomy of Seed Plants*, second ed. John Wiley and Sons, New York.

- Fanh A, Cutler DF (1992) *Xerophytes*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Fank-de-Carvalho SM, Graciano-Ribeiro D (2005). Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). *Acta Botanica Brasílica* **19**: 379-392.
- IBGE (2004). *Reserva Ecológica do IBGE – ambiente e plantas vasculares*. Vol. 3 – Estudos e Pesquisas – Informação Geográfica. MPOG/IBGE, Rio de Janeiro.
- Joly AB (1998). *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12 ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999). *Plant Systematics – a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Karnovsky MJ (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Abstracts Fifth Annual Meeting American Society for Cell Biology. *Journal of Cell Biology* **27**: 137-138A.
- Klink CA, Machado RB (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* **1**: 147-155.
- Kraus JE, Arduin M (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR, Rio de Janeiro.
- Lorenzi H, Matos FJA (2002). *Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Lorenzi H, Souza HM (1995). *Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Marchiorretto MS, Windisch PG, Siqueira JC (2002). Os gêneros *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R.E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. *Pesquisas, Botânica* **52**: 7-46.
- Marchiorretto MS (2008). Os gêneros *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. *Thesis*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Mauseth JD (2008). *Botany – an introduction to plant biology*, 4th ed. Jones and Bartlett Pub., Sudbury.
- Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva MC, Rezende AR, Filgueiras TS, Nogueira PE (1998). Flora vascular do Cerrado, in Sano SM, Almeida SP (Eds.) *Cerrado: ambiente e flora*. Embrapa CPAC, Planaltina, pp 286-556.
- Metcalfe CR, Chalk L (1979). *Anatomy of the Dicotyledons*- vol. I - Systematic Anatomy of the leaf and stem, second edition. Oxford University Press, Suffolk.
- Miranda H, Miranda AC (2000). Queimadas e estoques de carbono no Cerrado, in Moreira AG, Schwartzman S (eds) *As Mudanças Climáticas e os Ecossistemas Brasileiros*. Foco, Brasília, pp 75-81.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- Padmini S, Rao RS (1995). Structure, distribution and taxonomic importance of foliar stomata in some Indian Amaranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **118**: 149-161.
- Paiva EAS (2005). Effect of sample preparations for SEM studies of epicuticular wax in *Tradescantia pallida* (Commelinaceae) leaves. *Brazilian Journal of Morphological Sciences supplement* **2005**: 258.
- Paiva PHV (2000). A Reserva da Biosfera do Cerrado: fase II, in Cavalcanti TB, Walter BMT (eds) *Tópicos atuais em botânica – palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen, Brasília, pp 332-334.
- Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasílica* **20**: 257-264.
- Pio Corrêa M (1984). *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF, Rio de Janeiro.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (2000). Woody flora distribution of the Cerrado Biome: phytogeography and conservation priorities, in Cavalcanti TB, Walter BMT (eds) *Tópicos atuais em botânica – palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen, Brasília, pp 340-342.
- Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM; Souza MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção PACL, Pereira EC, Silva CF, Mesquita MR, Procópio LC (1999). *Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA, Manaus.
- Rudall P (2007). *Anatomy of flowering plants – an introduction to structure and development*. Cambridge University Press, New York.
- Salatino A, Montenegro G, Salatino MLF (1986). Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* **9**: 117-124.
- Salles AEH, Lima CG (1990). *Flores dos Cerrados – Pequeno Guia*. GDF, Brasília.
- Simon MF, Proença C (2000). Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? *Biological Conservation* **96**: 279-296.
- Siqueira JC (1987). Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia* **9**: 99-110.
- Siqueira JC (1988). *Plantas medicinais – identificação e uso das espécies dos cerrados*. Edições Loyola, São Paulo.
- Siqueira JC (1992). O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. *Pesquisas, Botânica* **43**: 5-197.
- Siqueira JC (2002). Amaranthaceae, in Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giulietti AN, Melhem TSA, Dittich V, Kameyama C. *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*, vol. II., HUCITEC, São Paulo, pp 11-30.
- Souza VC, Lorenzi H (2008). *Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II*. second ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Theobald WL, Krahulik JL, Rollins, RC (1979). Trichome description and classification, in Metcalfe CR, Chalk L (eds), *Anatomy of the Dicotyledons – systematic anatomy of the leaf and stem*, Vol. I, 2nd ed. Oxford University Press, London, pp 40-53.
- Wilkinson HP (1979). The plant surface (mainly leaf). Part I: stomata, in Metcalfe CR, Chalk L (eds), *Anatomy of the Dicotyledons – systematic anatomy of the leaf and stem*, Vol. I, 2nd ed. Oxford University Press, London, pp 97-117.

2.3 Manuscrito a ser ressubmetido

Este manuscrito foi produzido em decorrência da oportunidade de estudar e compreender estruturas fúngicas em interação natural com duas plantas nativas do Cerrado.

Durante a análise das plantas da tese (Amaranthaceae), à luz da microscopia eletrônica de transmissão, observou-se a presença de microorganismos provocando alterações estruturais nas células vegetais de *Gomphrena hermogenesii* e *Pfaffia gnaphaloides*. Aspectos da interação natural de fungos com espécies dessa família já havia sido observada nas superfícies foliares de outras espécies (Fank-de-Carvalho, 2004; Fank-de-Carvalho *et al.*, 2010) e em estruturas anatômicas (Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro, 2005), provocando a produção de taninos e outros compostos fenólicos, detectados por testes histoquímicos.

Visando contribuir para o entendimento das interações de populações naturais do Cerrado e considerando-se a riqueza de informações obtidas na análise ultraestrutural, produziu-se um artigo descrevendo tanto as estruturas das plantas quanto dos microorganismos, bem como as alterações na célula vegetal, provavelmente decorrentes dessa interação. O artigo corresponde ao objetivo específico 1.6.2.3.

Em análise de consultores *ad hoc* de uma revista brasileira especializada em Microbiologia, os achados relacionados à ultraestrutura foram considerados importantes, até mesmo como sendo a primeira descrição de interação de fungos com plantas do Cerrado, mas que precisaria de experimentos adicionais para publicação. Foram sugeridos que se fizesse a tentativa de isolamento do(s) fungo(s) a partir de explantes assépticos, seguido da cultura e análises moleculares. Para as análises morfométricas, exige-se a ampliação da base de dados e análise estatística apropriada à definição do nível de significância das alterações verificadas, juntamente com a revisão de alguns conceitos, em razão de terem sido obtidos a partir de estudos em livros (não em artigos). Neste sentido, as autoras devem estabelecer uma parceria com algum Departamento de Fitopatologia interessado em interações de fungos com plantas do Cerrado, para que possamos discutir as observações específicas dos consultores e realizar as análises imprescindíveis para nova submissão à publicação.

NATURAL FUNGUS COLONIZATION IN PLANT LEAVES OF CERRADO'S AMARANTHACEAE SPECIES¹

Suzane M. Fank-de-Carvalho^{a, c*}, Sônia Nair Bão^b

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas/SP, Brasil.

^b Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Ciências Biológicas. CEP 70919-970, Brasília/DF, Brasil.

^c Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq

*Corresponding author, E-mail: smfank@cnpq.br phone 55 (61) 2108-9778

ABSTRACT

Leaves of the plant species can be naturally colonized by fungi. The Amaranthaceae family is known for having the C4 carbonic cycle of photosynthesis, for its medicinal popular use and also for poisoning herbivores. Here are described ultrastructural aspects of a fungus colonized leaves of two Amaranthaceae species (*Gomphrena hermogenesii* J.C. de Siqueira and *Pfaffia gnaphaloides* (L.f.) Mart.) both natives of the Brazilian Cerrado. Were also described morphological changes observed in *G. hermogenesii* cells due to interaction with this microorganism. Inside the cells of several leaf tissues (epidermis, palisade and spongy parenchyma, bundle sheath, phloem and xylem) of both plant species 4-16 µm wide microorganism were found. Ultrastructural traits of the microorganism indicate the presence of a fungus belonging to Ascomycete division. This fungus has more affinity to the bundle sheath cells of *G. hermogenesii* leaves. Organelles of the same cell type in colonized and healthy leaves of *G. hermogenesii* indicate a closer association between fungal cells and the size of chloroplast lipid droplets (plastoglobuli) than with the size of starch granules. The size reduction of *G. hermogenesii* plastoglobuli could either be linked to its use as a primary source of carbon and energy by the fungus or to a plant's defense mechanism. Fungi could be increasing the poisoning potential of Amaranthaceae for herbivores and as well as the medicinal potential of the plant in folk medicine.

Keywords: Ascomycete, plant leaf, ultrastructure.

¹ Manuscrito a ser ressubmetido após realização de experimentos adicionais tentando o isolamento e análise de aspectos moleculares do(s) fungo(s).

INTRODUCTION

Amaranthaceae family clusters several genera which have species with C_3 , intermediate and C_4 metabolic photosynthetic pathways (13). In Brazil, this plant family is important to local human populations for its use in folk medicine as well as food source (18, 32). Some *Amaranthus* species such as *A. reflexus*, *A. quitensis* and *A. viridis*, known as *caruru*, when eaten by swines can lead to abdominal disease and up to 50% mortality (34). Moreover, *A. spinosus*, which is also called *caruru* and described as toxic for sheep in southern of Brazil, produces similar effects and also causes kidney disease (23). On the other hand, *A. spinosus* and *A. viridis* are used as a popular medicinal plant for various ailments including urinary inflammations (1). Although the *Amaranthus* genus is not considered native of Cerrado, it does occur in disturbed areas of this Biome (4). More than 60 species of 12 Amaranthaceae genera are native of Cerrado, and most of which are adapted to the climate dynamics and fire (33).

The Brazilian Cerrado is a tropical savannah-like ecosystem that occupies about 2 millions of km² (from 3-24° Latitude S and from 41-43° Longitude W), with a hot, semi-humid seasonal climate. This Biome has a dry winter and a rainy summer (7, 9, 31). The Cerrado has also a large variety of landscapes, from tall savanna woodland to low open grassland with no woody plants, and supports the richest flora among the world's savannas (more than 7.000 native species of vascular plants) with a high degree of endemism (14, 31). Although the Cerrado Biome is considered a hotspot for the conservation of global biodiversity, sheltering species fully adapted to survive under harsh conditions of soil and climate, only 30% of its biodiversity is reasonably known (14, 22). The occurrence of wildfires is one of the most important factors to determine this Biome vegetation, acting as a renewal element that alternates communities and maintain its biodiversity (6).

The study of the plant-microorganism interaction can lead to a wide range of applications. For example, health risks to human or stock farming animals' can be avoided simply by preventing the consumption of contaminated food or the medicinal plant. The plant metabolites against its endophytic guests could be isolated and used for the genetic improvement of crop biochemical defenses. Selected microorganism metabolites can be

isolated to act as a biological control of crop diseases and herbivores. Plants offer a wide range of habitats for microorganisms, including its aerial parts, rhizosphere and internal transport system (20). This kind of interaction contributes to the environmental equilibrium and can play essential roles in agricultural and food safety (20, 27).

Plants from hot and dry habitats shows a standard leaf anatomy organized as a palisade parenchyma above a spongy mesophyll (19). The C₄ plants also can be recognized by their morphological structure, since their leaves have a wreath-like arrangement termed Kranz anatomy (19, 28, 29) resulting from a modification of the C₃ pattern. The C₄ photosynthesis pathway evolved in a great diversity of Kranz anatomy forms, biochemical routes and dimorphism of chloroplast ultrastructure (1, 8, 28).

The high humidity and intense heat of the Cerrado's wet season favors the development of fungal hyphae on leaf surfaces, including on the Amaranthaceae species *Gomphrena arborescens* L.f., *G. pohlii* Moq. and *G. virgata* Mart. (12, 30).

Here are shown some aspects of *Gomphrena hermogenesii* J.C. de Siqueira and *Pfaffia gnaphaloides* (L.f.) Mart. leaves, ultrastructural traits of the eukaryotic invading microorganism as well as morphological changes that occurred inside of *G. hermogenesii* cells during colonization by this microorganism.

MATERIAL AND METHODS

Sampling: Visually healthy green leaves of the 3rd to 4th nodes of 2-6 specimens of pre-identified *G. hermogenesii* and of *P. gnaphaloides* were collected in the conservation area at the Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cara Preta, Alto Paraíso, Goiás State, Brazil. Small pieces of the middle portions from the leaves were cut using razor blade, fixed in 2% of glutaraldehyde, 2% of paraformaldehyde and 3% of sucrose in 0.05 M sodium cacodylate buffer and conserved under refrigeration until processing.

Voucher and identification - the specimens of *G. hermogenesii* were collected during vegetative and flowering stages of different seasons, while *P. gnaphaloides* specimens were collected only during the flowering stage. Sampling during the flowering stage of both species was done in September 20th, 2008, around 20-25 days after a wildfire that burned to

the ground most of the RPPN Cara Preta vegetation. All sampling was done between 12 a.m. to 4 p.m. in order to analyze the starch accumulation within the leaf tissues. Vegetative and flowering plant branches were pressed and deposited as voucher at the Brazilian Herbaria CEN, IBGE, PACA, UB and UEC. The voucher numbers 66301 and 66302, at IBGE Herbarium, are corresponding of *G. hermogenesii* in vegetative and flowering stages (collection n° 118 and 123) and voucher 66304 corresponds to *P. gnaphaloides* (collection number 125). The identification of the species was confirmed by an Amaranthaceae taxonomy specialist, Dra. Maria Salete Marchioretto, curator of PACA Herbarium at Universidade Vale dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Laboratory sample processing – the fixed samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide and 1.6% potassium ferricyanide (1:1 v/v), in block stained with 0.5% uranyl acetate solution (overnight). Samples were dehydrated in acetone ascending series, washed in propylene oxide and slowly embedded in Spurr's epoxy resin.

Microscopy - semi-thin sections were obtained using an ultramicrotome with glass knives, stained with toluidine blue and analyzed under the optical Zeiss Axiophot. Ultra-thin sections of the same material were obtained with a diamond knife, collected on 200 mesh copper grids and analyzed under the Transmission Electron Microscope TEM JEOL JEM 1011.

Morphometric analysis - 10-12 chloroplasts and their contents, from at least five bundle sheath cells, in colonized and healthy leaves of *G. hermogenesii* and 10 intracellular microorganisms in mesophyll and bundle sheath cells of its colonized samples were measured using the Axiovision® Software (Zeiss). The intercellular microorganism was also measured, across the larger dimension of 10 cells among the spongy parenchyma cells of *P. gnaphaloides*. All the measurements were expressed as average values with respective standard deviation.

RESULTS

Plant leaf structure

G. hermogenesii and *P. gnaphaloides* leaves are simple, amphistomatic and hairy

with uniseriate epidermis and dorsiventral mesophyll (Fig. 1-2).

The leaf mesophyll of *G. hermogenesii* has 1-2 layers of palisade parenchyma just below the adaxial epidermis (Fig. 1). Collateral vascular bundles are completely surrounded by a distinct parenchymatous bundle sheath with thick cell walls whose organelles are positioned towards the vascular bundles. There are 2-5 layers of spongy parenchyma near the abaxial surface. Around the higher order vascular bundles, the adaxial mesophyll is radial with narrow air spaces, while the abaxial mesophyll cells are less distinctly radial with larger air spaces. Both epidermal surfaces are flat, with exception of the prominently raised midrib on the abaxial surface.

P. gnaphaloides leaf has 1-2 layers of palisade parenchyma just below the adaxial epidermis (Fig. 2). The collateral bundles are involved by a less conspicuous bundle sheath with organelles near the walls opposite to the vascular bundles. There are 2-5 layers of spongy parenchyma near the abaxial surface. The midrib and all the minor veins protrude over the abaxial epidermal surface (Fig. 2).

The chloroplasts of palisade and spongy parenchymas are granal and peripherally arranged in leaves of both species, similar to the ones in the bundle sheath of *P. gnaphaloides* (Fig. 3). Bundle sheath chloroplasts of *P. gnaphaloides* are similar in shape and dimensions to those observed in the mesophyll of both species and apparently produce similar amounts of starch. Microbodies or peroxisomes were observed in *P. gnaphaloides* mesophyll and bundle sheath cells.

The mesophyll chloroplasts of *G. hermogenesii* rarely present starch granules and are usually smaller when compared with those in the bundle sheath. The bundle sheath chloroplasts have small amounts of stacked thylakoids, large starch granules and large plastoglobuli (Fig. 4). Peroxisomes are not common in *G. hermogenesii* leaf cells.

Microorganisms and their relationship with plant tissues

In young mature leaves collected during the flowering stage of both plant species, two distinct forms of microorganisms were observed: (i) a smaller organism was found in the intercellular spaces of the spongy parenchyma and inside a dead cell of the xylem tissue; (ii) a larger and distinctly eukaryotic organism was found within distinct living cells.

Some morphological alterations were found in living cells, usually associated with the presence of at least one microorganism, suggesting an infectious process.

Outside the plant cells some very small organisms were found, with sizes ranging from 0.375 μm to 1.125 μm (average sizes equal to $0.85 \mu\text{m} \pm 0.25$). These microorganisms seem to have a cell wall and some internal electrondense structures (Fig. 5). It was not possible to characterize any internal membrane system or flagella, and their shapes varied from spherical to slightly oval. These microorganisms were located in the intercellular spaces, especially in the spongy parenchyma tissue (Fig. 5). One microorganism with the same morphological aspect was found only once, inside a naturally dead cell of a vessel element of the xylem tissue in *P. gnaphaloides* leaf. In the intercellular spaces, penetrating through the cell wall of a *G. hermogenesii* palisade parenchyma cell, a larger two-cell microorganism was verified (Fig. 6), usually just inside cells (Fig. 7).

An eukaryotic organism with a size ranging from 4 to 16 μm wide (Fig. 7A) was found inside living cells in most of the leaf tissues (epidermis, palisade, spongy parenchyma, bundle sheath, phloem and xylem) of both plant species. This microorganism was found even inside the nucleus of a *G. hermogenesii* spongy parenchyma cell (Fig. 7B). The intracellular organism was observed as a single cell (Fig. 7A) and as a bicellular organism with a septum separating the two cells (Fig. 7C).

The shape and density of their boundaries indicate that the intracellular microorganism cytoplasm is encapsulated by a cell wall and that each cell comprises either multiple nuclei per cell or a multilobular nucleus in both unicellular (Fig. 7D) and bicellular (Fig. 7C) forms. Elongated mitochondria were found in the cytoplasm, usually near of the septum or the cell wall (Fig. 7D, 7E). The septum between two neighboring cells can go through the full size of the cell section (Fig. 7E) or be interrupted by a simple centered pore (Fig. 7C, 7F). Near of the septum there is a mass of vesicles (Fig. 7C, 7F) and one or two dark round spots (Fig. 7E, 7F). All the characters above indicate that the intracellular organism should be a fungus, probably an Ascomycete, which was always associated with disrupted organelles in its host cells (Fig. 7B, 7C, 7D).

Comparing the organelles of the same cell type in colonized (Fig. 7C) and healthy (Fig. 4) leaf samples from *G. hermogenesii* an association between the presence of the

fungus and a reduced size of the lipid droplets (plastoglobuli) inside of the plant chloroplasts was observed. The bundle sheath chloroplasts analyzed from *G. hermogenesii* samples obtained during both periods, at vegetative (Fig. 4) and at flowering (Fig. 7C) stages, have a starch content range from 8.6 to 22.8% of the total organelle area (Table 1). The diameters of its lipid droplets, however, range from 0.15 to 1.34 μm in healthy leaf samples and from 0.06 to 0.17 μm in colonized leaf samples.

DISCUSSION

The anatomy of *G. hermogenesii* leaf is similar to that of *G. arborescens* L.f. (11), *G. cespitosa*, *G. dispersa*, *G. nitida*, *G. sonora* (36), *G. conica*, *G. flaccida* (3) among others, most of them arranged in a *Gomphrena* atriplicoid-type of Kranz anatomy (13, 28). As expected, there was no significant variation in this species leaf anatomy due to the life cycle stage, although older leaves collected during the vegetative stage have a thicker cuticle covering both epidermis surfaces. The leaf anatomy and the granal chloroplast ultrastructure observed in *P. gnaphaloides* is similar to the observations made in *P. jubata* (10), which also lacks Kranz anatomy.

The absence of peroxisomes in *G. hermogenesii* leaf tissues and their presence among all chlorenchyma tissues of the *P. gnaphaloides* leaf is compatible with their possible photosynthesis metabolisms. Along with the Kranz syndrome and dimorphic chloroplasts, the peroxisome absence indicates that *G. hermogenesii* performs the C_4 pathway of photosynthesis. In this species, the CO_2 concentration in the bundle sheath cells must be efficient, leading to a significant reduction of the oxygenase function of its RuBisCO enzyme, turning itself virtually free of the photorespiration process. On the other hand, the presence of peroxisomes in *P. gnaphaloides* leaf cells is consistent with the use of the C_3 pathway of photosynthesis for carbon fixation, agreeing with the results of a non morphological study (29).

RuBisCO (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase) is a key enzyme for photosynthesis and is active inside chloroplasts. Acting as a carboxylase, RuBisCO adds atmospheric CO_2 to ribulose-1, 5-bisphosphate, fixing the carbon. However, acting as an oxygenase, RuBisCO splits ribulose-1, 5-bisphosphate and releases part of the fixed carbon

in a process called photorespiration. Peroxisomes play an essential role in this latter process, which is typical of C_3 plants. Acting in close contact with chloroplasts and mitochondria, peroxisomes participate in the glycolate pathway, in order to recover to the Calvin cycle part of the carbon lost during photorespiration (16, 19, 26).

The colonization damage effects appear to be more or less similar in *P. gnaphaloides* and *G. hermogenesii* leaves. In both hosts, the organelles' disruption was initiated by their external envelope, since the organelles' internal membranes were generally found preserved. It seems that the plant nucleus was the last to acknowledge the presence of the parasite, because sometimes the external membranes of chloroplasts and mitochondria were damaged but the external nucleus membrane was still intact. All chloroplasts had their transitory starch granules preserved, even when they were dispersed in the cytoplasm. These data suggest that the biotrophic fungi slowly draw nutrients from plants, in a strategy typical of endophytic species in order to preserve their hosts (19). In both plant leaves disrupted organelles were observed even in cells where the parasite could not be visualized, probably due to a hypersensitive reaction against the fungus. According to Mauseth (19), some plants have a short-term and elaborate antifungal defense in which some cells die immediately upon parasite contact, leading to starvation of the intracellular obligate parasite.

Mitochondria were identified along with the cell wall and near the septum in this intracellular organism, which is consistent with Chandler and Roberson (5), who characterize fungus mitochondria as usually elongated organelles positioned in parallel to the growing axis of the cell.

The occurrence of a simple septa pore and the nearby "Woronin bodies" indicate that the fungi found in both plant hosts belong to the Ascomycete division. The fungus septa pore is larger and more complex than plant plasmodesmata and it is usually seen in higher fungi (2) allowing cytoplasm continuity from cell to cell and organelle migration through it (19). The dark round spots found near the septum or the septum pores are called "Woronin bodies" (5, 19). According to Mauseth (19), an important aspect of hypha walls is the nature of the septa pores: when the perforation has a flange and a typically hemispherical cap on each side, the diagnosis is of a Basidiomycete. On the other hand,

Ascomycete septum has a simple pore in its center, closely associated with one or several “Woronin bodies”.

The bicellular parasite shows a cytoplasm vesicle mass (Fig. 7C, 7F) that could be the “spitzenkörper”. The actual location of this mass of vesicles must be transitory in this hypha and could be explained by its translocation from the neighbour cell, because it was found near the septum pore. No similar structure was found in any other fungus cell. The “spitzenkörper” is usually located in the apex of a growing hypha and it is responsible for the deposition of substances in the growing cell wall (5, 25).

All the structures that could represent the nucleus of a parasite cell do not usually have a condensed structure typical of a nucleolus. Nevertheless some of the nuclei shown in figures 7C and 7D have small dark areas that could indicate a condensation of a nucleolus. According to Mauseth (19), fungi nuclei show little differentiation into euchromatin and heterochromatin and are less than 2 μm in diameter, which is consistent with the presented data.

Although not shown here, in some sections some fungi were observed crossing the host cell walls, usually through the plasmodesmata region. The preponderance of the fungus observed as a single cell and without the ascus (its reproductive structure) suggests a recent infection caused by a sterile or an asexual fungus. Only in one cell of *P. gnaphaloides* was a fungus hyphae observed producing two buds (data not showed), suggesting the beginning of its asexual reproduction. The budding process is common in yeasts (Ascomycete) (2, 26). If this fungus co-evolved with members of the Amaranthaceae family, its spore dispersion could be induced by fire also using the same way that was selected by these plants for regrowth and flowering. There are more than 30.000 species of Ascomycete and they are responsible for food poisoning and plant diseases (26). Except for the unicellular yeast, all Ascomycete are filamentous and can reproduce either asexually or sexually (26).

This infecting Ascomycete can be using the plant plastoglobuli (consisting essentially of lipids) as a primary carbon and energy source. The diameter of the host plastoglobuli is much larger in healthy plant samples (Table 1) than in the same fungi colonized species sample. Although the fungi first choice of energy source is usually

soluble carbohydrates, lipids are very important because triglycerides are storage substances as well as membrane constituents, cell wall and hormones components (24, 25). Furthermore, lipids can be responsible for the fungi pathogenicity (17, 25). Putzke and Putzke (25) reports that it is not necessary to add lipids in the culture medium used for fungi *in vitro* maintenance but when triglycerides are added the fungi development is increased. Fungi carbon uptake, metabolism and translocation are poorly understood even in arbuscular mycorrhizal symbiosis, a topic largely studied due to its importance in agriculture (24). According to Lavoie *et al.* (17), Ascomycete fungi can rewire its transcriptional network and use lipids in the metabolism, growth, development and pathogenicity. Another possible explanation for lipid storage reduction inside of chloroplasts could be due to plant fatty acid regulation, unsaturation and mobilization in response to stress caused by fungi biotic interactions (35).

Although plastoglobuli content in chloroplasts (increase in the amount of lipid droplets) could be linked to plant senescence (15), this may be not the case, because the number of remaining plastoglobuli inside the chloroplasts from colonized samples is similar to the plastoglobuli number in healthy samples in the same cell type and species (Table 1). Only their size is reduced in colonized samples. The large plastoglobuli found in health leaves from *G. hermogenesii* are similar to our findings in other Amaranthaceae species, native of the Cerrado Biome, such as *Froelichiella grisea*, *G. arborescens*, *G. pohlii* and *G. virgata* (*in development*).

The increased number of transitory starch granules in colonized samples can be explained by the range of time during sampling. All samples were collected from 12 a.m. to 4 p.m., insuring transitory starch formation by photosynthesis, and early enough to prevent its translocation to the storage organs. The flowering (colonized) samples were collected near 4 p.m. and the vegetative (healthy) samples were collected near 12 a.m. This sampling scheme gave more light time to the flowering plants at least to form and store transient starch within its chloroplasts. There is no data to assure the same about chloroplast storage lipids. Although chloroplasts are also sites of protein and lipid biosynthesis (probably storage as plastoglobuli), both processes are not clear (26), including their timing. The larger chloroplast total area in the colonized samples can be explained by the dispersion of

the internal membrane system, once the external envelope is disrupted.

The ultrastructure of the smallest microorganism found in the intercellular spaces of the plant hosts (fig. 5) suggests it can be a prokaryotic organism (like a bacterium), but they could also be fungi spores which will develop just before or after invading the plants cells, as observed in figure 6. The fungi spores could penetrate the intercellular spaces through any open stomata. Although distributed in all tissues of the plant, including the vascular ones, the intracellular Ascomycete found in both plants species showed more affinity to the bundle sheath cells of *G. hermogenesii* leaves, which have more capacity for energy production. Bundle sheath cells are the principal site for carbon fixation in C₄ plants (16, 19, 26).

The two fungi host plants were collected in an area that is now a Conservation Reserve, but in the past it was a cattle farm. Both plants grow in flat areas, usually more appropriate to naturally feed animals, not very far from a small river. Both plants belong to the Amaranthaceae family, the same as the *caruru* species *Amaranthus quitensis*, *A. reflexus*, *A. spinosus* and *A. viridis*, all are considered poisonous to herbivores (1, 23, 34). However, no study was found for the later species to verify the possible natural association of the plants with any kind of fungi or bacteria. Around 99% of fungi and bacteria associated with plants do not harm them and can benefit the plants through dissolving of phosphates, fixation of the atmospheric nitrogen and also by providing toxin to improve the plant's defenses against herbivores or by improving ways to capture water (21). In exchange, the plant gives food to its parasite, which is normally classified as an endophytic organism.

The dimorphic chloroplasts and leaf anatomy indicate the C₄ photosynthesis pathway operation in *G. hermogenesii* leaves, although a carbon isotope ratio study of Sage *et al.* (29) indicates that *G. hermogenesii* would not be a C₄ species. The distribution of its key photosynthetic enzymes will be carried out using immuno cytochemistry, in our laboratory, in order to complete this data.

P. gnaphaloides showed anatomic and ultrastructural characteristics compatible with plants that perform the C₃ photosynthesis pathway. However, all the samples were colonized, disabling further morphological studies for a complete organelle description

linked to the photosynthesis process on these samples. Healthy samples should be found and analyzed to complete a profile linking morphological characteristics and photosynthesis pathways on these species.

The plant samples preparation for transmission electron microscopy proved to be useful also to study the fungi morphology inside of plants cells as well the aspects of host-parasite interaction. This kind of study could be recommended for plants considered toxic to herbivores and to any medicinal plant consumed by humans, in order to give more information about the real source of poisoning or medicinal effect and for fine quality control. In both species, the external macro aspects of the plants did not indicate the presence of the endophytic fungus.

The size reduction observed in chloroplast plastoglobuli could be due to the use of its lipids by the fungus, as primary source of carbon and energy, or to its mobilization by the host plants in response to stress caused by fungus biotic interactions.

All morphological characteristics observed in the intracellular microorganism suggest that it should be an obligate biotroph endophytic fungus belonging to Ascomycete division. The complete identification of the fungus depends on its isolation from the environment/hosts.

ACKNOWLEDGEMENTS

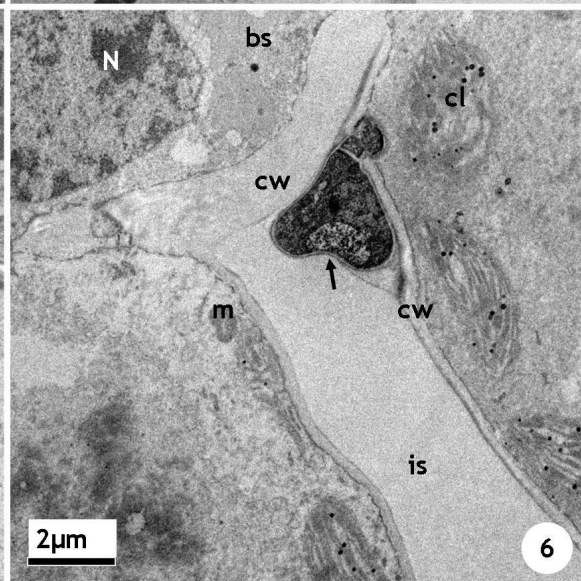
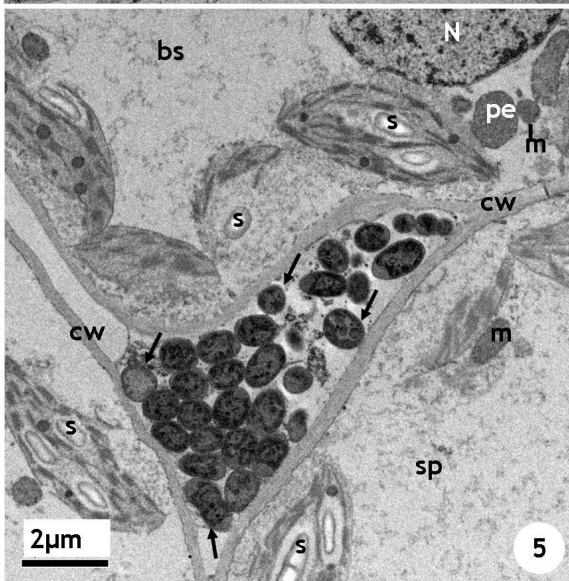
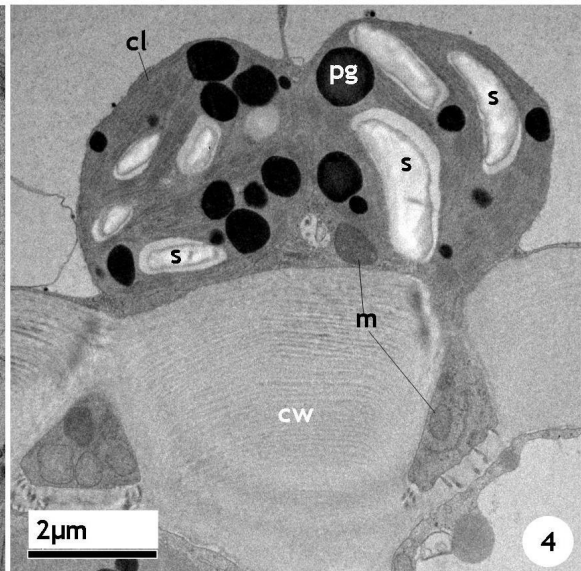
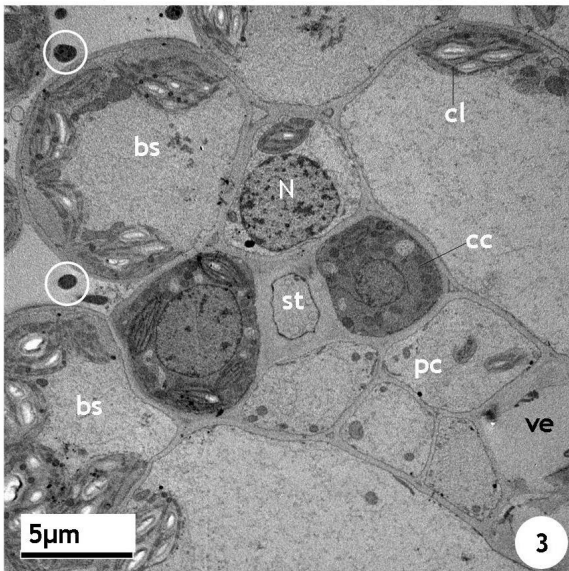
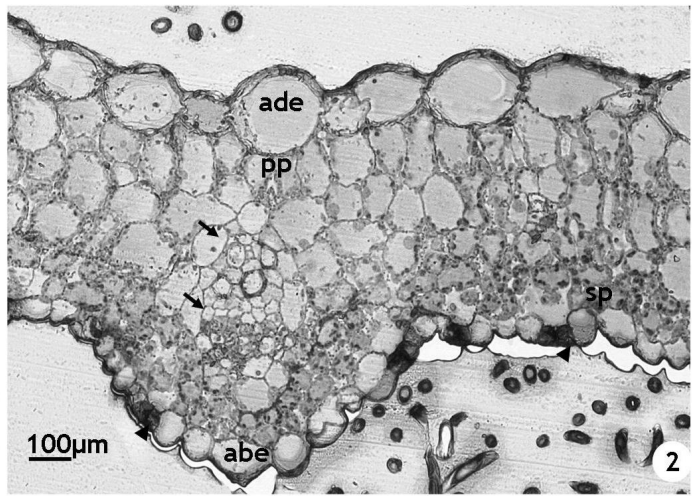
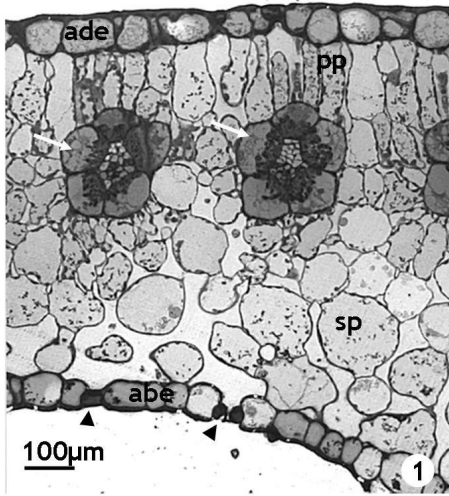
Thanks to CAPES, CNPq and FINEP for financial support and to the ONG Oca Brasil for authorizing this research at RPPN Cara Preta Conservation area.

REFERENCES

1. Agra, M.F.; Baracho, G.S.; Nurit, K.; Basílio, I.J.L.D.; Coelho, V.P.M. (2007). Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. *J of Etnopharmacol.* 111, 383-395.
2. Bozzola, J.J.; Russel, L.D. (1999). *Electron Microscopy – Principles and Techniques for Biologists*, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.
3. Carolin, R.C.; Jacobs, S.W.L.; Vesk, M. (1978). Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. *Aust. J. Bot.* 26, 683-698.
4. Cavalcanti, R.B.; Ramos, A.E. (2001). *Flora do Distrito Federal, Brasil*, volume I. EMBRAPA, Brasília.
5. Chandler, D.E.; Roberson, R.E. (2009). *Bioimaging - current concepts in light and electron microscopy*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.
6. Coutinho, L.M. (1980). As queimadas e seu papel ecológico. *Brasil Florestal* 10 (44), 7-23.
7. Dias, B.F.S. (coord.). (1992). *Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis*. FUNATURA/IBAMA, Brasília.
8. Edwards, G.E.; Franceschi, V.R.; Voznesenskaya, E.V. (2004). Single-cell C₄ photosynthesis versus dual-cell (Kranz) paradigm. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 173-96.
9. Eiten, G. (2001). *Vegetação natural do Distrito Federal*. SEBRAE/UnB, Brasília.
10. Estelita-Teixeira, M.E.; Handro, W. (1984). Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Can. J. Bot.* 62, 812-817.
11. Fank-de-Carvalho, S.M.; Graciano-Ribeiro, D. (2005). Arquitetura, anatomia e histoquímica de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). *Acta bot. Bras.* 19 (2), 377-390.
12. Fank-de-Carvalho, S.M.; Gomes, M.R.A.; Silva, P.I.T.; Bão, S.N. (2010). Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. *Biocell* 34 (1), 23-35.
13. Kadereit, G.; Borsh, T.; Weising, K.; Freitag, H. (2003). Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C₄ photosynthesis. *Int. J. Plant Sci.* 164 (6), 959-986.

14. Klink, C.A.; Machado, R.B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*. 1 (1), 147-155.
15. Kutík, J. (1998). The development of chloroplast structure during leaf ontogeny. *Photosynthetica* 35 (4), 481-505.
16. Laetsch, W.M. (1974). The C₄ syndrome: a structural analysis. *Annu Rev Plant Physiol* 25, 27-52.
17. Lavoie, H.; Hogues, H.; Whiteway, M. (2009). Rearrangements of the transcriptional regulatory networks of metabolic pathways in fungi. *Curr Opin Microbiol* 12, 655-663.
18. Lorenzi, H.; Abreu Matos, F.J. (2000). *Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
19. Mauseth, J.D. (2009). *Botany - an introduction to plant biology*, 4th ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.
20. Montesinos, E. (2003). Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *Int Microbiol* 6, 221-223.
21. Oliveira, M.; Marcolin, N. (2009). Entrevista João Lúcio de Azevedo – Medo injustificado – especialista em microrganismos de plantas diz que apenas 1% dos fungos e bactérias causam problemas. *Pesquisa Fapesp* 164, 12-17.
22. Paiva, P.H.V. (2000). A Reserva da Biosfera do Cerrado: fase II, *in*: Cavalcanti, T. B.; Walter, B.M.T. (Eds), *Tópicos atuais em botânica - palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica*. Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen, Brasília, p. 332-334.
23. Peixoto, P.V.; Brust, L.A.C.; Brito, M.F.; França, T.N.; Cunha, B.R.M.; Andrade, G.B. (2003). Intoxicação natural por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em ovinos no sudeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 23 (4), 179-184.
24. Pfeffer, P.E.; Douds Jr., D.D.; Bécard, G.; Shachar-Hill, Y. (1999). Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120, 587-598.
25. Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (2002). *Os Reinos dos Fungos*, vol. 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

26. Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. (2001). *Biologia Vegetal*, 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
27. Rocha, R.; Luz, D.E.; Engels, C.; Pileggi, S.A.V.; Jaccoud Filho, D.S.; Matiello, R.R.; Pileggi, M. (2009). Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). *Braz. J. Microbiol.* 40, 73-78.
28. Sage, R.F. (2004). The Evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytol.* 161 (2), 341-370.
29. Sage, R.F.; Sage, T.L.; Pearcy, R.W.; Borsch, T. (2007). The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis in Amaranthaceae *sensu stricto*. *Am. J. Bot.* 94 (12), 1992-2003.
30. Salatino A.; Montenegro G.; Salatino M.L.F. (1986). Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. *Rev. bras. Bot.* 9, 117-124.
31. Simon, M.F.; Proença, C. (2000). Phytogeographic patterns of Mimosa (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? *Biol. Conserv.* 96, 279-296.
32. Siqueira, J.C. de. (1987). Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. *Acta biol. leopoldensia* 9 (1), 99-110.
33. Siqueira, J.C. de. (2007). O bioma Cerrado e a preservação de grupos taxonômicos: um olhar sobre as Amaranthaceae. *Pesquisas, Botânica* 58, 389-394.
34. Timm, C.D.; Riet-Correa, F. (1997). Plantas Tóxicas para Suínos. *Ciênc. Rural* 27 (3), 521-528.
35. Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid insaturation, mobilization and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* 30, 967-977.
36. Welkie, G.W.; Caldwell, M. (1970). Leaf anatomy of species in some dicotyledon families as related to the C₃ and C₄ pathways of carbon fixation. *Can. J. Bot.* 48, 2135-2146.



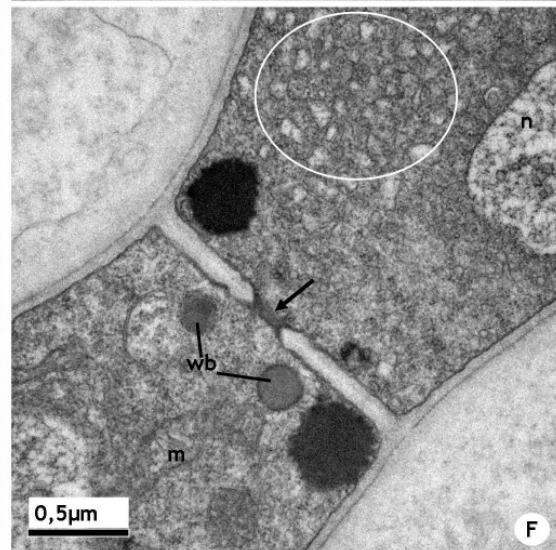
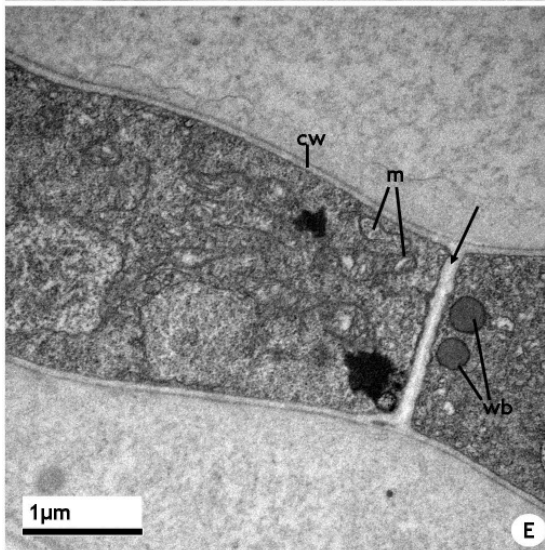
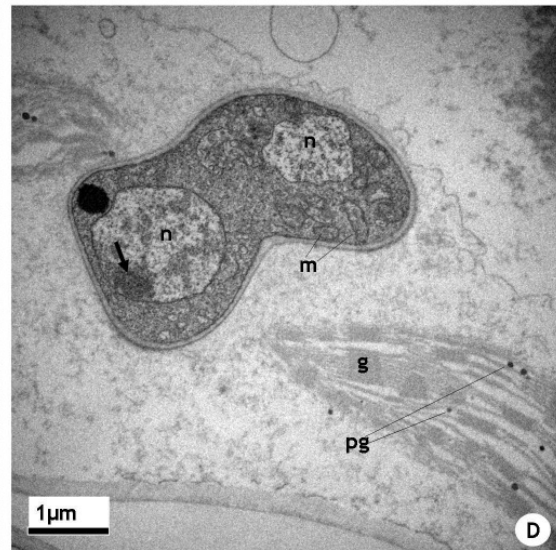
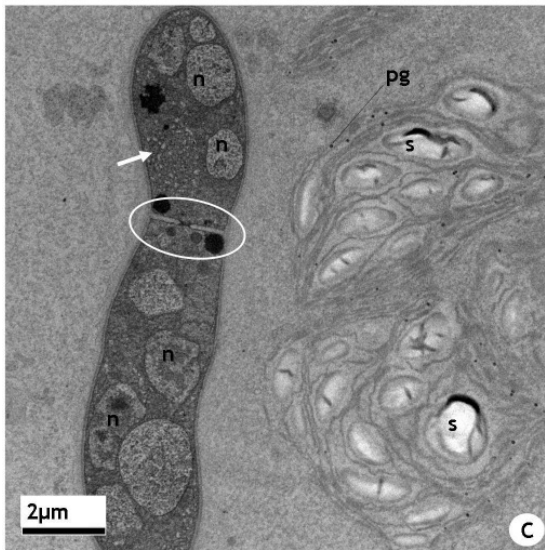
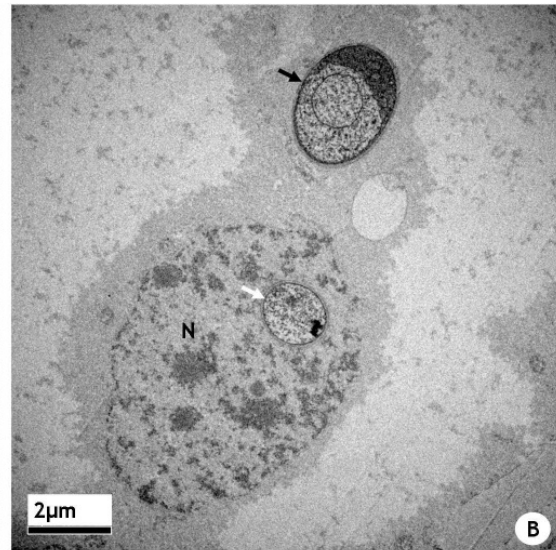
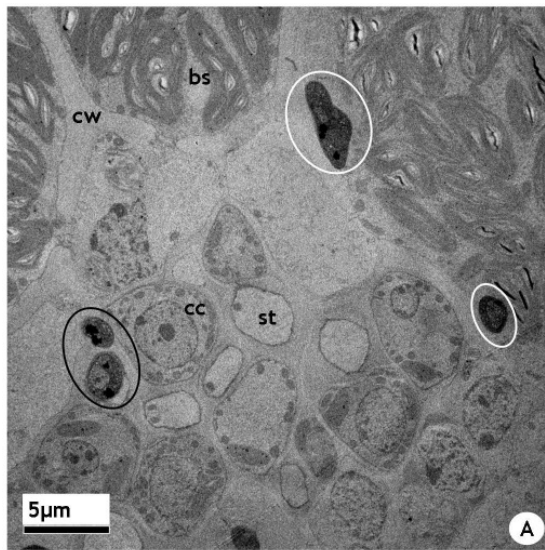
Legend: abe – abaxial epidermis; ade – adaxial epidermis; bs – bundle sheath cell; cc – companion cell; cl – chloroplast; cw – cell wall; is – intercellular space; m – mitochondrion; N – plant nucleus; pc – parenchyma cell; pe – peroxisomes; pp – palisade parenchyma; pg – plastoglobuli; s – starch granule; sp – spongy parenchyma; st – sieve tube element; ve – vessel element of xylem.

Fig. 1-2: Leaf transverse section under the light Microscope. **Fig. 3-6:** Amaranthaceae leaves under Transmission Electron Microscope.

Figure 1. *Gomphrena hermogenesii* shows a conspicuous and complete bundle sheath (arrow).

Figure 2. *Pfaffia gnaphaloides* has a less conspicuous bundle sheath (arrow). **Figure 3.** Vascular bundle of *P. gnaphaloides* with smallest microorganisms in the intercellular spaces (white circles).

Figure 4. Bundle sheath organelles of *G. hermogenesii* healthy sample. **Figure 5.** Higher magnification of the small organisms in the intercellular spaces (arrow) of *P. gnaphaloides* colonized sample. **Figure 6.** Microorganism entering a palisade parenchyma cell of *G. hermogenesii*, passing through the cell wall (arrow).



Legend: bs – bundle sheath cell; cc – companion cell; cl – chloroplast; g – granum; m – mitochondrion; n – fungus nucleus; N – plant nucleus; pc – parenchyma cell; pg – plastoglobuli; s – starch granule; st – sieve tube element; wb – Woronin bodies.

Figure 7. Ascomycete division fungus inside *G. hermogenesii* (Amaranthaceae) leaves under TEM. **A:** Unicellular parasites infecting a sieve tube element (black circle) and bundle sheath cells (white circles). **B:** Parasite infecting a plant cell nucleus (white arrow) and outside the nucleus (black arrow) of the same cell. **C:** Bicellular parasite with multiple nuclei or a multilobulated nucleus, a simple pore in the septum center (ellipse) and a nearby vesicle mass (arrow). **D:** Unicellular parasite with one nucleus with nucleolus (arrow) and elongated mitochondria. **E:** Parasite with a complete septum (arrow), mitochondrion, cell wall and two Woronin bodies. **F:** Higher magnification of 7C shows the parasite septum with a simple pore (arrow), Woronin bodies and a mass of vesicles (circle).

Table 1. Morphometric data of chloroplasts in bundle sheath cells of *Gomphrena hermogenesii* J. C. de Siqueira (Amaranthaceae) leaves in healthy and fungi colonized samples.

<i>G. hermogenesii</i> bundle sheath chloroplasts	Healthy sample	Colonized sample
Chloroplast area	9.94 $\mu\text{m}^2 \pm 2.58$	14.70 $\mu\text{m}^2 \pm 5.08$
Starch granule total area per chloroplast	1.7 $\mu\text{m}^2 \pm 0.74$	2.26 $\mu\text{m}^2 \pm 1.32$
Ratio of starch total area by chloroplast area	17.07 % ± 5.68	14.96 % ± 4.98
Starch granule units per chloroplast	3.4 ± 1.26	4.58 ± 1.5
Plastoglobuli units per chloroplast	7.7 ± 2.36	6.5 ± 3.53
Plastoglobuli diameter	0.53 $\mu\text{m} \pm 0.23$	0.10 $\mu\text{m} \pm 0.03$

Note: All numbers are expressed as average result of 10-12 chloroplasts measurements plus or minus standard deviation.

2.4 Manuscrito em preparação

Este manuscrito trata dos aspectos anatômicos e ultraestruturais das folhas de espécies da família *Amaranthaceae* que ocorrem no Cerrado, a maioria nativa, algumas de forma endêmica, bem como espécies como subespontâneas e/ou invasoras, que colonizam áreas perturbadas de Cerrado em função do cultivo para utilização medicinal. Os resultados preliminares de todas as espécies incluídas neste manuscrito foram publicados em Congressos Nacionais e Internacionais e pretende-se, com o mesmo, responder ao objetivo específico 1.6.2.4.

Esse estudo indica que as espécies da família *Amaranthaceae* desenvolveram variações estruturais (anatomia e ultraestrutura), provavelmente durante a evolução em seus ambientes de origem, que refletem estratégias diferenciadas para sua sobrevivência e adaptação, especialmente para seu metabolismo fotossintético. Algumas das variações observadas parecem desvinculadas do ambiente e da duração das folhas ao longo do tempo, mas podem estar relacionadas ao desenvolvimento do metabolismo C_4 . O estudo da anatomia das folhas das *Amaranthaceae* pode auxiliar na elucidação das variações vinculadas ao desenvolvimento do metabolismo C_4 . Por exemplo, o posicionamento de organelas nas células da bainha vascular pode ser determinante para a operação do metabolismo intermediário C_3 - C_4 , uma vez que todas as espécies C_4 deste estudo mantêm o mesmo posicionamento de organelas da espécie intermediária. Além disso, as espécies C_4 freqüentemente demonstram espessamento das paredes nas células da bainha vascular e o dimorfismo dos cloroplastos indica o predomínio de um subtipo desse metabolismo. Estudos em maiores quantidades de espécies e com outras técnicas auxiliares (medições das trocas gasosas e imunocitoquímica, por exemplo), bem como técnicas histoquímicas, podem revelar dados adicionais e relevantes para a elucidação dos aspectos similares e diferenciadores não apenas do metabolismo, mas também para auxiliar a diagnose taxonômica das espécies.

O manuscrito será submetido para publicação em um periódico a ser definido, indexado. Inicialmente projeta-se a submissão ao *Plant Biology*, um periódico alemão. Após a definição do periódico, serão realizados os devidos ajustes ao formato da revista.

C₃, INTERMEDIARY AND C₄ METABOLISM IN AMARANTHACEAE FROM A TROPICAL SAVANNAH

Suzane M. Fank-de-Carvalho^{1,3*} & Sônia Nair Bão²

¹ Programa de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Caixa Postal 6109, CEP 13083-864, Campinas/SP, Brasil.

² Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, CEP 70919-970, Brasília/DF, Brasil.

³ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Phone number: +55 (61) 2108-9778. E-mail: smfank@cnpq.br

RUNNING HEAD: Fank-de-Carvalho & Bão - Amaranthaceae leaves' ultrastructure

ABSTRACT: Anatomic and ultrastructural characteristics in leaves of Amaranthaceae family species have been associated with the C₄ photosynthesis pathway. Aiming to study the anatomy and ultrastructure of the Brazilian genera *Alternanthera*, *Froelichiella*, *Gomphrena*, *Hebanthe* and *Pfaffia*, leaves were collected in Brasília, Federal District, Brazil and in Alto Paraíso, Goiás State, Brazil. Samples were fixed and processed for anatomical and ultrastructural studies. The anatomy of the various species is very similar, although we found some variations among genera and in the number of cell layers and organelle concentration. All *Gomphrena* spp. have Kranz anatomy and dimorphic chloroplasts; they have few or no starch granules and conspicuous grana in the mesophyll cells and many starch granules and no grana in bundle sheath cells. Dimorphic chloroplasts were not found in the other genera studied. *Alternanthera* species presented variable anatomy, with organelles positioned towards the vascular bundle in *A. paronychioides* and in the peripheral position in *A. brasiliana* bundle sheath cells. Based on anatomy and ultrastructure, *Alternanthera* has C₃ and intermediate C₃-C₄ species; *Froelichiella grisea*, *Hebanthe eriantha*, *Pfaffia glomerata* and *P. townsendii* are C₃ species and *Gomphrena arborescens*, *G. hermogenesii*, *G. lanigera*, *G. pohlii*, *G. prostrata* and *G. virgata* are ultrastructurally adapted to operate the subtype NAPD-ME of the C₄ photosynthesis pathway.

Key-words: Amaranthaceae, Cerrado, dimorphic chloroplasts, Kranz anatomy, ultrastructure.

INTRODUCTION

The C₄ pathway is broadly dispersed among Angiospermae plants. Environment is responsible for the relative abundance of a determined subtype of the C₄ photosynthesis pathway, which is highly dependent on structural and ultrastructural coordination in leaves (Press, 1999). The anatomical compartment of the C₄ pathway can involve two kinds of chlorenchyma cells - the bundle sheath and the mesophyll cells - and the wall thickness of the first works to prevent loss of CO₂ (Press, 1999; Malkin & Niyogi, 2000). In this way, the presence of a complete parenchyma bundle sheath and the radial arrangement of the adjacent mesophyll cells – the classic Kranz anatomy - are the most reliable anatomic characters used to determine the C₄ pathway (Gutschick, 1999). However, evolutionary convergence indicates variable patterns of biochemistry and cellular and subcellular organization (Press, 1999). Nowadays, occurrence of the Kranz syndrome is no longer considered the only way for C₄ photosynthesis to operate, since this can also be achieved by a chloroplast specialization inside the same cell (Edwards *et al.*, 2001; Sage, 2002; Voznesenskaya *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2004).

Laetsch (1968) studied the leaves of *Amaranthus edulis* (Amaranthaceae) and *Atriplex lentiformis* (Chenopodiaceae) and associated their structural and ultrastructural characteristics with an adjustment to a faster and more efficient carbon fixation in environments with reduced availability of water. C₄ photosynthesis occurs in the Amaranthaceae family, and the genus *Alternanthera* has C₃, C₄ and C₃-C₄ intermediate species (Laetsch, 1974; Sage & Monson, 1999). Recent study of the carbon isotope ratios of Herbarium species and molecular data (Sage *et al.*, 2007) has determined that approximately 28% of the Amaranthaceae species use the C₄ photosynthesis pathway, including 19.5% of the *Alternanthera* species studied and 89% of *Gomphrena* species. The presence of Kranz anatomy and dimorphic chloroplasts seems to be typical for the *Gomphrena* genus, as verified in *G. brachystylis*, *G. brownii*, *G. canescens*, *G. celosioides*, *G. conica*, *G. flaccida*, *G. globosa* and *G. macrocephala* (Carolin *et al.*, 1978; Estelita-Teixeira & Handro, 1984). The organelle position and granal structure of their chloroplasts suggests the use of the NADP-ME subtype of C₄ metabolism (Carolin *et al.*, 1978; Estelita-

Teixeira & Handro, 1984). According to Borsch *et al.* (2001), species' survival in adverse environments can be achieved by the operation of C₄ photosynthesis.

In order to improve knowledge on the biodiversity of the Brazilian Cerrado Biome, a tropical savannah, this study aimed to describe and discuss anatomical and ultrastructural characteristics of 12 Amaranthaceae leaves: *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, *A. paronychioides* St.-Hil, *Froelichiella grisea* R.E.Fr., *Gomphrena arborescens* L.f., *G. hermogenesii* J.C.Siqueira, *G. lanigera* Pohl. ex Moq., *G. pohlii* Moq., *G. prostrata* Desf., *G. virgata* Mart., *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen, *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and *P. townsendii* Pedersen. All the species are native to Brazil and occur in the Cerrado Biome; six of them are endemic to Brazil and one is endemic to the Brazilian Cerrado Biome (Marchioretto *et al.*, 2010).

Considering that microscopy is a good analytical method to describe and recognize any adulteration in medicinal plant material (Jorge, 2000), these descriptions can also be useful as drug quality control data on medicinal species and for taxonomic purposes. The ultrastructural knowledge of the chloroplasts and other organelles, as well as their disposition inside cells can help to determine C₄ pathway operation and the possible predominant subtype in the species, in order to understand more about the evolution of this photosynthesis pathway.

MATERIAL AND METHODS

Place of collection: *A. brasiliana* was collected in cultivated gardens in the Campus of the University of Brasília (UnB), in Brasília. *A. paronychioides* was commercially acquired and raised in greenhouse conditions, in Brasília. *H. eriantha* and *P. glomerata* were obtained from a medicinal garden at EMBRAPA/Cenargen, in Brasília. A duplicate of *P. glomerata* was obtained from Dr. Jean Kléber Mattos, cultivated in a greenhouse in the Biological Station of UnB, in Brasília. *G. arborescens*, *G. pohlii* and *G. virgata* were collected in an Cerrado area at the Olympic Center of UnB, near the coordinates 15°45.936' S and 047°51.187' W, in Brasília. Duplicates of *G. arborescens* and *G. virgata* were collected in a Cerrado area at the Roncador Ecological Reserve/Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR/IBGE), near the coordinates 15°57.241' S and 047°52.089' W, in

Brasília. All the other species, *F. grisea*, *G. hermogenesii*, *G. lanigera*, *G. prostrata* and *P. townsendii*, were collected in the protected area of Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta (RPPN Cara Preta), in Alto Paraíso, Goiás State, Brazil, around the coordinates 14°00.507' S and 047°31.057' W.

Sampling: Visually healthy green leaves of the 3rd to 4th node of 2-6 specimens of pre-identified species were collected. For anatomical studies, leaves were submitted to FAA₇₀, a fixation solution made of formaldehyde, ethanol and acetic acid (Kraus & Arduin, 1997) for 48h fixation, and conserved in ethanol 70% until processing. For ultrastructural studies, small pieces of the middle portions from the leaves were obtained by razor blade cutting, fixed in 2% of glutaraldehyde, 2% of paraformaldehyde and 3% of sucrose in 0.05 M sodium cacodylate buffer for 24 h and conserved under refrigeration until processing.

Control material and identification - Vegetative and flowering plant branches were collected, pressed, dried and deposited as control material at IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), UB (Universidade de Brasília), PACA (Porto Alegre Colégio Anchieta/Universidade Vale dos Sinos) and other Brazilian Herbaria. The identification of the species was confirmed by an Amaranthaceae taxonomy specialist, Dra. Maria Salete Marchioreto, curator of the PACA Herbarium at Universidade Vale dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Laboratory sample processing – Anatomical samples were free-hand sliced to be studied under optical microscopy. Ultrastructural samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide and 1.6% potassium ferricyanide (1:1 v/v) for one hour in dark, followed by in-block staining with 0.5% uranyl acetate solution (overnight). Samples were then dehydrated in acetone ascending series and slowly embedded in Spurr's epoxy resin or dehydrated in ethanol ascending series, washed in propylene oxide and embedded in Poly Bed 812 (Polyscience) epon resin.

Microscopy - semi-thin sections were obtained with an ultramicrotome using glass knives, stained with toluidine blue and analyzed under the optical Zeiss Axiophot. Free-hand sliced sections were used to determine the composition of crystal inclusions (Kraus & Arduin, 1997). Ultra-thin sections of the same material were obtained with a diamond knife,

collected in 200 mesh copper grids and analyzed, without any additional staining, under the Transmission Electron Microscope TEM JEOL JEM 1011.

RESULTS

All the species have simple hairy leaves, alternate or opposite, with entire margins. The petiole is short or absent in *G. arborescens* with oblong leaves, long in *G. prostrate* small oval leaves and absent in *G. virgata* lanceolate leaves, whose bases form a kind of sheathing around the stem. The blade size and shape of their leaves is variable: the smallest one belongs to *G. lanigera*, the narrowest to *G. virgata* and the largest blade was found in *G. pohlii*. The epidermis is always uniseriate and nonglandular trichomes are present on both leaf surfaces. Anatomic and ultrastructural results will be presented by genus.

a) *Alternanthera* genus - *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (syn=*A. dentata*), *A. paronychioides* St.-Hil. (syn=*A. ficoidea*).

Anatomy – The leaves of species of this genus have a uniseriate, amphistomatous and thin cuticle epidermis with bigger cells on the adaxial surface. The mesophyll is dorsiventral and a thin-walled parenchymatous bundle sheath surrounds their collateral vascular bundles (fig. 1A and 1B). Uniseriate trichomes and stomata are more frequent on the abaxial surface of the epidermis of both species. Trichomes are rare in *A. paronychioides* leaves. Calcium oxalate druses are found in mesophyll cells and in the palisade parenchyma of *A. brasiliana*, whose cell arrangement is looser, with more intercellular spaces. Larger druses were found in mesophyll cells of *A. paronychioides*, frequently in rounder cells between vascular bundles. *A. paronychioides* intercellular spaces are reduced in relation to *A. brasiliana* mesophyll leaves, its spongy cells are horizontally oriented and its palisade parenchyma is slightly radial in relation to vascular bundles. In mesophyll and bundle sheath cells of *A. brasiliana* (fig. 1A) organelles are peripherally positioned. In *A. paronychioides* (fig. 1B), bundle sheath organelles are concentrated towards the vascular bundle and few organelles are in peripheral position, as they are in mesophyll cells.

Ultrastructure - Mesophyll cell chloroplasts (in palisade and spongy parenchyma) have conspicuous grana, small and few plastoglobuli (fig. 1C, 1D). In *A. brasiliana* the starch

granules are equally produced by mesophyll (fig. 1C) and bundle sheath chloroplasts (fig. 1E). In *A. paronychioides* the starch granules are few and smaller in mesophyll chloroplasts (fig. 1D) in relation to the bundle sheath ones (fig. 1F), where the chloroplasts seem to be bigger in relation to the mesophyll ones. In *A. brasiliiana* bundle sheath chloroplasts there are few peripheral vesicles (Fig. 1E) while in *A. paronychioides* chloroplasts this structure was not observed (fig. 1D, 1F). Numerous mitochondria and small granal chloroplasts were observed in the companion cells of phloem (fig. 1G) in both *Alternanthera* species, similarly with all the other species of this study. Chloroplasts in the guard cells of stomata (Fig. 1H) are smaller and granal, like the ones observed in the phloem companion cells (fig. 1G).

b) *Froelichiella* genus – *Froelichiella grisea* R.E.Fr.

Anatomy and ultrastructure – The leaves of species in this genus have uniseriate, amphistomatous and thin cuticle epidermis, with longer trichomes on the abaxial surface. The mesophyll is isobilateral and a less defined bundle sheath surrounds their collateral vascular bundles (fig. 2A). The palisade parenchyma near adaxial surface is formed by longer and larger cells than the abaxial one. Calcium oxalate druses were found in mesophyll cells, mostly in the adaxial palisade parenchyma. Organelles are equally distributed among chlorenchyma tissues, usually near the cell walls. Chloroplasts are always granal (fig. 2B), even in its vascular cells. Large starch granules (usually one or two per organelle) were found in all chloroplasts (fig. 2B), evenly distributed among the chlorenchyma tissues. Plastoglobuli are few and small in mesophyll chloroplasts (fig. 2B), but guard cell chloroplasts usually present just one large plastoglobulus and less conspicuous grana. Mitochondria (fig. 2B) and peroxisomes were found in mesophyll and bundle sheath cells.

c) *Hebanthe* genus - *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen (syn.: *Pfaffia paniculata*)

Anatomy and ultrastructure – This genus species has a thick leaf with uniseriate epidermis, stomata only on abaxial surface and dorsiventral mesophyll (fig. 3A). Calcium oxalate druses were found in mesophyll cells, mostly in the palisade parenchyma. The

parenchymatous bundle sheath cells have thin walls and peripheral organelles (fig. 3A). Organelles in mesophyll cells are also centrifuge but seem to be more concentrated in the palisade parenchyma (Fig. 3A). Chloroplasts have similar granal ultrastructure in all cell types and plastoglobuli and starch granules are large in the bundle sheath (fig. 3B) and in mesophyll cells. Mitochondria and peroxisomes are common near chloroplasts in mesophyll and bundle sheath (fig. 3B) cells.

d) *Gomphrena* genus - *Gomphrena arborescens* L.f., *G. hermogenesii* J.C.Siqueira, *G. lanigera* Pohl. ex Moq., *G. pohlii* Moq., *G. prostrata* Desf., *G. virgata* Mart.

Anatomy – The leaves of species in this genus have uniseriate and amphistomatous epidermis, dorsiventral mesophyll and a thick-walled parenchymatous bundle sheath around collateral vascular bundles (fig. 4A, B, C). In the bundle sheath cells of all *Gomphrena* spp. studied, the organelles are positioned towards the vascular tissue (fig. 4A, B, C). Trichomes are always uniseriate and nonglandular, frequently on both surfaces. Calcium oxalate druses (fig. 4A, C) are found in mesophyll idioblast cells of all species. *G. arborescens*, *G. hermogenesii* (fig. 4A), *G. lanigera* and *G. prostrata* have smaller and less distinctly radial cells in the abaxial mesophyll layer that precede the larger spongy parenchyma cells, a variation of the classical Kranz anatomy. *G. pohlii* (fig. 4B) abaxial mesophyll is formed by one layer of cells: radiating from vascular bundles there is one layer of palisade parenchyma, the typical feature of the Kranz anatomy, and under smaller veins and in the space between veins there is one additional discontinuous layer of spongy parenchyma. *G. virgata* (fig. 4C) has an intermediate pattern of abaxial mesophyll, with longer and larger cells radiating from vascular bundles and at least one layer of spongy parenchyma before the abaxial epidermis, very similar to the classical Kranz anatomy.

Ultrastructure - Mesophyll cell chloroplasts (in palisade and spongy parenchyma) have conspicuous grana, rare or absent starch granules and variable sizes of plastoglobuli in *G. arborescens* spongy parenchyma (fig. 4D) and in all the other *Gomphrena* spp. Larger plastoglobuli were found in *G. arborescens*, *G. hermogenesii*, *G. pohlii* and *G. virgata* and smaller plastoglobuli were found in *G. prostrata* and *G. lanigera* chloroplasts, in all mesophyll cells. A peripheral reticulum was found in chloroplasts of *G. arborescens* (fig.

4D), *G. pohlii* and *G. virgata* mesophyll cells and the largest is the one of *G. pohlii* palisade parenchyma (fig. 4E). Bundle sheath chloroplasts are completely devoid of grana (fig. 4F) or have few stacked thylakoids (fig. 4G) in all species, but always have large starch granules and plastoglobuli. The larger the starch granules, the more deformed the chloroplasts' typical lens shape (fig. 4F, G). Mitochondria are numerous in bundle sheath cells (fig. 4G) and are always near chloroplasts. Peroxisomes are rare, and a few were observed near chloroplasts in palisade and spongy parenchyma cells, but not in the bundle sheath. Phloem companion cells are mitochondria-rich in *G. virgata* (fig. 4H) and in all the other *Gomphrena* species. Chloroplasts and mitochondria in phloem cells are reduced in size, like the guard cells of stomata of *G. pohlii* (fig. 4I) and all the other known *Gomphrena* species, but share similar ultrastructure (granal, with plastoglobuli and starch granules).

e) *Pfaffia* genus - *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and *P. townsendii* Pedersen

Anatomy and ultrastructure – The leaves of this genus have uniseriate epidermis, stomata on both surfaces (rare and usually larger on adaxial surface of both species) and dorsiventral mesophyll, as shown in *P. townsendii* (fig. 5A). In *P. townsendii*, the abaxial epidermis is formed by smaller cells and stomata are raised in relation to the ordinary epidermal cells (fig. 5A), while in *P. glomerata* stomata are slightly sunken on adaxial surface and leveled on abaxial surface. In both species calcium oxalate druses are found in idioblasts between veins and in palisade parenchyma cells. Spongy parenchyma cells are horizontally oriented and bundle sheath cells have thin walls and peripheral organelles (fig. 5A) in both species. The intercellular spaces are narrower in *P. townsendii* spongy parenchyma. Chloroplasts are granal and have a similar size in all mesophyll cells, with large plastoglobuli and starch granules, as in *P. glomerata* spongy parenchyma (fig. 5B). Mitochondria and peroxisomes are common near chloroplasts (fig. 5B). Phloem companion cells are mitochondria rich and chloroplasts are smaller and granal, as in *Alternanthera* species (fig. 1G, H).

DISCUSSION

All species studied have hairy leaves, with hair density and pattern still to be determined, except for *G. arborescens*, *G. pohlii* and *G. virgata*, which have two sizes and shapes of uniseriate trichomes arranged in different densities (Fank-de-Carvalho *et al.*, 2010). The Cerrado species with thinner cuticles (*F. grisea* and *P. townsendii*) have thicker trichome coverage (Fank-de-Carvalho *et al.*, 2010b). Trichomes can be useful to provide shade on the upper epidermis, avoiding excessive sunlight and reducing water loss by transpiration, and are densely arranged on desert plants (Mauseth, 2009).

Cerrado species native to open areas tend to have a thicker cuticle over epidermal cells and thicker walls in bundle sheath cells, at least in *Gomphrena* genus. The cuticle thickness is not related to the duration of the leaves, since the very short-lived leaves of *G. lanigera* present a thick cuticle and the thickest bundle sheath cell walls (Fank-de-Carvalho *et al.*, 2010b) of all *Gomphrena* species studied.

Chloroplast plastoglobuli can be large in Cerrado plants, as was verified in *F. grisea* (fig. 2B), *G. arborescens* (fig.4D, 4F), *G. hermogenesii* (data not shown), *G. pohlii* (fig. 4E) and *G. virgata* (4G). According to Bréhélin & Kessler (2008), plastoglobuli consist of an outer lipid monolayer containing neutral lipids and proteins/enzymes related to lipid metabolism; their dimensions vary from 30 nm to several micrometers. Plastoglobuli shape and size change during development and plastid differentiation, and under stress conditions, clustering of large groups of connected plastoglobuli can be observed (Bréhélin & Kessler, 2008; Grennan, 2008). Although plastoglobuli content in chloroplasts could be linked to plant senescence (Kutík, 1998), this may not be the case since all leaf samples collected were visually healthy and green. However, it is possible that this characteristic can be due to the high-light stress environment of these plants and linked also to plant defenses against fungal infection (Fank-de-Carvalho & Bão, not published). Plastoglobuli are now recognized as lipoprotein structures which play an active role in plastids (Greenan, 2008). Lipid and protein storage inside the chloroplasts could favor plants' fatty acid regulation, unsaturation and mobilization in response to the stress caused by biotic interactions,

especially due to the presence of plastoglobulin among its proteins (Bréhélin & Kessler, 2008; Upchurch, 2008).

The anatomy and ultrastructure of leaves from the species studied have a pattern that has already been described for other Amaranthaceae members, except for *Hebanthe* and *Froelichiella* genera, which are described here for the first time.

The presence of a well defined and complete parenchymatous bundle sheath with centripetous organelles, as well the presence of stomata on both epidermis surfaces, supports the intermediate C₃-C₄ photosynthetic pathway for *A. paronychioides*. A key element in this species is the bundle sheath with rounder cells and centripetous organelles, against the less defined shape and peripheral organelles of the same cells in *A. brasiliensis*. The peripheral organelles of the palisade, spongy and bundle sheath cells, the similarity of cell wall thickness in all tissues and the loose arrangement of mesophyll around the bundle sheath indicate a C₃ metabolism for *A. brasiliensis*. The anatomy of *A. brasiliensis* leaf, a medicinal species called “penicilina” or “terramicina”, is consistent with the study of Howart-Delaporte *et al.* (2002), which reports its trichomes as ornamented and nonglandular, similar to the larger ones of *G. arborescens* (Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro, 2005) and other Amaranthaceae species (Handro, 1964; Fank-de-Carvalho *et al.*, 2010). Leaves of *A. sessilis* and *A. tenella*, both medicinal species, also have hairy leaves with dorsiventral mesophyll and druses in idioblasts (Mussury *et al.*, 2008). The anatomy of *A. paronychioides* leaf, an ornamental species called “periquito”, is consistent with data and drawings of Rajendrudu *et al.* (1986) who, based on its leaf anatomy, CO₂ compensation point and activity of key photosynthetic enzymes determined the intermediate C₃-C₄ metabolism, but did not mention stomata on both epidermis surfaces. This anatomical character is considered necessary for lower values of mesophyll resistance, helping to reduce the CO₂ compensation point (Parkhurst, 1978). *A. brasiliensis* (‘infalível’) is a medicinal plant used by people from almost all regions of Brazil (Lorenzi & Matos, 2002) and *A. paronychioides* (syn=*A. ficoidea*) is an ornamental species widely used in Brazilian gardens (Lorenzi & Souza, 1995).

The anatomy and ultrastructure of *F. grisea*, *H. eriantha*, *P. glomerata* and *P. townsendii* are compatible with the C₃ pathway of photosynthesis. The *Pfaffia* leaf species

described has anatomy and ultrastructure similar to *P. jubata* leaf (Estelita-Teixeira & Handro, 1984). This is the first study of this type concerning the leaves of all the four species. *P. glomerata* and *H. eriantha* (syn=*P. paniculata*) are medicinal species whose roots are widely used in Brazil, known as Brazilian ginseng (Lorenzi & Matos, 2002). According to a carbon isotope ratio study (Sage *et al.*, 2007), all the *Pfaffia* species studied are C₃.

The anatomy and ultrastructure of the six *Gomphrena* species studied are compatible with the NADP-ME subtype of C₄ pathway of photosynthesis. While *G. pohlii* and *G. virgata* have a more classical type of Kranz anatomy, *G. arborescens*, *G. hermogenesii*, *G. lanigera* and *G. prostrata* have the same type of Kranz anatomy found in most *Gomphrena* species (Handro, 1964; Carolin *et al.*, 1978; Estelita-Teixeira & Handro, 1984; Ueno, 1998; Muhaidat *et al.*, 2007). Their anatomy and ultrastructure are very similar to those of *G. globosa*, whose ultrastructure, enzyme immunolocalization and biochemical assays indicate the NADP-ME subtype of C₄ pathway (Carolin *et al.*, 1978; Ueno, 1998; Muhaidat *et al.*, 2007). According to Carolin *et al.* (1978), *Gomphrena celosioides*, *G. conica*, *G. brachystylis*, *G. brownii*, *G. flaccida* and *G. canescens* have leaves with a radial adaxial mesophyll and a less distinctly radial abaxial mesophyll with large air spaces and some additional layers of spongy mesophyll cells between the abaxial epidermis; Kranz cells form a complete parenchymatous bundle sheath with centripetous chloroplasts presenting rudimentary grana. The leaf anatomy of *G. arborescens* (syn=*G. officinalis*), *G. pohlii* and *G. prostrata* is consistent with the one described by Handro (1964). Estelita-Teixeira & Handro (1984) studied the leaf ultrastructure of *Gomphrena macrocephala*, *G. prostrata* and *G. decipiens*, all native to the Brazilian Cerrado Biome, establishing a gradual chloroplast polymorphism as typical of the NADP-ME subtype of the C₄ pathway. The similar anatomy and ultrastructure of *Aerva persica*, an Amaranthaceae C₄ species with NADP-ME subtype of photosynthesis, was classified as “atriplicoid” (Muhaidat *et al.*, 2007), due to the presence of a complete or nearly complete bundle sheath primarily responsible for carbon reduction in photosynthesis. Kadereit *et al.* (2003) classified the same structure found in another species of this genus as *Gomphrena*-type Kranz anatomy; they also put into this category species from the Amaranthaceae genera *Alternanthera*,

Blutaparon, *Froelichia*, *Guilleminea* and *Tidestomia*. Chloroplasts of the Kranz cells of C₄ plants usually have no grana, present little PSII activity and a larger amount of starch (Buchanan *et al.*, 2000) while, in C₃ plants, the palisade cells show a larger amount of starch than the ones of the spongy parenchyma (Lewis, 1984). The species *G. arborecens* and *G. pohlii* (called “paratudo-do-campo” and “paratudo-amarelinho”, respectively) are used as medicinal plants by inhabitants of the Cerrado Biome, especially their large tuberous roots (Barros, 1982; Siqueira, 1987, 1988).

Along with the *Gomphrena-atrilocoid* type of Kranz anatomy and dimorphic chloroplasts, the rarity of peroxisomes indicates that *G. hermogenesii* performs the C₄ pathway of photosynthesis. In this species, the CO₂ concentration in the bundle sheath cells must be efficient, leading to a significant reduction in the oxygenase function of its RuBisCO enzyme, making it virtually free of photorespiration. On the other hand, the presence of peroxisomes in *Alternanthera*, *Froelichiella*, *Hebanthe* and *Pfaffia* spp. leaf cells is consistent with the use of the C₃ pathway of photosynthesis. Peroxisomes in plant leaves, acting in close contact with chloroplasts and mitochondria, participate in the glycolate pathway in order to recover to the Calvin cycle part of the carbon lost during photorespiration (Laetsch, 1974; Mauseth, 2009). According to the carbon isotope ratio study (Sage *et al.*, 2007), five of the *Gomphrena* species studied are C₄, but *G. hermogenesii* was considered a C₃ species.

Mesophyll chloroplasts of *G. arborecens*, *G. pohlii* and *G. virgata* and bundle sheath chloroplasts of *A. brasiliiana* have a peripheral reticulum of vesicles, similar to the one demonstrated in *Amaranthus edulis* chloroplasts of mesophyll and bundle sheath cells (Laetsch, 1968), but less conspicuous. This structure was not found in any of the other species analyzed. These findings indicate that a peripheral reticulum is not a common feature just in C₄ plants, since *A. brasiliiana* has all the structural characteristics of a C₃ plant and a carbon isotope ratio study also determined the same photosynthesis metabolism for it (Sage *et al.*, 2007). The peripheral reticulum (PR) was defined as a network of tubules leading from the interior of the plastid to the space between the limiting membranes, as an adaptation for rapid transport (Laetsch, 1968). Later, Laetsch (1974) stated that PR was not affected by fixation in glutaraldehyde or osmium tetroxide, but could be destroyed by

KMnO₄ fixation, suggesting that PR composition is different from that of thylakoids and plastid envelopes. Although structural chloroplast dimorphism was not a common feature in all C₄ plants, PR was found in all the C₄ plants described up to the time of these studies, being always more evident in mesophyll chloroplasts (Laetsch, 1974).

Amaranthaceae species are hard to find in the field and it is difficult to distinguish the species only by morphology, especially in vegetative stages. This later aspect demands extra care when dealing with native species, collected directly from the field. Another frequent problem in studying this family is the delimitation of a species even by experts on the family, because of plant plasticity, and related synonym problems. The species *Gomphrena officinalis* Mart. was considered a valid synonym for *G. macrocephala* and for *G. arborescens* until 1985 (Siqueira, 1984, 1992). However, after examining the species' holotype deposited in the Linnean Herbarium under number 319-3, Siqueira reconsidered his opinion and recognized the validity of the first species' given name, *G. arborescens*, described by Linnaeus' son in 1781, and started to use the name *G. arborescens* L.f. instead of *G. officinalis*. More than that, he recognized *G. macrocephala* as a distinct species. Nowadays, *G. officinalis* is a valid synonym only for *G. arborescens* (Siqueira, 1992). Some studies have been carried out on *G. macrocephala*, citing the species as *G. officinalis* (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1982; Figueiredo-Ribeiro, 1993), which could lead to mistaken references. The carbon isotope ratio study (Sage *et al.*, 2007) indicates C₄ metabolism for *G. arborescens*, *G. officinalis* and *G. macrocephala* (two different species and three given informations), based on Herbaria data. According to the same study, *A. brasiliana* is a C₃ species and *A. paronychioides* is a C₄ species. However, *A. paronychioides* is considered a synonym for *A. ficoidea* (Marchioretto, 2009; Marchioretto *et al.*, 2010) and it was determined as an intermediary C₃-C₄ species. This is more than enough to recommend the storage of control material in registered Herbaria and to consult taxonomy experts in all studies about native Amaranthaceae species, ensuring their best identification.

In this work at least one anatomical difference was found among the *Alternanthera* species studied that can be linked to the classification of one (*A. paronychioides*) as a C₃-C₄ intermediary plant and the other (*A. brasiliana*) as a C₃ species: the former has the bundle sheath organelles positioned towards the vascular bundles while the latter has peripheral

positioned organelles in bundle sheath cells. Anatomy and ultrastructure of twelve Amaranthaceae species found in the Cerrado Biome determined the presence of a structural base for the performance of C₄ photosynthesis subtype NADP-ME in all the six studied *Gomphrena* species (*G. arborescens*, *G. hermogenesii*, *G. lanigera*, *G. pohlii*, *G. prostrata* and *G. virgata*). The other studied species (*Froelichiella grisea*, *Hebanthe eriantha*, *P. glomerata* and *P. townsendii*) have a leaf structure compatible with C₃ metabolism.

Acknowledgment: The authors are grateful to the staff of the Electronic Microscopy Laboratory of the University of Brasília, where the work was carried out. CAPES, CNPq and FINEP are gratefully acknowledged for financial support. Thanks go to IBGE/RECOR, OCA Brasil/RPPN Cara Preta, EMBRAPA/Cenargen and to Dr. Jean Kleber/UnB for allowing research in protected areas and for providing the specimens studied. We are very grateful to Dra. Maria Salete Marchioretto for species identification.

REFERENCES

- Barros, M.G.A.E. 1982. Plantas medicinais – usos e tradições em Brasília – DF. **Oréades** 8(14/15): 140-149.
- Borsch, T; Clemants, S; Mosyakin, S. 2001. Symposium: Biology of the Amaranthaceae-Chenopodiaceae alliance. **Journal of the Torrey Botanical Society** 128(3): 234-235.
- Bréhelin, C.; Kessler, F. 2008. The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. **Photochemistry and Photobiology** 84(6): 1388-1394.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. U.S.A: American Society of Plant Physiologists.
- Carolin, R.C.; Jacobs, S.W.L.; Veski, M. 1978. Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. **Australian Journal of Botany** 26: 683-698.
- Coutinho, L.M. 1980. As queimadas e seu papel ecológico. **Brasil Florestal** 10(44): 7-23.
- Dias, B.F.S. (coord.). 1992. **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. FUNATURA/IBAMA, Brasília.
- Edwards, G.E.; Franceschi, V.R.; Ku, M.S.B.; Voznesenskaya, H.V.; Pyankov V.I.; Andreo, C.S. 2001. Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C₄ plants. **Journal of Experimental Botany** 52(536): 577-590.
- Edwards, G.E.; Franceschi, V.R.; Voznesenskaya, H.V. 2004. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. **Annual Review of Plant Biology** 55: 173-196.
- Eiten, G. 2001. **Vegetação natural do Distrito Federal**. SEBRAE/UnB, Brasília.
- Estelita-Teixeira, M.E.; Handro W. 1984. Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Canadian Journal of Botany** 62: 812-817.
- Fank-de-Carvalho, S.M.; Bão, S.N. *in press*. Natural fungi colonization in plant leaves of Cerrado's Amaranthaceae family. **Brazilian Journal of Microbiology** – submitted.
- Fank-de-Carvalho, S.M.; Gomes, M.R.A.; Silva, P.I.T.; Bão, S.N. 2010. Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. **Biocell** 34 (1), 23-35.
- Fank-de-Carvalho, S.M.; Marchioretto, M.S.; Bão, S.N. 2010b. Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae encontradas na Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, Goiás, Brasil. **Biota Neotropica**, 10(4): 000-000, *on line*.
- Fank-de-Carvalho SM, Graciano-Ribeiro, D. 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). **Acta Botanica Brasileira** 19(2): 379-392.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1993. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 5(2): 203-208.

- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Dietrich, S.M.C.; Carvalho, M.A.M.; Vieira, C.C.J.; Isejima, E.M.; Dias-Tagliacozzo, G.M.; Tertuliano, M.F. 1982. As múltiplas utilidades dos frutanos – reserva de carboidratos em plantas nativas do cerrado. **Ciência Hoje** 14(84): 16-18.
- Gutschick VP. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure – research reviews. **New Phytologist** 143: 3-18.
- Grennan, A.K. 2008. Plastoglobule proteome. **Plant Physiology** 147: 443-445.
- Handro W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das amarantáceas dos cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 36(4): 479-499.
- Howart Delaporte, S.; Milaneze, M.A.; Palazzo de Melo, J.C.; Jacomassi, E. 2002. Estudo farmacognóstico de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense** 21(3): 169-174.
- Jorge, L. I. F. 2000. **Botânica aplicada ao controle de qualidade de alimentos e de medicamentos**. São Paulo: Ed. Atheneu.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellog, E.A.; Stevens, P.F. 2002. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Kadereit, G.; Borsh, T.; Weising, K.; Freitag, H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C₄ photosynthesis. **International Journal of Plant Sciences** 164 (6), 959-986.
- Kraus, J.E.; Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR.
- Klink, C.A.; Machado, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade** 1(1): 147-155.
- Kutík, J. 1998. The development of chloroplast structure during leaf ontogeny. **Photosynthetica** 35 (4), 481-505.
- Laetsch, W.M. 1968. Chloroplast specialization in dicotyledons possessing the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthetic CO₂ fixation. **American Journal of Botany** 55(8): 875-883.
- Laetsch WM. 1974. The C₄ syndrome: a structural analysis. **Annual Review of Plant Physiology** 25: 27-52.
- Lewis, D.H. 1984. Occurrence and distribution of storage carbohydrates in vascular plants. In: Lewis DH, ed. **Storage carbohydrates in vascular plants**. Seminar Series 19, Cambridge: Cambridge University Press/Society for Exp. Biology, 1-52.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Lorenzi, H.; Souza, H.M. 1995. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Editora Plantarum.

- Malkin, R.; Niyogi, K. 2000. Photosynthesis. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. U.S.A.: American Society of Plant Biologists, 568-628.
- Marchioreto, M.S. 2009. **Personal communication** – plant species identification and actual valid names. Curator of PACA Herbarium, at Universidade Vale dos Sinos, in São Leopoldo, Rio Grande do Sul State, Brazil. E-mail: herbariopaca@unisinos.br
- Marchioreto, M.S., Senna, L., Siqueira, J.C. de. 2010. **Amaranthaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000042> (acesso em 12/06/2010).
- Mauseth, J.D. 2009. **Botany - an introduction to plant biology**, 4th ed. Jones & Bartlett Publishers, Sudbury.
- Miranda, H. & Miranda, A.C. 2000. Queimadas e estoques de carbono no Cerrado. Pp. 75-81. In: Moreira, A.G.; Schwartzman, S. (eds.). **As Mudanças Climáticas e os Ecossistemas Brasileiros**. Brasília: Editora Foco.
- Mittermeier, R.A.; Myers, N.; Mittermeier, C.G. 1999. **Hotspots. Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions**. Mexico City: CEMEX & Conservation International.
- Muhaidat, R.; Sage, R.F.; Dengler, N.G. 2007. Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C₄ eudicots. **American Journal of Botany** 94(3): 362-381.
- Mussury, R.M.; Silva, M.A.; Betoni, R.; Scanlon, S.P.Q.; Felipe-de-Melo, A.M.M.M. 2008. Contribuição ao estudo farmacobotânico de *Alternanthera sessilis* (L.) DC e *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 89(3): 189-193.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853-858.
- Paiva, P.H.V. 2000. A Reserva da Biosfera do Cerrado: fase II. PP. 332-334. In: Cavalcanti, T. B.; Walter, B.M.T. (Eds), **Tópicos atuais em botânica - palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica**. Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen, Brasília.
- Parkhurst, D. F. 1978. The adaptive significance of stomatal occurrence on one or both surfaces of leaves. **Journal of Ecology** 66: 367-383.
- Press, M.C. 1999. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations – research reviews. **New Phytologist** 143: 213-219.
- Rajendrudu, G.; Prasad, J.S.R.; Rama Das, V.S. 1986. C₃-C₄ species in *Alternanthera* (Amaranthaceae). **Plant Physiology** 80: 409-414.
- Ratter, J.A.; Ribeiro, J.F.; Bridgewater, S. 2000. Woody flora distribution of the Cerrado Biome: phytogeography and conservation priorities. Pp. 340-342. In: Cavalcanti, T. B.; Walter, B. M. T. (Eds). **Tópicos atuais em botânica – palestras convidadas do 51º**

Congresso Nacional de Botânica. Brasília, Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen.

Sage, R.F. 2002. C₄ photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy. **Trends in Plant Science** 7: 283-285.

Sage R.F.; Monson, R.K. (eds). 1999. **C₄ Plant Biology**. United States of America: Academic Press.

Sage, R.F.; Sage, T.L.; Pearcy, R.W.; Borsch, T. 2007. The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis in *Amaranthaceae sensu stricto*. **American Journal of Botany** 94 (12): 1992-2003.

Siqueira, J.C. 1984. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) nos cerrados do Brasil. **Acta Biologica Leopoldinensia** 1(2): 183-194.

Siqueira, J.C. 1987. Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. **Acta Biologica Leopoldinensia** 9(1): 99-110.

Siqueira, J.C. 1988. **Planta Medicinais – identificação e uso das espécies dos cerrados**. São Paulo: Edições Loyola.

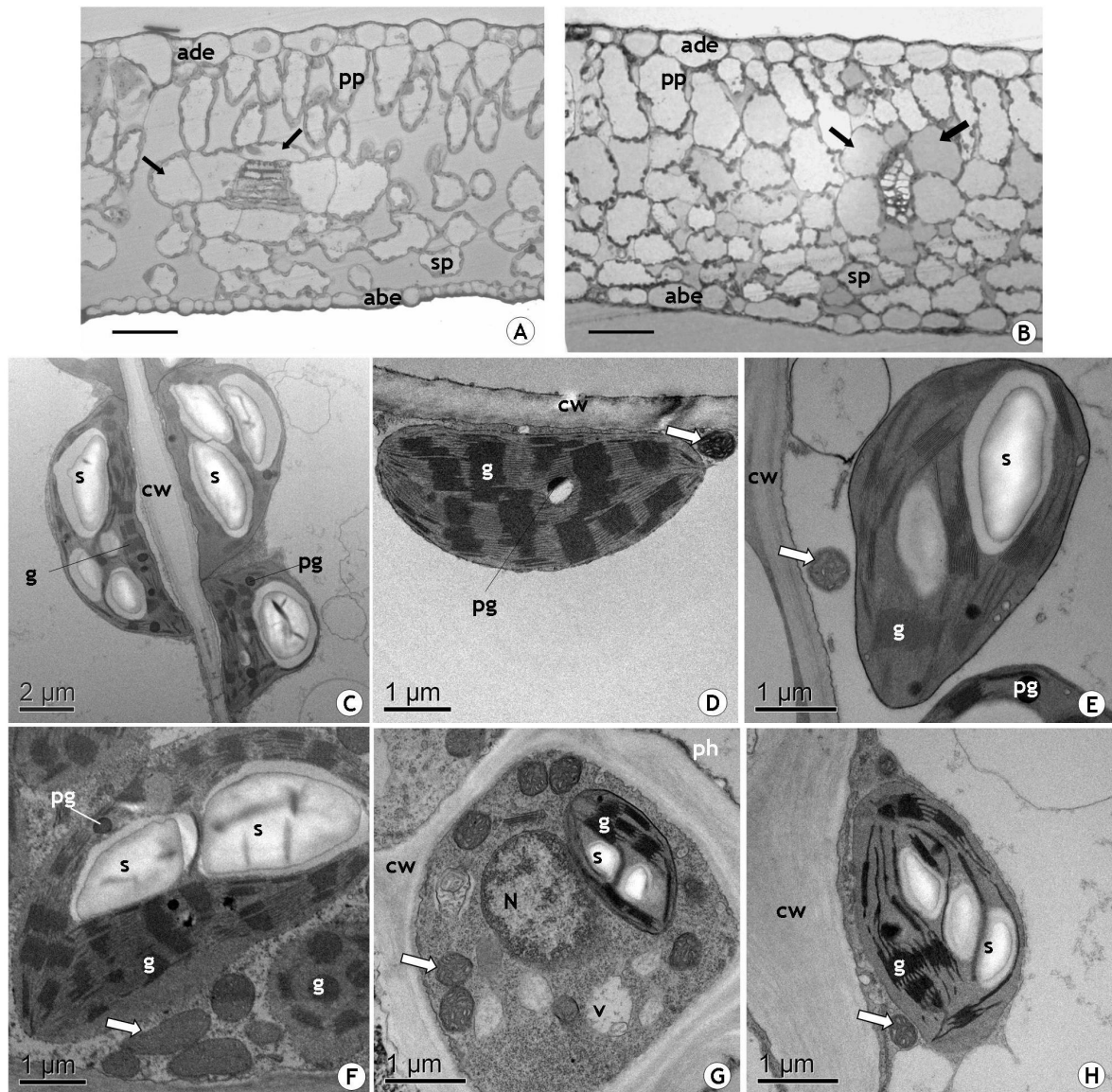
Siqueira, J.C. 1992. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. **Pesquisas, Botânica** 43: 5-197.

Simon, M.F.; Proença, C. 2000. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation** 96, 279-296.

Ueno, O. 1998. Immunogold localization of photosynthetic enzymes in leaves of various C₄ plants, with particular reference to pyruvate orthophosphate dikinase. **Journal of Experimental Botany** 49(327): 1637-1646.

Upchurch, R.G. 2008. Fatty acid insaturation, mobilization and regulation in the response of plants to stress. **Biotechnology Letters** 30: 967-977.

Voznesenskaya, E.V.; Edwards, G.E.; Kiirats, O.; Artyusheva, E.G.; Franceschi, V.R. 2003. Development of biochemical specialization and organelle partitioning in the single-cell C₄ system in leaves of *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae). **Annals of Botany** 90(12): 1669-1680.



Legend: arrowhead (stoma); black arrow: bundle sheath cell; white arrow: mitochondrion; white circle: idioblast with a druse; abe: abaxial epidermis; ade: adaxial epidermis; cc: companion cell; cw: cell wall; g: granum; N: nucleus; n: nucleolus; p: peroxisome; pg: plastoglobuli; pp: palisade parenchyma; pr: peripheral reticulum; s: starch granule; sp: spongy parenchyma; st: sieve tube element.

Figure 1A-H. *Alternanthera* species. Fig. A-B: Transverse section of *A. brasiliana* and *A. paronychioides* leaves under optical microscope (OM). Bar = 50 μm. **Fig. C-H:** Micrographs under a transmission electron microscope (TEM). **Fig. C:** *A. brasiliana* palisade parenchyma cells. **Fig. D:** *A. paronychioides* spongy parenchyma cell. **Fig. E:** *A. brasiliana* bundle sheath cell. **Fig. F:** *A. paronychioides* bundle sheath cell. **Fig. G:** *A. brasiliana* phloem companion cell. **Fig. H:** *A. brasiliana* guard cell of a stoma.

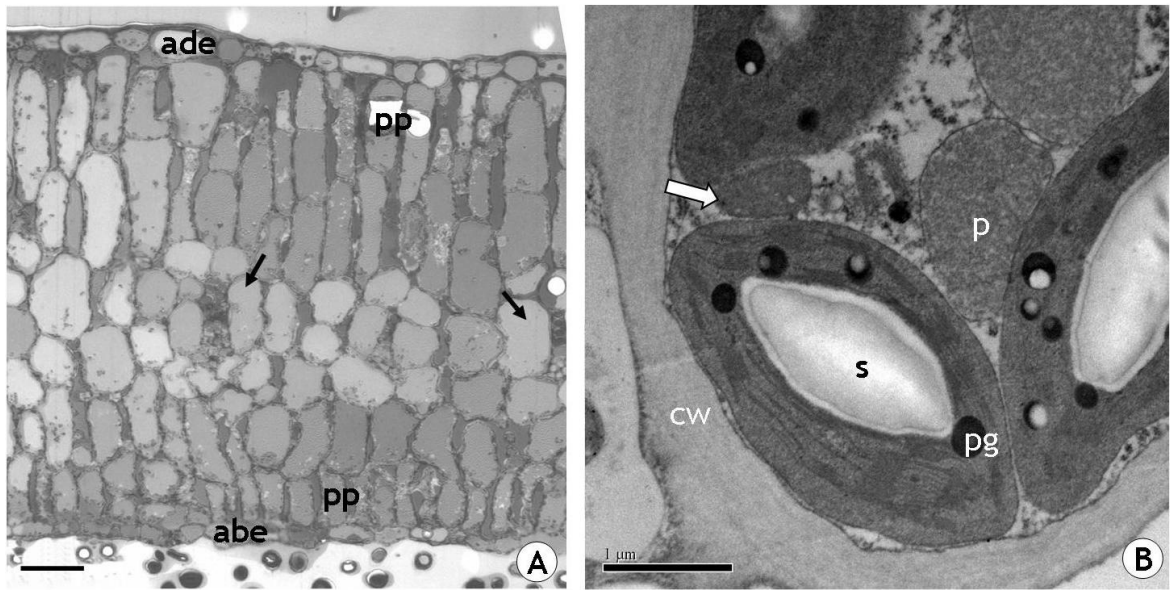


Figure 2A-B. *Froelichiella* specie. Fig. A: Transverse section of *F. grisea* leaf under OM. Bar = 50 μ m. Fig. B: Organelles of *F. grisea* mesophyll cell under TEM.

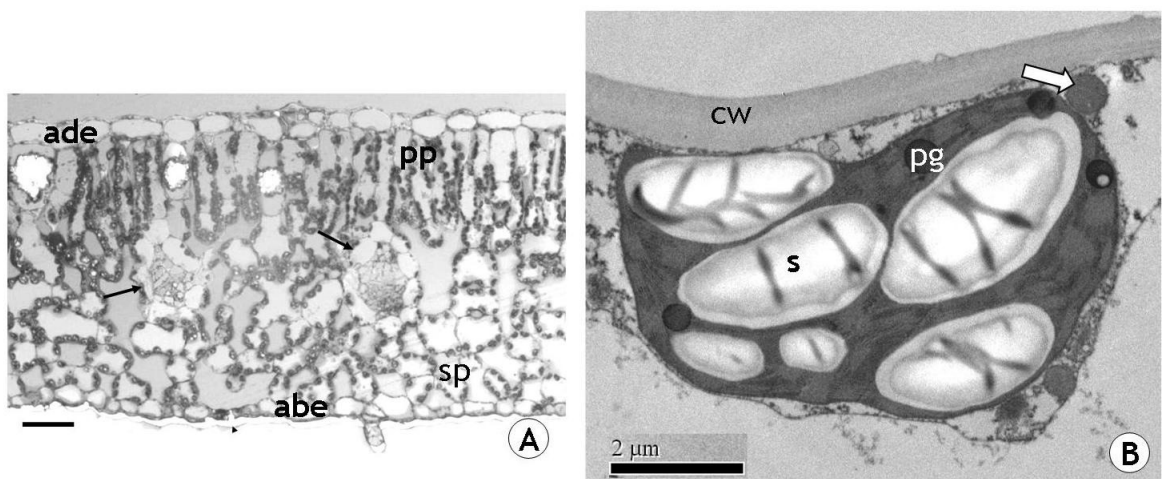


Figure 3A-B. *Hebanthe* specie. Fig. A: Transverse section of *H. eriantha* leaf under OM. Bar = 50 μ m. Fig. B: Organelles of *H. eriantha* bundle sheath cell under TEM.

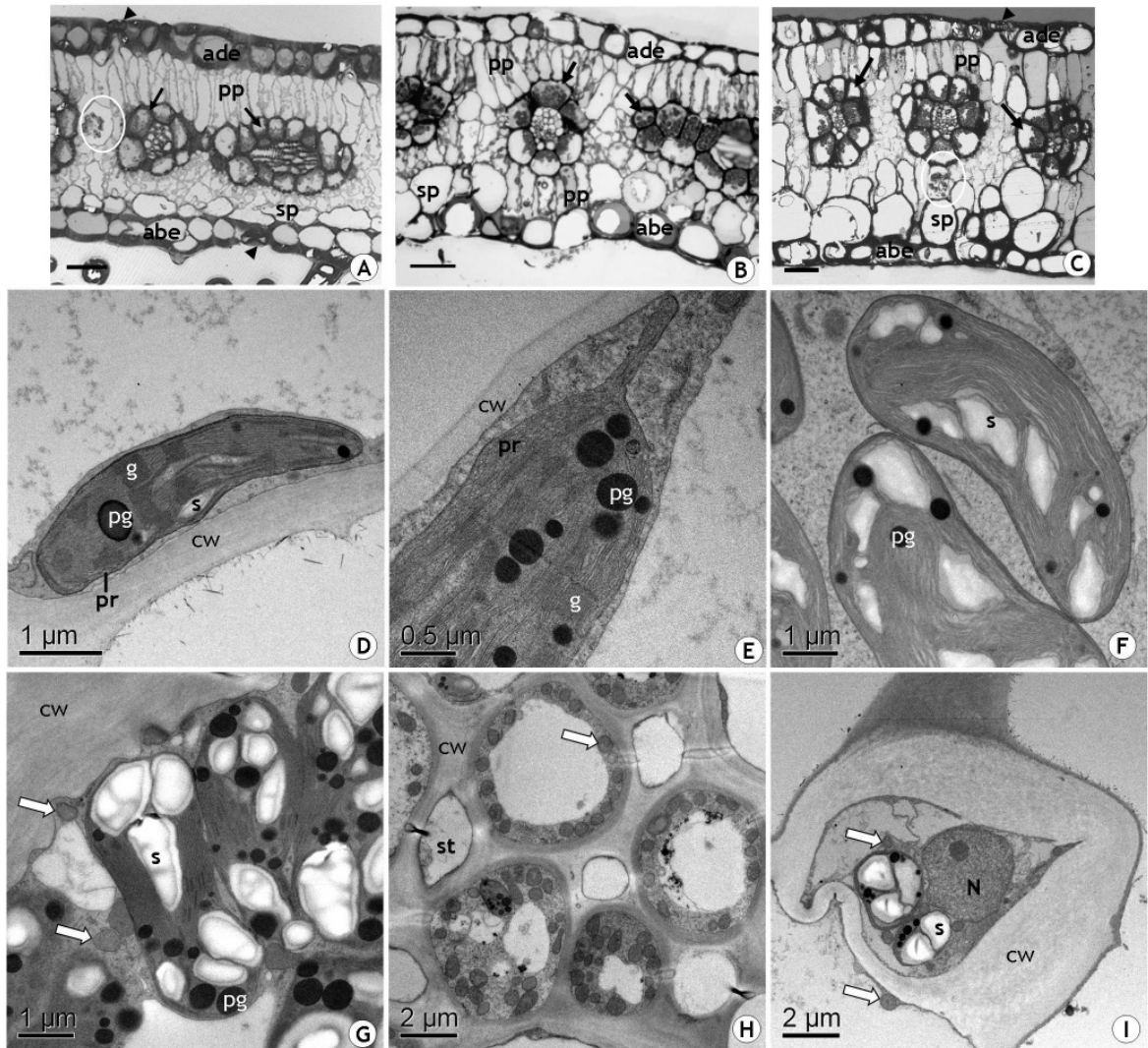


Figure 4A-I. *Gomphrena* species. Fig. A-C: Leaf transverse section under OM. Bar = 50 μm. **Fig. A:** *G. hermogenesii*. **Fig. B:** *G. pohlii*. **Fig. C:** *G. virgata*. **Fig. D-I:** Micrographs under TEM. **Fig. D:** Chloroplast of *G. arborescens* spongy parenchyma. **Fig. E:** Chloroplast with extended peripheral reticulum in *G. pohlii* palisade parenchyma cell. **Fig. F:** Agranal chloroplasts in *G. arborescens* bundle sheath cell. **Fig. G:** Chloroplasts with rudimentary grana in *G. virgata* bundle sheath cell. **Fig. H:** Phloem cells in *G. virgata* vascular bundle. **Fig. I:** Transverse section of a stoma guard cell of *G. pohlii* leaf.

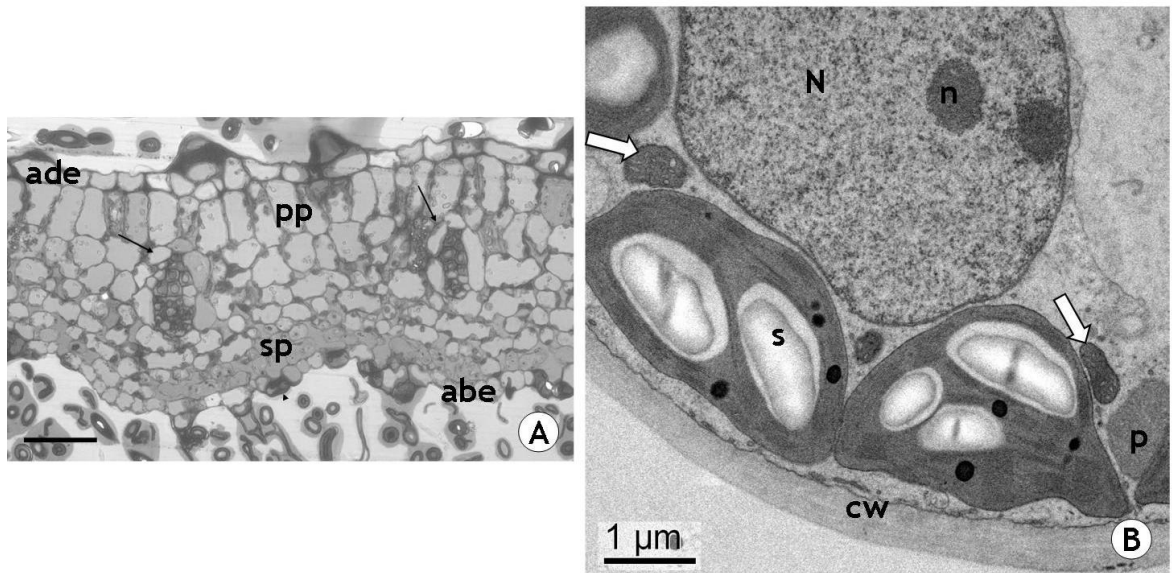


Figure 5A-B. *Pfaffia* species. Fig. A: Transversal section of *P. townsendii* leaf under OM. Bar = 50 μm . **Fig. B:** Organelles of *P. glomerata* spongy parenchyma cell under TEM.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A família Amaranthaceae representa um desafio para o estudo das espécies nativas do Cerrado. Seu comportamento fenológico pode ser considerado atípico em relação ao encontrado na maioria das espécies de plantas, que no período de um ano, após a maturidade, geralmente completam um ciclo reprodutivo (floração, frutificação e dispersão). Embora a maioria das espécies seja perene, suas porções aéreas podem ser persistentes ao longo do ano e as folhas podem ser permanentes ou descartadas até mesmo antes da floração, especialmente durante o período de auge da seca. Algumas espécies têm clara dependência da ocorrência de fogo para a rebrotação de suas porções aéreas, a partir de sistemas subterrâneos bem desenvolvidos e, geralmente, com xilopódios. Também pode haver dependência do fogo para a floração ou para a frutificação. Outro aspecto interessante é a rapidez com que pode ocorrer a rebrotação das porções aéreas, seguida de floração e dispersão dos frutos: em *G. lanigera*, todo esse ciclo foi completado em cerca de 20 dias após ocorrência de fogo. O comportamento pirofítico das espécies favorece o estabelecimento pioneiro das mesmas, principalmente nas áreas abertas do Cerrado. Os levantamentos de flora podem acabar negligenciando as espécies dessa e de outras famílias que dependem da ocorrência de fogo, quando realizados em locais ou épocas em que não há incêndios no cerrado. Os dados descritos no artigo 2.1 corroboram nossa hipótese inicial e apontam para a necessidade de alterações nos procedimentos usuais de levantamento de flora, a fim de que outras espécies, não necessariamente da família Amaranthaceae, mas com semelhante comportamento fenológico, possam ser coletadas e listadas como presentes, especialmente em áreas de preservação permanente. Neste sentido, sugere-se que as áreas de preservação onde ocorreu fogo sejam acompanhadas mensalmente, pelo período mínimo de um semestre, para observação, coleta e descrição do comportamento de espécies pirofíticas. Além disso, sugere-se que o período mínimo de acompanhamento de qualquer área, para levantamento botânico preliminar, seja de dois anos, com coletas mensais ou bimensais. Além disso, levantamentos de flora seriam mais efetivos se fosse possível contar com grupos de coletores especialistas em diferentes famílias, a fim de tentar realizar a identificação das espécies, em campo, através de exemplares em estágio vegetativo,

marcando as localizações das mesmas em GPS para coleta e confirmação de espécies do grupo de interesse quando da floração. Sugere-se, inclusive, que exemplares em estágio vegetativo também sejam coletados e depositados em herbários, desde que garantida a identificação das espécies, de preferência com ilustrações fotográficas do ambiente e do espécime coletado, para compor um banco de dados virtual correlacionado às espécies. A melhoria das coletas e da ilustração das espécies deve, sobremaneira, auxiliar novos pesquisadores interessados em diferentes famílias da flora brasileira.

A presença de cera epicuticular do tipo plaquetas, orientadas paralelamente, em algumas espécies de *Gomphrena* (artigo 2.2) reforça a relação filogenética entre Chenopodiaceae e Amaranthaceae, atualmente tratadas como apenas uma família (Amaranthaceae). Corroborar, também, nossa hipótese inicial, uma vez que as espécies do gênero *Gomphrena*, nativas do Cerrado Brasileiro, demonstraram presença de esculturas de cera epicuticular. Essas esculturas podem ser marcadores de variação estrutural relacionada ao ambiente, indicando a necessidade de ampliação de pesquisas micromorfológicas em Amaranthaceae *sensu stricto*. A presença de cristais de cera epicuticular não representa uma barreira efetiva contra a infecção fúngica, embora possa dificultar/retardar a penetração das hifas através das células epidérmicas comuns. O estudo do padrão de distribuição da cera epicuticular em espécies nativas deve ser complementado pelo estudo em espécimes cultivados, pois a presença de hifas fúngicas é constante nas superfícies de espécies do Cerrado. Durante a interação com as plantas, os fungos são capazes de dissolver os cristais de cera epicuticular, dificultando a análise de seu padrão de distribuição, cuja forma e localização são consideradas de valor taxonômico. Desta forma, é importante reduzir o impacto desta variável ambiental (as recorrentes infecções fúngicas), analisando também amostras de ambientes estéreis (estufa, cultivo).

Os solventes geralmente utilizados para a completa desidratação das amostras a serem estudadas sob microscopia eletrônica de varredura (acetona e etanol) podem dissolver, também, os cristais de cera epicuticular. Diferentes solventes afetam diferentemente os cristais de diferentes espécies (vide artigo 2.2), sugerindo que em espécies do mesmo gênero, a cera epicuticular pode ter composição química diferenciada. Assim, para o estudo estrutural é fundamental o estabelecimento de material controle, não

submetido aos solventes químicos usuais. Para este estudo, foi escolhida como controle uma amostra simples, coletada e fixada sobre o portaespécime, secada naturalmente, apenas com adição de sílica no dessecador para garantir a absorção da umidade do ambiente.

Os estudos da interrelação com microorganismos devem ser intensificados em espécies da família *Amaranthaceae*, conhecida por espécies de utilização medicinal comprovada (como as espécies de ginseng-brasileiros, *Hebanthe eriantha* e *Pfaffia glomerata*) e popular (como as espécies para-tudo, cujas raízes são consideradas tônicas e febrífugas, *Gomphrena arborescens* e *G. pohlii*), e por sua toxicidade na dieta de herbívoros (o caruru, *Amaranthus* spp.). Os estudos ultraestruturais, se conjugados com o isolamento do elemento de colonização e/ou infecção, demonstram potencial para a descrição de novas espécies de microorganismos. O protocolo de fixação e infiltração utilizado para estudos de microscopia eletrônica de transmissão em vegetal se mostrou suficiente para estudos ultraestruturais de fungos colonizando folhas (artigo 2.3). Além disso, a realização de estudos ultraestruturais em espécies vegetais de interesse médico e/ou veterinário pode auxiliar no controle de qualidade das amostras e na determinação da presença de potenciais contaminantes, também produtores de metabólitos (como fungos) capazes de produzir efeitos curativos e/ou tóxicos. Embora os fungos aqui descritos sejam colonizadores de folhas, usualmente consumidas pelos animais de pastagem, elementos fúngicos também foram encontrados nos tecidos vasculares das plantas, indicando que há potencialidade para sua presença também nos órgãos subterrâneos, usualmente utilizados como medicinais.

As espécies do Cerrado, nativas de áreas abertas, tendem a ter uma cutícula mais desenvolvida e células da bainha vascular com paredes mais espessas, pelo menos no gênero *Gomphrena*. A espessura da cutícula, entretanto, não está somente relacionada à duração das folhas, uma vez que a espécie com folhas de menor tempo de duração (*G. lanigera*) também apresenta cutícula grossa, além de também possuir as mais espessas paredes nas células da bainha vascular. Essas características (cutícula e paredes celulares espessas), somadas à presença ou não de lignina e outras substâncias graxas impregnadas nas paredes celulares, bem como a anfiestomia e largos espaços intercelulares, dificulta tanto a fixação quanto a correta embebição das amostras em resinas para estudos

anatômicos e ultraestruturais. Em razão dessas dificuldades, foram desenvolvidos pelo menos dois protocolos diferenciados para a embebição dos tecidos para microscopia eletrônica de transmissão (anexos 2 e 3). Além disso, o tempo de fixação das amostras foi elevado para cerca de 24h, dando mais tempo para a penetração das soluções fixadoras nos tecidos. Outro aspecto fundamental é providenciar a completa submissão das amostras na solução fixadora (com auxílio de vácuos baixos, se possível, ou utilização de êmbolos – pedaços de papel filtro, usualmente – para empurrar os tecidos para o fundo do frasco). As amostras foliares de algumas espécies tendem a flutuar também durante a embebição em resina, provavelmente em função das bolhas de ar que permanecem dentro dos espaços intercelulares. Neste sentido, a utilização da substituição do solvente (acetona ou etanol) por óxido de propileno, previamente ao início da embebição em resina, auxiliou bastante na preparação das amostras mais difíceis (anexo 3), provavelmente por auxiliar a retirada total da água dos tecidos e, também, por ser muito volátil, auxiliar na exclusão do ar armazenado nos espaços intercelulares.

A anatomia foliar e a ultraestrutura das espécies estudadas apresentam um padrão similar ao descrito para outras espécies da família *Amaranthaceae*, exceto para os gêneros *Hebanthe* e *Froelichiella*, cujas descrições anatômicas e ultraestruturais foram realizadas pela primeira vez. Entretanto, ainda há diversas espécies que não foram estudadas sob ponto de vista estrutural e não há garantias de que padrões similares sejam encontrados em todas as espécies. Desta maneira, sugere-se a continuidade do estudo, com a inclusão de outros gêneros e espécies, bem como a realização adicional de testes histoquímicos para ampliar o conhecimento sobre os componentes do metabolismo secundário que são freqüentes na família. A ampliação dos estudos histoquímicos se justifica não apenas pelo ponto de vista estrutural, mas também para nortear estudos fitoquímicos, uma vez que muitas espécies da família são utilizadas como medicinais; há casos de efeito medicinal já comprovado.

Embora aumente a exposição dos tecidos internos ao dióxido de carbono, a anfiestomia foliar não está, necessariamente, relacionada com a ocorrência do metabolismo C_4 (vide artigos 2.1 e 2.4). Das doze espécies estudadas, onze são anfiestomáticas, seis possuem anatomia e ultraestrutura compatível com o metabolismo C_4 subtipo NADP-ME

(todas as espécies do gênero *Gomphrena*), pelo menos uma é bioquimicamente reconhecida como intermediária C₃-C₄ (*Alternanthera paronychioides*), e as demais possuem anatomia e ultraestrutura compatível com o metabolismo C₃. Entretanto, a evolução do metabolismo C₄ pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao desenvolvimento da anfiestomia associada à maior espessura do limbo foliar em espécies herbáceas. A anfiestomia pode ter sido desenvolvida para aumentar a exposição dos tecidos internos ao dióxido de carbono, favorecendo a absorção do carbono pelos tecidos mais internos, próximos ao sistema vascular. Neste sentido, a anfiestomia é, provavelmente, um elemento que contribuiu significativamente para a evolução do metabolismo C₄.

Pelo menos uma espécie de metabolismo intermediário C₃-C₄ foi analisada (artigo 2.4). Foi possível caracterizar a anatomia Kranz em suas folhas, com uma bainha parenquimática completa, bem como anfiestomia. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os cloroplastos do mesofilo e da bainha vascular. Assim, o elemento chave para a ocorrência do metabolismo intermediário parece ser a aglomeração das organelas nas paredes vizinhas ao feixe vascular das células da bainha, único diferencial da espécie intermediária (*A. paronychioides*) em relação às demais espécies C₃. Tendo em vista que todas as espécies C₄ deste estudo também apresentam as organelas da bainha vascular aglomeradas nas paredes mais próximas ao feixe vascular, esse seria outro elemento que contribuiu para a evolução do metabolismo C₄.

Outro diferencial, também observável anatomicamente, é o arranjo mais compacto das células da espécie intermediária em relação à outra espécie do mesmo gênero (*A. brasiliana*), que deve realizar a fotossíntese apenas pela via de C₃. Nas duas espécies de *Alternanthera*, peroxissomos e mitocôndrias são encontradas tanto nas células do mesofilo quanto da bainha, indicando que a fotorrespiração ocorre em ambos os tecidos. Na espécie C₃ os grãos de amido são maiores e em maior quantidade nas células do parênquima paliádico, enquanto na espécie intermediária o amido parece se acumular mais nos cloroplastos da bainha. Quantificar o acúmulo de amido nas diferentes células e determinar se há diferenças na quantidade e no tamanho das organelas pode ser uma boa estratégia para definir marcadores estruturais relacionados ao metabolismo, mas o maior desafio é a

padronização da coleta e fixação das amostras, uma vez que exigiria o mesmo regime de iluminação das espécies e coleta simultânea, para parar o metabolismo num dado momento.

Todas as espécies com metabolismo C_4 são perenes (*Gomphrena* spp.), sempre com sistema subterrâneo bem desenvolvido (tuberoso a lenhoso), encontradas em ambientes de alta luminosidade (áreas abertas de cerrado) e com estratégias variáveis em relação ao tempo de duração das folhas e demais porções aéreas. Todas as espécies C_4 são anfiestomáticas e possuem mesofilo dorsiventral com parênquima lacunoso voltado para a face abaxial (artigo 2.4). As bainhas parenquimáticas vasculares possuem paredes mais espessas em relação às células vizinhas, podendo ou não apresentar impregnação com lignina ou outras substâncias lipídicas, e suas organelas são encontradas aglomeradas junto às paredes voltadas para os feixes vasculares. O espessamento das paredes das células da bainha e a impregnação dessas com substâncias impermeabilizantes (lignina e/ou suberina) parecem elementos estruturais também ligados à evolução do metabolismo C_4 , uma vez que contribuem para que a célula tenha um controle ativo das trocas realizadas com as células vizinhas, evitando o transporte de água e solutos pela via apoplástica.

Além disso, todas as espécies C_4 possuem cloroplastos dimórficos, com grana bem desenvolvida nas células do mesofilo e grana ausente ou pouco desenvolvida nos cloroplastos da bainha vascular, característicos do subtipo NADP-ME. Além disso, nessas espécies são raras as observações de peroxissomos, enquanto mitocôndrias são facilmente observáveis. Espécies C_4 possuem muitos grãos de amido acumulados dentro dos cloroplastos com grana rudimentar ou ausente da bainha vascular, enquanto o amido é ausente ou raro nos cloroplastos granais do mesofilo. A raridade de peroxissomos reflete a redução no processo de fotorrespiração, onde tal organela é importante na via bioquímica para a recuperação de parte do carbono perdido pela via do glicolato. A predominância do amido na bainha vascular reflete o processo de fixação de carbono sendo realizado preferencialmente nos cloroplastos dessas células. Para a confirmação do metabolismo C_4 e determinação do subtipo predominante para todas as espécies seria interessante a imunomarcagem das enzimas relacionadas à fotossíntese. O desafio é a obtenção dos anticorpos para essas enzimas, uma vez que apenas anti-RuBisCO é produzido comercialmente e há diversas exigências para a importação de anticorpos e enzimas obtidos

experimentalmente em laboratórios no exterior, dificultando o processo de aquisição desse tipo de reagente.

Os cloroplastos de algumas espécies C_4 possuem retículo periférico desenvolvido. O retículo periférico também foi encontrado em pelo menos uma espécie C_3 , mas está ausente na maioria das espécies analisadas, inclusive espécies C_4 . Desta forma, o retículo periférico não pode ser considerado como estrutura exclusiva de espécies com metabolismo C_4 , nem de ocorrência obrigatória. Em relação à maior quantidade de mitocôndrias em células da bainha vascular, nas espécies de metabolismo C_4 há uma concentração maior de organelas (principalmente cloroplastos e mitocôndrias) nas células da bainha, mas é preciso desenvolver alguma técnica para avaliar corretamente a diferença entre essas quantidades em relação às células do mesofilo, preferencialmente com uso de microscopia confocal (para análise da célula integral). É evidente, entretanto, que os cloroplastos da bainha vascular são mais especializados na produção de energia sob a forma de ATP, pela alta frequência de tilacóides estromais e reduzida formação de grana. O gasto energético nas células da bainha vascular é elevado, uma vez que há a produção de carboidratos durante o dia e a transferência do mesmo para os tecidos vasculares durante o período noturno, o que justificaria o maior acúmulo tanto de cloroplastos (que produzem amido) quanto de mitocôndrias (fornecedoras de energia para o processo de degradação e transferência do amido transitório). A análise do desenvolvimento de organelas nas espécies dessa família poderia auxiliar a entender suas variações estruturais e suas origens, bem como, potencialmente, auxiliar a esclarecer a função, por exemplo, do retículo periférico e dos plastoglôbulos.

Plastoglôbulos bem desenvolvidos foram encontrados em cloroplastos de algumas das espécies do Cerrado. Essa estrutura é geralmente ligada à senescência em folhas, mas este não pode ser o caso dessas espécies, uma vez que sempre foram selecionadas para a coleta de folhas saudáveis e sem sinais de degradação da clorofila nem de infecção por microorganismos. Em alguns casos foram encontradas vesículas com substâncias osmofílicas transitando entre cloroplastos e membranas celulares. Não foi possível, ainda, analisar o significado ou a origem desse trânsito, mas trata-se de um aspecto interessante a desvendar e que também pode ser esclarecido com estudos do desenvolvimento das

organelas foliares. Neste sentido, pode ser enriquecedor estudar o desenvolvimento das organelas a partir das folhas primordiais (cotiledonares), além do estudo de regiões foliares menos maduras (base) e mais maduras (ápice), em comparação do terço-médio do mesófilo foliar.

As variações anatômicas das folhas das espécies são parcialmente decorrentes da genética, da adaptação ao ambiente e também podem estar relacionadas ao hábito, comportamento ecológico e fenologia (duração das folhas durante o ciclo de vida da planta), corroborando a hipótese inicial desse trabalho. O estudo dessas espécies confirma que pode haver diferentes soluções estruturais para a obtenção de um mesmo resultado fisiológico, especialmente em relação ao metabolismo fotossintético, mesmo em espécies da mesma família e/ou gênero, favorecendo a especiação e, provavelmente, a maior concentração de espécies de *Amaranthaceae* no Bioma Cerrado. Desta forma, a família *Amaranthaceae* pode ser um bom marcador da riqueza de dicotiledôneas de pequeno porte e da capacidade de regeneração das áreas de campos rupestres, campos úmidos e outros tipos de vegetação aberta dos cerrados. O monitoramento constante das áreas preservadas e disponíveis para a pesquisa científica pode revelar dados inesperados e ampliar a motivação para a ampliação das pesquisas e para a conservação do mosaico de ecossistemas que formam o Bioma Cerrado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- Agra, M.F.; Baracho, G.S.; Nurit, K.; Basílio, I.J.L.D.; Coelho, V.P.M. 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 111, 383-395.
- Almeida, S.P. de; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. 1998. **Cerrado - espécies vegetais úteis**. Planaltina, Embrapa.
- Antonucci, N.P. 2010. **Estudos anatômicos, ultra-estruturais e bioquímicos da síndrome Kranz em folhas de duas espécies de *Gomphrena* L. (Amaranthaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de São Paulo.
- Barros, M.G.A.E. 1981-1982. Plantas medicinais - usos e tradições em Brasília -DF. In: VII Simpósio de Plantas Mediciniais. **Oréades** 8 (14/15): 140-149.
- Barthlott, W.; Neinhuis, C.; Cutler, D.; Ditsch, F.; Meusel, I.; Theisen, I.; Wilhelmi, H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society** 126: 237-260.
- Batalha, M.A.; Martins, F.R. 2004. Reproductive fenology of the cerrado plant community in Emas National Park (Central Brazil). **Australian Journal of Botany** 52: 149-161.
- Biodiversitas. 2010. http://www.biodiversitas.org.br/florabr/listas_flora.asp. Acesso em 09/09/2010.
- Black, C.C.Jr.; Mollenhauer, H.H. 1971. Structure and distribution of chloroplasts and other organelles in leaves with various rates of photosynthesis. **Plant Physiologist** 47: 15-23.
- Bremer, K.; Chase, M. W.; Stevens, P. F. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 85: 531-553.
- Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. 2005. HPLC characterization of Betalains from plants in the Amaranthaceae. **Journal of Chromatographic Science** 43: 454-460.
- Carolin, R.C.; Jacobs, S.W.L.; Veski, M. 1978. Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. **Australian Journal of Botany** 26: 683-698.

Cavalcanti, T.B.; Ramos, A.E. 2001. **Flora do Distrito Federal, vol. I**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Conservation International; Funatura; Fundação Biodiversitas; Universidade de Brasília. 1999. **Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade do Cerrado e Pantanal**. Disponível em www.bdt.org.br/bdt/workcerrado. Acesso em 19/05/2005.

Coutinho, L.M. 1980. As queimadas e seu papel ecológico. **Brasil Florestal** 10(44): 7-23.

Duarte, M.R.; Debur, M.C. 2004. Characters of the leaf and stem morpho-anatomy of *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze, Amaranthaceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 40(1): 85-92.

Edwards, G.E.; Franceschi, V.R.; Ku, M.S.B.; Voznesenskaya, H.V.; Pyankov V.I.; Andreo, C.S. 2001. Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C₄ plants. **Journal of Experimental Botany** 52(536): 577-590.

Edwards, G.E.; Franceschi, V.R.; Voznesenskaya, H.V. 2004. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. **Annual Review of Plant Biology** 55: 173-196.

Eiten, G. 2001. **Vegetação natural do Distrito Federal**. Brasília: SEBRAE/UNB.

Engel, T.; Barthlott, W. 1988. Micromorphology of epicuticular waxes in Centrosperms. **Plant Systematics and Evolution** 161: 71-85.

Estelita-Teixeira, M.E.; Handro, W. 1984. Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Canadian Journal of Botany** 62: 812-817.

Fank-de-Carvalho, S.M. 2004. **Contribuição ao conhecimento botânico de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae) – estudos anatômicos e bioquímicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília – Departamento de Botânica.

Fank-de-Carvalho, S.M., Graciano-Ribeiro, D. 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). **Acta Botânica Brasilica** 19(2): 379-392.

Fank-de-Carvalho, S.M., Campos, M.B.S.; Prates, E.M.B.; Zuany, L.V.; Arcanjo, A.C.; Galhardo, I.C.; Albuquerque, R.W.; Carvalho, P.S.; Miranda, S.C.; Amaral, A.G.;

- Somavilla, N.S.; Proença, C.E.B. 2009. Florística de uma área de cerrado da Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil. **Heringeriana** 3(2): 19-43
- Gavilanes, M.L. 1999. Estudo anatômico do eixo vegetativo de plantas daninhas que ocorrem em Minas Gerais. 1. Anatomia foliar de *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae). **Ciência e Agrotecnologia** 23(4): 881-898.
- Gutschick, V.P. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure – research reviews. **New Phytologist** 143: 3-18.
- Handro, W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das amarantáceas dos cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 36(4): 479-499.
- Handro, W. 1965. Pollen grains of plants of the Cerrado. X - Amaranthaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 37(3/4): 557-565.
- Handro, W. 1967. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das amarantáceas dos cerrados. II – Gênero *Pfaffia*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 39(3/4): 495-506.
- Harborne, J. B. 1984. **Phytochemical Methods – a guide to modern techniques of plant analysis**. 2 ed. New York, Chapman and Hall.
- Hatch, M.D. 2002. C₄ photosynthesis: discovery and resolution. **Photosynthesis Research** 73: 251-256.
- IPNI. 2009. **The International Plant Names Index**. <http://www.ipni.org/index.html> (acesso em 11/09/2009).
- Joly, A.B. 1998. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellog, E.A.; Stevens, P.F. 2002. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Kimler, L.; Mears, J.; Mabri, T.J.; Rösler, H. 1970. On the question of mutual exclusiveness of Betalains and Anthocyanins. **Taxon** 19(6): 875-878.

- Klink, C.A.; Machado R.B. 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology** 19(3): 707-713.
- Laboriau, M. L. S. 1961. Pollen grains of plants of the “Cerrado” - I. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 33(1): 119-130.
- Laetsch, W.M. 1974. The C₄ syndrome: a structural analysis. **Annual Review of Plant Physiology** 25: 27-52.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D. L.; Cox, M.M. 2000. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, Sarvier.
- Malkin, R.; Niyogi, K. 2000. Photosynthesis, cap. 12. Pp. 568-628. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA, American Society of Plant Biologists.
- Marchioretto, M.S. 2008. Os gêneros *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Marchioretto, M.S.; Miotto, S.T.S.; Siqueira, J.C. de. 2008. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Hebanthe* Mart. (Amaranthaceae). **Pesquisas, Botânica** 59: 159-170.
- Marchioretto, M.S.; Miotto, S.T.S.; Siqueira, J.C. de. 2009. Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia** 60(3): 667-681.
- Marchioretto, M.S.; Senna, L.; Siqueira, J.C. de. 2010. *Amaranthaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000042> (acesso em 12/06/2010).
- Marchioretto, M.S.; Windisch, P.G.; Siqueira, J.C.de. 2002. Os gêneros *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R.E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. **Pesquisas, Botânica** 52: 7-46.

- Marchioreto, M.S.; Windisch, P.G.; Siqueira, J. C. de. 2004. Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R. E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. **Iheringia Série Botânica** 2: 149-159.
- Marchioreto, M.S.; Windisch, P.G.; Siqueira, J. C. de. 2005. Problemas de conservação das espécies dos gêneros *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R. E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. **Acta Botânica Brasilica** 19(2): 215-219.
- Mendonça, R.C.; Felfili, J.M.; Walter, B.M.T.; da Silva, M.C. Jr.; Rezende, A.V.; Filgueiras, T.S.; Oliveira, P.E. 1998. **Flora vascular do Cerrado**. Disponível em www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/levantamento/floravascular.pdf. Acesso em 19/09/2005.
- Miranda, H.; Miranda, A.C. 2000. Queimadas e estoques de carbono no Cerrado. Pp. 75-81. In: Moreira, A.G.; Schwartzman, S. (Eds). **As Mudanças Climáticas e os Ecossistemas Brasileiros**. Brasília, Ed. Foco.
- MMA. 2010. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf (acesso em 09/09/2010).
- Monteiro-Scanavacca, W.R. 1971. Vascularização floral em Amaranthaceae. **Ciência e Cultura** 23(3): 339-349.
- Müller, K.; Borsch, T. 2005. Phylogenetics of Amaranthaceae based on matK/trnK sequence data – evidence from parsimony, likelihood and bayesian analyses. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 92: 66-102.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.
- Paiva, P.H.V. de. 2000. A Reserva da Biosfera do Cerrado: fase II. Pp. 332-334. In: Cavalcanti, T. B.; Walter, B. M. T. (Eds). **Tópicos atuais em botânica – palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica**. Brasília, Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen.

- Peixoto, P.V.; Brust, L.A.C.; Brito, M.F.; França, T.N.; Cunha, B.R.M.; Andrade, G.B. 2003. Intoxicação natural por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em ovinos no sudeste do Brasil. **Pesquisas Veterinárias Brasileiras** 23(4), 179-184.
- Press, M.C. 1999. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations – research reviews. **New Phytologist** 143: 213-219.
- Ratter, J.A.; Ribeiro, J.F.; Bridgewater, S. 2000. Woody flora distribution of the Cerrado Biome: phytogeography and conservation priorities. Pp. 340-342. *In*: Cavalcanti, T. B.; Walter, B. M. T. (Eds). **Tópicos atuais em botânica – palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica**. Brasília, Sociedade Brasileira de Botânica/Embrapa-Cenargen.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 2001. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan.
- Ribeiro, J.E.L. da S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A. da S.; Brito, J.M. de; Souza, M.A.D. de; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira, E. da C.; Silva, C.F. da; Mesquita, M.R.; Procópio, L.C. 1999. **Flora da Reserva Ducke**. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus, INPA.
- Sage, R.W. 2002. C₄ photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy. **Trends in Plant Science** 7(7):283-285.
- Salatino, A.; Montenegro, G.; Salatino, M.L.F. 1986. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica** 9: 117-124.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. 1992. **Plant Physiology**. 4 ed. Belmont, Wadsworth Publishing Company.
- Siqueira, J.C. de. 1981. **Utilização popular das plantas do Cerrado**. São Paulo: Ed. Loyola.

- Siqueira, J.C. de. 1987. Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. **Acta Biológica Leopoldinensia** 9(1): 99-110.
- Siqueira, J.C. de. 1988. **Plantas medicinais – identificação e uso das espécies dos cerrados**. São Paulo: Ed. Loyola.
- Siqueira, J.C. de. 1992. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. **Pesquisas, Botânica** 43: 5-197.
- Siqueira, J.C. de. 2002. Amaranthaceae. Pp. 11-30. In: Wanderley, M. G. L.; Shepherd, G. J.; Giulietti, A. N.; Melhem, T. S. A.; Dittrich, V.; Kameyama, C. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo, v. II**. São Paulo, HUCITEC.
- Siqueira, J.C. de. 2007. O Bioma Cerrado e a preservação de grupos taxonômicos: um olhar sobre as Amaranthaceae. **Pesquisas, Botânica** 58: 389-394.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2008. **Botânica Sistemática** – Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Stryer, L. 1996. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan.
- Timm, C.D.; Riet-Correa, F. 1997. Plantas Tóxicas para Suínos. **Ciência Rural** 27(3): 521-528.
- Ueno, O. 1998. Immunogold localization of photosynthetic enzymes in leaves of various C₄ plants, with particular reference to pyruvate orthophosphate dikinase. **Journal of Experimental Botany** 49(327): 1637-1646.
- Vieira, R.F.; Silva, S.R.; Alves, R.B.N.; Silva, D.B.; Dias, T.A.B.; Wetzel, M.M.V.S., Udry, M.C.; Martins, R.C. 2002. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas – resultados da 1ª reunião técnica**. Brasília, Embrapa-CENARGEN/IBAMA/CNPq.
- Voznesenskaya, E.V.; Artyusheva, E.G.; Franceschi, V.R.; Pyankov, V.I.; Kiirats, O.; Ku, M. S.B; Edwards, G.E. 2001. *Salsola arbusculiformis*, a C₃-C₄ intermediate in Salsoleae (Chenopodiaceae). **Annals of Botany** 88: 337-348.

Voznesenskaya, E.V.; Edwards, G.E.; Kiirats, O.; Artyusheva, E.G.; Franceschi, V.R. 2003. Development of biochemical specialization and organelle partitioning in the single-cell C₄ system in leaves of *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae). **Annals of Botany** 90(12): 1669-1680.

Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). Part I: stomata, pp 97-117. *In*: Metcalfe, C.R.; Chalk, L. (eds), **Anatomy of the Dicotyledons – systematic anatomy of the leaf and stem**, Vol. I, 2 ed. Oxford University Press, London.

5. APÊNDICES

Anexo 1 – Lista de publicações de 2006 a 2010.

Anexo 2 – Protocolo de preparação de amostras para MET com resina SPURR.

Anexo 3 – Protocolo de preparação de amostras para MET com Poly/Bed812.

Anexo 4 – Tabela de espécies da família Amaranthaceae utilizadas na tese e *vouchers* do material-testemunha depositado no Herbário PACA.

Anexo 5 - Declaração relativa à Bioética e Biossegurança.

Anexo 1 – Lista de publicações de 2006 a 2010

Publicações relacionadas ao Doutorado

Artigos Publicados:

- 1) FANK-DE-CARVALHO, S. M., GOMES, M. R. A., SILVA, P. Í. T., BAO, S. N. , 2010. Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. *Biocell* (Mendoza), 34(1): 23-35.
- 2) FANK-DE-CARVALHO, S. M., MARCHIORETTO, M.S., BAO, S. N. 2010. Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, Goiás, Brasil. *Biota Neotropica* 10(4), out/dez (Edição em Português. Online).

Resumos Simples Publicados em Congressos:

- 1) FANK-DE-CARVALHO, S. M., GOMES, M. R. A., NAME, K. P. O., MARCHIORETTO, M.S., BAO, S. N. A Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta (Alto Paraíso/GO) e a conservação de espécies de Amaranthaceae do Cerrado In: 61ª Reunião Anual da SBPC, 2009, Manaus-AM. **Anais da 61ª Reunião Anual da SBPC**. Manaus-AM: SBPC, 2009. **Painel**.

Resumos Expandidos Publicados em Simpósios e Congressos Nacionais e Internacionais

- 1) FANK-DE-CARVALHO, S. M., BAO, S. N. Anatomical and ultrastructural aspects of Amaranthaceae leaves from Chapada dos Veadeiros, Goiás State, Brazil In: 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy 2009 - CIASEM 2009, 2009, Rosário-Argentina. **Acta Microscopica**. Rosário: Inter-American Society of Electron Microscopy, 2009. v.18. p.605 – 606. **Apresentação Oral**.
- 2) FANK-DE-CARVALHO, S. M., CORRÊA, J. R., BAO, S. N. Anatomical and ultrastructural aspects of *Gomphrena hermogenesii* J.C. de Siqueira and *Pfaffia gnaphaloides* (L.f.) Mart. (Amaranthaceae) leaves from Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brazil In: 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy 2009 - CIASEM 2009, 2009, Rosário-Argentina. **Acta Microscopica**. Rosário: Inter-American Society of Electron Microscopy, 2009. v.18. p.475 – 476. **Painel**.
- 3) FANK-DE-CARVALHO, S. M., BAO, S. N. Anatomy and ultrastructure of the Brazilian Ginseng leaves: *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen and *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) In: 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy 2009 - CIASEM 2009, 2009, Rosário-Argentina. **Acta Microscopica**. Rosário: Inter-American Society of Electron Microscopy, 2009. v.18. p.639 – 640. **Painel**.
- 4) FANK-DE-CARVALHO, S. M., NAME, K. P. O., BAO, S. N. Anatomy and ultrastructure of *Alternanthera ficoidea* (L.) R.Br. (Amaranthaceae) leaves In: Simpósio de Microscopia no Cerrado, 2008, Pirenópolis-GO. **Documentos 265**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. p.193 – 195. **Painel**.
- 5) FANK-DE-CARVALHO, S. M., GOMES, M. R. A., BAO, S. N. Anatomy and ultrastructure of

Gomphrena virgata Mart. and *G. globosa* L. leaves (Amaranthaceae) In: Simpósio de Microscopia no Cerrado, 2008, Pirenópolis. **Documentos 265 - SMC - Simpósio de Microscopia no Cerrado**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. p.283 – 285. **Painel**.

- 6) FANK-DE-CARVALHO, S. M., ZANELA, L. L., BAO, S. N. Anatomy and ultrastructure of leaves of *Alternanthera dentata* (Moench) Stuebel ex R.E. Fr. (Amaranthaceae) In: Simpósio de Microscopia no Cerrado, 2008, Pirenópolis-GO. **Documentos 265**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. p.198 – 201. **Painel**.
- 7) FANK-DE-CARVALHO, S. M., BAO, S. N. Anatomy and ultrastructure of *Gomphrena arborescens* L. f. and *G. pohlii* Moq. (AMARANTHACEAE) leaves for the C4 photosynthesis In: 9th Interamerican Congress of Electron Microscopy, 2007, Cusco-Peru. **Acta Microscopica**. Mexico City: Inter-American Committee of Societies of Electron Microscopy, 2007. v.16. p. 239 – 240. **Painel**.
- 8) FANK-DE-CARVALHO, S. M., BAO, S. N. Leaf micromorphology of *Gomphrena* spp. (AMARANTHACEAE) In: 9th Interamerican Congress of Electron Microscopy, 2007, Cusco-Peru. **Acta Microscopica**. Mexico City: Inter-American Committee of Societies of Electron Microscopy, 2007. v.16. p.238 – 239. **Painel**.
- 9) FANK-DE-CARVALHO, S. M., BAO, S. N. Leaf surfaces of *Gomphrena pohlii* Moq. (Amaranthaceae) under Scanning Electron Microscopy In: XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007, Búzios-RJ. **CD-ROM**. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007. **Painel**.
- 10) FANK-DE-CARVALHO, S. M., SANTOS, M.R.R., SILVA, P.Í.T., BAO, S. N. Ultrastructure of *Gomphrena pohlii* Moq. (AMARANTHACEAE) leaves In: XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007, Búzios-RJ. **CD-ROM**. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007. **Painel**.

Publicações não relacionadas (projetos paralelos)

Artigos Publicados:

- 1) PROENÇA, C., SOARES-SILVA, L.H., SILVA, P.Í.T., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Two new endemic species of Myrtaceae and an anatomic novelty from the Highlands of Brazil. *Kew Bulletin*, v.65, p.1-6, 2010.
- 2) **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, CAMPOS, M.B.S., PRATES, E.M.B., ZUANY, L.V., ARCANJO, A. C., GALHARDO, I.C., ALBUQUERQUE, R.V., CARVALHO, P. S., MIRANDA, S. C., AMARAL, A. G., SOMAVILLA, N. S., PROENÇA, C. Florística de uma área de cerrado da Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. **Heringeriana**, v.3, p.19 - 43, 2009.
- 3) **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, TELES, A. M., CAMPOS, M.B.S., SILVA, P.Í.T., ANDRADE, L. A.A., SANTOS, M.R.R., ARAÚJO, R.F., PEREIRA, T.A., PROENÇA, C. Levantamento Florístico do Parque Olhos D'Água, Brasília, DF, Brasil. **Heringeriana (ex-Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer)**, v.2, p.23 - 37, 2008.
- 4) ZUANY, L.V., PRATES, E.M.B., FRANCO, M.P.M., GALHARDO, I.C., ALBUQUERQUE, R.V., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Levantamento Florístico de uma área de Cerrado da

Universidade de Brasília. **Revista Brasileira de Biociências (Nota Científica)**, v.5, p.801 - 805, 2007.

- 5) PAIVA, J.G.A., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, MAGALHÃES, M. P., GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasílica**, v.20, p.257 - 264, 2006.

Capítulo de Livro Publicado:

- 1) PROENÇA, C., SOARES-SILVA, Lúcia Helena, RIVERA, V.L., SIMON, M. F., OLIVEIRA, R.C., SANTOS, I.A., BATISTA, J.A.N., RAMALHO, C.L., MIRANDA, Z.J.G., CARDOSO, C.F.R., BARBOZA, M.A., BIANCHETTI, L.B., GONÇALVES, E.G., SINGER, R.M., GOMES, S.M., SILVA, S.R., MARTINS, R.C., MUNHOZ, C.B.R., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Bioregionalização e centros de endemismo do Bioma Cerrado utilizando dados de distribuição de espécies de plantas superiores. In: Cerrado: conhecimento científico como subsídio para as ações de conservação. Brasília: Thesaurus Editora, 2010, p. 89-148.

Resumos Simples Publicados em Congressos:

- 1) GOMES, M.R.A., ZANELA, L.L., SILVA, P.Í.T., BAO, S. N., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Anatomia foliar de *Croton goyazensis* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) In: 60ª Reunião Anual da SBPC, 2008, Campinas. **Anais da 60ª Reunião Anual da SBPC**. Campinas: UNICAMP, 2008. **Painel**.
- 2) SILVA, P.Í.T., GOMES, M. R. A., BAO, S. N., PROENÇA, C., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Anatomia foliar de *Psidium* sp. nov. (Myrtaceae) In: 60ª Reunião Anual da SBPC, 2008, Campinas. **Anais da 60ª Reunião Anual da SBPC**. Campinas: UNICAMP, 2008. **Painel**.
- 3) SILVA, P.Í.T., SANTOS, M.R.R., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, BAO, S. N., PROENÇA, C. Anatomia foliar de *Psidium australe* Cambess (Myrtaceae) In: 59 Reunião Anual da SBPC, 2007, Belém-PA. **Anais/Resumos 59 Reunião Anual da SBPC**. 2007. **Painel**.
- 4) **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, ARAÚJO, R.F., SILVA, P.Í.T., PROENÇA, C. Arquitetura e caracterização da epiderme foliar de *Psidium* sp. nov. (Myrtaceae) In: 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo. **CD ROM**. São Paulo - SP: Sociedade Brasileira de Botânica, 2007. **Painel**.
- 5) **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, SILVA, P.Í.T., ARAÚJO, R.F., SANTOS, M.R.R., BAO, S. N. Arquitetura foliar de *Psidium basanthum* O. Berg. In: 59 Reunião Anual da SBPC, 2007, Belém-PA. **Anais/Resumos 59 Reunião Anual da SBPC**. 2007. **Painel**.
- 6) SENNA, A., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Anatomia da raiz primária de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae) In: 57º Congresso Brasileiro de Botânica, 2006, Gramado. **Resumos 57º Congresso Brasileiro de Botânica**. Gramado-RS: Sociedade Brasileira de Botânica, 2006. CD-ROM.
- 7) KALKMANN, D.C., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.**, SOARES-SILVA, L.H. Organização de Carpoteca Didática de Frutos para auxílio em aulas práticas In: 57º Congresso Nacional de Botânica, Gramado-RS. **CD-ROM - Anais do 57º Congresso Nacional de Botânica**. 2006.

Resumos Expandidos Publicados em Simpósios e Congressos Nacionais

- 1) GOMES, M.R.A., **FANK-DE-CARVALHO, S.M.**, BAO, S.N. Anatomy and ultrastructure of leaves of *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae) In: Simpósio de Microscopia no Cerrado, 2008, Pirenópolis-GO. **Documentos 265**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. p.239 – 241. **Painel**.
- 2) **FANK-DE-CARVALHO, S.M.**, TELES, A.M., CAMPOS, M.B.S., ANDRADE, L.A.A., SANTOS, M.R.R., SILVA, P.Í.T., ARAÚJO, R.F., PEREIRA, T.A., PROENÇA, C. Levantamento Florístico do Parque Olhos d'Água, Brasília, DF, Brasil. In: LVII Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado. **Painel**.
- 3) ZUANY, L.V., PRATES, E.M.B., FRANCO, M.P.M., GALHARDO, I.C., ALBUQUERQUE, R.V., **FANK-DE-CARVALHO, S. M.** Levantamento Florístico de uma área de cerrado da Universidade de Brasília In: LVII Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado. **Painel**. Publicado como Nota Científica na Revista Brasileira de Biociências, 5(2): 801-803 (2007).

Anexo 2 – Protocolo de preparação de amostras para MET com resina SPURR.

Microscopia Eletrônica de Transmissão - Protocolo 1

Estudo Ultraestrutural de folhas de vegetais com cutículas finas e paredes pouco espessas.		
1) FIXAÇÃO - OK. Todo o material fixado está no primeiro tampão cacodilato de sódio 0,05M		
2) LAVAGENS remover excesso fixador 4X (15 minutos cada) no tampão Caco 0,05M		
3) PÓS FIXAÇÃO	Ferrocianeto de potássio FCK 1,6% (reduz tetróxido de ósmio) + Tetróxido de ósmio 2% (1+1). Fixa lipídios, contrasta e preserva íons cálcio	1 hora no escuro, em temperatura ambiente
4) LAVAGENS remover excesso pós-fixador 2X (15 min cada) no tampão Caco 0,05M + 2x em água destilada		
5) CONTRASTAÇÃO IN BLOCK	Acetato de uranila aquoso (0,5%).	Manter no escuro , overnight - em geladeira. Pode parar nesta fase. Início dia/hora:
6) LAVAGENS remover excesso contrastador 3X em água destilada (rápido)		
7) DESIDRATAÇÃO	Temperatura ambiente. Com vácuo a cada troca, sempre que possível. Quanto mais espaços intercelulares, mais importante o uso do vácuo. Quanto mais finas as paredes e cutículas, menor o tempo necessário em cada fase (10 - 30 minutos)	
Acetona 30%	30 minutos	Início:
Acetona 50%	30 minutos	Início:
Acetona 70%	30 minutos	Início:
Acetona 90%	30 minutos	Início:
Acetona 100%	30 minutos	Início:
Acetona 100%	30 minutos	Início:
Acetona 100%	30 minutos	Início:
8) INFILTRAÇÃO		
Sempre em temperatura ambiente. Não levar à geladeira para evitar condensação		
Resina SPURR	Material deixado sob rotação lenta o tempo todo (ou agitação em placa, se não houver rotador disponível). Se possível, utilizar vácuo (cerca de 2h) logo após cada troca. De preferência, misturar a resina com a acetona previamente ao contato com o material	
Acetona e resina (3+1)	12h - 24h	Início dia/hora:
Acetona e resina (2+1)	12h - 24h	Início dia/hora:
Acetona e resina (1+1)	12h - 24h	Início dia/hora:
Acetona e resina (1+1)	12h - 18h	Início dia/hora:
Acetona e resina (1+2)	12h - 18h	Início dia/hora:
Acetona e resina (1+3)	12h - 18h	Início dia/hora:
resina pura	12h - 15h	Início dia/hora:
9) INCLUSÃO		
Sempre em temperatura ambiente. Não levar à geladeira para evitar condensação		
resina pura	identificar os blocos (lápis ou caneta nanquim) e anotar na ata. Colocar pouca resina, o material e completar a resina. Retirar as bolhas. Levar à estufa e cobrir com placa de petri.	Início dia/hora:
Polimerização	mínimo 6h - até 2 dias. Estufa 60 graus	Início dia/hora:

Anexo 3 – Protocolo de preparação de amostras para MET com Poly/Bed812.

Microscopia Eletrônica de Transmissão - Protocolo 2		
Estudo Ultraestrutural - folhas de embebição difícil, com cutícula e paredes grossas e grandes espaços intercelulares. RESINA EPON Poly/Bed 812		
1) FIXAÇÃO - cortar as partes em placa de Petri com água destilada e fixar glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,05M. Tamanho amostra: 1-2 mm de espessura (máximo)		
Tempo fixação	1 horas (temp ambiente) + overnight (até 24 horas total) em geladeira.	Após fixação, colocar em tampão Cacodilato de sódio 0,05M
2) LAVAGENS	remover excesso fixador	4X (15 minutos cada) no tampão
3) PÓS FIXAÇÃO	Ferrocianeto de potássio FCK 1,6% (reduz tetróxido de ósmio) + Tetróxido de ósmio 2% (1+1). Fixa lipídios	1 hora no escuro, em temperatura ambiente
4) LAVAGENS	remover excesso pós-fixador	2X em água destilada (rápido) + 2X (15 min cada) no tampão.
5) CONTRASTAÇÃO IN BLOCK	Acetato de uranila aquoso (0,5%).	Manter no escuro , overnight. Pode parar nesta fase. Início dia/hora:
6) LAVAGENS	remover excesso contrastador	3X em água destilada (rápido)
7) DESIDRATAÇÃO	Temperatura ambiente. ETANOL MERCK (na fase 100%)	
Etanol 25%	30 minutos	Início:
Etanol 50%	30 minutos	Início:
Etanol 70%	30 minutos	Início:
Etanol 95%	30 minutos	Início:
Etanol 100%	3X - 45 minutos cada	Início:
8) SUBSTITUIÇÃO DO DESIDRATANTE POR ÓXIDO DE PROPILENO (OP):		
Etanol + OP (1:1)	15 minutos	Início:
OP Puro	15 minutos (2x)	Início:
8) INFILTRAÇÃO	Sempre em temperatura ambiente. Não levar à geladeira para evitar condensação	
Resina EMBed 812	Preparar a resina fresca, sempre que possível. Usamos protocolo de Luft, J.H.(1961), J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409. A rotação lenta do material auxilia a infiltração, acelerando o processo. Não esquecer de homogeneizar a amostra e, preferencialmente, fazer a mistura do óxido com a resina antes da utilização	
OP e resina (3+1)	1h vácuo + 1h rotor	Início dia/hora:
OP e resina (1+1)	1h vácuo + 1h rotor	Início dia/hora:
OP e resina (1+2)	overnight (rotor)	Início dia/hora:
OP e resina (1+3)	1h vácuo + 1h rotor	Início dia/hora:
resina pura	overnight (rotor)	Início dia/hora:
9) INCLUSÃO	Sempre em temperatura ambiente. Não levar à geladeira para evitar condensação	
resina pura	identificar os blocos e anotar na ata. Colocar pouca resina, o material e completar a resina. Retirar as bolhas. Levar à estufa e cobrir com placa de petri. Deixar polimerizar	Início dia/hora:
Polimerização	mínimo 6h - até completa polimerização (pode levar até 5 dias). Estufa 60 graus	Início dia/hora:

Anexo 4

Tabela. Espécies da família Amaranthaceae utilizadas na tese e voucher do depósito no Herbário PACA

Espécie	nºs coleta*	Hábito	Sistema subterrâneo	Habitat	Local de Coleta	Voucher - PACA**
<i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze	110	herbácea	ramificado e pouco desenvolvido	Cultivada	Universidade de Brasília, Brasília/DF	103380
<i>Alternanthera paronychioides</i> St. Hil.	107, 111, 116	herbácea	ramificado e pouco desenvolvido	Cultivada	SQN 211, Brasília/DF	103392, 103393, 103394
<i>Froelichiella grisea</i> R.E.Fr.	119a-b, 124	herbácea	tuberoso, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	RPPN Cara Preta	103386, 103395
<i>Gomphrena arborescens</i> L. f.	100	subarbustiva	tuberoso ou lenhoso, com gemas subterrâneas	campo sujo, solo argiloso	Centro Olímpico, Universidade de Brasília/DF	103390
<i>Gomphrena globosa</i> L.	106	herbácea	ramificado e pouco desenvolvido	Cultivada	SQN 211, Brasília/DF	103376
<i>Gomphrena hermogenesii</i> J.C. Siqueira	123, 118a-b,	herbácea	tuberoso, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	RPPN Cara Preta	103384, 103385
<i>Gomphrena lanigera</i> Pohl. ex Moq.	126	herbácea	tuberoso, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	RPPN Cara Preta	103387
<i>Gomphrena pohlii</i> Moq.	101	subarbustiva	tuberoso e lignificado, com gemas subterrâneas	campo sujo, solo argiloso	Centro Olímpico, Universidade de Brasília/DF	103391
<i>Gomphrena prostrata</i> Mart.	127	herbácea	tuberoso e lignificado, com gemas subterrâneas	campo limpo úmido, solo arenoso	RPPN Cara Preta	103388
<i>Gomphrena virgata</i> Mart.	104a-b-c, 122	arbustiva	tuberoso e lignificado, com gemas subterrâneas	campo limpo e campo sujo, solo argiloso	Reserva Ecológica do Roncador/IBGE e Centro Olímpico da Universidade de Brasília, Brasília/DF	103375, 103397
<i>Hebanthe eriantha</i> (Poir) Pedersen	129	subarbustiva	tuberoso	Cultivada	Embrapa/Cenargen, Brasília/DF	103399
<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	128, 130	arbustiva	tuberoso	Cultivada	Embrapa/Cenargen e Estação Ecológica da Universidade de Brasília, Brasília/DF	103389, 103398
<i>Pfaffia gnaphalioides</i> (L.f.) Mart.	125	herbácea	tuberoso	base de morro, solo rochoso	RPPN Cara Preta	103379
<i>Pfaffia townsendii</i> Pedersen	102, 112 e 113	subarbustiva, arbustiva	tuberoso	morro pedregoso, solo rochoso	RPPN Cara Preta	103374, 103381, 103382

Nota: Nota: (*) Coletor: S.M. Fank-de-Carvalho *et al.* **PACA = Herbário da Universidade do Vale dos Sinos, São Leopoldo - Rio Grande do Sul, Brasil.

DECLARAÇÃO

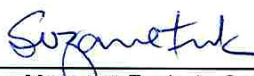
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Contribuição ao conhecimento da anatomia, micromorfologia e ultraestrutura foliar de Amaranthaceae do Cerrado";

(☒) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

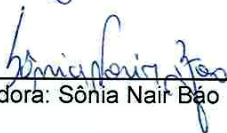
() tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

_____, sob Protocolo(s) nº _____.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluna: Suzane Margaret Fank de Carvalho



Orientadora: Sônia Nair Bão

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome: _____

Função: _____