UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

ROSINA MUTO MARASCA

Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) ROSINA MUTO MARASCA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Marília de Moraes Castro
Co-orientadora: Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M325e

Marasca, Rosina Muto
Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae) / Rosina Muto Marasca. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Marília de Moraes Castro, Luiza Sumiko Kinoshita.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Apocynaceae. 2. *Rauvolfia*. 3. Estruturas secretoras. 4. Coléteres. I. Castro, Marília de Moraes. II. Kinoshita, Luiza Sumiko. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Secretory structures in *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae).
Palavras-chave em inglês: Apocynaceae; *Rauvolfia*; Secretory structures; Colleters.
Área de concentração: Biologia Vegetal.
Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.
Banca examinadora: Marília de Moraes Castro, André Olmos Simões, Ana Paula Stechhahn Lacchia.
Data da defesa: 25/01/2008.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 25 de janeiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marília de Moraes Castro (Orientadora) _____
Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões _____
Assinatura

Dra. Ana Paula Stechhahn Lacchia _____
Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro _____
Assinatura

Profa. Dra. Solange Cristina Mazzoni Viveiros _____
Assinatura

“Não deixes que nada te perturbe, nem te assuste.

Tudo passa. Deus não muda.

A paciência tudo alcança.”

Madre Teresa de Calcutá

Aos meus filhos, Maria Luiza, Gustavo

e ao meu marido Marcos,

por toda compreensão, amor e carinho,

durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mostrar o melhor caminho e pela força que me motiva todos os dias a buscar o melhor.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Capes - pelo auxílio concedido durante os dois anos de Mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Botânica da UNICAMP, sob a coordenação da Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro.

Ao Instituto Agronômico de Campinas por colaborar com a autorização de coletas de alguns indivíduos utilizados neste trabalho, cultivados na Fazenda Santa Elisa.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, no qual desenvolvi todo meu trabalho e convivi com pessoas maravilhosas. Ao técnico responsável, Sebastião Henrique Militão Júnior, pela grande ajuda, por sempre atender, prontamente, às minhas solicitações prontamente e pelo apoio nas resoluções dos problemas de bancada.

Ao laboratório de Taxonomia Vegetal, pelo empréstimo de ferramentas para coleta, utilização de lupas e principalmente, ao técnico João Carlos Galvão pelas dicas e auxílio durante algumas coletas.

Aos responsáveis pelo Herbário – UEC - pela orientação do processo de herborização e inclusão do material testemunha utilizado no presente trabalho.

À Professora Dra. Marília de Moraes Castro, pela coragem de orientar uma pessoa há muito tempo afastada da vida acadêmica e por toda a paciência e dedicação ao ensinar, não somente as técnicas de laboratório, mas também os caminhos da pesquisa. Por ser criteriosa e acreditar que com dedicação tudo pode ficar ainda melhor.

À Professora Dra. Luiza Sumiko Kinoshita e aos membros da pré-banca, Prof. Dr. André Olmos Simões, Dra. Ana Paula Stechhahn Lacchia; Prof. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro e Dra. Carolina Scatolin do Rio, pelas valiosas sugestões que tanto contribuíram para a melhoria deste trabalho.

À Professora Dra. Ingrid Koch, pela gentileza ao mostrar os indivíduos de Joaquim Egídio e por estar sempre pronta a trocar idéias sobre o maravilhoso sistema de reprodução de *Rauvolfia sellowii.*

À Professora Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro, membro da banca de avaliação do meu processo de qualificação, pelas palavras valiosas que me ajudaram a seguir em frente.

Ao Professor Dr. André Olmos Simões pelas valiosas dicas e pela ajuda em relação ao Abstract.

Ao meu marido, Marcos, por todo amor, carinho nos momentos bons e difíceis, principalmente, o incentivo que, muitas vezes, me ajudou a seguir e nunca desistir. Por acreditar quando eu mesma já não conseguia e por me acolher nas horas de aflição.

Aos meus filhos Maria Luiza Marasca e Gustavo Henrique Marasca, principalmente, pelos carinhos, abraços dados quando estava sentada em frete ao computador, por mostrarem o verdadeiro amor e compreensão das horas de ausência.

Aos meus pais Mario e Zilda por serem exemplos de trabalho, coragem e mostrarem em que a família é o bem mais precioso que podemos ter. Agradeço especialmente por todo carinho e incentivo durante esta fase da minha vida. À minha querida irmã, Marinella, por me ensinar que, o que vale a pena é fazer aquilo que nos deixa feliz; por sempre me apoiar e ajudar com a língua inglesa. A todos os meus familiares, pelos carinhos e incentivos.

À minha sogra, Maria, por tantas vezes deixar seus afazeres, para me ajudar com as crianças e com a casa.

Às amigas, Ana Cristina Andrade de Aguiar, Ana Paula Stechhahn Lacchia, Karina Fidanza Rodrigues, Ludimila Micheliunas e Priscila Andressa Cortez, por todo apoio no início desta minha caminhada e pela amizade; por todos os momentos de alegria compartilhados. Ao amigo Diego por toda ajuda, achando sempre um tempinho para me ajudar em meio a tanto trabalho. Ao amigo Gustavo, pelas fotos maravilhosas de morfologia. A todos os amigos do laboratório, Isabel, Luciana, Maria Carolina, Nazaré, Poliana, Raquel e Shesterson, pelo companheirismo e ajuda. A todos os colegas do Departamento que, de uma forma ou de outra, ajudaram nestes anos de trabalho.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

ÍNDICE

RESUMO 1

ABSTRACT 3

INTRODUÇÃO GERAL 5

OBJETIVOS 10

CAPíTULO I. Coléteres foliares de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae)

Introdução 12

Material e métodos 14

Resultados 16

Ilustrações 18

Discussão 31

Referências bibliográficas 34

CAPíTULO II. Coléteres bracteolares de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae) – caracterização estrutural e análise comparativa com os foliares

Introdução 39

Material e métodos 41

Resultados 43

Ilustrações 46

Discussão 59

Referências bibliográficas 62

CAPíTULO III. Estruturas secretoras florais de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae), com ênfase na cabeça dos estiletes

Introdução 68

Material e métodos 72

Resultados 74

Ilustrações 76

Discussão 91

Referências bibliográficas 95

CONSIDERAÇÕES FINAIS 101

PERSPECTIVAS 104

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

RESUMO

O estudo morfológico das estruturas secretoras encontradas em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. foi realizado com o intuito de confirmar a presença de coléteres, através da análise da composição química, do secretado por eles produzido em órgãos vegetativos e reprodutivos, e efetuar um estudo comparado definindo tipo, número e posição ocupada. As estruturas secretoras florais também foram anatomicamente caracterizadas, com ênfase na cabeça dos estiletes. Uma grande quantidade de secreção esbranquiçada de aspecto gomoso é observada envolvendo ambas as faces dos primórdios foliares e a região adaxial das folhas jovens. Esta secreção é constituída principalmente por mucilagem (detectada pela reação PAS e pelo Vermelho de rutênio) e produzida por um número elevado de coléteres cônicos, os quais apresentam uma variação de comprimento e estão dispostos em duas ou três fileiras paralelas a superfície da base dos primórdios. Estas estruturas apresentam tanto origem axilar quanto marginal, são íntegras e persistem nas folhas adultas ocupando posição intrapeciolar. Coléteres responsáveis pela liberação de uma secreção incolor, constituída principalmente por mucilagem, são observadas nas brácteas folhosas e nas brácteas diminutas das inflorescências. Cada bráctea folhosa possui 9-13 coléteres polimorfos e destes, 2-4 são marginais do tipo *standard* e os demais são axilares cônicos semelhantes aos foliares. Nas brácteas diminutas é possível notar 2-4 coléteres marginais cônicos. A distensão da cutícula é observada nos coléteres foliares e das brácteas folhosas, e nos senescentes das brácteas diminutas. As estruturas secretoras encontradas nas flores são: epiderme da cabeça dos estiletes, nectários e laticíferos. Coléteres calicinais não foram observados. A epiderme da cabeça dos estiletes produz polissacarídeos e a presença de tricomas longos abaixo dos apêndices apicais diferencia a cabeça da flor funcionalmente masculina da feminina. A cabeça

dos estiletes destas flores não apresenta adnação a qualquer dos verticilos florais e corresponde ao “tipo 2” descrito para Apocynaceae. O nectário é anelar na base e levemente bilobado no ápice; a vascularização é constituída por feixes concêntricos na região basal e por cordões floemáticos na região apical. O parênquima nectarífero é revestido por epiderme unisseriada, com estômatos ocupando preferencialmente a região apical. Os laticíferos são ramificados e estão presentes em todas as peças florais. A presença de um anel nectarífero e ausência de coléteres calicinais são caracteres relevantes em nível de tribo: considerados conjuntamente, eles corroboram a posição de *R. sellowii* em Vinceae.

ABSTRACT

The work here presented a morphological and anatomical study of the secretory structures of *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. The main goal of this study is to confirm the presence of colleters in the vegetative and reproductive organs of this species by analysing the chemical composition of the exsudate they produce and by doing a comparative study of their structural type, number and organization. An anatomical characterization of flower secretory strutures was also conducted, with emphasis on the style head. A substancial amount of a whitish, gluelike secretion was observed surrounding both faces of the young leaf primordia. This secretion is mainly composed by a mucilage (detected by the PAS and Ruthenium red reactions) produced by several, conical colleters organized in two to three rows parallel to the leaf primordia base. The observed colleters can be either axillary and marginal in origin, form an entire and undivided body, and are persistent even in mature leaves, where they have an intrapetiolar position. Other colleters secreting a colorless fluid, mainly composed by mucilage, were also observed on the leafy and minute bracts of the inflorescences. Each leafy bract bears 9-13 colleters, from which 2 to 4 are marginal and standard-type, and the remaining are axillary and resemble morphologically the conical colleters from the leaf primordia. The minute bracts, on the contrary, bear 2 to 4 marginal, conical colleters at the base. A distention of the cuticle was observed in the epidermal cells of the colleters at the leaf primordia and leafy bracts, and also on the senescent colleters at the minute bracts. Three types of secretory structures were found in the flowers of *R. sellowii*: epidermal cells of the style-head, nectaries and laticifers. No colleters were found at the base of the calyx lobes. The epidermal cells of the style-head produce mucilage, and the presence of long trichomes below the apical appendages of the style-head is a major distinctive

characteristic of masculine functionally flowers. Regardless the flower type, the style-head is never fused to the androecium and thus correspond to the “type 2” organizational level described in Apocynaceae. The nectaries form an annular ring surrounding the ovary base and slightly bilobed at the apex. Vascularization of the organ is constituted by concentric bundles at the basal portion and phloematic bundles at the apical portion. The nectariferous parenchima is covered by a single epidermal layer, with stomata distributed preferentially at the apex. The observed laticifers are branched and are widely distributed in all floral organs. The presence of a conspicuous nectary ring surrounding the ovary and the absence of colleters at the base of the calyx lobes are diagnostic characteristics traditionally used in the tribal classification of Apocynaceae, and their co-ocurrence in *R. sellowii* corroborates its placement in the tribe Vinceae.

INTRODUÇÃO GERAL

Rauvolfia sellowii Müll.Arg. está inserida na família Apocynaceae, a qual passou por mudanças desde que foi descrita pela primeira vez por Adanson (1763). Endress & Bruyns (2000) propuseram uma nova classificação para Apocynaceae, com a inclusão de Asclepiadaceae que, desta maneira, ficou constituída por 424 gêneros distribuídos em cinco subfamílias: Rauvolfioideae Kostel., Apocynoideae Burnett, Periplocoideae R.Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R.Br. ex Burnett. Recentemente, a família foi descrita por Judd *et al.* (2002) com cerca de 335 gêneros e 3700 espécies de áreas tropicais e subtropicais e alguns poucos gêneros distribuídos por áreas temperadas.

A vasta ocorrência das estruturas secretoras ou glândulas em espécies de Apocynaceae traz uma grande importância econômica e medicinal, pois desses são extraídas compostos como látex, glicosidios cardiotônicos e alcalóides (Metcalfe & Chalk 1950; Rizzini & Mors 1976). As estruturas secretoras estão relacionadas com a produção de substâncias resultantes do metabolismo primário e secundário. Estas substâncias começaram a ser estudadas no século passado por pesquisadores interessados, principalmente, no poder destas como: drogas medicinais, veneno, aromatizantes e materias industriais (Taiz & Zeiger 1998).

Em Apocynaceae, as estruturas secretoras são encontradas tanto nos órgãos vegetativos quanto nos reprodutivos e as mais relatadas são: coléteres, epiderme da cabeça dos estiletes, nectários, laticíferos, osmóforos, cavidades, idioblastos e tricomas (Solereder 1908; Woodson & More 1938; Metcalfe & Chalk 1950, 1979; Rao & Ganguli 1963; Fallen 1986; Thomas 1991; Kunze 1993, 1994, 1997; Lin & Bernardello 1999; Endress & Bruyns

2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2006; Simões 2004; Demarco 2005; Demarco *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006, 2007).

Os coléteres são estruturas glandulares associadas à proteção dos meristemas, através da produção de uma secreção viscosa ou gomosa de coloração variada (Thomas 1991). A secreção pode ser constituída por mucilagem, lipídios (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991), ou ainda, por uma mistura de ambas (Fahn 1979). Quando presentes em Apocynaceae, são emergências ou glândulas persistentes localizadas na região adaxial de órgãos como folhas, brácteas, bractéolas e sépalas (Thomas 1991). Apesar de ser uma estrutura de grande ocorrência e utilizada como um caráter taxonômico em Apocynaceae (Woodson 1936; Rao 1956; Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Koch 2002; Simões & Kinoshita 2002; Spina 2004), poucos trabalhos, foram realizados envolvendo distribuição, estrutura, ontogênese e histoquímica dos coléteres (Mirabella 1897; Ramayya & Bahadur 1968; Fjell 1983; Mohan & Inamdar 1986; Dave *et al.* 1987; Kuriashen & Dave 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991; Appezzato–da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006).

Segundo Metcalfe & Chalk (1950), os laticíferos têm ocorrência universal em Apocynaceae, pois além de serem relatados para as partes vegetativas (Metcalfe & Chalk 1950; Milanez 1959; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Demarco *et al.* 2006), também são encontrados em partes reprodutivas (Murugan & Inamdar 1987a,b; Aguiar 2003; Demarco 2005, Demarco *et al.* 2006; Rio 2006). As plantas produtoras de látex são consideradas bem sucedidas (Farrell *et al.* 1991), pelo fato do látex inibir a herbivoria, impedir a proliferação de fungos e selar ferimentos (Fahn 1979; Farrell *et al.* 1991; Demarco 2005).

Apocynaceae apresenta uma grande variação na estrutura floral, que vai de flores mais simples sem adnação entre os verticilos férteis nas subfamílias mais basais, até as mais complexa culminando em Asclepiadoideae (Fallen 1986; Endress 1994). A maioria dos representantes caracteriza-se por apresentar simetria radial, corola tubular pentâmera e muitas espécies são polinizadas por insetos (Fallen 1986). O trabalho mais abrangente de estrutura floral das Apocynaceae, até o momento, foi realizado por Woodson e Moore (1938), no qual 59 espécies foram estudadas, com o objetivo principal de comparar a vascularização e morfologia floral. Posteriormente, Rao & Ganguli (1936), Fallen (1986), Kunze (1993, 1994, 1997), Galetto (1997), Torres & Galetto (1998), Lin & Bernardello (1999) contribuíram com dados importantes sobre a estrutura floral de representantes desta família. Para alguns gêneros brasileiros podemos citar os trabalhos de, Rio (2006), Simões (2004), Demarco (2005), Gomes (2006), Simões (2006) e Simões *et al.* (2006, 2007) que contribuíram com dados importantes, sobre anatomia e morfologia floral de algumas espécies da flora brasileira.

A união dos carpelos é um fato comum nas angiospermas mais derivadas (Walker 1975a; Endress *et al.* 1983). Em Apocynaceae, esta fusão dá origem à cabeça dos estiletes a qual é revestida por epiderme secretora (Walker 1975a,b). Fallen (1986) ao analisar a morfologia, histologia e a função da cabeça dos estiletes de espécies de Apocynaceae definiu uma progressão em relação aos estádios evolutivos desta estrutura.

Nas Apocynaceae, os nectários florais podem apresentar uma grande variação em relação à origem, posição e forma (Woodson & More 1938; Rao & Ganguli 1963; Rachmilevitz & Fahn 1973; Galetto 1997; Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999; Rio 2006), ocorrendo também fusão parcial ou total destas estruturas secretoras ao gineceu, ou à

corola, ou à corona (Rao & Ganguli 1963). Em Rauvolfioideae, quando presentes, os nectários podem estar localizados ao redor do ovário formando um anel contínuo (Woodson & More 1938), com ápice lobado ou não, ou até mesmo como dois nectários alternos aos dois carpelos (Woodson & More 1938; Rachmilevitz & Fahn 1973).

O osmóforo é uma estrutura glandular floral epidérmica exposta (Vogel 1990), a qual pode apresentar diversas formas (Esau 1965) e ser encontrado em várias partes florais; freqüentemente, na região mais distal do perianto. Esta estrutura utiliza rapidamente os materiais de reserva para produzir secreções voláteis de composição variável para atrair polinizadores (Vogel 1990). Em Apocynaceae, esta estrutura é pouco estudada sendo apenas citada, sem nenhuma comprovação estrutural nos trabalhos de Galetto (1997), Torres & Galetto (1998) e Lin & Bernardello (1999). Demarco (com. pess.) sugere a presença destas estruturas nos lobos da corola de *Aspidosperma australe* Müll.Arg.

Rauvolfioideae constitui um grupo bastante heterogêneo em relação à estrutura floral e agrupa os táxons mais basais de Apocynaceae. Para a delimitação de tribos são utilizados tanto caracteres vegetativos quanto reprodutivos (Endress & Bruyns 2000). Evidências morfológicas associadas a dados moleculares têm demonstrado mudanças significativas na delimitação de tribos em Rauvolfioideae (Simões *et al.* 2007).

Rauvolfia L. pertence à tribo Vinceae Duby de Rauvolfioideae (Endress & Bruyns 2000; Simões *et al.* 2007) e apresenta cerca de 70 espécies de distribuição tropical. Destas, 20 são encontradas no Brasil e 11 são endêmicas, sendo *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. a única espécie que ocorre no estado de São Paulo (Koch & Kinoshita 2005). A revisão taxonômica mais recente, das espécies neotropicais do gênero foi realizada por Koch (2002) juntamente com o

estudo sobre a biologia reprodutiva e aspectos morfológicos e funcionais de *R. sellowii*, no qual foi constatado o primeiro caso de dioicia funcional para a familia (Koch *et al.* 2002).

Os componentes deste gênero podem ser subarbustos, arbustos ou árvores, com 3-6 folhas por nó, verticiladas. Coléteres dentiformes ou filiformes estão presentes na região nodal, na margem dos pecíolos, na face ventral dos pecíolos e nos artículos das inflorescências (Thomas 1991; Koch 2002). A ocorrência e a posição dos coléteres vegetativos no gênero foram utilizadas como caráter taxonômico na definição de seções dos gêneros americanos e na determinação das espécies neotropicas (Rao 1956; Koch 2002).

Rauvolfia tem sido objeto de estudos fitoquímicos devido aos alcalóides indólicos (Kato 2001), sendo que estas plantas são utilizadas como fontes de importantes agentes terapêuticos. Apenas um trabalho com enfoque no isolamento de compostos químicos foi encontrado para *R. sellowii*; neste, a partir do extrato das folhas um novo alcalóide foi detectado e denominado sellowiine (Batista *et al.* 1996).

Baseado na importância dos estudos relacionados com as espécies portadoras destes compostos ativos, Gonçalves (1962/65) realizou um estudo sobre a anatomia da folha de *R. grandiflora* Mart. por achar necessário um melhor conhecimento das plantas brasileiras de importância farmacológica.

As flores de *Rauvolfia* geralmente são actinomorfas a levemente zigomorfas, pentâmeras e na maioria dos casos hermafroditas, podendo apresentar ginodioicia ou dioicia (Koch 2002). Poucos trabalhos foram realizados em relação à estrutura floral, estando estes mais voltados para morfologia e polinização, como os de *R. grandiflora* Mart. ex A.DC. in DC. (Lopes & Machado 1999), *R. tetraphylla* L. (Bawa *et al.* 1985), *R. sellowii* (Koch 2002; Kock *et al.* 2002) e *R. serpentina* (L.) Benth. ex Kurtz. (Mital & Issar 1968). Koch *et al.* (2002)

relataram a dioicia funcional em *R. sellowii.* Dados anatômicos foram encontrados apenas sobre a vascularização floral de *R. tetraphyla* (Woodson & More 1938). Apesar de Fallen (1986) ter incluído *R. balansae* (Baillon) Boit. e *R. reflexa* Teijsm. & Binnend em seu estudo, estas não foram selecionadas para a descrição da estrutura floral. Dados anatômicos florais de *R. sellowii* não foram encontrados. Assim, os trabalhos que envolvem o gênero abordam principalmente as substâncias de interesse farmacológico havendo, portanto, escassez em estudos relacionados à parte estrutural de órgãos vegetativos e reprodutivos.

Este trabalho está inserido em uma ampla pesquisa, realizada no Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP por um grupo de professores e alunos, a qual tem por objetivo principal o estudo anatômicos de espécies brasileiras de Apocynaceae. Dentre os trabalhos realizados até o momento podemos citar: Rio (2002, 2006), Rio *et al.* (2002, 2005), Aguiar (2003), Simões (2004), Demarco (2005), Demarco *et al.* (2006), Gomes (2006), Simões *et al.* (2006, 2007).

Os únicos trabalhos anatômicos de espécies brasileiras de Rauvolfioideae, realizados por pesquisadores brasileiros, foram descritos por Gonçalves (1962/65) para *Rauvolfia grandiflora* Mart., Aguiar (2003) para *Tabernamontana catharinensis* A.DC., por Demarco (2005) para duas espécies de *Aspidosperma* Mart. (Alstoniae) e Demarco *et al.* (2006) para *A. australe* Müll.Arg. A escolha de *Rauvolfia sellowii*, para este trabalho, deve-se ao fato desta espécie ser componente da subfamília mais basal de Apocynaceae (Kinoshita & Simões 2005), uma das três subfamílias de ocorrência no território brasileiro e por ser a única espécie do gênero que ocorre no estado de São Paulo (Koch & Kinoshita 2005). Os dados obtidos irão colaborar também, com as pesquisas realizadas no presente momento pela

equipe do Departamento de Botânica da UNICAMP, relativas aos estudos anatômicos e filogenéticos de *Rauvolfia*.

OBJETIVOS

Diante da escassez de dados anatômicos das espécies brasileiras de Rauvolfioideae, os objetivos principais deste trabalho são: caracterizar anatomicamente os coléteres em órgãos vegetativos e reprodutivos , bem como as estruturas secretoras das flores de *Rauvolfia sellowii.*

Objetivos específicos

- Definir a ocorrência, a posição, o número, o tipo dos coléteres foliares e comprovar a presença de mucilagem na secreção por eles produzida;
- Verificar a ocorrência dos coléteres em órgãos reprodutivos, definir sua posição e número, caracterizar a sua estrutura, comprovar a presença de mucilagem na secreção por eles produzida e realizar um estudo comparativo com os coléteres foliares;
- Caracterizar anatomicamente as estruturas secretoras dos dois tipos florais de *Rauvolfia sellowii*, dando ênfase à cabeça dos estiletes.

CAPÍTULO I

Coléteres foliares de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae)

INTRODUÇÃO

Os coléteres têm por função lubrificar e proteger os meristemas através da produção de uma substância viscosa composta por mucilagem, por substâncias lipofílicas, incluindo os terpenos, ou por ambas (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991). Por semelhança estrutural, os coléteres já foram confundidos com nectários extraflorais (Mohan & Inamdar 1986) e, de acordo com a posição ou características semelhantes às de outras estruturas secretoras, apresentaram diferentes denominações ao longo dos anos na literatura (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Metcalfe & ChalK 1950, 1979; Subramanian *et al.* 1989).

Nas Apocynaceae, os coléteres são freqüentemente encontrados em órgãos vegetativos (Thomas 1991) e podem estar ausentes em alguns gêneros (Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Sennblad *et al*. 1998; Demarco 2005). Por serem identificados pela função que exercem, os coléteres podem variar estruturalmente como tricomas, emergências ou glândulas, quando vascularizados (Fahn 1990; Thomas 1991).

Os coléteres podem fornecer caracteres utilizados em trabalhos taxonômicos em Apocynaceae, pois a sua ocorrência, tipo e número são, geralmente, constantes dentro de um gênero e/ou espécie (Woodson 1935, 1936; Rao 1956; Rio 2001; Rio *et al.* 2002; Koch 2002; Simões & Kinoshita 2002). Poucos estudos relacionados à estrutura, distribuição, desenvolvimento e histoquímica dos coléteres vegetativos (Mirabella 1897; Fjell 1983;

Thomas & Dave 1989a,b; Thomas *et al.* 1989; Demarco 2005) foram realizados até o momento em espécies de Rauvolfioideae Kostel. Poucos trabalhos com espécies brasileiras foram realizados por pesquisadores brasileiros, os quais desenvolveram estudos com espécies das subfamílias Apocynoideae Burnett (Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002; 2005) e Asclepiadoideae (Demarco 2005).

O tipo estrutural mais descrito nas Apocynaceae é o padrão (standard), denominado por Lersten (1974) para descrever os coléteres em Rubiaceae. Recentemente, novos tipos de coléteres como, cônicos, ramificados e sésseis, foram descritos em órgãos vegetativos de espécies de *Prestonia* R.Br. (Rio *et al.* 2002), *Blepharodon* Decne. (Demarco 2005), *Forsteronia* G.Mey. (Rio *et al.* 2005) e *Mandevilla* Lind. Simões *et al.* (2006). Em relação ao posicionamento dos coléteres em órgãos vegetativos, eles podem ocupar duas posições: interpeciolar e intrapeciolar (Sennblad *et al.* 1998).

Rauvolfia é pantropical pertencente à tribo Vinceae Duby de Rauvolfioideae (Endress & Bruyns 2000), sendo que, 26 das 70 espécies são atualmente reconhecidas e endêmicas na América do Sul (Koch 2002). As estruturas presentes na região nodal dos representantes deste gênero foram interpretadas como estípulas por Rao (1956), apesar de chamá-las de escamas de botões em algumas espécies. Diante desta contradição, Koch (2002) identificou as estípulas descritas por Rao (1956) como catáfilos, por protegerem gemas na região nodal de algumas espécies neotropicais. A ocorrência e a posição dos coléteres vegetativos no pecíolo das folhas e região nodal, foram utilizadas como caracteres taxonômicos na definição de seções dos gêneros americanos (Rao 1956) e na determinação das espécies neotropicas (Koch 2002). A presença de coléteres peciolares foi relatada para o gênero (Mia 1960; Jain *et*

al. 1986; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991), existindo uma controvérsia em relação à presença dos calicinais (Thomas 1991; Endress & Bruyns 2000).

Até o presente momento, apenas o ápice caulinar de *Rauvolfia vomitoria* Afsel. (Mia 1960) e as folhas de *Rauvolfia grandiflora* Mart. (Gonçalves 1962/65) foram anatomicamente investigados. Nas descrições destes órgãos vegetativos, dados sobre a estrutura anatômica dos coléteres não foram relatados. Apesar de não ter realizado um estudo anatômico, mas apenas análise morfológica, Rao (1956) relatou dados relevantes sobre estas estruturas ao comparar a região nodal de *Rauvolfia cubana* A.DC., *R. littoralis* Rusby, *R. serpentina* (L.) Benth ex Kurz e *R. tetraphylla* L..

Rauvolfia sellowii Müll.Arg. é a única espécie do gênero ocorrente no estado de São Paulo (Koch & Kinoshita 2005) e a única em Apocynaceae a apresentar dioicia funcional (Koch *et al*. 2002).

Diante da importância taxonômica e da escassez de dados anatômicos dos coléteres de *Rauvolfia sellowii*, o objetivo deste trabalho é definir a ocorrência, a posição, o número, o tipo dos coléteres foliares e comprovar a presença de mucilagem na secreção por eles produzida.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado no presente estudo foi coletado em três áreas nas imediações de Campinas (Distrito de Joaquim Egídio, Bairro Taquaral - Parque Portugal e Subdistrito de Barão Geraldo - *campus* da Universidade Estadual de Campinas), onde a marcação dos indivíduos femininos e masculinos de *Rauvolfia sellowii* foi realizada, durante o período de floração no ano de 2005. Ramos vegetativos de três indivíduos femininos e dois masculinos foram coletados de junho a julho de 2006. Os materiais testemunha foram identificados pela

Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita e Profa. Dra. Ingrid Koch, e incorporados ao Herbário UEC (tabela 1).

Tabela 1. Dados referentes ao material testemunha de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg.

Indivíduo	Localidade	Nome e nº coletor	Data	Registro UEC
feminino	Campinas, Distrito de Joaquim Egídio	RM Marasca 1	17/IX/2005	145793
masculino	Campinas, Distrito de Joaquim Egídio	RM Marasca 3	17/IX/2005	145795
masculino	Campinas, Bairro Taquaral	RM Marasca 8	11/X/2005	145798
feminino	Campinas, Bairro Taquaral	RM Marasca 9	11/X/2005	145799
feminino	Campinas, Subdistrito de Barão Geraldo	RM Marasca 13	20/I/2006	145815

A análise morfológica foi realizada em material vivo, com o uso de microscópio estereoscópico, para confirmar a presença dos coléteres nas folhas adultas, folhas jovens e primórdios foliares. O registro dos resultados morfológicos relevantes foi obtido através de câmera digital Nikon SMZ-U.

Os ápices vegetativos foram selecionados e fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50% 1:1:18 v/v) por 24h (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina 9:1 v/v) por 48h (Lillie 1948 *in* Clark 1973). As peças isoladas foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940) e incluídas em paraplast. Secções seriadas longitudinais e transversais, com 12μm de espessura, foram obtidas através de micrótomo rotativo Microm HM340E, coradas com Safranina e Azul de astra para o estudo estrutural (Gerlach 1969) e montadas em resina sintética. Para evidenciar as principais classes de compostos sintetizados pelos coléteres, alguns testes foram realizados: reação PAS para evidenciar polissacarídeos totais (Jensen 1962), Vermelho de

rutênio para mucilagem (Gregory & Baas 1989) e preto de Sudão B (Pearse 1985) para lipídios totais. As lâminas obtidas foram montadas em gelatina glicerinada.

Dados relevantes foram registrados em filme KODAK Pro Image 100 e Gold 100 utilizando-se microscópio Olympus BX51; as escalas foram obtidas através da projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. Os negativos foram digitalizados em 600 dpi e utilizados para a elaboração das pranchas no software Microsoft PowerPoint 2000.

RESULTADOS

Os ramos vegetativos de *Rauvolfia sellowii* são desprovidos de estípulas (figuras 1-4). Os ápices caulinares apresentam em seu primeiro nó visível quatro folhas jovens eretas (figura 1), as quais envolvem os primórdios foliares (figuras 2-3). Com a utilização de microscópico estereoscópico, é possível observar uma grande quantidade de secreção esbranquiçada de aspecto gomoso envolvendo a região adaxial das folhas jovens (figuras 2-4) e ambas as faces dos primórdios foliares (figuras 3-4). Esta secreção é produzida por coléteres de cor amarela, os quais estão presentes na base das folhas jovens e dos primórdios (figuras 3-4). A partir do segundo nó visível, a secreção é escassa e os coléteres têm cor castanha (figura 1).

Opostos aos primórdios foliares, os coléteres são diferenciados na gema apenas pela sua origem em: marginais (figuras 5-7) e axilares (figuras 8-9). Os marginais são formados na base dos primórdios do segundo e terceiro nós (figuras 5-7). No terceiro nó, coléteres axilares também são observados em início de seu desenvolvimento (figuras 8-9). Todos os coléteres ocupam posição intrapeciolar (figuras 12, 14, 16). O elevado número de coléteres e

sua disposição em duas ou três fileiras, paralelas a superfície da base dos órgãos examinados (figuras 10, 12, 14, 16, 18), inviabilizam a definição do número destas estruturas em *R. sellowii*.

Na fase secretora, uma variação no comprimento dos coléteres é observada no quarto nó (primeiro nó visível) na base das folhas jovens (figura 18). Os mais curtos ocupam posição proximal ao nó (figuras 18-19) e os mais longos, posição distal (figuras 18-20). Ambos são cônicos, íntegros, persistentes e recobertos por cutícula que pode se apresentar distendida do ápice para a base (figuras 14-17, 20, 26, 32). Estruturalmente são formados por um pedúnculo não secretor (figuras 10-11, 19) e uma região alongada constituída por epiderme em paliçada secretora que recobre um eixo central de células parenquimáticas (figuras 14-17, 19, 22, 27).

O pedúnculo é constituído por epiderme com células cúbicas recobertas por cutícula (figuras 10-11, 19, 24, 29) e eixo central formado apenas por células parenquimáticas desprovidas de cristais (figuras 19, 21, 24, 29).

Na região alongada, a epiderme em paliçada possui células secretoras de paredes finas, citoplasma denso que são responsáveis pela produção do exsudato acidófilo, evidenciado no interior das células pela Safranina (figura 19). As células secretoras apresentam retração no protoplasto (figuras 19, 26, 28, 32) após a liberação do exsudato, que será acumulado no espaço deixado pela distensão da cutícula (figuras 26, 31-32) para, posteriormente, ser liberado para o meio extracelular. A presença do núcleo não pode ser observada devido a grande quantidade de secreção no interior da célula (figuras 19, 26, 32). O eixo central é formado por células parenquimáticas alongadas longitudinalmente e desprovido de vascularização (figuras 18-21). Idioblastos cristalíferos com cristais do tipo

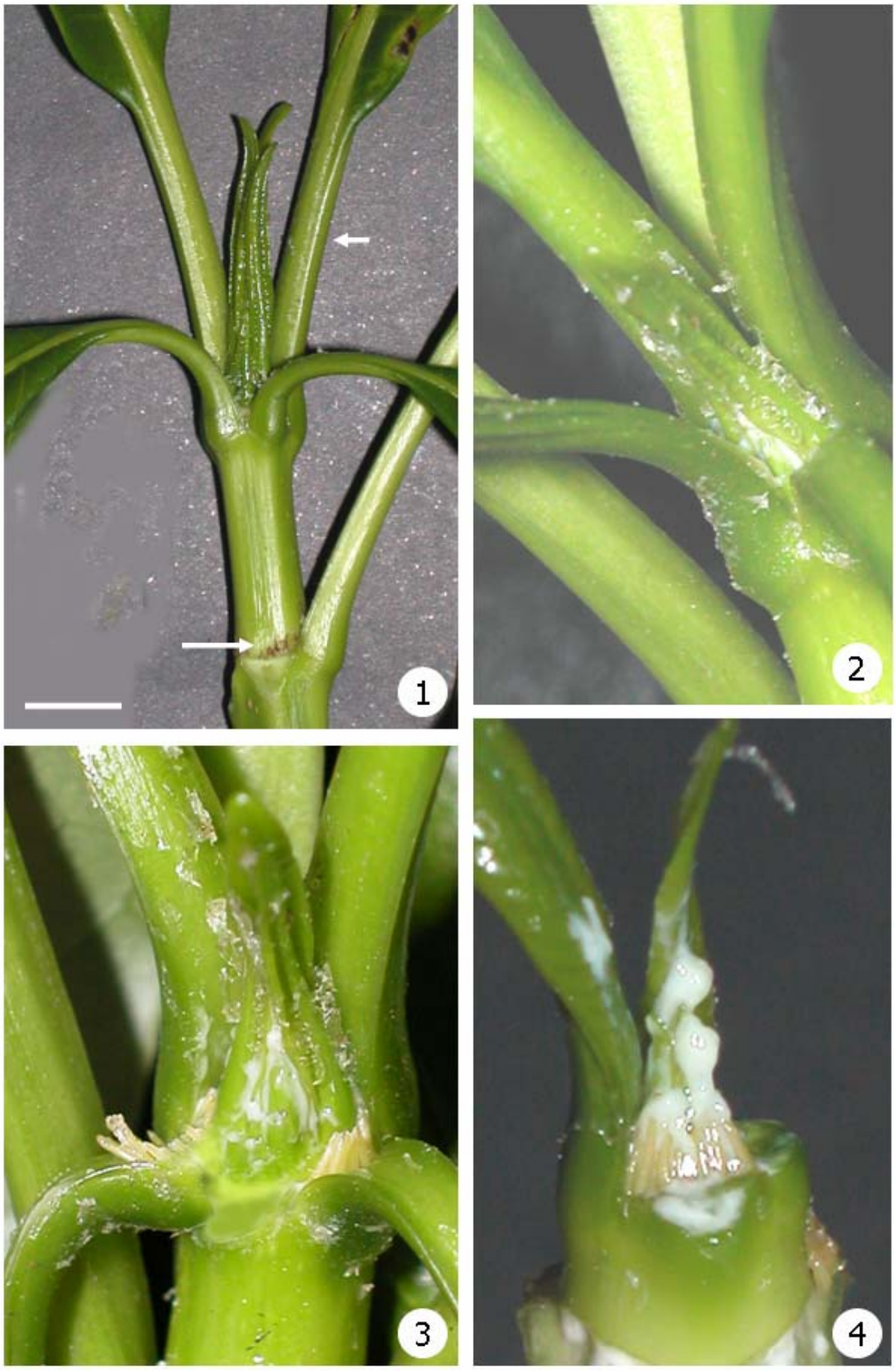
drusa (figura 21), são observados em alguns coléteres em fase secretora. Tricomas e laticíferos não foram observados.

A presença de polissacarídeos é constatada no interior das células da epiderme em paliçada (figuras 22-28), no espaço subcuticular (figuras 24-26) e no meio extracelular (figuras 22-26). Para o teste com Vermelho de rutênio, o resultado é positivo para mucilagem apenas no interior das células da epiderme em paliçada (figuras 27-28).

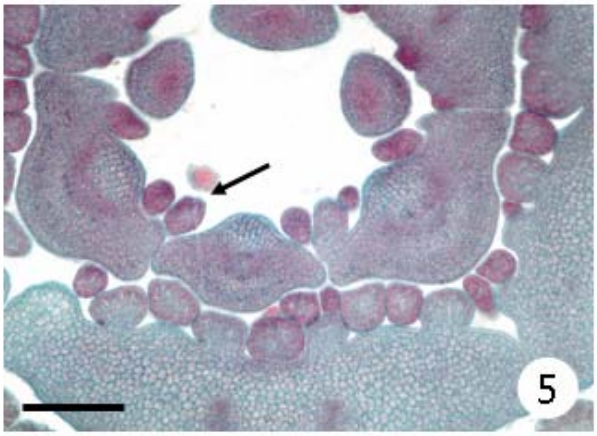
A cutícula recobre o coléter desde sua base até o ápice e é evidenciada pelo preto de Sudão B (figura 29). Com a distensão desta estrutura, forma-se um espaço onde a secreção é acumulada (figuras 31-32). O exsudato dos coléteres de materiais fixados pelo FAA (figura 30) ou pelo FNT (figura 32) apresenta resultado negativo para preto de Sudão B.

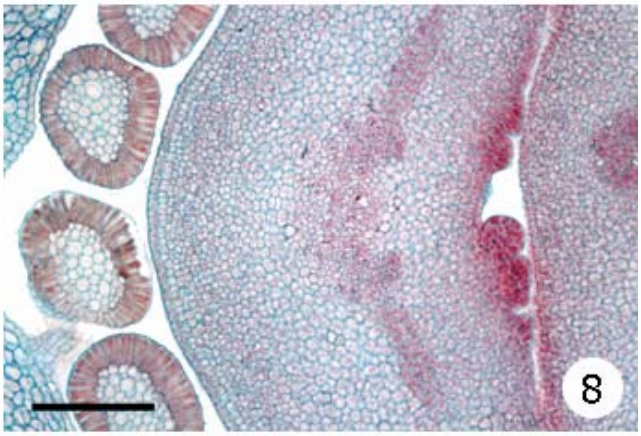
I LUSTRAÇÕES

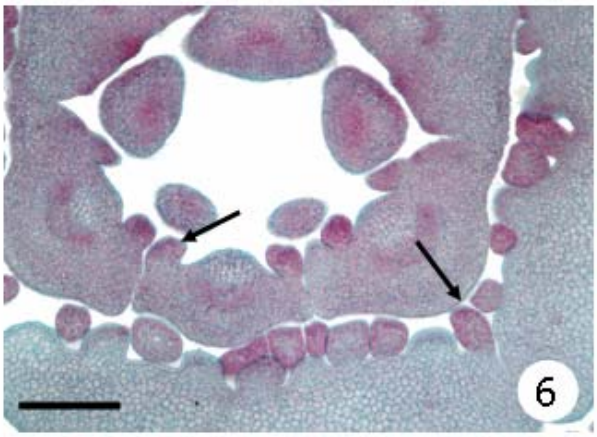
Figuras 1-4. Ramos vegetativos do indivíduo coletado no *campus* da UNICAMP (UEC 145815). **1.** Vista geral do ramo; notar folhas jovens (seta curta) no primeiro nó visível. Coléteres senescentes na base de folha jovem (removida) no segundo nó visível (seta longa). **2-4.** Secreção esbranquiçada de aspecto gomoso envolvendo as folhas jovens e os primórdios foliares. **Escala**: 1. 1cm

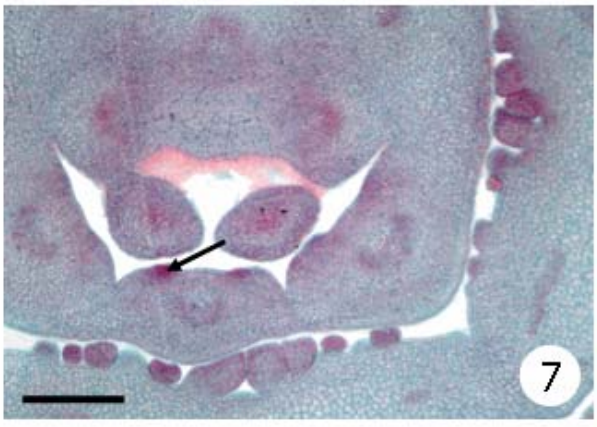

1
2
3
4

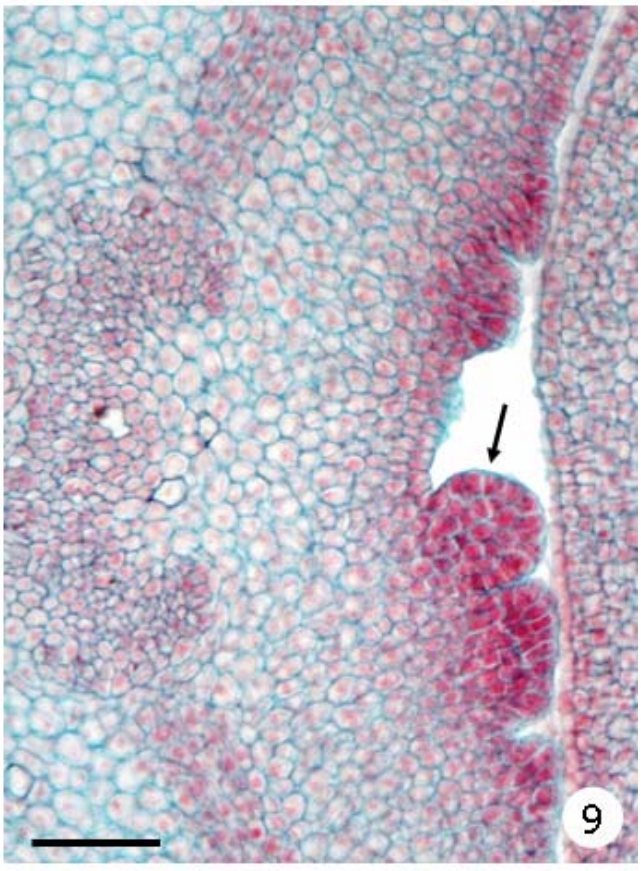
Figuras 5-9. Coléteres do segundo e terceiro nó em secções transversais. **5-7.** Formação dos coléteres marginais nos primórdios do segundo e terceiro nós (setas). **5.** Região apical da gema. **6.** Região mediana da gema. **7.** Região basal da gema. **8.** Coléteres em formação na axila dos primórdios do terceiro nó. **9.** Pormenor da figura 8. **Escalas:** 5-7. 200μm; 8. 150μm; 9. 50μm


5

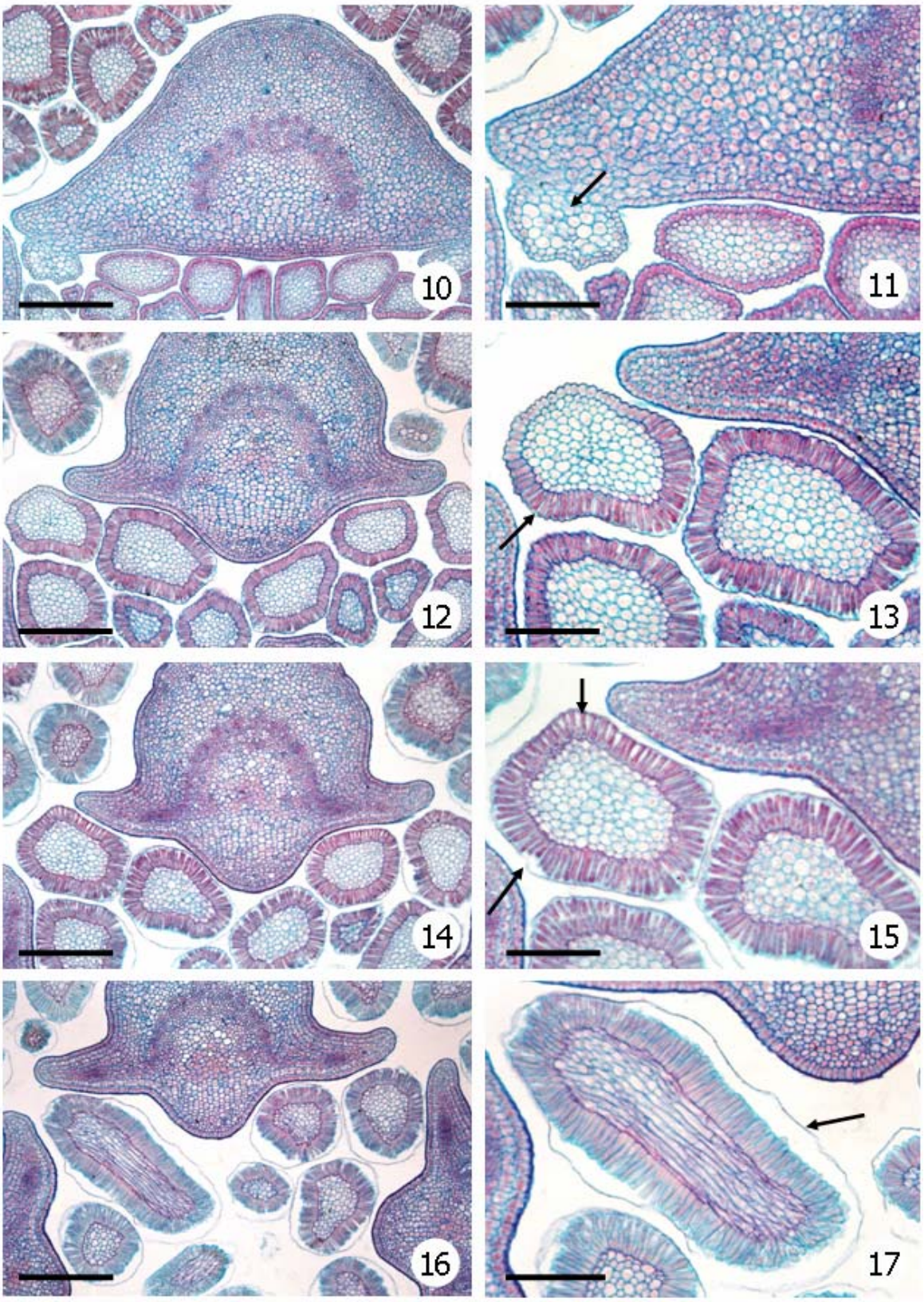

8


6


7

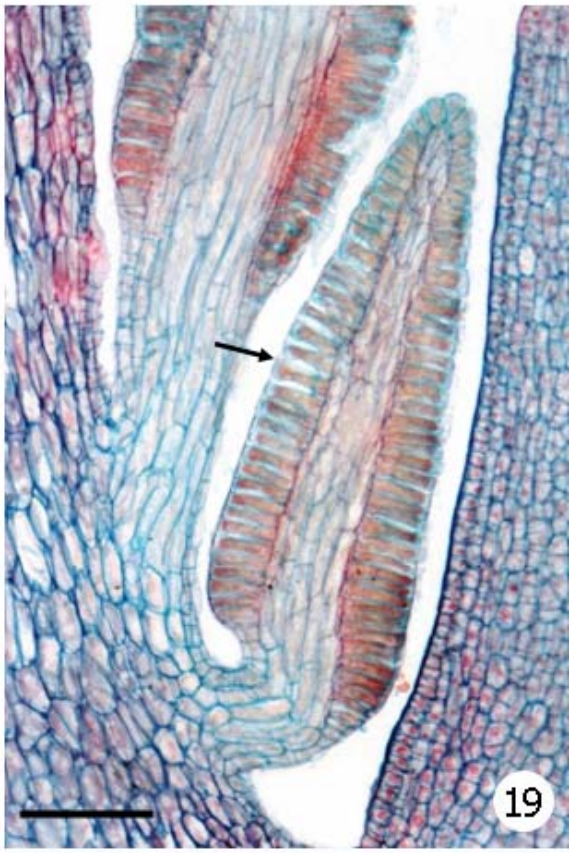

9

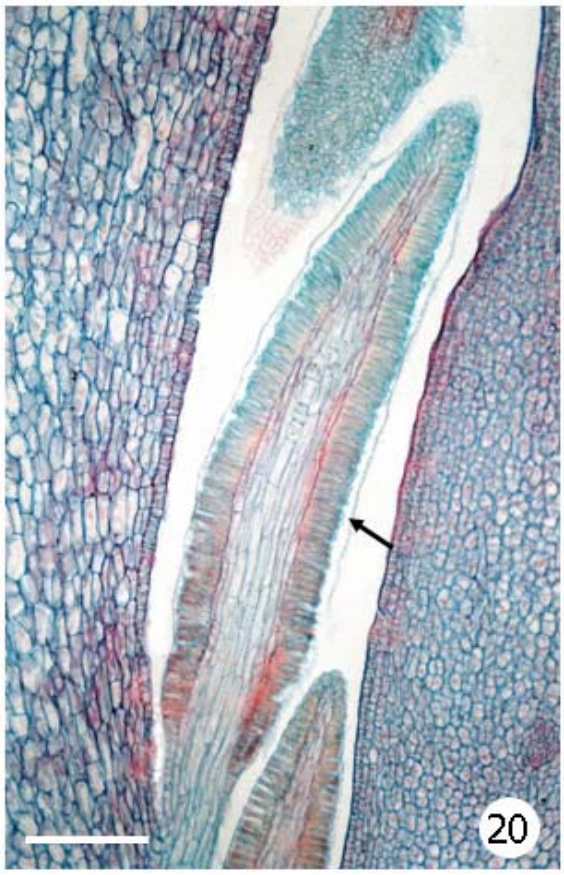
Figuras 10-17. Coléteres em secções transversais de um primórdio foliar do terceiro nó. **10-11.** Região basal do coléter marginal, pedúnculo (seta). **12-13.** Região basal do coléter, epiderme em paliçada (seta). **14-15.** Região mediana do coléter, células epidérmicas apresentam retração do protoplasto (seta curta) e cutícula distendida (seta longa). **16-17.** Região apical do coléter, cutícula completamente distendida (seta). **11,13,15,17.** Pormenor das figuras 10,12,14,16. **Escalas:** 10,12,14,16. 200μm; 11,13,15,17. 100μm.

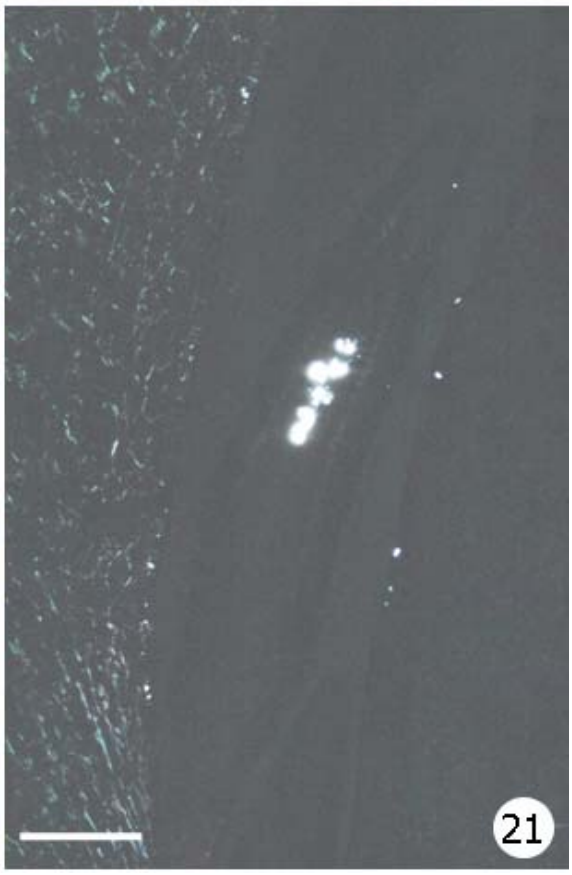

10
11
12
13
14
15
16
17

Figuras 18-21. Coléteres em secções longitudinais do quarto nó (primeiro nó visível). **18.** Notar variação no comprimento dos coléteres foliares e presença de cutícula distendida no coléter mais longo. **19.** Detalhe do coléter mais curto, notar retração do protoplasto (seta). **20.** Detalhe do coléter mais longo com cutícula distendida (seta). **21.** Drusas no parênquima da porção central do coléter evidenciadas por luz polarizada. **Escalas:** 18. 200μm; 19. 75μm; 20-21. 100μm.

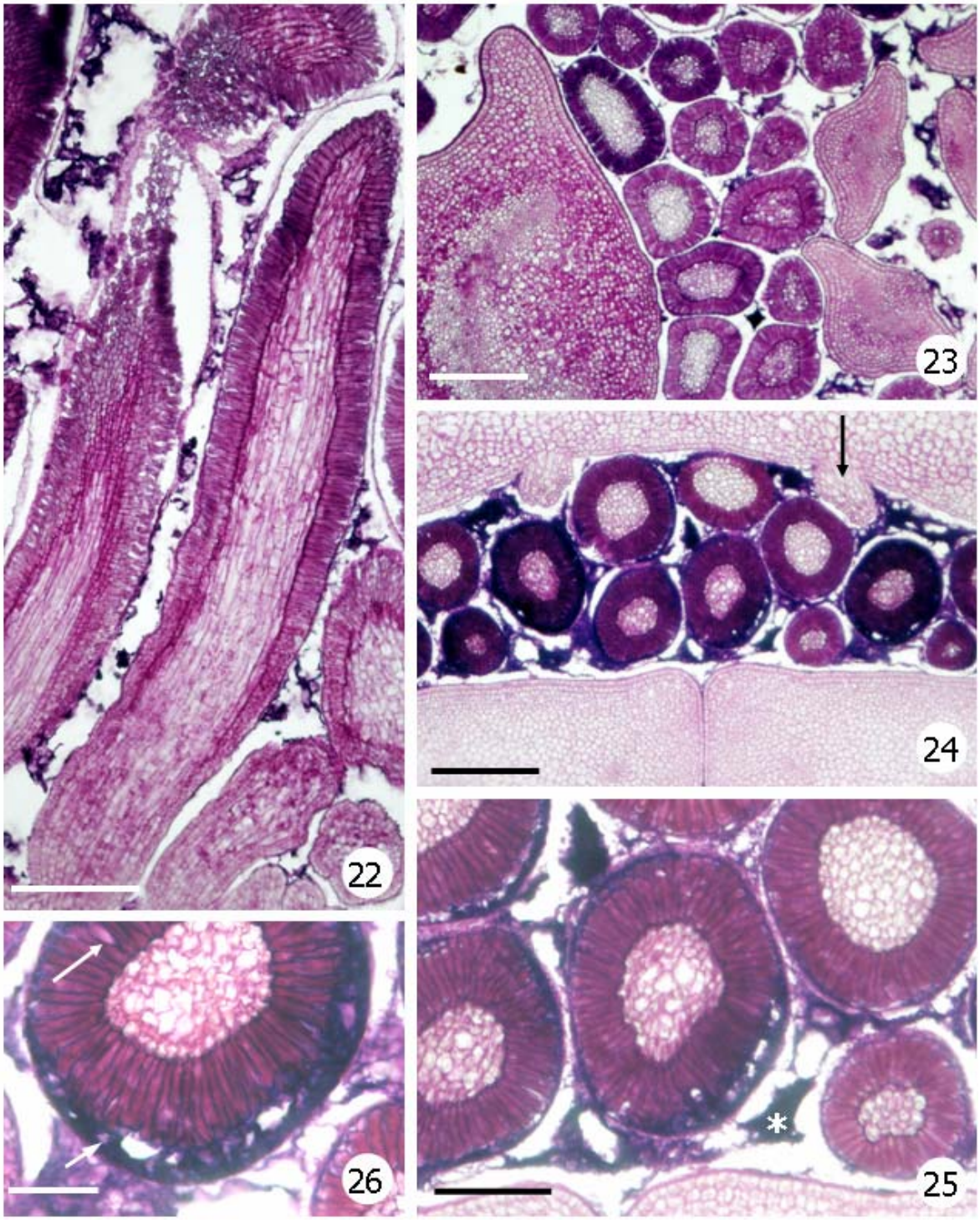
18


19


20

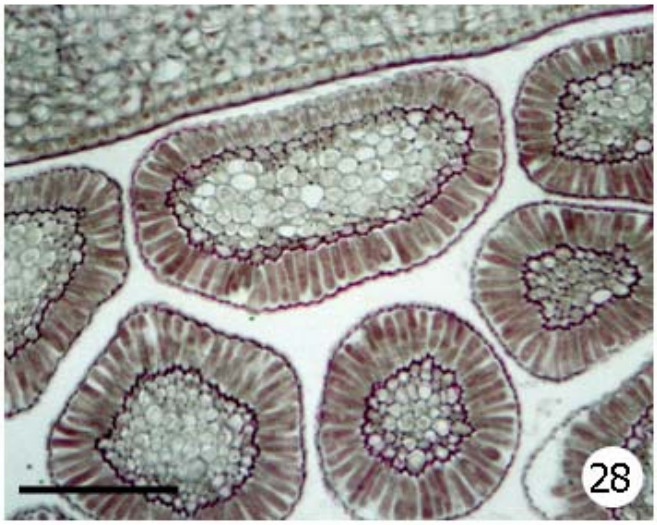

21

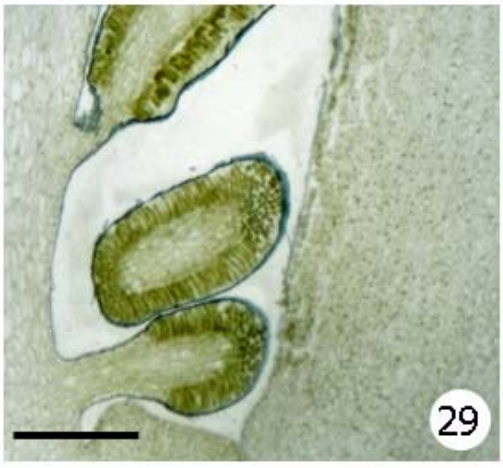
Figuras 22-26. Coléteres do terceiro e quartos nós submetidos à reação PAS. **22.** Secção longitudinal (UEC 145793). **23-26.** Secções transversais (UEC 145799). **22.** Polissacarídeos evidenciados no interior das células em paliçada e no meio extracelular. **23.** Vista geral dos coléteres do terceiro nó. **24.** Vista geral dos coléteres do quarto nó, notar células não secretoras no pedúnculo (seta). **25-26.** Detalhe da figura 24, notar retração do protoplasma (seta longa), distensão da cutícula; polissacarídeos evidenciados no interior da célula, no espaço subcuticular (seta curta) e no meio extracelular (*). **Escalas:** 22. 150μm; 23-24. 200μm; 25.100μm; 26. 50μm.


22
23
24
25
26
*

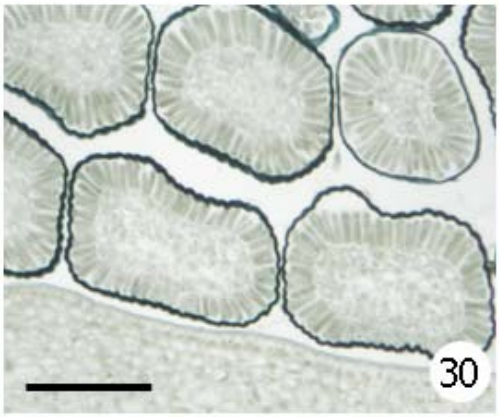
Figuras 27-32. Coléteres do terceiro e quarto nó. **27, 29.** Secções longitudinais. **28,30-32.** Secções transversais. **27–28.** Resultado positivo para mucilagem no interior das células epidérmicas em paliçada, nos coléteres submetidos ao Vermelho de rutênio (UEC 145815). **29-32.** Resultado positivo apenas na cutícula, notar espaço subcuticular; coléteres fixados em FAA (29-30) e FNT (31-32) submetidos ao preto de Sudão B (UEC 145799). **32.** Pormenor da figura 31. **Escalas:** 27,29-30. 200μm; 28,31. 100μm; 32. 50μm.

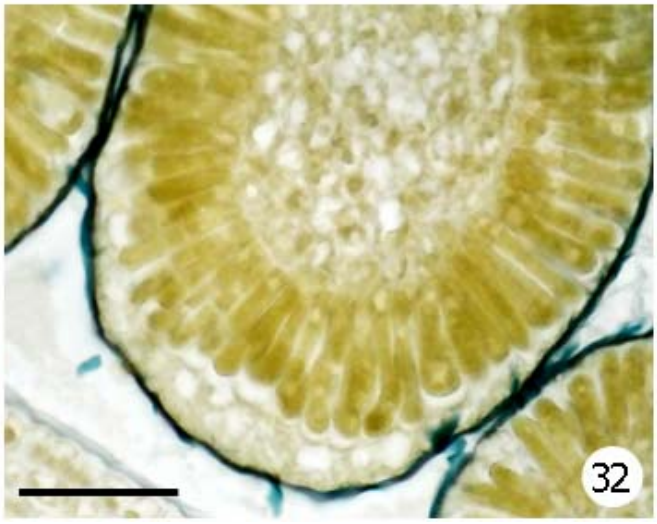
27


28


29

31


30


32

DISCUSSÃO

Os coléteres ocorrem na base da face adaxial dos primórdios foliares e no pecíolo das folhas jovens e adultas dos indivíduos com flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas de *Rauvolfia sellowii* (Koch 2002). Essa característica já foi observada nas folhas de outras espécies do gênero (Rao 1956; Mia 1960; Gonçalves 1962/65; Thomas 1991). A presença destas estruturas no pecíolo já foi registrada em 12 gêneros de Rauvolfioideae: *Allamanda* L., *Alstonia* R., *Carissa* L., *Catharantus* G., *Cerbera* L., *Himatanthus* Willd., *Melodinus* Forst., *Plumeria* L., *Rauvolfia* L., *Thevetia* L. *Vallesia* Ruiz & Pav. e *Vinca* L. (Mirabella 1897; Mia 1960; Fjell 1983; Jain *et al.* 1986; Thomas & Dave 1989 a,b; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991). Nas tribos mais basais de Rauvolfioideae (Endress & Bruyns 2000) podem estar presentes, em espécies como *Vallesia cymbaefolia* Orteg. (Mirabella 1897) e *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1991), ou ausentes, em espécies como *Aspidosperma australe* Müll. Arg. e *A. tomentosum* Mart. (Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Demarco 2005).

Os coléteres encontrados em *R. sellowii* são amarelos, desde o início de seu desenvolvimento até a fase secretora, quando produzem uma secreção esbranquiçada de aspecto gomoso, que envolve a região adaxial das folhas jovens do primeiro nó visível e todos os primórdios do ápice. Thomas (1991) afirmou que a secreção dos coléteres se inicia antes do desenvolvimento das folhas, quando estes são amarelos e secretam um material pegajoso que envolve todo ápice vegetativo. Essa observação se confirma nos primórdios de todo ápice vegetativo de *R. sellowii*. Em *Blepharodon bicuspidatum* Fourn., os coléteres têm cor verde no início de seu desenvolvimento, mas possuem a porção secretora amarelada durante a fase secretora quando produzem uma secreção de cor branca de aspecto viscoso

(Demarco 2005). Coléteres de cor verde pálida já foram descritos em *Vinca acutiflora* Bert. por Mirabella (1897).

Os coléteres marginais e axilares de *R. sellowii* são formados na base dos primórdios do segundo e terceiro nós. Neste último, coléteres axilares também são observados em início de seu desenvolvimento. Todos os coléteres ocupam posição intrapeciolar, a qual está de acordo com as descritas na revisão feita para as espécies neotropicais do gênero (Koch 2002) e para seção *Macrovolfia* (Rao 1956). Koch (2002) observou a ausência de catáfilos nessa espécie, mas no gênero as espécies podem ou não apresentar essas estruturas. Rao (1956) relatou que através de observações realizadas em *Rauvolfia tetraphylla*, *R. littoralis*, *R. serpentina* e *R. cubana*, os coléteres e as estípulas, embora associados, são distintos em relação a sua origem. *R. sellowii* não apresenta estípulas, ou estas não são observadas, e os coléteres têm origem na base adaxial das folhas.

Nos indivíduos observados, um número elevado de coléteres posicionados em duas a três fileiras na base dos primórdios e das folhas jovens inviabilizou a definição do número dessas estruturas. A ocorrência de seis a oito coléteres já foi registrada para espécies de *Rauvolfia* (Thomas & Dave 1991), mas o relato da presença de inúmeros coléteres, como os encontrados em *R. sellowii*, é um dado novo. O número dos coléteres pode variar entre indivíduos, como já foi registrado para *Thevetia* (Hifny Saber *et al.* 1969 *apud* Thomas 1991), *Allamanda cathartica* L. (Ramayya & Bahadur 1968; Thomas & Dave 1989a) ou até mesmo no próprio indivíduo, como em *B. bicuspidatum* (Demarco 2005).

Estruturalmente, os coléteres de *R. sellowii* são emergências que apresentam variação de comprimento. Todos são cônicos, constituídos por um pedúnculo não secretor, uma porção alongada secretora e revestidos totalmente por cutícula fina que apresenta distensão

do ápice para a base. As estruturas encontradas são semelhantes ao tipo “standard” descrito por Lersten (1974), por apresentarem uma região alongada revestida por epiderme secretora, porém, são diferentes em relação a forma e ao tamanho do pedúnculo, pois estes são mais longos. Nas Apocynaceae, como em várias famílias, essa terminologia tem sido amplamente utilizada para descrever os coléteres encontrados (Thomas 1991; Rio *et al*. 2002; Demarco 2005; Rio *et al.* 2005). Coléteres cônicos já foram descritos em *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005), mas estes se diferenciam dos encontrados em *R. sellowii* por apresentar pedúnculo curto.

Todo o corpo do coléter de *R. sellowii* é revestido por fina cutícula que apresenta distensão do ápice para a base. Através da análise das secções transversais, é possível observar que o exsudato sai do interior das células epidérmicas é acumulado no espaço subcuticular e posteriormente liberado para o meio extracelular, sem rompimento da cutícula. O processo de liberação e o acúmulo da secreção no espaço subcuticular estão de acordo com o registrado em *Mellodinus scandens* Forst. e *Vallesia cymbaefolia* (Mirabella 1897), mas há divergência quanto ao rompimento da cutícula, que não é observado em *R. sellowii*. A distensão parcial da cutícula e o acúmulo do exsudato já foram registrados em *Allamanda neriifolia* e *Thevetia peruvuiana* (Fjell 1983). Fahn (1979) descreveu que, normalmente, a mucilagem e a goma são acumuladas abaixo da parede celular ou entre ela e o espaço deixado pela retração do protoplasma ou, ainda, são secretadas através da parede e da cutícula para o exterior.

Modificações estruturais na epiderme em paliçada não foram encontradas, mas a presença de idioblastos cristalíferos foi registrada na parte central do parênquima, que constitui o corpo central do coléter. Estas estruturas já foram registradas nas células centrais

de *Allamanda canthartica* (Thomas & Dave 1989a) e *Roupelia grata* Wall. (= *Strophanthus gratus* (Wallich & Hook. ex Benth.) Baill). (Thomas *et al.* 1989). Embora seja considerado por Thomas (1991) como uma modificação estrutural, Demarco (2005) ressalta que em *B. bicuspidatum* estas estruturas não devem ser consideradas como modificações, pois ocorrem em todos os órgãos desta espécie. Em *R. sellowii*, esses idioblastos têm ocorrência semelhante à descrita por Demarco (2005) para *B. bicuspidatum* pois são observadas em várias peças florais (Ver Cap. III).

Mucilagem foram evidenciados no interior das células epidérmicas em paliçada, característica que valida a identificação destas estruturas como coléteres. A presença dessa substância também foi comprovada, como componente principal, na secreção dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002) e *Blepharodun bicuspidatum* (Demarco 2005). A secreção presente ao redor de todos os primórdios e folhas jovens corrobora a função descrita por Fahn (1979) para os coléteres encontrados em *R. sellowii*. Além da mucilagem, a presença de compostos lipofílicos também já foi registrada em *Allamanda cathartica* L. (Tomas & dave 1989a), *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1990), *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (hoje *M. polhiana*) e *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CLARK, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae *s.l.*). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.

FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.

FAHN, A. 1990. Plant anatomy. 4th ed., Pergamon Pres, Oxford.

FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.

GERLACH, D. 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgard.

GONÇALVES, C.R. 1962/65. Sobre a anatomia de *Rauwolfia grandiflora* Mart. (Apocynaceae) Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 18:293-306.

GREGORY, M. & BASS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38:125-174.

JAIN, S.; PILLAI, A. & GOYAL, S.C. 1986. Seedling anatomy of some Apocynacea. Feddes Repertorium 97:847-851.

JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman and Co, San Francisco.

JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.

KOCH, I. 2002. Estudos das espécies neotropicais do gênero *Rauvolfia* L. (APOCYNACEAE). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KOCH, I.; BITTRICH, V. & KINOSHITA, L.S. 2002. Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae;

Rauvolfioideae) – a report of dioecy in Apocynaceae. Botanisher Jahrbücher für Systematik 124:83-104.

KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae – *Rauvolfia* L. *In.* Flora Fanerogânica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti, coords.), Fapesp, Rima, São Paulo, v. 4, pp. 78–79.

LERSTEN, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). American Journal of Botany 61:973-981.

MARCONDES-FERREIRA, W. & KINOSHITA, L.S. 1996. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 19:203-214.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2, Claredon Press, Oxford

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. v.1, Claredon Press, Oxford.

MIA, A.J. 1960. Structure of the shoot apex of *Rauvolfia vomitoria*. Botanical Gazette 122:121-124.

MIRABELLA, M.A. 1897. Contribuzioni alla conoscenza dei colleteri. Contribuitions from the biological vegetable.Cap.II, p.1-28. Casa editrice Virzi, Palermo.

MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.

PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry: theoretical and applied. Vol. II, 4th ed., C. Livingstone, Edinburgh.

RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the “squamellae” in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.

RAO, A.S. 1956. A revision of *Rauvolfia* with particular reference to the American species. Annals of Missouri Botanical Garden 43:253-355.

RAO, V.S. & GANGULI, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of Indian Botanical Society 42:419-435.

RIO, M.C.S. do 2001. Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R. BR. nom. cons. (Apocynaceae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocyancaea). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.

RIO, M.C.S. do & KINOSHITA, L.S. 2005. *Prestonia* R.Br. (Apocynacea) no Sul e Sudeste do Brasil. Hoehnea 32:233-258.

RIO, M.C.S. do; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2005. Anatomia foliar com subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.

SENNBLAD, B.; ENDRESS, M.E. & BREMER, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribo Wrightieae (Apocynaceae) revisited. American Journal of Botany 85:1143-1158.

SIMÕES, A.O. & KINOSHITA, L.S. 2002. The Apocynaceae *s.str*. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. Darwiniana 40:127-169.

SUBRAMANIAN, R.B.; MURUGAN, V.; MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences 99:423-429.

THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetica Aspects of colleter. Annals of Botany 68:287-305.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda canthartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:201-203.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Reportorium 102:23-28.

THOMAS, V.; DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.

WOODSON, R.E. Jr. 1935. The floral anatomy and probable affinities of the genus *Grisebachiella*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 62:471-478.

WOODSON, R.E. Jr. 1936. Studies in Apocynaceae. IV. The American genera of Echitoideae. Annals of Missouri Botanical Garden 23:169-548.

WOODSON, R.E. Jr. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceus flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.

CAPÍTULO II

Coléteres bracteolares de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae) – caracterização estrutural e análise comparativa com os foliares

INTRODUÇÃO

Os coléteres são estruturas glandulares associadas à proteção dos meristemas, através da produção de uma secreção viscosa ou gomosa de coloração variada (Thomas 1991). A secreção pode ser constituída por mucilagem, por substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990; Thomas 1991) ou, ainda, por uma mistura de ambas (Fahn 1979). A função da mucilagem difere muito entre as espécies, órgãos, ou tecidos em que ocorre (Fahn 1979). Estruturalmente, os coléteres podem ser tricomas ou emergências (Thomas 1991) e receberam diferentes denominações ao longo dos anos (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Metcalfe & ChalK 1950,1979; Subramanian *et al.* 1989).

Em Apocynaceae, estas estruturas são persistentes e estão localizadas na região adaxial de órgãos como folhas, brácteas, bractéolas e sépalas (Thomas 1991). Segundo Endress e Bruyns (2000), essas estruturas estão ausentes em Alstonieae G.Don, ou em Aspidospermae Miers segundo Simões *et al.* (2007). Apesar de ser utilizada como um caráter taxonômico em Apocynaceae (Woodson 1935, 1936; Rao 1956; Marcondes-Ferreira & Kinoshita 1996; Rio 2001; Rio *et al.* 2002; Koch 2002; Simões & Kinoshita 2002), poucos trabalhos foram realizados, diante do número elevado de espécies (Judd *et al.* 2002),

envolvendo essas estrutura na família (Mirabella 1897; Ramayya & Bahadur 1968; Fjell 1983; Mohan & Inamdar 1986; Dave *et al.* 1987; Kuriashen & Dave 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991; Appezzato–da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006).

O tipo estrutural mais comum nas Apocynaceae é o tipo padrão (standard), de acordo com a terminologia proposta por Lersten (1974) para coléteres de Rubiaceae. Recentemente, coléteres cônicos, laminares, ramificados e sésseis foram descritos em espécies de *Prestonia* R.Br. (Rio 2001), *Blepharodon* Decne. (Demarco 2005), *Forsteronia* G.Mey. (Rio *et al.* 2005) e *Mandevilla* Lind. e Mesechites A. DC. (Simões 2004; Simões *et al.* 2006).

Em Rauvolfioideae Kostel., os coléteres peciolares já foram descritos para espécies de 12 gêneros, dos quais apenas *Allamanda* L., *Himatanthus* Willd., *Thevetia* L. e *Carissa* L. apresentam também coléteres bracteolares (Mirabella 1897; Mia 1960; Fjell 1983; Jain *et al.* 1986; Thomas & Dave 1989 a,b; Thomas *et al.* 1989; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991; Spina 2004; Gomes 2006). Dados anatômicos relacionados a estas estruturas em Rauvolfioideae já foram relatados em *Allamanda canthartica* L., *A. neriifolia* Hook., *Himathanthus obovatus* (A.DC.) Woodson, *Vinca minor* L. e *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum (Fjell 1983; Thomas & Dave 1989a; Demarco 2005; Gomes 2006).

As inflorescências de *Rauvolfia* L. são variações de dicásios, morfologia básica descrita por Woodson (1935) para Apocynaceae e que podem apresentar diferenças entre o número de paracládios, de flores por paracládios, ramificações e nas proporções dos eixos da inflorescência (Koch 2002). Para as 36 espécies neotropicais do gênero reconhecidas por Koch (2002), as brácteas das inflorescências são estruturas foliares pequenas, geralmente

membranáceas que variam de forma e tamanho com margem inteira, denteada somente na base ou glanduloso-denteada. Este último caráter foi descrito para dez espécies de *Rauvolfia*. Quando presentes nesses órgãos, os coléteres ocorrem na face adaxial (Koch 2002).

A presença de coléteres peciolares já foi descrita para o gênero (capítulo 1), os bracteolares não foram descritos anatomicamente havendo a controvérsia quanto à ocorrência dos calicinais (Mia 1960; Jain *et al.* 1986; Thomas 1991; Thomas & Dave 1991; Endress & Bruyns 2000).

Rauvolfia sellowii Müll.Arg. apresenta inflorescências pleiocasiais, dispostas apenas nos verticilos terminais, com brácteas triangulares de margem denteada na base e na região mediana (Koch 2002). Diante da importância taxonômica relatada para os coléteres peciolares em *Rauvolfia*, a controvérsia existente em relação à presença dos calicinais e a ausência de dados sobre os bracteolares, os objetivos deste trabalho são: verificar a ocorrência dos coléteres em órgãos reprodutivos, definir sua posição e número, caracterizar a sua estrutura, comprovar a presença de mucilagem na secreção por eles produzida e realizar um estudo comparativo com os coléteres foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Ramos com flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas de *Rauvolfia sellowii* foram coletados em três áreas nas imediações de Campinas (Bairro Taquaral - Parque Portugal, Subdistrito de Barão Geraldo - *campus* da Universidade Estadual de Campinas e Instituto Agronômico de Campinas – Fazenda Santa Elisa). Ramos vegetativos foram coletados em junho de 2006 e reprodutivos de agosto a janeiro em 2005 e 2006. Os

materiais testemunha foram coletados, identificados pelas Profas. Dras. Luiza Sumiko Kinoshita e Ingrid Kock, e incorporados ao Herbário UEC (tabela 1).

Tabela 1. Dados referentes ao material testemunha de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg.

Indivíduo	Localidade	Nome e nº Coletor	Data	Registro UEC
masculino	Campinas, Bairro Taquaral	RM Marasca 8	11/X/2005	145798
feminino	Campinas, Bairro Taquaral	RM Marasca 9	11/X/2005	145799
masculino	Campinas, Instituto Agronômico	RM Marasca 11	10/X/2006	145813
feminino	Campinas, Subdistrito de Barão Geraldo	RM Marasca 13	20/I/2006	145815

A análise morfológica dos ramos vegetativos e reprodutivos foi realizada em material vivo e fixado, através da utilização de microscópio estereoscópico para verificar a ocorrência de coléteres nas folhas, nas brácteas e no cálice. Os dados relevantes foram registrados com câmera digital Nikon SMZ-U e os esquemas, utilizando o microscópio estereoscópico Olympus SZH10 com câmara clara acoplada. A determinação dos dois tipos estruturais de brácteas presentes nos ramos reprodutivos foi baseada na descrição realizada por Weberling (1992).

Ramos vegetativos de um indivíduo (UEC 145815) e reprodutivos de quatro (UEC 145815, 145799, 145798, 145813) foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50% 1:1:18 v/v) por 24h (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina 9:1 v/v))48h (Lillie 1948 *in* Clark 1973). Ápices vegetativos, inflorescências em início de desenvolvimento, a região de articulação (nós) dos paracládios das inflorescências desenvolvidas e botões florais foram isolados a partir destes ramos.

As peças isoladas foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940) e incluídas em paraplast. Secções seriadas longitudinais e transversais com 12μm de espessura foram obtidas através de micrótomo rotativo Microm HM340E, coradas

com Safranina e Azul de astra (Gerlach 1969) e montadas em resina sintética para o estudo estrutural.

Para evidenciar as principais classes de compostos sintetizados pelos coléteres, alguns testes foram realizados: reação PAS (Jensen 1962) para polissacarídeos totais, Vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) para mucilagem e preto de Sudão B (Pearse 1985) para lipídios totais. As lâminas obtidas foram montadas em gelatina glicerinada.

Após a análise de todo laminário, dados relevantes foram registrados em filme Kodak Pro Image 100 e Gold 100 utilizando-se microscópio Olympus BX51; as escalas foram obtidas através da projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. Os negativos foram digitalizados com 600 dpi e utilizados para a elaboração das pranchas no software Microsoft Powerpoint 2000.

RESULTADOS

Os ramos reprodutivos têm origem terminal (figuras 1-3) e apresentam paracládios articulados, os quais tornam-se mais curtos à medida que se aproximam do ápice (figuras 3, 5). As estruturas foliares dos ramos reprodutivos são chamadas, neste trabalho, de brácteas folhosas por protegerem a inflorescência durante seu desenvolvimento inicial (figuras 1-2) e por apresentarem as mesmas características morfológicas das folhas encontradas nos ápices vegetativos (figuras 3-4). Em uma análise mais detalhada das inflorescências em microscópio estereoscópico, é possível observar a presença de brácteas diminutas glanduloso-denteadas nas articulações (nós) dos paracládios (figura 5C-D). Coléteres são evidenciados nos dois tipos de brácteas e no pecíolo das folhas (figuras 6-10, 12) e não são encontrados nos verticilos florais (figura 11).

Coléteres das brácteas folhosas

Quando analisadas em microscópio estereoscópico, as brácteas folhosas jovens apresentam secreção incolor produzida por coléteres presentes em sua base (figura 5A-B) ocupando posição intrapeciolar (figura 5A).

Cada bráctea possui 9-13 coléteres em sua base (figuras 5B, 8) e destes, 2-4 ocupam posição marginal e os demais, posição axilar. Os marginais são semelhantes ao tipo padrão e os axilares são cônicos (figuras 6-7), semelhantes aos coléteres foliares (figura 12). Estruturalmente ambos são formados por pedúnculo não secretor (figuras 6-8, 12, 13, 17, 22, 23, 26) e região alongada constituída por epiderme em paliçada secretora, que recobre um eixo central de células parenquimáticas desprovido de vascularização (figuras 6-7, 12, 13, 17, 18, 22). Tricomas e laticíferos não são observados nos coléteres bracteolares analisados.

O pedúnculo dos coléteres é constituído por epiderme de células cúbicas, não secretoras, recobertas por cutícula e eixo central formado apenas por células parenquimáticas desprovidas de cristais (figuras 7-8, 12, 13). Nos coléteres marginais, o pedúnculo é mais longo que nos axilares (figuras 6-7).

A epiderme em paliçada apresenta células secretoras de paredes finas, citoplasma denso e estas são responsáveis pela produção do exsudato acidófilo, evidenciado apenas no interior das células pela Safranina (figuras 7-8). A visualização do núcleo é dificultada devido à grande quantidade de secreção no interior das células. A retração do citoplasma observada nas células secretoras dos coléteres foliares (figuras 12, 17, 26) ocorre também nos coléteres das brácteas folhosas (figuras 7-8, 13, 18-20) após a liberação do exsudato, que é acumulado no espaço subcuticular e, posteriormente, liberado para o meio extracelular, sem rompimento da cutícula.

Nas secções dos coléteres submetidas à reação PAS, a presença de polissacarídeos é evidenciada no interior das células epidérmicas em paliçada e no meio extracelular (figuras 13, 17). O resultado é negativo para as células epidérmicas da região do pedúnculo (figuras 13, 17). Para as secções tratadas com Vermelho de rutênio, o resultado é positivo para mucilagem na secreção contida no interior das células epidérmicas em paliçadas (figuras 18-20).

A secreção dos coléteres tratados com preto de Sudão B apresenta resultado negativo para substâncias lipofílicas (figuras 23-26). O mesmo teste evidencia cutícula fina envolvendo os coléteres da bráctea folhosa (figura 23), os coléteres foliares (figura 26) e cutícula espessa na face abaxial da bráctea folhosa (figura 23)

Coléteres das brácteas diminutas

Em análise realizada em microscópio estereoscópico, as brácteas diminutas estão presentes nas articulações dos paracládios que constituem a inflorescência (figura 5A,C,D). Morfologicamente, elas são triangulares com margem denteada (figura 5C-D). No ápice das expansões da lâmina, que formam as margens denteadas (figuras 9-10), é possível notar 2-4 coléteres (figuras 9, 10) responsáveis pela produção de secreção incolor que envolve brácteas diminutas e botões florais. Estruturalmente, os coléteres são cônicos, formados por um pedúnculo não secretor e uma região curta revestida por epiderme em paliçada secretora, e são desprovidos de vascularização (figuras 9-10, 14-16, 21, 24-25).

A epiderme em paliçada apresenta células de paredes finas e citoplasma denso, a qual envolve um parênquima não secretor central (figuras 9-10, 14-16, 20-21, 24-25). Nos coléteres em fase secretora (figuras 15-16, 20, 24-25) e em início de senescência (figuras 9-

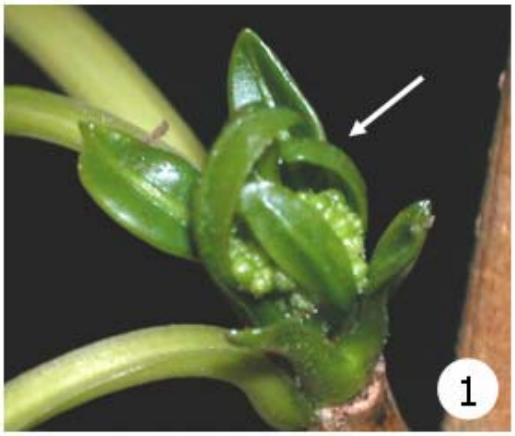
10, 14, 21) é possível observar a retração do protoplasto, a qual deriva da liberação do exsudato. A distensão da cutícula ocorre apenas em coléteres em início de senescência.

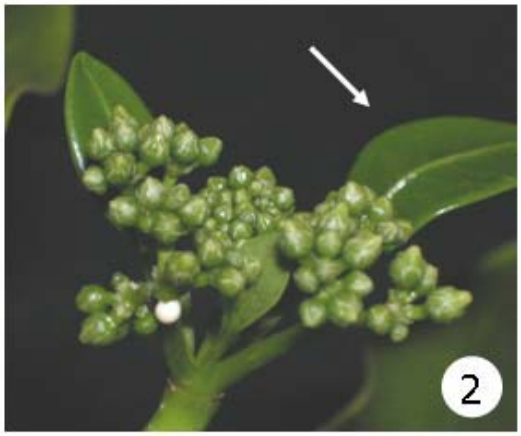
Através da análise das secções longitudinais (figuras 14-16) submetidas à reação PAS, a presença de polissacarídeos totais é evidenciada no interior das células epidérmicas em paliçada. Já com o tratamento pelo Vermelho de rutênio, o resultado é positivo para mucilagem nas células epidérmicas dos coléteres em fase secretora (figuras 19-20)

Cutícula é evidenciada pelo preto de Sudão B envolvendo toda a bráctea diminuta e os coléteres. O resultado é negativo para substâncias lipofílicas na secreção contida no interior das células epidérmicas em paliçada (figuras 24-25).

ILUSTRAÇÕES

Figuras 1-4. Ramos reprodutivos (1-3) e vegetativo (4) do indivíduo coletado no *campus* da UNICAMP (UEC 145815). **1-2.** Inflorescências em início de desenvolvimento, observar brácteas folhosas jovens (setas); **3.** Vista geral da inflorescência. **4.** Ápice caulinar vegetativo.

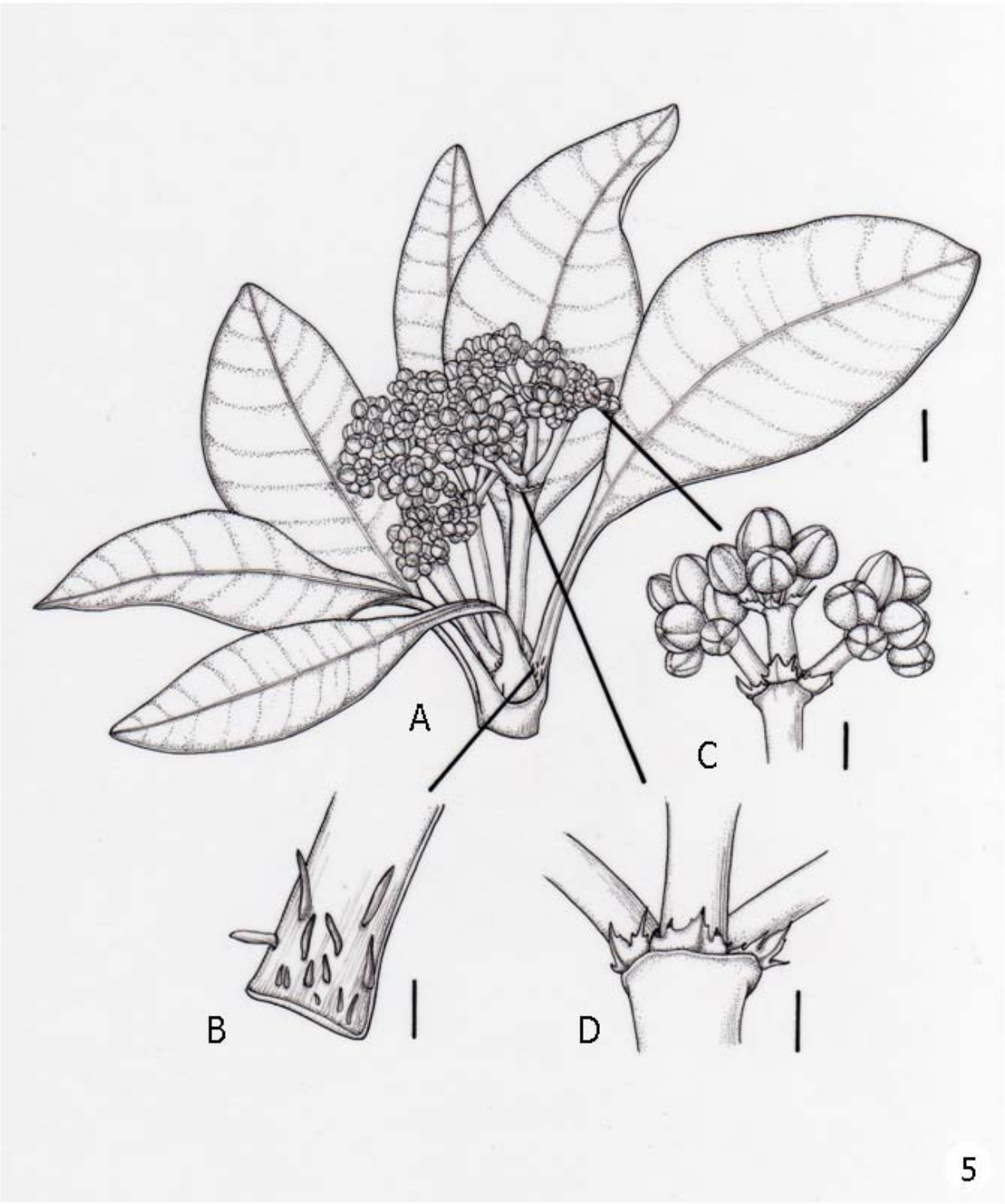

1


2

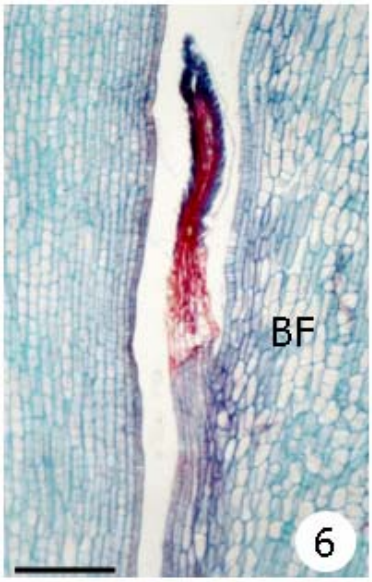
3

4

Figura 5. Inflorescência do indivíduo coletado no *campus* da UNICAMP (UEC 145815). **A.** Vista geral da inflorescência. **B.** Detalhe da porção adaxial do pecíolo da bráctea folhosa, observar a presença de coléteres. **C-D.** Detalhe dos nós da inflorescência, notar brácteas diminutas com margens denteadas. **Escalas:** A. 5mm; B – D. 1mm.

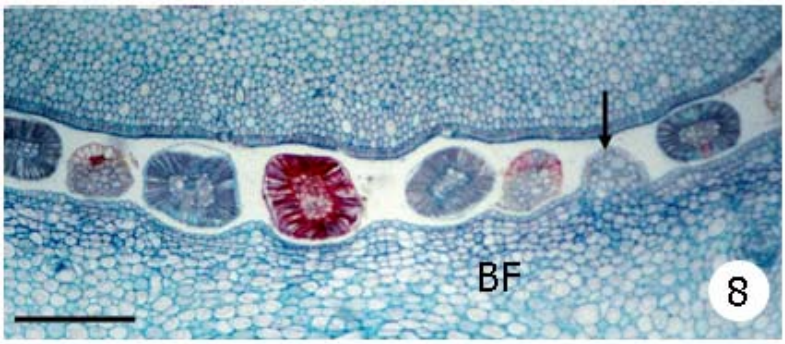

A
B
C
D
5

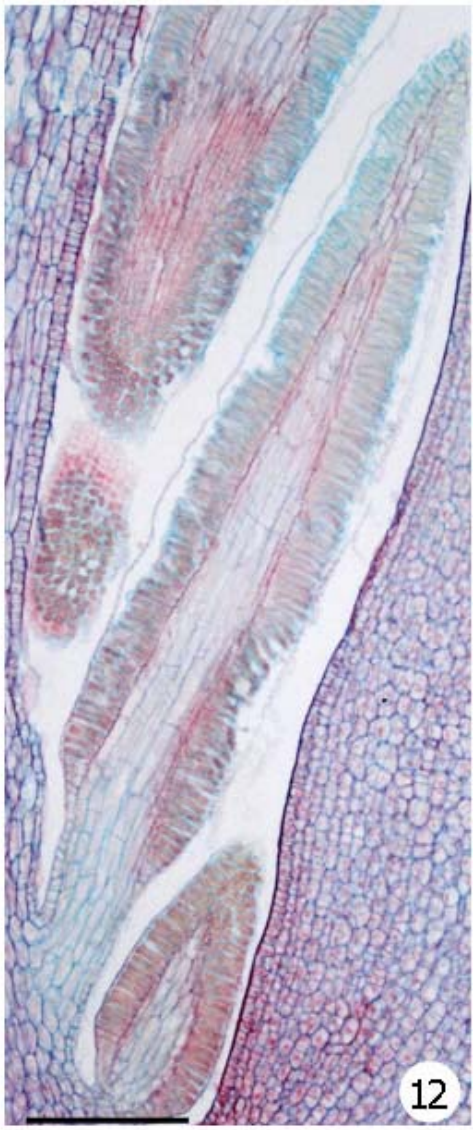
Figuras 6-12. Coléteres bracteolares e foliares. **6-7, 11-12.** Secções longitudinais. **8-10**. Secções transversais. **6-8.** Bráctea folhosa. **9-10.** Brácteas diminutas. **6.** Coléter do tipo padrão. **7.** Coléter cônico. **8.** Disposição e número dos coléteres, observar células epidérmicas do pedúnculo (seta). **9-10.** Coléteres marginais. **11.** Ausência de coléteres calicinais no botão floral (UEC 145813). **12.** Coléteres foliares (UEC 145798). **BF –** Bráctea folhosa; **BD** – Bráctea diminuta. **Escalas:** 6,8,11. 200μm; 7. 75μm; 9-10. 100μm; 12. 150μm.

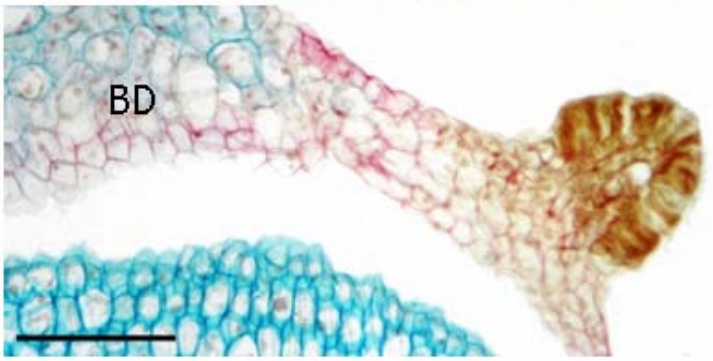

BF
6

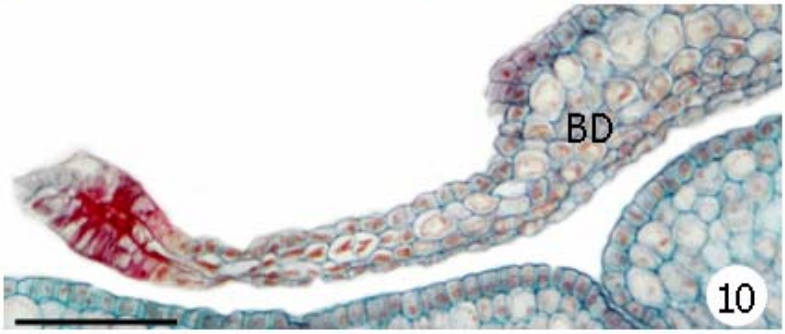
BF
7

11


BF
8

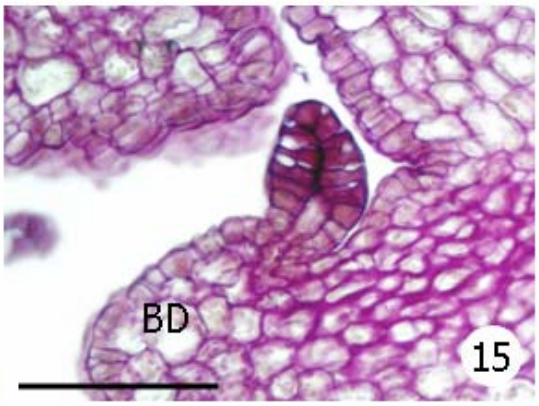

12


BD
9


BD
10

Figuras 13-17. Coléteres bracteolares e foliares submetidos à reação PAS. **13-14, 17.** Secções longitudinais. **15-16.** Secções transversais. **13-16.** Coléteres bracteolares. **17.** Coléteres foliares (UEC 145798). **13.** Coléter da bráctea folhosa (UEC 145798). **14.** Coléter da bráctea diminuta em início de senescência (UEC 145799). **15-16.** Coléteres da bráctea diminuta em fase secretora (UEC 145798, UEC 145813). **13, 15-16.** Coléteres axilar e marginais, polissacarídeos evidenciados no interior das células em paliçada. **17.** Polissacarídeos evidenciados no interior das células em paliçada e no meio extracelular (seta). **BF –** Bráctea folhosa; **BD** – Bráctea diminuta. **Escalas:** 13,15-16. 75μm; 14. 200μm; 17.150μm.

BF
13


BD
15

BD
16

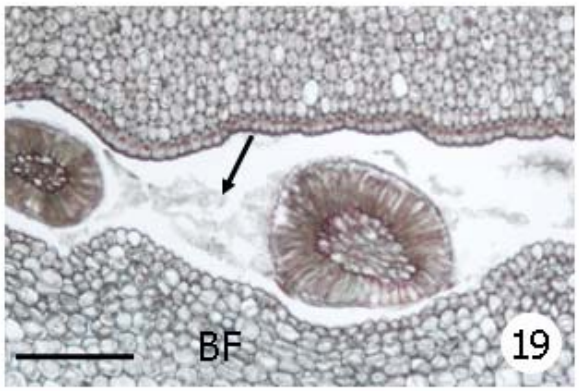
BD
14

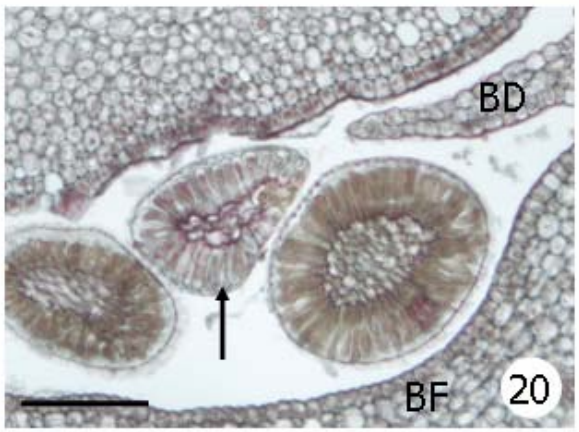
17

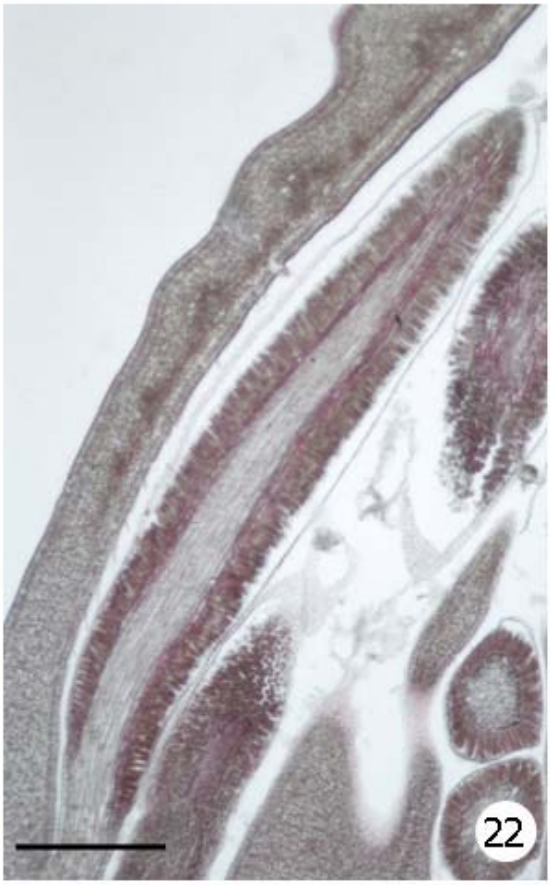
Figuras 18-22. Coléteres bracteolares e foliares submetidos ao teste com Vermelho de rutênio. **18, 21-22.** Secções longitudinais. **19-20.** Secções transversais. **18-19.** Coléter da bráctea folhosa (UEC 145798, UEC 145799). **20.** Coléteres das brácteas folhosa e diminuta (seta) (UEC145799). **21.** Coléter da bráctea diminuta (UEC 145813). **22.** Coléteres foliares (UEC 145798). **18-20, 22.** Resultado positivo para mucilagem no interior das células em paliçada. **21.** Coléter em início de senescência. **BF –** Bráctea folhosa; **BD** – Bráctea diminuta. **Escalas:** 18-22. 75μm; 22. 250μm.

BF
18

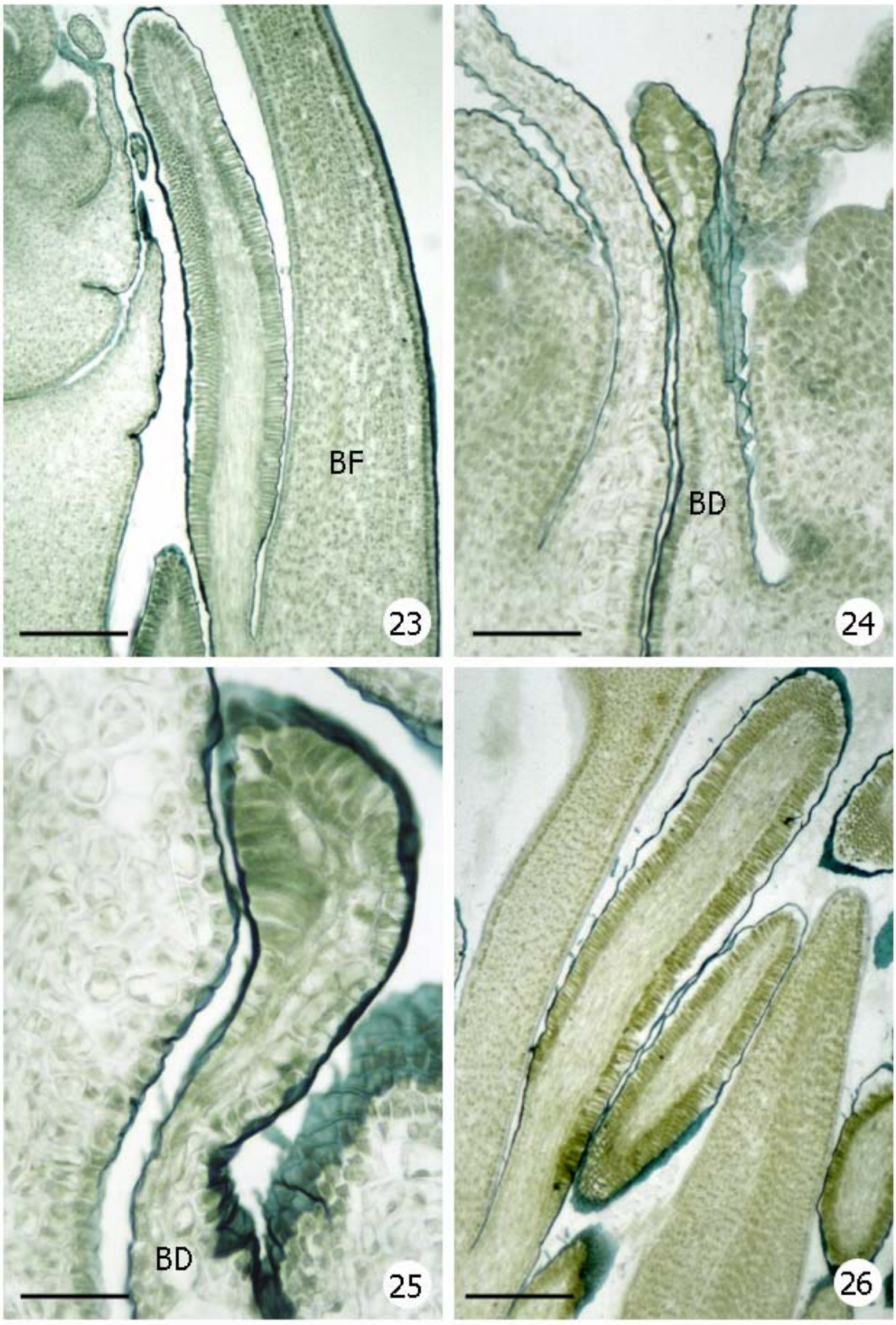
BD
21


BF
19


BD
BF
20


22

Figuras 23-26. Coléteres bracteolares e foliares em secções longitudinais submetidos ao teste com preto de Sudão B em material fixado pelo FNT. **23.** Bráctea folhosa (UEC 145798). **24-25.** Bráctea diminuta (UEC 145815). **26.** Coléteres foliares (UEC 145798). **23-27.** Resultado positivo na cutícula dos coléteres. **BF –** Bráctea folhosa; **BD** – Bráctea diminuta. **Escalas:** 23,26. 200μm; 24. 75μm; 25. 50μm.


BF
23
BD
24
BD
25
26

DISCUSSÃO

Nas inflorescências de *Rauvolfia sellowii* dois tipos de brácteas são observados: folhosas e diminutas. As brácteas folhosas são morfologicamente semelhantes às folhas mas diferenciam-se destas devido à função de proteção das inflorescências durante o início de seu desenvolvimento. A análise anatômica realizada neste trabalho indicou a presença de glândulas na margem das brácteas diminutas. As brácteas diminutas estão localizadas nas articulações dos paracládios e são triangulares com margem glanduloso-denteada, descrita pela primeira vez para a família no presente estudo, devido à ocorrência dos coléteres marginais observados em suas extremidades. A presença de brácteas triangulares com margem denteadas foi descrita para esta espécie por Koch (2002), mas não o caráter glanduloso-denteado.

Os coléteres de *R. sellowii* estão presentes na base da porção adaxial dos primórdios foliares e folhas, nas brácteas folhosas e nas diminutas. Apenas através da análise comparativa da posição dos coléteres, e pela presença de cutícula espessa das brácteas folhosas de *R. sellowii* foi possível diferenciá-las das folhas fotossintetizantes. Koch (2002) enfatizou a dificuldade em observar o desenvolvimento da inflorescência em material herborizado. A posição dos coléteres no pecíolo e nas brácteas de *R. sellowii* foi descrita por Koch (2002).

Em *R. sellowii*, a ausência de coléteres calicinais está de acordo com a descrição de Endress & Bruyns (2000) para os gêneros da tribo Vinceae Duby. A presença desta estrutura no cálice de *Rauvolfia* já foi descrita para o gênero por Thomas & Dave (1991), mas estes autores não mencionaram a espécie estudada e nem os descreveram anatomicamente.

A presença de brácteas com margem denteada glanduloso-denteada nas articulações das inflorescências e a ausência de coléteres calicinais em *R. sellowii* sugerem que o exsudato produzido protege os meristemas presentes nas articulações dos paracládios. Spina (2004) propôs que a presença de coléteres na base das brácteas de *Himatanthus* Willd. ex Schult. estaria relacionada à proteção das gemas florais. A função de proteger os meristemas já foi proposta por Fahn (1979) e Thomas (1991); os resultados encontrados para os coléteres das brácteas folhosas e diminutas das espécies de *R. sellowii* corroboram a função proposta por estes autores. A ausência de coléteres vegetativos em *Aspidosperma australe* Müll.Arg. e *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Demarco 2005), a presença de coléteres vegetativos em *Alstonia scholaris* L. (Thomas & Dave 1989b.) e vegetativos e bracteolares em *R. sellowii* sugerem que estas estruturas surgiram inicialmente nos órgãos vegetativos destes gêneros

Os coléteres das brácteas folhosas de *R. sellowii* são de dois tipos: cônicos e semelhantes ao tipo padrão. Os cônicos, que ocupam posição axilar são semelhantes aos coléteres foliares (capítulo I). Nas brácteas diminutas estas estruturas ocupam posição marginal e são apenas cônicos. Todos os coléteres encontrados em *R. sellowii* são formados por pedúnculo não secretor e região constituída por epiderme em paliçada secretora que recobre um eixo central de células parenquimáticas desprovido de vascularização. Os coléteres marginais das brácteas folhosas são semelhantes ao tipo padrão (standard) descrito por Lersten (1974) para Rubiaceae, mas são diferentes em relação ao tamanho do pedúnculo, pois os de *R. sellowii* são mais longos. Coléteres bracteolares do tipo padrão já foram registrados em *Forsteronia pubescens* (Rio 2006). Em *Ditassa retusa* Mart. (Gomes

2006), os coléteres bracteolares são estruturalmente semelhantes aos presentes nas brácteas diminutas de *R. sellowii*.

A presença de idioblasto cristalíferos não é constante nos coléteres de *R. sellowii*, pois estes são observados apenas no eixo parenquimático dos coléteres foliares em fase secretora (capitulo I). Estas estruturas já foram mencionadas nos coléteres de *Allamanda canthartica* (Thomas & Dave 1989a), *Blepharodon bicuspidatum* Fourn. (Demarco 2005) e *Roupelia grata* Wall. (Thomas *et al.* 1989). Embora Rio (2006) tenha descrito os coléteres das bractéolas de *Forsteronia pubescens*, a autora não mencionou a ocorrência de idioblastos cristalíferos nestas estruturas.

Todos os coléteres analisados de *R. sellowii* são desprovidos tricomas, laticíferos e de vascularização. A ausência de vascularização é constante, nos coléteres calicinais das espécies de Apocynaceae estudadas por Woodson & Moore (1938). Coléteres calicinais e foliares desprovidos de vascularização já foram descritos em *Allamanda cathartica*, *Blepharodon bicuspidatum*, *Forsteronia australis* Müll.Arg., *F. glabrescens* Müll.Arg., *F. pubescens* A.DC., *F. thyrsoidea* (Vell.) Müll.Arg., *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll.Arg. (hoje *Mandevilla longiflora*, (Desf.) Pichon), *Mandevilla pycnantha*, *M. scabra*, *M. tenuifolia*, *Mesechites mansoana* (A.DC.) Woodson, *Roupelia grata*, *Secondatia densiflora* A.DC. e *S. floribunda* A.DC. (Thomas & Dave 1989a; Thomas *et al.* 1989; Demarco 2005; Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006).

Os coléteres das brácteas folhosas e das brácteas diminutas são responsáveis pela secreção de uma substância incolor o que os distinguem dos foliares. A secreção produzida e liberada pelos coléteres foliares é esbranquiçada de aspecto gomoso (capitulo I). Secreção

incolor produzida por coléteres calicinais e esbranquiçada nos foliares já foram observadas por Demarco (com. pess.) em *Blepharodon bicuspidatum*.

O acúmulo do exsudato no espaço subcuticular liberado do interior das células epidérmicas, sem rompimento da cutícula, é evidenciado nos coléteres das brácteas folhosas e nos foliares (capítulo I) em *R. sellowii*. Este modo de liberação do exsudato também já foi descrito para *Allamanda neriifolia, Calotropi*, *Plumeria rubra* L. e *Thevetia peruviana* (Fjell 1983; Mohan & Inamdar 1986; Kuriachen & Dave 1989). Em *Mellodinus scandens* Forst. e *Vallesia cymbaefolia* (Mirabella 1897), o processo de liberação do exsudato para o espaço subcuticular é semelhante ao encontrado em *R. sellowii* mas diverge em relação ao rompimento da cutícula ocorrente nestas duas espécies. Nos coléteres bracteolares e foliares de *R. sellowii*, a presença de mucilagem foi evidenciada no interior das células epidérmicas em paliçada. Nas brácteas diminutas, esta substância foi registrada apenas no interior das células epidérmicas. A presença de polissacarídeos já foi registrada no interior das células epidérmicas nos coléteres de *Allamanda canthartica, Blepharodon bicuspidatum*, *, Forsteronia australis*, *F. glabrescens*, *F. thyrsoidea, F. pubenscens, Mandevilla illustris*, *M. pohliana* (sob *M. velutina*, Appezzato-da-glória & Estelita 2000) , *Plumeria rubra, Prestonia coalita* e *Roupelia grata* (Mohan & Inamdar 1986; Thomas & Dave 1989a; Thomas *et al.* 1989; Appezzato–da-Glória & Estelita 2000, Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Demarco 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CLARK, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae *s.l.*). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DAVE, Y.; THOMAS, V. & KURIACHEN, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G.Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.

ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.

FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.

FAHN, A. 1990. Plant anatomy. 4th ed., Pergamon Pres, Oxford.

FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.

GERLACH, D. 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgard.

GOMES, S.M. 2006. Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GREGORY, M. & BASS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38:125-174.

JAIN, S.; PILLAI, A. & GOYAL, S.C. 1986. Seedling anatomy of some Apocynaceae. Feddes Repertorium 97:847-851.

JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman and Co, San Francisco.

JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.

KOCH, I. 2002. Estudos das espécies neotropicais do gênero *Rauvolfia* L. (Apocynaceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KOCH, I.; BITTRICH, V. & KINOSHITA, L.S. 2002. Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae; Rauvolfioideae) – a report of dioecy in Apocynaceae. Botanisher Jahrbücher für Systematik 124:83-104.

KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae – *Rauvolfia* L. *In.* Flora Fanerogânica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti, coords.), Fapesp, Rima, São Paulo, v. 4, pp. 78–79.

KURIASHEN, P.M. & DAVE, Y. 1989. Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.

LERSTEN, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). American Journal of Botany 61:973-981.

PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry: theoretical and applied. Vol. II, 4th ed., C. Livingstone, Edinburgh.

MARCONDES-FERREIRA, W. & KINOSHITA, L.S. 1996. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 19:203-214.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2, Claredon Press, Oxford

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. v.1, Claredon Press, Oxford.

MIA, A.J. 1960. Structure of the shoot apex of *Rauvolfia vomitoria*. Botanical Gazette 122:121-124.

MIRABELLA, M.A. 1897. Contribuzioni alla conoscenza dei colleteri. Contribuitions from the biological vegetable. Cap.II, p.1-28. Casa editrice Virzi, Palermo.

MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.

RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the “squamellae” in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.

RAO, A.S. 1956. A revision of *Rauvolfia* with particular reference to the American species. Annals of the Missouri Botanical Garden 43:253-355.

RAO, V.S. & GANGULI, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of Indian Botanical Society 42:419-435.

RIO, M.C.S. do 2001. Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R.BR. nom. cons. (Apocynaceae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do 2006. Estudos anatômicos em espécies de cerrado de *Forsteronia* G.Mey. (APOCYNACEAE). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocyancaea). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.

RIO, M.C.S. do; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.

SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers. (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SIMÕES, A.O.; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of Linnean Society 152:387-398.

SIMÕES, A.O. & KINOSHITA, L.S. 2002. The Apocynaceae *s.str*. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. Darwiniana 40:127-169.

SPINA, A.P. 2004. Estudos taxonômicos, micro-morfologicos e filogenéticos do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae- Plumerieae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SUBRAMANIAN, R.B.; MURUGAN, V.; MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretion of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences 99:423-429.

THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of colleter. Annals of Botany 68:287-305.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda canthartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:201-203.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Reportorium 102:23-28.

THOMAS, V.; DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.

WEBERLING, F. 1992. Morphology of flowers and inflorescences. University Press, Cambridge.

WOODSON, R.E. JR. 1935. The floral anatomy and probable affinities of the genus *Grisebachiella*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 62:471-478.

WOODSON, R.E. JR. 1936. Studies in Apocynaceae. IV. The American genera of Echitoideae. Annals of the Missouri Botanical Garden 23:169-548.

WOODSON, R.E. JR. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceus flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.

CAPÍTULO III

Estruturas secretoras florais de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae), com ênfase na cabeça dos estiletes

INTRODUÇÃO

Apocynaceae caracteriza-se por grande variação na estrutura floral em relação, principalmente, à disposição ou adnação do androceu e gineceu. Um padrão de especialização pode ser observado nestas estruturas nos representantes desta família, que se inicia na subfamília mais basal Rauvolfioideae Kostel., com flores mais simples, até culminar com as flores mais complexas encontradas em Asclepiadoideae (Fallen 1986; Endress 1994; Endress & Bruyns 2000).

As flores da maioria dos representantes desta família apresentam simetria radial, corola tubular pentâmera, e geralmente, são polinizada por insetos (Fallen 1986). Até o momento, o trabalho mais abrangente de estrutura floral das Apocynaceae foi realizado por Woodson e Moore (1938), no qual 59 espécies foram estudadas, com o objetivo principal de comparar a vascularização e morfologia. Posteriormente, Rao & Ganguli (1963), Fallen (1986), Kunze (1993, 1994, 1997), Galetto (1997), Torres & Galetto (1998), Lin & Bernardello (1999) e Gomes (2006) contribuíram com dados importantes sobre a estrutura floral encontrada na família.

A epiderme da cabeça dos estiletes, coléteres, nectários e laticíferos são as estruturas secretoras florais mais investigadas nos representantes de Apocynaceae (Woodson & More

1938; Rao & Ganguli 1963; Fallen 1986; Thomas 1991; Galetto 1997; Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999; Endress & Bruyns 2000; Rio 2001, 2006; Simões 2004; Demarco 2005; Demarco *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006, 2007). Trabalhos relacionados com estruturas secretoras florais de alguns gêneros brasileiros já foram realizados por Rio (2001, 2006), Simões (2004), Demarco (2005) e Simões *et al.* (2006, 2007). A ocorrência de osmóforo e sua possível localização foram mencionadas para a família (Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999), mas dados sobre sua estrutura foram descritos apenas para algumas espécies de *Ceropegia* L. (Esau 1965; Vogel 1990; Endress 1994).

A união congênita dos carpelos das flores é um fato comum nas angiospermas mais derivadas (Walker 1975a; Endress *et al.* 1983). Em Apocynaceae, esta fusão dá origem à cabeça dos estiletes, a qual é revestida por epiderme secretora (Walker 1975a,b) e descrita como sendo a responsável pela secreção de substâncias relacionadas com o transporte de pólen em Rauvolfioideae e, por isso, de grande importância para o sistema de polinização (Fallen 1986; Endress 1994; Koch *et al.* 2002).

Fallen (1986), ao analisar a morfologia e a função da cabeça dos estiletes de espécies de Apocynaceae, definiu uma progressão em relação aos estádios evolutivos desta estrutura e estabeleceu quatro tipos básicos dentro da família. No tipo 1 a cabeça dos estiletes é a mais simples e apresenta apenas um tipo de célula na epiderme secretora. O tipo 2 possui em sua região apical um anel de tricomas, em seu corpo principal células em paliçada curtas e em sua base um “colar” membranoso de tricomas longos. No tipo 3 encontram-se todas as características do tipo 2, mas com adnação as anteras, resultando na formação do ginostégio. Com a perda secundária das estruturas para captura de pólen na base da cabeça e do anel

superior de tricomas, o tipo 4 é semelhante ao tipo 1, mas apresenta adnação com a cabeça dos estiletes.

Os coléteres são emergências ou tricomas presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos (Thomas 1991). Nas Apocynaceae, são emergência ou glândulas localizadas na região adaxial das folhas, brácteas e sépalas. A ausência de coléteres calicinais é freqüente em Rauvolfioideae (Endress & Bruyns 2000).

Os nectários variam de forma, desde superfícies glandulares até glândulas vascularizadas especializadas (Esau 1965; Fahn 1990). Podem ser encontrados na superfície dos órgãos, formando elevações, ou ainda alojados em depressões (Fahn 1979) e normalmente são constituídos por tecido secretor e tecido vascular (Fahn 1990).

Nas Apocynaceae, os nectários podem apresentar uma grande variação em relação à origem, posição e forma (Woodson & More 1938; Rao & Ganguli 1963; Rachmilevitz & Fahn 1973; Galetto 1997; Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999; Rio 2006), ocorrendo também fusão parcial ou total destas estruturas ao gineceu ou à corola (Rao & Ganguli 1963). Duas origens já foram relatadas para os nectários encontrados em Apocynaceae: carpelar (Woodson & More 1938; Rao & Ganguli 1963) e receptacular (Galetto 1997). Em Rauvolfioideae, quando presentes, os nectários estão localizados ao redor do ovário formando um anel contínuo (Woodson & More 1938), com ápice lobado ou não, ou até mesmo com dois nectários alternos aos dois carpelos (Woodson & More 1938; Rachmilevitz & Fahn 1973). A presença de nectário não é universal em Apocynaceae (Endress & Bruyns 2000), pois podem estar ausentes em alguns representantes de Aspidospermeae miers (Simões *et al.* 2007), como em *Aspidosperma australe* Müll.Arg. (Demarco 2005).

Além de serem relatados para as partes vegetativas (Metcalfe & Chalk 1950; Milanez 1959; Stockstill & Nessler 1986; Murugan & Inamdar 1987; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997; Rio *et al.* 2005; Demarco *et al.* 2006), os laticíferos também são encontrados em partes reprodutivas (Murugan & Inamdar 1987; Aguiar 2003; Demarco 2005; Demarco *et al.* 2006; Rio 2006).

Rauvolfioideae constitui um grupo bastante heterogêneo em relação à estrutura floral (Endress & Bruyns 2000) e as estruturas secretoras florais mais relatadas são: epiderme da cabeça dos estiletes, laticíferos, nectários, coléteres e osmóforos (Woodson & Moore 1938; Rao & Gabguli 1963; Fallen 1986; Thomas 1991;Lin & Bernardello 1999; Endress & Bruyns 2000; Demarco 2005; Gomes 2006).

Rauvolfia L. pertence à tribo Vinceae Duby, de Rauvolfioideae, apresenta cerca de 70 espécies de distribuição tropical, e destas, das 20 espécies encontradas no Brasil, 11 são endêmicas (Koch & Kinoshita 2005). Suas flores são pequenas, levemente zigomorfas, pentâmeras e na maioria dos casos, hermafroditas, podendo apresentar anteras vazias e ginodioicia ou dioicia (Koch 2002; Koch *et al.* 2002). *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg., além de ser a única espécie do gênero ocorrente no estado de São Paulo, se destaca das outras espécies dentro de Apocynaceae por apresentar dioicia funcional; tal caráter foi constatado em estudos recentes de biologia floral; a qual não havia sido relatada até então para a família (Koch *et al.* 2002; Koch & Kinoshita 2005). Dos poucos estudos realizados com o gênero constatou-se que a maioria está relacionada à biologia floral (Mital & Issar 1968; Bawa *et al.* 1985; Lopes & Machado 1999; Koch *et al.* 2002). Dados anatômicos foram encontrados apenas sobre a vascularização floral de *R. tetraphylla* L.(Woodson & More 1938) e apesar de

Fallen (1986) ter incluído *R. balansae* (Baillon) Boit. e *R. reflexa* Teijsm. & Binnend em seu estudo, estas não foram selecionadas para a descrição da estrutura floral (Fallen 1986).

Devido à escassez de dados sobre a anatomia das estruturas secretoras florais de espécies brasileiras de *Rauvolfia*, o objetivo deste trabalho foi caracterizar anatomicamente as estruturas secretoras das flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas, de *Rauvolfia sellowii*, dando ênfase à cabeça dos estiletes e contribuindo, assim, com novos dados para o melhor entendimento da estrutura floral de espécies deste gênero. Os dados obtidos irão colaborar, também, com as pesquisas realizadas no presente momento pela equipe do Departamento de Botânica da UNICAMP, relativas aos estudos anatômicos e filogenéticos de *Rauvolfia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ramos reprodutivos de indivíduos com flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas de *Rauvolfia sellowii* foram coletados em três áreas nas imediações de Campinas (Distrito de Joaquim Egídio, Bairro Taquaral - Parque Portugal e Instituto Agronômico de Campinas - Fazenda Santa Elisa). Os materiais testemunha foram identificados pelas Profas. Dras. Luiza Sumiko Kinoshita e Ingrid Koch e posteriormente, incorporados ao Herbário UEC (tabela 1).

Tabela 1. Dados referentes ao material testemunha de *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg.

Indivíduo	Localidade	Nome e nº do Coletor	Data	Registro UEC
feminino	Distrito de Joaquim Egídio	RM Marasca 01	17/IX/2006	145793
feminino	Distrito de Joaquim Egídio	RM Marasca 02	17/IX/2006	145794
masculino	Distrito de Joaquim Egídio	RM Marasca 03	17/IX/2005	145795
feminino	Campinas, Fazenda Santa Elisa	RM Marasca 06	11/X/2005	145812
masculino	Campinas, Fazenda Santa Elisa	RM Marasca 07	11/X/2006	145813
masculino	Campinas, Bairro Taquaral	RM Marasca 08	11/X/2005	145798
feminino	Campinas, Bairro Taquaral	RM Marasca 09	11/X/2005	145799

A análise morfológica dos ramos reprodutivos foi realizada em material vivo e fixado, através da utilização de microscópio estereoscópico para verificar a diferença existente entre as flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas. Com esta análise foi possível constatar as características necessárias para diferenciar os dois tipos florais e por este motivo a terminologia utilizada no presente estudo foi baseada na descrita por Koch *et al.* (2002), pois os dados observados seguem o mesmo padrão. Os dados relevantes foram registrados através de câmera digital Nikon SMZ-U.

Os ramos reprodutivos foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50% 1:1:18 v/v) por 24h (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina 9:1 v/v) por 48h (Lillie 1948 *in* Clark 1973). A solução aquosa de Vermelho neutro foi utilizada para verificar a ocorrência de lipídios, esta solução estas substâncias coram os lipídios em vermelho e pode indicar a presença e a distribuição de compostos voláteis responsáveis pela fragrância floral (Kearns & Inouye 1993). Flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas adultas foram selecionadas, desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário; Johansen 1940) e incluídas em paraplast. Secções seriadas longitudinais e transversais, com 12μm de espessura, foram obtidas através de micrótomo

rotativo Microm HM340E, coradas com Safranina e Azul de astra (Gerlach 1969) para o estudo estrutural e montadas em resina sintética. Para evidenciar a presença de carboidratos na cabeça dos estiletes, dois testes foram realizados: reação PAS (Jensen 1962) para polissacarídeos totais e Vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) para mucilagem. As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

Os dados relevantes foram registrados em filme Kodak Pro Image 100 e Gold 100 utilizando-se microscópio Olympus BX51; as escalas foram obtidas através da projeção de lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações. Os negativos foram digitalizados com 600 dpi, e as imagens utilizadas para a elaboração das pranchas no Microsoft PowerPoint 2000.

RESULTADOS

As flores de *Rauvolfia sellowii* são pequenas, com menos de 1cm quando adultas, pentâmeras, de corola tubulosa branco-esverdeada, constrita na fauce e na metade do tubo com lobos reflexos em antese (figuras 1-5), quando liberam fragrância. Dois tipos florais são observados nos indivíduos analisados: flores funcionalmente masculinas apresentam anteras com grãos de pólen (figuras 2, 6, 10) e flores funcionalmente femininas com anteras obliteradas, sem grãos de pólen (figuras 4, 7, 11).

Os lobos das pétalas (figuras 6-7), dos dois tipos florais, apresentam células papilosas na epiderme adaxial, acima das anteras (figuras 9-11). A região das papilas na epiderme (figura 9) apresenta resultado positivo ao tratamento com vermelho neutro (figura 5). Células papilosas na epiderme também foram observadas na face adaxial das sépalas (figura 8), mas estas apresentam resultado negativo ao Vermelho neutro.

As estruturas secretoras florais encontradas em *R. sellowii* são: a epiderme da cabeça dos estiletes (figuras 12-15, 17-20, 22-27), nectários (figuras 28-34) e laticíferos (figuras 35-39). Coléteres calicinais não foram encontrados nesta espécie.

O gineceu é bicarpelar, sincárpico na base, livre na região mediana, unido na região apical de onde saem os dois estiletes fundidos, os quais são mais longos nas flores funcionalmente masculinas e mais curtos nas femininas (figuras 6-7). Na região apical dos estiletes forma-se a cabeça dos estiletes que não apresenta adnação a qualquer outro verticilo floral (figuras 6-7) e caracteriza-se por um corpo central fusiforme revestido por epiderme secretora (figuras 15, 20) e dois apêndices apicais livres (figuras 12, 17).

Os apêndices apicais são revestidos por células papilosas não secretoras (figura 15) opostas ao tubo da corola e células papilosas de parede lignificada na região livre (figuras 15-16).

A epiderme da cabeça dos estiletes, abaixo dos apêndices apicais, apresenta três tipos estruturais de células secretoras que produzem uma substância incolor de aspecto pegajoso: células em paliçada, tricomas unicelulares curtos e longos (figura 13, 15, 18, 20, 24, 27) e células alongadas justapostas (figuras 14-15, 19-20, 24, 27). As células em paliçada estão na região mediana, situadas logo abaixo dos apêndices apicais (figuras 13, 15, 18, 20). Na região entre os apêndices e as células em paliçada foram observados tricomas mais longos em algumas flores funcionalmente masculinas (figura 15). A região mediana da cabeça dos estiletes é composta exclusivamente por tricomas secretores unicelulares alongados de base alargada (figuras 13, 15, 18, 20) onde normalmente, os núcleos estão localizados. A base da cabeça tem formato umbraculiforme (figuras 14-15, 19-20) devido à união de quatro a seis fileiras de células alongadas que se curvam para baixo na direção do ovário (figuras 14-15,

19-20, 24, 27). Os três tipos de células apresentam paredes finas e conteúdo citoplasmático de aspecto denso em fase secretora (figuras 13, 22-27).

Nas células parenquimáticas que constituem o corpo da cabeça dos estiletes, em luz polarizada, é possível observar a presença de cristais e grande quantidade de grãos de amido (figuras 16, 21). Os feixes vasculares, na base da cabeça, são concêntricos anficrivais (figuras 14, 19) e à medida que se aproximam do ápice tornam–se colaterais (figuras 13, 18) até apresentarem apenas elementos traqueais nos apêndices apicais (figuras 12, 15, 17, 20).

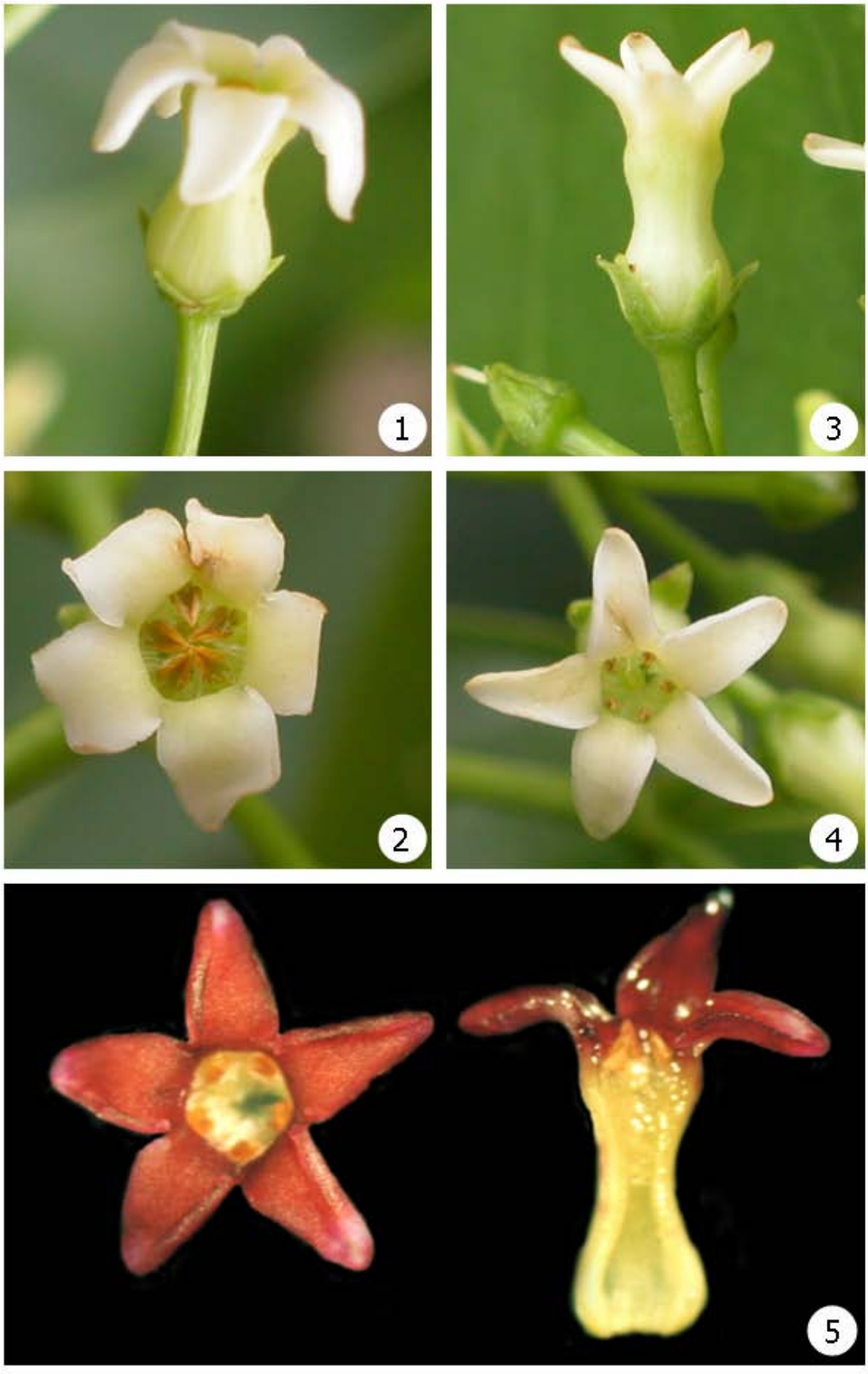
A presença de mucilagem é evidenciada no interior das células epidérmicas secretoras, tanto das flores funcionalmente masculinas (figuras 22-24) como nas femininas (figuras 25-27), submetidas ao teste de Vermelho de rutênio (figuras 22-24, 26) e à reação PAS (figuras 25, 27).

Um anel nectarífero conspícuo está localizado ao redor do ovário das flores funcionalmente femininas (figura 30) e masculinas, onde se observa pequena quantidade de substância incolor fluida. Este anel é livre da base até o ápice (figuras 33-34), contínuo desde sua base até a porção mediana e bilobado na região apical (figuras 28-30). Os dois lobos ficam opostos aos dois carpelos na altura do ovário (figura 28). A epiderme que reveste todo o nectário é unisseriada com estômatos que são observados principalmente no ápice (figuras 28-29, 31-32), na face oposta às pétalas (figura 32). O parênquima nectarífero é constituído principalmente por células pequenas de parede fina, núcleo grande (figuras 32-34) e citoplasma denso na fase secretora. O tecido vascular do anel é composto por feixes vasculares concêntricos anficrivais (figura 32) e à medida que se aproximam do ápice tornam-se constituídos apenas por elementos floemáticos.

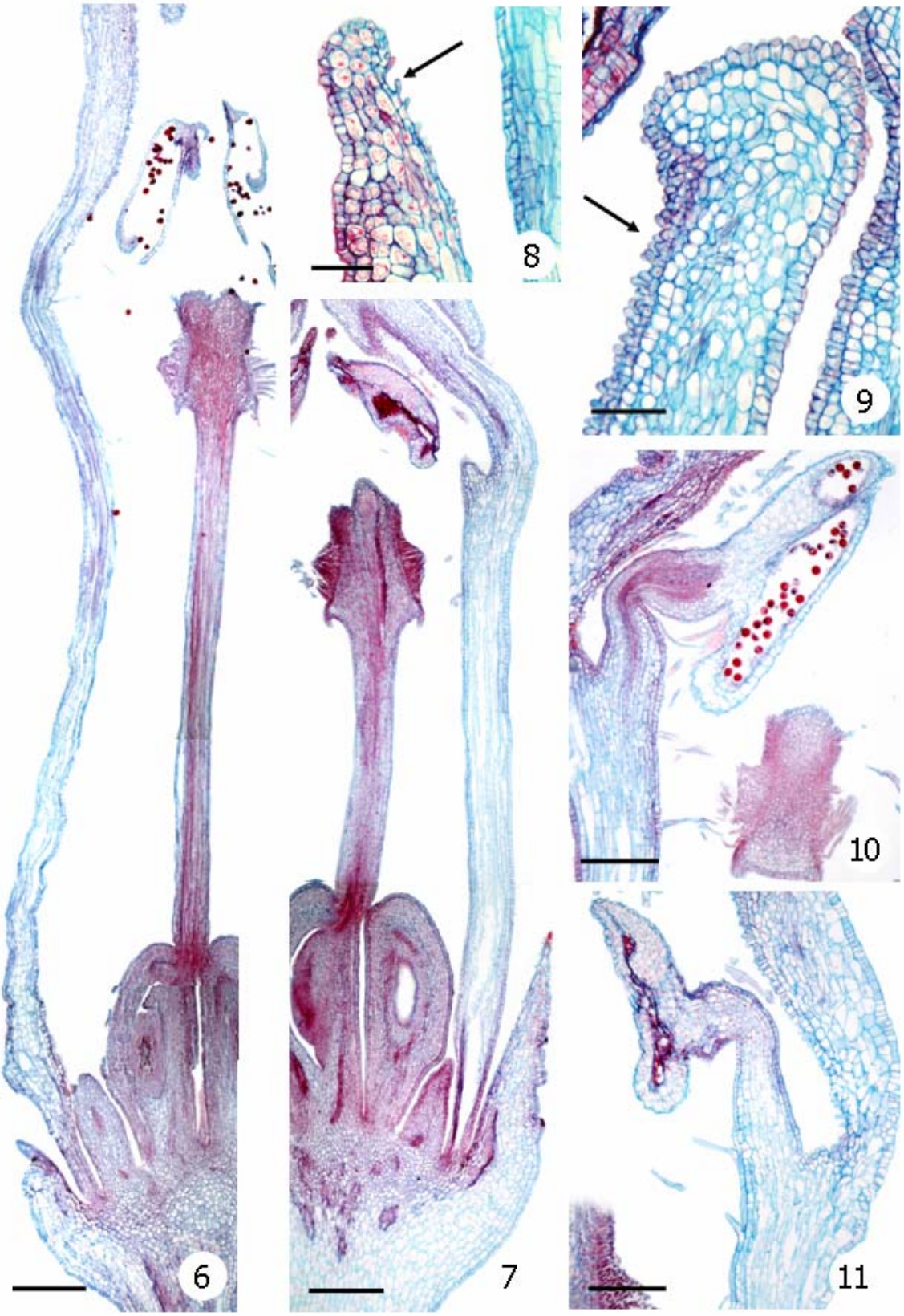
Os laticíferos encontrados nas flores de *R. sellowii* produzem látex branco de aspecto leitoso. Devido ao seu calibre (figuras 35, 38) e a suas células alongadas (figuras 36, 37, 39) os laticíferos são de fácil observação (figuras 35-39) nos cortes histológicos das flores adultas de *R. sellowii*. Estes podem ser encontrados no mesofilo das sépalas (figura 35), das pétalas (figura 36), do ovário (figura 37) e no parênquima medular do pedicelo (figuras 38, 39). No ovário também podem ser facilmente observados devido ao grande número de ramificações (figura 37). Suas células alongadas são constituídas por paredes um pouco mais espessas que as parenquimáticas do órgão onde estão situados (figuras 35). O núcleo geralmente ocupa posição central (figuras 36, 38, 39).

I LUSTRAÇÕES

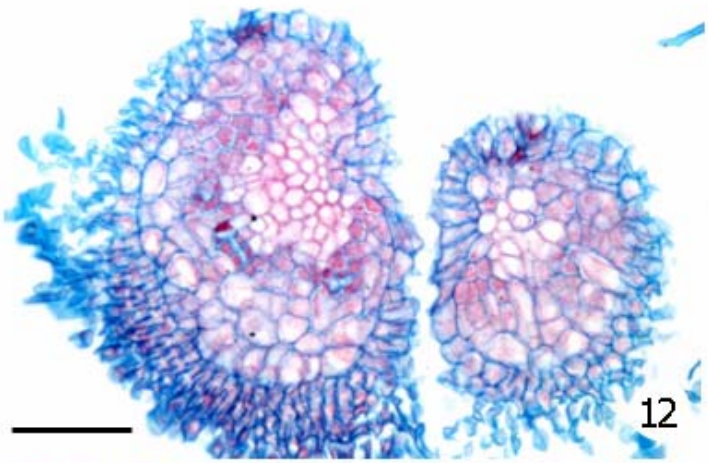
FIGURAS 1-5. Flores funcionalmente masculinas (1-2) e funcionalmente femininas (3-5) adultas, coletadas no Distrito de Joaquim Egídio. **1-2** Flores funcionalmente masculinas; notar anteras (UEC 145795). **3-4.** Flores funcionalmente femininas; observar anteras reduzidas. **5.** Flor funcionalmente feminina submetida ao vermelho neutro; notar resultado positivo nos lobos da corola (UEC 145793).

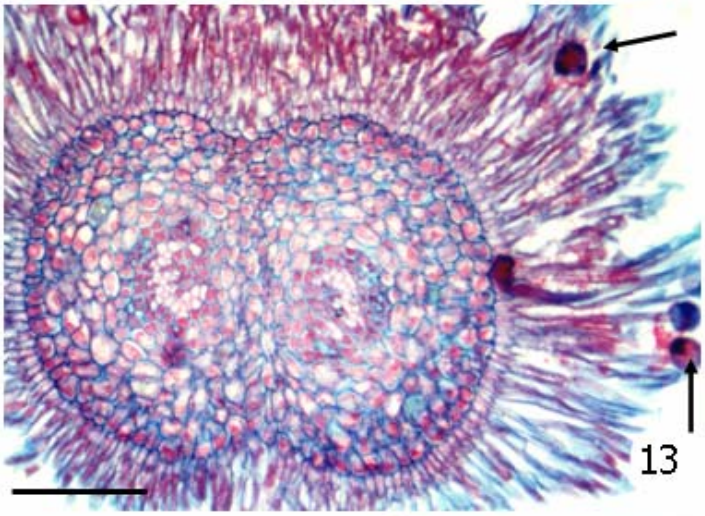

1
3
2
4
5

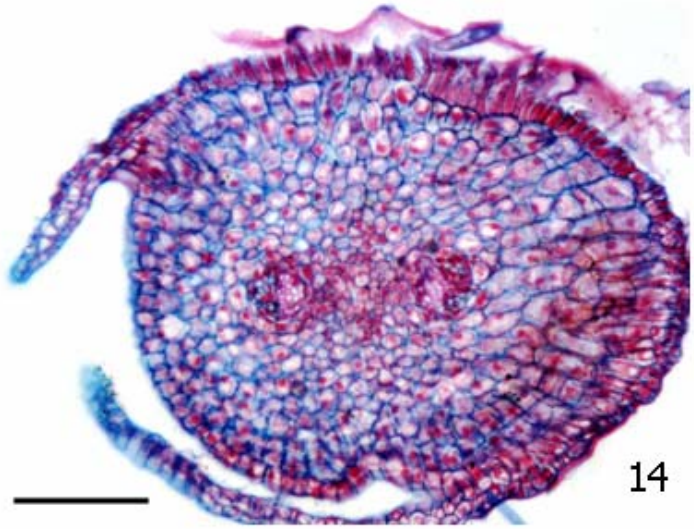
FIGURAS 6-11. Flores em secções longitudinais. **6.** Flor funcionalmente masculina, em antese. **7-9, 11.** Flores funcionalmente femininas, em pré-antese. **10.** Flor funcionalmente masculina, em pré-antese. **6-7.** Vista geral da flor, notar cabeça dos estiletes e anteras. **8.** Epiderme papilosa (seta) na face adaxial da sépala. **9.** Epiderme papilosa na face adaxial (seta) no lobo da pétala. **10.** Antera com grãos de pólen. **11.** Antera com saco polínico obliterado, grãos de pólen ausentes. **Escalas:** 6-7,10-11. 300μm; 8-9. 75μm.

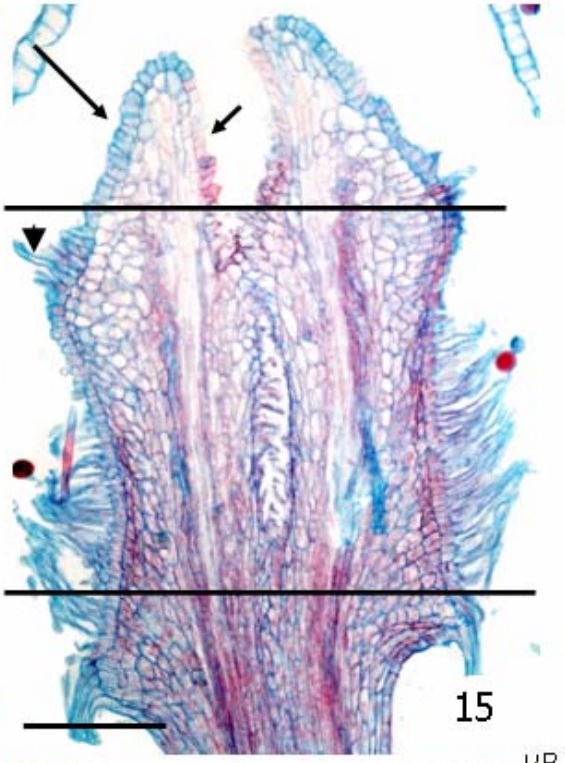

6
7
8
9
10
11

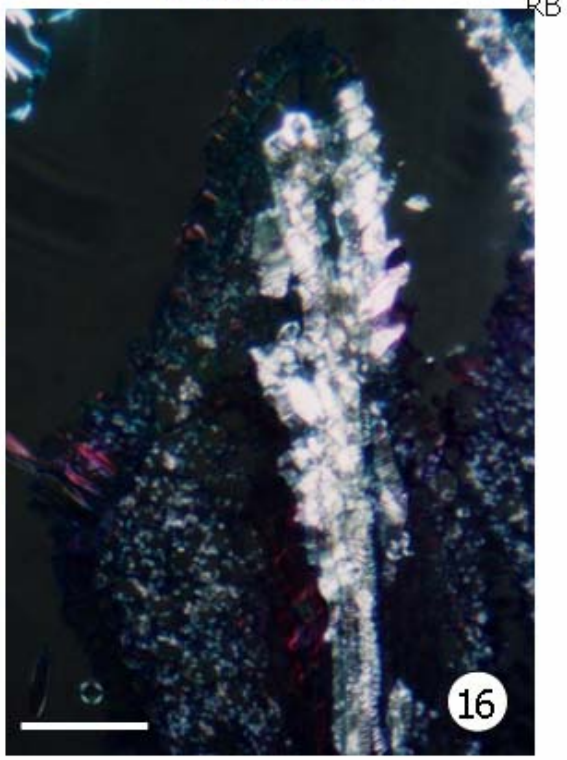
FIGURAS 12-16. Cabeça dos estiletes de flores funcionalmente masculinas, em antese. **12-14.** Secções transversais. **15-16.** Secções longitudinais. **12.** Apêndices apicais. **13.** Região mediana com tricomas longos; notar secreção no meio extracelular retendo os grãos de pólen (setas). **14.** Região basal com secreção no meio intra e extracelular. **15.** Vista geral da cabeça; observar epiderme papilosa na região externa dos apêndices (seta longa), células esclerificadas na região interna (seta curta) e tricomas longos na base (cabeça de seta). **16.** Pormenor da figura 15 em luz polarizada; notar vascularização. **Escalas:** 12-14. 100 μm; 15. 150μm; 16. 75μm. **RA –** região apical; **RM –** Região mediana; **RB –** Região basal.


12

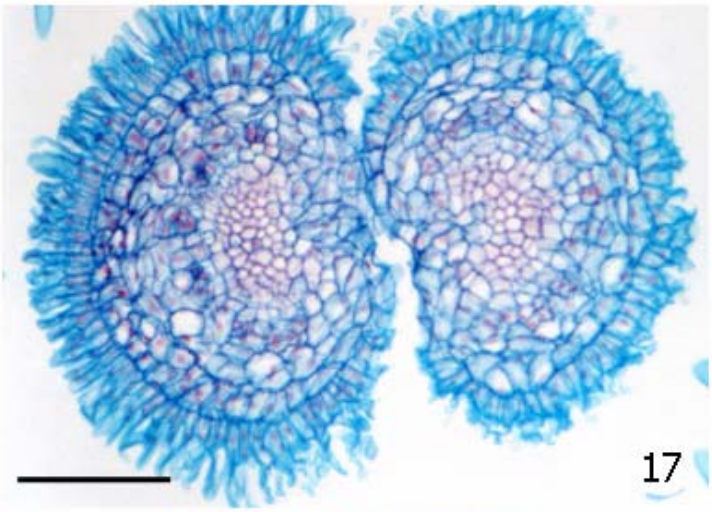

13

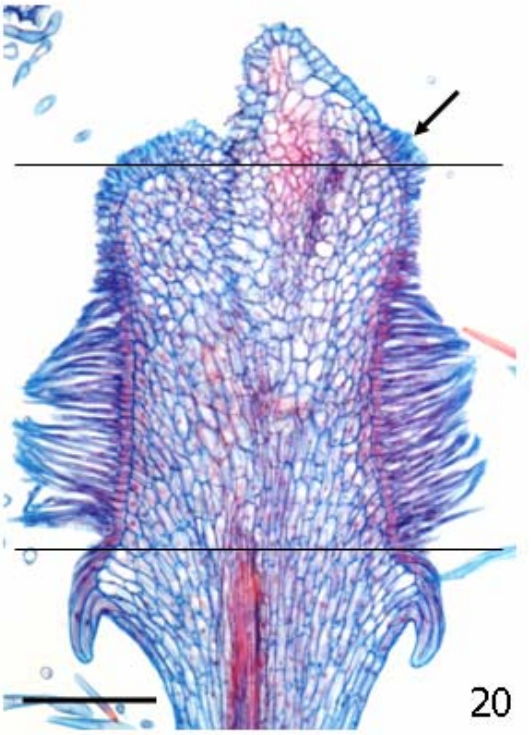

14

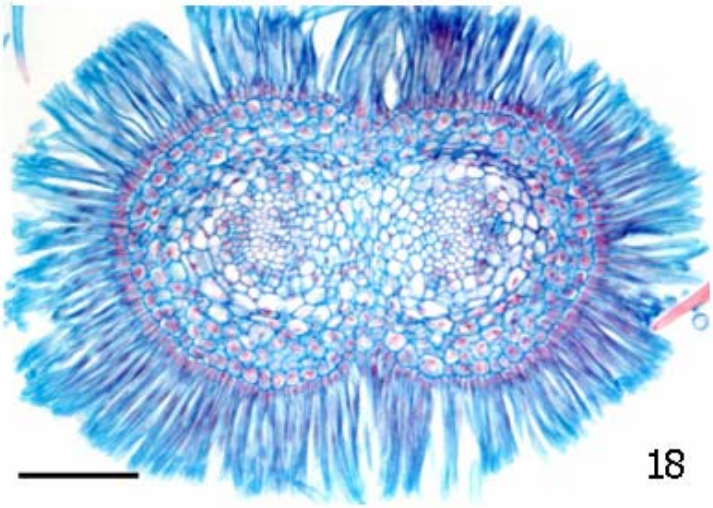

15

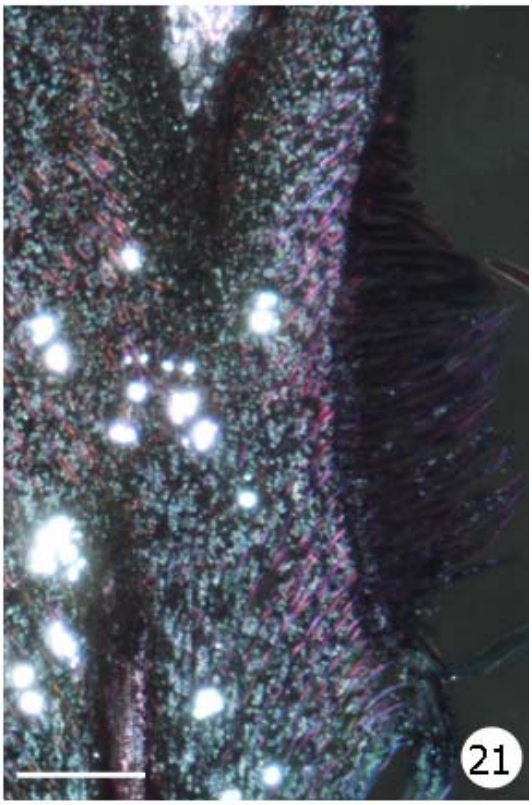

KB
16

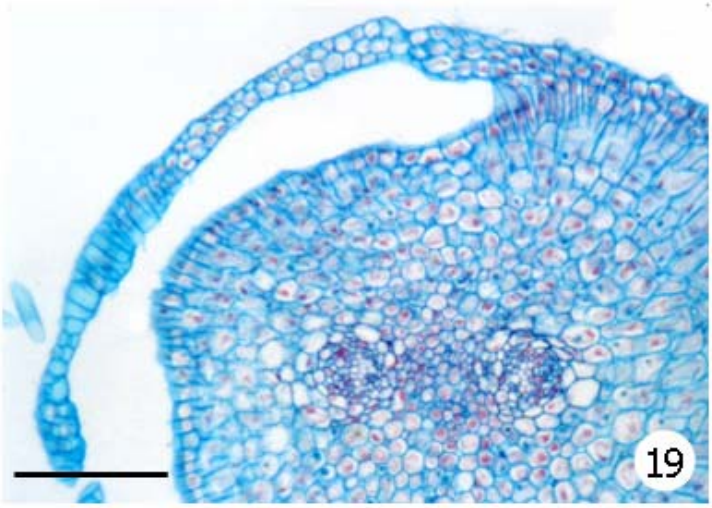
FIGURAS 17-21. Cabeça dos estiletes de flores funcionalmente femininas, em antese. **17-19.** Secções transversais. **20-21.** Secções longitudinais. **17.** Apêndices apicais. **18.** Região mediana. **19.** Região basal. **20.** Vista geral da cabeça; observar ausência de tricomas longos na base dos apêndices apicais (seta). **21.** Pormenor, em luz polarizada, da região indicada por seta na figura 20. **Escalas:** 17-19. 100μm; 20.150μm; 21. 75μm.


17

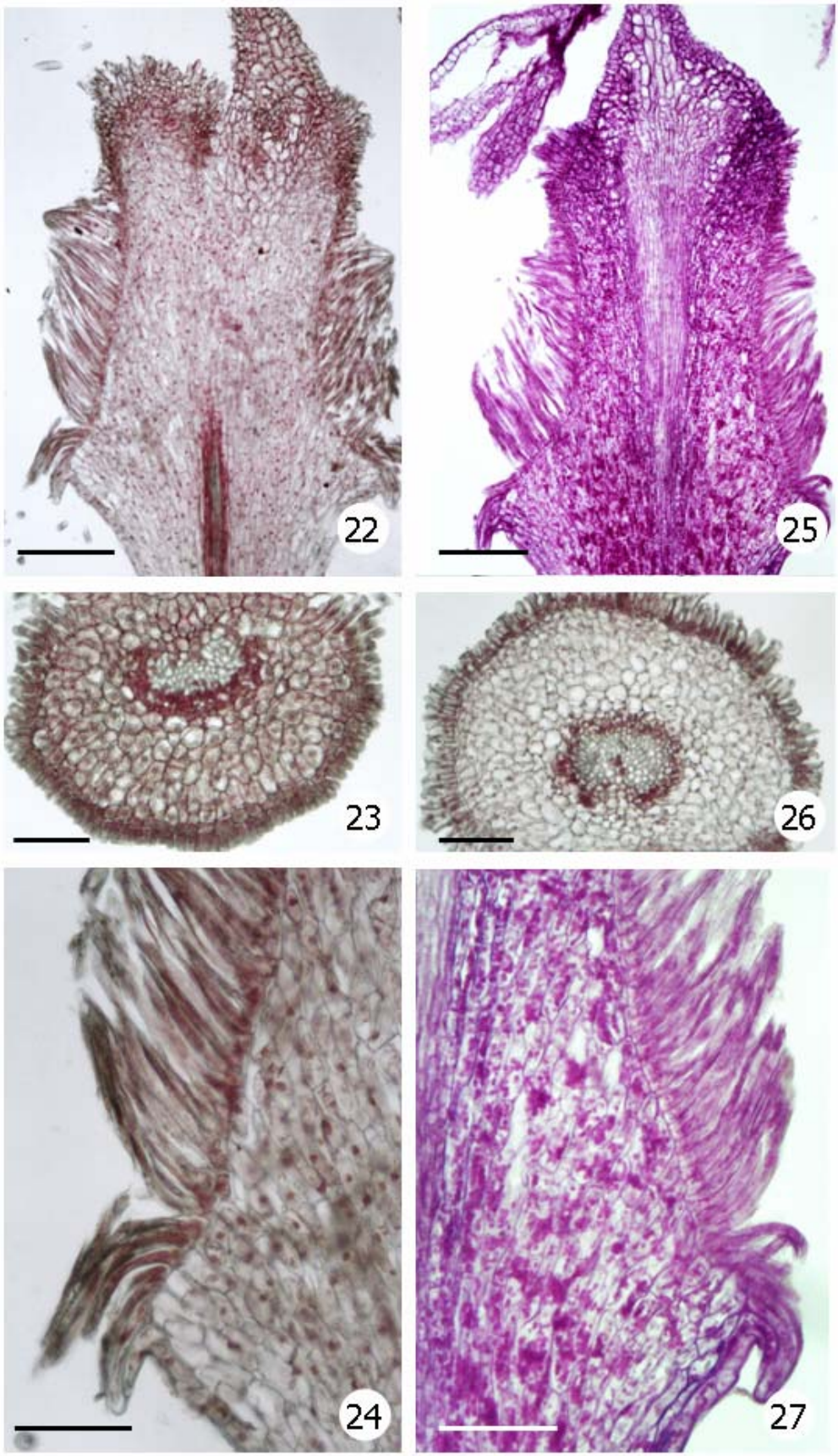

20


18

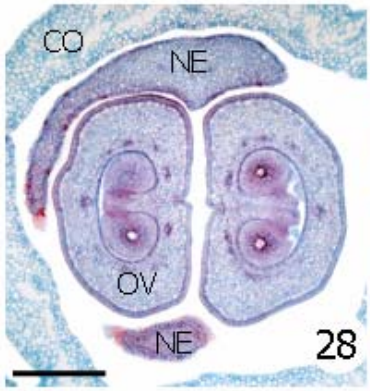

21

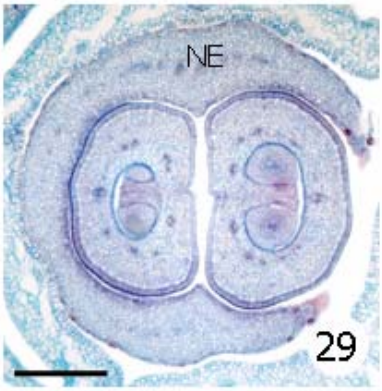

19

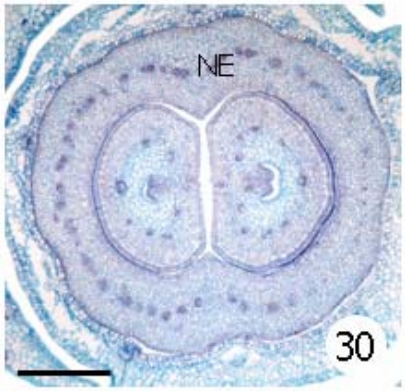
FIGURAS 22-27. Cabeça dos estiletes de flores em pré-antese, submetidas ao teste com Vermelho de rutênio (22-24, 26) e reação PAS (25, 27). **22-24.** Flores funcionalmente masculinas (UEC 145795, UEC 145798). **25-27.** Flores funcionalmente femininas (UEC 145793, UEC 145799). **22, 24, 25, 27.** Secções longitudinais. **23, 26.** Secções transversais. **22, 24.** Resultado positivo para mucilagem no interior dos tricomas presentes na região central da cabeça. **23, 26.** Resultado positivo para mucilagem no interior das células em paliçada presente na base dos apêndices apicais. **25, 27.** Resultado positivo no interior das células em paliçada e tricomas. **Escalas:** 22,25. 150μm; 23-24,26-27. 75μm.

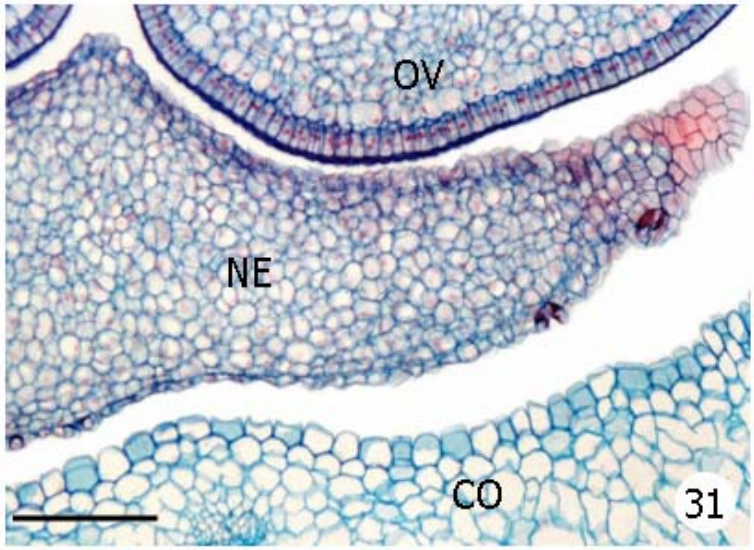

22
25
23
26
24
27

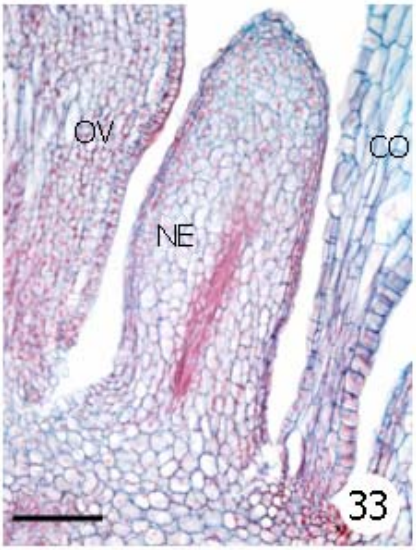
FIGURAS 28-34. Nectários das flores em pré-antese e antese. **28-32.** Flores em pré-antese **33-34.** Flores em antese. **28-32, 34.** Flores funcionalmente femininas. **33.** Flor funcionalmente masculina. **28-32.** Secções transversais da região basal da flor. **33-34.** Secções longitudinais. **28.** Região apical do nectário. **29.** Região mediana. **30.** Região basal. **31.** Pormenor da figura 29; notar presença de estômatos (seta). **32.** Pormenor da figura 30; observar presença de feixes vasculares (seta). **33-34.** Vista geral dos nectários. **Escalas:** 28-30. 200μm. 31-34. 100μm. **CO –** Corola; **NE –** Nectário; **OV –** Ovário.

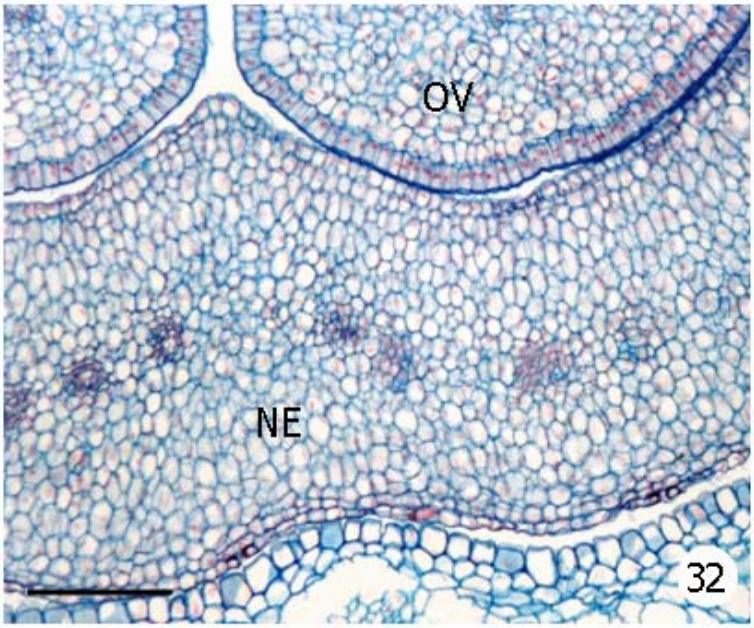

CO
NE
OV
NE
28

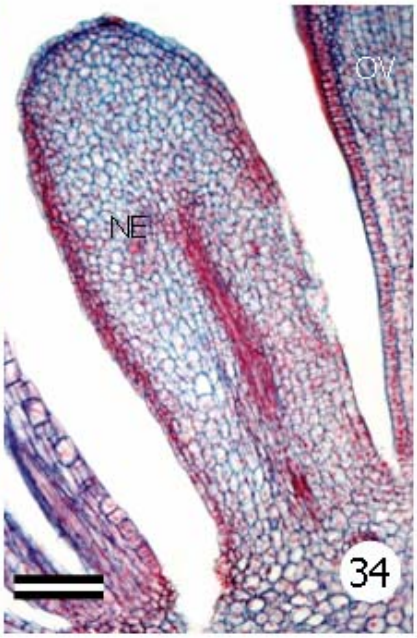

NE
29


NE
30

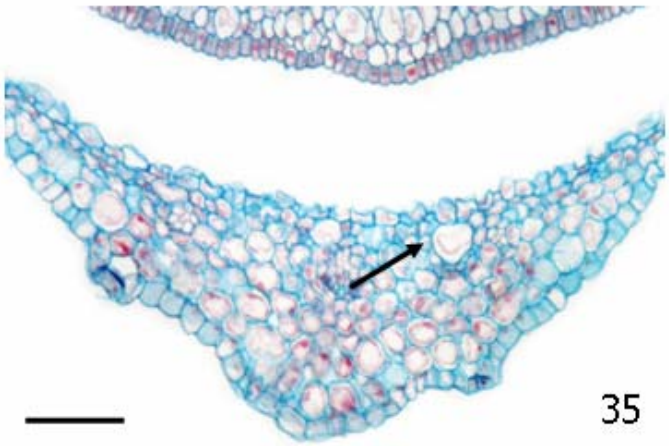

OV
NE
CO
31


OV
CO
NE
33

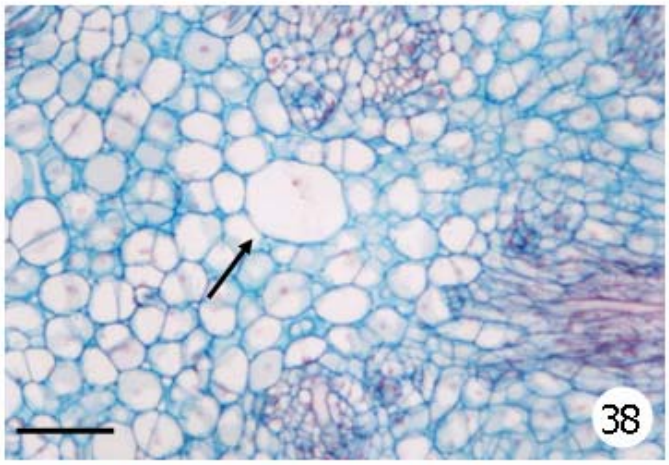

OV
NE
32

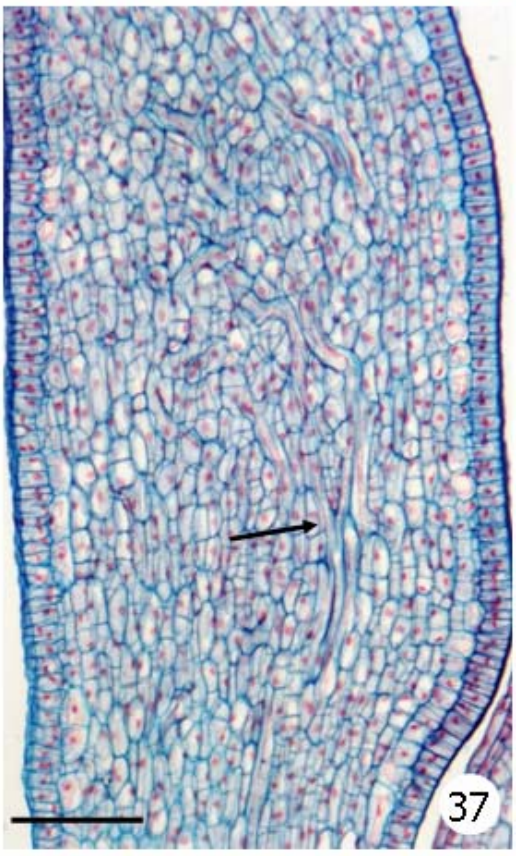

OV
NE
34

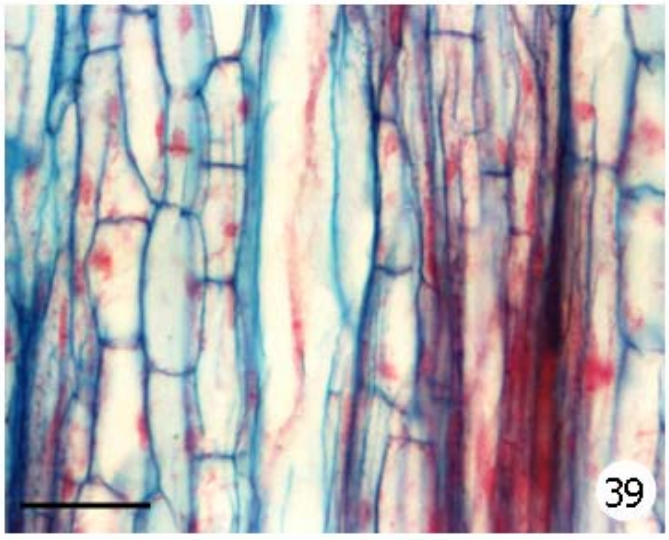
FIGURAS 35-39. Laticíferos das flores em antese. **35, 38.** Secções transversais. **36-37, 39.** Secções longitudinais. **35.** Laticífero na sépala; notar calibre e parede fina. **36.** Laticíferos no mesofilo do tubo da corola; observar posição do núcleo. **37.** Ramificações dos laticíferos no ovário (seta). **38-39.** Laticíferos na medula do pedicelo; notar calibre e posição do núcleo (seta). **Escalas:** 35-39, 75μm.


35

36


38


37


39

DISCUSSÃO

As flores de *Rauvolfia sellowii* são pequenas, com menos de 1cm quando adultas, pentâmeras, de corola tubulosa branco-esverdeada, constrita na fauce e na metade com lobos reflexos em antese quando liberam fragrância. Este tipo de corola protege o néctar ou o pólen do vento e da chuva e, ainda, restringe o acesso de certos grupos de polinizadores ao centro da flor (Endress 1994) que no caso de *R. sellowii* são polinizadas freqüentemente por abelhas, moscas e mariposas (Koch *et al.* 2002). Dois tipos florais foram observados: flores com anteras contendo grãos de pólen e flores com anteras obliteradas, sem grãos de pólen.

Os lobos da corola das flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas em *R. sellowii* apresentam epiderme papilosa na face adaxial. A presença desta estrutura associada, ao resultado positivo ao Vermelho neutro sugere a função de osmóforos aos lobos das pétalas. Os osmóforos secretam compostos altamente voláteis que podem ser produzidos por uma epiderme secretora ou pelo mesofilo para depois ser liberado através de estômatos (Endress 1994). Além destas regiões, outras partes florais podem se diferenciar em osmóforos e assumir várias formas (Esau 1965). Em *Ceropegia strapeliaeformis* (Asclepiadoideae R. Br. ex Burnett), os osmóforos são constituídos por papilas secretoras encontradas nas sépalas (Esau 1965). Em Apocynaceae, estas estruturas já foram mencionadas para espécies de *Aspidosperma e Mandevilla*, mas nenhum dado atômico foi ilustrado (Torres & Galetto 1998, Lin & Bernardello 1999).

A organização das flores de *R. sellowii* é semelhante à descrita por Fallen (1986) para *Kopsia fruticosa* Blume, principalmente em relação à forma da cabeça dos estiletes. A cabeça dos estiletes de *R. sellowii* não apresenta adnação com qualquer verticilo floral.

Estruturalmente, a cabeça dos estiletes das flores funcionalmente masculinas e femininas apresenta dois apêndices apicais não secretores. Estas estruturas apresentam epiderme papilosa externamente e são vascularizados por elementos traqueais. A presença de traqueídes já foi mencionada por Fallen (1986) nos apêndices apicais de *Kopsia fruticosa, Anechites* Griseb.*, Cameraria* L. e *Haplophyton croksii* L. Benson.

O corpo principal da cabeça é revestido por epiderme secretora, a qual é constituída de células em paliçada em seu terço superior, tricomas curtos e longos na região mediana e células alongadas no terço basal que conferem formato umbraculiforme à cabeça. Apenas a epiderme secretora da cabeça dos estiletes das flores funcionalmente masculinas apresenta tricomas longos na base dos apêndices apicais. Fallen (1986) definiu uma progressão evolutiva desta estrutura em Apocynaceae e a cabeça dos estiletes de *R. sellowii* corresponde ao tipo 2.

Um grau de especialização em relação à epiderme já pode ser observada nas cabeças dos estiletes de *R. sellowii*, quando comparadas com as espécies já estudadas de *Aspidosperma* Mart. (Lin & Bernardello 1999; Gomes 2006; Demarco 2005), *Geissospermum* Allemão, *Haplophyton* A.DC. (Fallen 1986).

Embora os tricomas longos da base dos apêndices, que formam o anel voltado para as anteras sejam observados apenas nas flores funcionalmente masculinas, a presença destas estruturas corrobora com a função descrita por Fallen (1986) em relação à deposição de pólen nesta região. É possível que a presença destes tricomas esteja relacionada com apresentação secundária de pólen nas flores funcionalmente masculinas de *R.sellowii*. Apresentação secundária de pólen já foi descrita para *R. grandiflora* Mart. ex A. DC in DC, na

qual a deposição do pólen é realizada sobre a região apical, não receptiva, da cabeça dos estiletes (Lopes & Machado 1999).

Em *R. sellowii*, a epiderme que reveste a cabeça dos estiletes apresenta atividade secretora desde a região abaixo dos apêndices apicais até a região basal da cabeça. Fallen (1986) denominou a região da base da cabeça de colar membranoso e atribuiu a ela a função de retirar e acumular os grãos polens transportados pelos polinizadores; no presente estudo, além de ter sido encontrado pólen aderido a esta região foi confirmada a atividade secretora da mesma.

A epiderme secretora da cabeça dos estiletes das flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas produz uma substância incolor de aspecto pegajoso, na qual foi evidenciada a presença de mucilagem no interior das células desde as em paliçada até as alongadas da base. Esta substância tem papel fundamental no sistema de polinização (Fallen 1986; Koch *et al.* 2002). Mital & Issar (1968) observaram que a germinação dos grãos de pólen de *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurtz ocorria somente na presença de mucilagem. A mucilagem tem função relevante no transporte de grãos de pólen pelos polinizadores em *R. sellowii* (Koch 2002; Koch *et al.* 2002). Essa substância apresenta uma desidratação rápida no aparelho bucal dos polinizadores entre as visitas realizadas em mais de um indivíduo. Para que o pólen seja depositado na próxima flor, a mucilagem deve ser hidratada novamente e duas hipóteses são sugeridas por Koch *et al.* 2002: 1) a reidratação ocorreria na próxima flor visitada, pelo contato com a mucilagem presente na região mediana da cabeça dos estiletes, 2) a reidratação ocorreria pelo contato com o néctar. A presença dos elementos traqueais em grande quantidade nos apêndices apicais da cabeça dos estiletes de *R. sellowii*, descrita no presente estudo, pode estar intimamente relacionada com este

processo. Fallen (1986) descreveu a importância da presença dos traqueídes para manter a umidade em toda a cabeça evitando a desidratação do adesivo (do meio extracelular), o que poderia prejudicar todo o mecanismo de polinização.

O nectário de *R. sellowii* é livre desde a base até o ápice, formando um anel como em *Thevetia peruviana* L. e *Tarbernaemontana chrysocarpa* L. (Woodson & More 1938), mas em sua metade distal deixa de ser circular e apresenta-se em forma de ferradura, e mais acima, levemente bilobado. Nectários bilobados e com ápice bilobado já foram descritos em outros gêneros da tribo Vinceae como em *Catharanthus* G. (Walker 1975a), *Kopsia* Blume (Woodson & More 1938) e *Vinca* L. (Rachmilevitz & Fahn 1973).

O anel nectarífero é constituído por epiderme unisseriada revestida por fina cutícula e com estômatos principalmente em seu ápice. A liberação de néctar via estômatos já foi descrita em *Vinca rosea* L. e *Vinca major* L. (Rachmilevitz & Fahn 1973; Fahn 1979). Estômatos estão presentes na região mediana e apical dos nectários de espécies de *Mandevilla* Lindl. (Galetto 1997) e *Forsteronia* G.Mey. (Rio 2006).

O sistema vascular do anel nectarífero de *R. sellowii* é constituído por feixes concêntricos anficrivais em sua base e região mediana e apenas elementos floemáticos próximo ao ápice. Nectários vascularizados por elementos floemáticos e xilemáticos já foram relatados para espécies de *Mandevilla* por Galetto (1997).

Os laticíferos ramificados são observados em todas as peças de flores em antese masculinas e femininas de *R. sellowii*. O látex tem aspecto leitoso e é liberado mediante a injúria do tecido. As ramificações são observadas, principalmente, no mesofilo ovariano. O látex pode ser leitoso, avermelhado, amarelo, cinza ou incolor e está presente em todas as Apocynaceae (Metcalfe & Chalk 1950; Endress & Bruyns 2000, Aguiar 2003; Demarco 2005;

Demarco *et al.* 2006; Rio 2006). Segundo Fahn (1979) os laticíferos são classificados em dois tipos: articulados e não articulados. Na maioria das espécies descritas de Apocynaceae, os laticíferos são do tipo não articulado (Murugan e Inamdar 1987, Appezzato-da-Glória & Estelita 1997, Aguiar 2003). Nos laticíferos de *Aspidosperma australe* e *Blepharodum bicuspidatum* (Demarco *et al.* 2006) constatou-se a dissolução rápida das paredes transversais das células e sinais de dissolução não foram observados logo abaixo do ápice vegetativo, onde estas estruturas foram formadas. A partir desta observação, estes autores denominaram os laticíferos destas espécies de articulados anastomosados. Em *Forsteronia*, laticíferos não-articulados ramificados já foram registrados no receptáculo floral, cálice, mesofilo ovariano e nas lacínias da corola (Rio 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, S. 2003. Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.

BAWA, K.S; PERRY, D.R. & BEACH, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. American Journal of Botany 72:331-345.

CLARK, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

DAFNI, A.M.; KENAN, P.G. & HUSBAND, B.C. 2005. Practical pollination biology. Eviroquest, Cambridge.

DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae *s.l.*). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DEMARCO, D.; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.

ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.

ENDRESS, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. University Press, Cambridge.

ENDRESS, P.K.; JENNY, M. & FALLEN, M.E. 1983. Convergent elaboration of apocarpous gynoecia in higher dicotyledons (Sapindales, Malvales, Gentianales). Nordic Journal of Botany 3:293-300.

ESAU, K. 1965. Plant anatomy. 2nd. ed., John Wiley & Sons Inc., New York.

FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.

FAHN, A. 1990. Plant anatomy. 4th. ed., Pergamon Pres, Oxford.

FALLEN, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: Morphological, functional and evolutionary aspects. Botanisher Jahrbücher für Systematik 106:245-286.

GALETTO, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentina Apocynaceae. Flora 192:197-207.

GERLACH, D. 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgard.

GREGORY, M. & BASS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38:125-174.

GOMES, S.M. 2006. Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman and Co, San Francisco.

JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.

KEARNS C.A. & INOUYE D.W. 1993. Techniques for pollination biologist. Niwot: University Press of Colorado

KOCH, I. 2002. Estudos das espécies neotropicais do gênero *Rauvolfia* L. (Apocynaceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KOCH, I.; BITTRICH, V. & KINOSHITA, L.S. 2002. Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae; Rauvolfioideae) – a report of dioecy in Apocynaceae. Botanisher Jahrbücher für Systematik 124:83-104.

KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae – *Rauvolfia* L. *In.* Flora Fanerogânica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A. M. Giulietti, coords.), Fapesp, Rima, São Paulo, v. 4, pp. 78–79.

KUNZE, H. 1993. Evolution of the translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. Plant Systematics and Evolution 185:99-122.

KUNZE, H. 1994. Ontogeny of the translator in Asclepiadaceae *s.str.* Plant Systematics and Evolution 193:223-242.

KUNZE, H. 1997. Corona and nectar system in Asclepiadinae (Asclepiadaceae). Flora 192:175-183.

LIN, S. & BERNARDELLO, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperna quebracho – blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Science 160:869-878.

LOPES, A.V. & MACHADO, I.C. 1999. pollination and reproductive biology of *Rauvolfia grandiflora* (Apocynaceae): secondary pollen presentation, herkogamy and self-incompatibility. Plant Biology 1:547-553.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2, Claredon Press, Oxford

MILANEZ, F.R. 1959. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – I. Embrião. Rodriguésia 21/22:347-394.

MITAL, S.P. & ISSAR S.C. 1968. Observations on floral biology, fruit setting and seed development in *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurtz. Indian Journal Agricultural Sciences 39:807-812.

MURUGAN, V. & INAMDAR, J.A. 1987. Studie in the laticíferos of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.

RACHMILEVITZ, T. & FAHN, A. 1973. Ultrastruture of nectary of *Vinca rosea* L., *Vinca major* L. and *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Valencia* and its relation to the mechanism of nectar secretion. Annals of Botany 37: 1-9.

RAO, V.S. & GANGULI, A. 1963 – Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.

RIO, M.C.S. do 2001. Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R.BR. nom. cons. (Apocynaceae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do 2006. Estudos anatômicos em espécies de cerrado de *Forsteronia* G.Mey. (APOCYNACEAE). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocyancaea). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.

RIO, M.C.S. do; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.

SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers. (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SIMÕES, A.O.; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152:387-398.

SIMÕES, A.O.; RIO, M.C.S. do; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2007. Gynostegium morphology of Mesechitae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae) as it pertains to the classification of the tribe. International Journal of Plant Science 168:999-1012.

SIMÕES, A.O.; LIVSHULTZ, T.; CONTI, E. & ENDRESS, M. 2007. Phylogeny and systematics of the Rauvolfioideae (Apocynaceae) based on molecular and morphological evidence. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:268-297.

STOCKSTILL, B.L. & NESSLER C.L. 1986. Ultrastrutural observations on the nonarticulated, branched laticíferos in *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). Phytomorfology 36:347-355.

THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of colleter. Annals of Botany 68:287-305.

TORRES, C. & GALETTO, L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127:207-223.

VOGEL, S. 1990. The role of scent glands in pollination on the structure and function of osmophores. Washington, Smithsonian Institution Libraries and the National Science Foundation.

WALKER, D.B. 1975a. Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynocial ontogeny. American Journal of Botany 62:457-467.

WALKER, D.B. 1975b. Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). II. Fine structure of the epidermis before fusion. Protoplasma 86: 86:29-41.

WOODSON, R.E. JR. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceus flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do estudo dos ápices vegetativos de *Rauvolfia sellowii* foi possível observar que os coléteres ocorrem na base da porção adaxial dos primórdios foliares, no pecíolo das folhas jovens e adultas. Eles têm cor amarela desde o início de seu desenvolvimento até a fase secretora, quando produzem uma secreção esbranquiçada de aspecto gomoso que envolve a região adaxial das folhas jovens do primeiro nó visível e todos os primórdios do ápice. Estas observações corroboram com a afirmação de Thomas (1991) de que a secreção dos coléteres se inicia antes do desenvolvimento das folhas, quando estes apresentam cor amarelada e secretam um material pegajoso que envolve todo ápice vegetativo.

Um número elevado de coléteres foliares, de origem axilar e marginal, está posicionado em duas a três fileiras paralelas a superfície da base dos órgãos examinados. A posição dos coléteres de *R. sellowii* está de acordo com a descrita por Koch (2002) na revisão feita para as espécies neotropicais do gênero. A ocorrência de seis a oito coléteres já foi registrada para o gênero (Thomas & Dave 1991).

Os coléteres de *R. sellowii* estão presentes também, na base da face adaxial das brácteas folhosas, nas diminutas, ausentes nas sépalas e são responsáveis pela produção de uma secreção incolor. A posição destas estruturas nas brácteas folhosas de *R. sellowii* está de acordo com a descrita por Koch (2002). Segundo a autora, as brácteas das inflorescências são estruturas que variam de forma e tamanho com margem inteira, denteada somente na base ou glanduloso-denteada. Este último caráter já foi descrito para dez espécies de *Rauvolfia* (Koch 2002) e está relacionado com a presença dos coléteres marginais encontrados nas brácteas diminutas de *R. sellowii*.

Na base de cada bráctea diminutas de *R. sellowii* foram observados 9-13 coléteres e destes, 2-4 ocupam posição marginal e os demais, posição axilar. Os marginais são semelhantes ao tipo padrão e os axilares são cônicos, semelhantes aos coléteres foliares. O tipo estrutural mais comum nas Apocynaceae é o tipo padrão (standard), mas recentemente, novos tipos de coléteres foram descritos para algumas espécies (Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006).

A presença de coléteres nas brácteas das articulações das inflorescências e a ausência de coléteres calicinais em *R. sellowii* sugerem que o exsudato produzido protege os meristemas presentes nestas regiões. Esta função já foi proposta para os coléteres bracteolares de *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Spina 2004). A proteção dos meristemas pela secreção produzida pelos coléteres, já foi proposta por Fahn (1979) e Thomas (1991); os resultados encontrados para os coléteres foliares e bracteolares de *R. sellowii* reforçam a hipótese proposta por estes autores.

Mucilagem foi evidenciada na secreção de todos os coléteres de *R. sellowii,* característica que valida estas estruturas como coléteres. O acúmulo do exsudato no espaço subcuticular liberado do interior das células epidérmicas foi evidenciado nos coléteres das brácteas folhosas e nos foliares, mas não nos coléteres das brácteas diminutas. Este modo de liberação do exsudato também já foi descrito para espécies de alguns gêneros de Rauvolfioideae (Fjell 1983; Mohan & Inamdar 1986).

Ao analisar a estrutura floral de *R. sellowii* foi possível caracterizar anatomicamente as estruturas secretoras encontradas, dando ênfase à cabeça dos estiletes. As estruturas secretoras florais desta espécie são: a epiderme da cabeça dos estiletes, nectários e

laticíferos. Nesta espécie não foram encontrados coléteres calicinais, o que corrobora o posicionamento desta espécie dentro de Rauvolfioideae (Endress & Bruyns 2000).

Os lobos da corola de *R. sellowii* apresentam uma epiderme papilosa na face adaxial. Ao analisar a morfologia destas papilas e associá-las com o resultado positivo ao Vermelho neutro, sugerimos à estas estruturas a função de osmóforos. Em Apocynaceae, estas estruturas já foram mencionadas para outras espécies mas nenhum dado anatômico foi registrado (Torres & Galetto 1998; Lin & Bernardello 1999).

A cabeça dos estiletes dos dois tipos florais de *R. sellowii* é caracterizada por corpo central fusiforme e dois apêndices apicais não secretores. A porção secretora é formada por epiderme de tricomas longos, células em paliçada em seu terço superior, tricomas curtos e longos na região mediana e na base quatro a seis fileiras de células alongadas unidas que se curvam para baixo na direção do ovário conferindo um formato umbraculiforme a esta região. Os tricomas longos situados logo abaixo dos apêndices apicais estão presentes apenas na epiderme secretora da cabeça dos estiletes das flores funcionalmente masculinas. A cabeça dos estiletes de *R. sellowii* é semelhante ao tipo 2 descrito por Fallen (1986), e a presença de tricomas longos na base dos apêndices apicais das flores funcionalmente masculinas está de acordo com a função de deposição de grãos pólen, descrita pela autora. Na secreção da epiderme secretora foi constatada a presença de mucilagem.

A ausência de adnação da cabeça dos estiletes a qualquer verticilo floral foi observada no presente estudo. Esta característica é descrita para os membros de Rauvolfioideae Kostel., pois a adnação com os estames está presente nos representantes de Apocynoideae Burnett. Periplocoideae R.Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R.Br. ex Burnett. (Endress & Bruyns 2000).

O nectário de *R. sellowii* é anelar, livre desde sua base até o ápice e vascularizado. A ocorrência de estômatos no ápice destas estruturas sugere que a liberação do néctar ocorre via estômatos, sendo que este tipo de liberação já foi descrito para outras espécies de Rauvolfioideae (Rachmilevitz & Fahn 1973; Fahn 1979).

Os laticíferos ramificados, encontrados em todas as peças florais de *R. sellowii* são mais visíveis no mesofilo dos carpelos. Na maioria das Apocynaceae, os laticíferos são do tipo não articulado (Murugan & Inamdar 1987, Appezzato-da-Glória & Estelita 1997), mas no presente estudo não foram observadas paredes transversais nos extensos laticíferos, um estudo de ontogênese é necessário para melhor descrever estas estruturas.

PERSPECTIVAS

Diante dos dados inéditos apresentados no presente estudo, em relação à presença de coléteres marginais nas brácteas diminutas das inflorescências de *R. sellowii*, seria muito interessante realizar uma investigação mais ampla destas estruturas em outras espécies de *Rauvolfia* e verificar a importância deste caráter dentro do gênero. Ao analisar os dados morfológicos descritos por Koch (2002) e a classificação infragenérica de Rao (1956) foi possível observar que brácteas com margem glanduloso-denteada ocorrem principalmente nos componentes da seção *Macrovolfia* (Rao 1956).

Um estudo de ontogênese das flores funcionalmente femininas e masculinas de *R. sellowii* ajudaria a descrever as diferentes fases de secreção das estruturas secretoras e facilitaria o entendimento do mecanismo de polinização. Este tipo de estudo seria interessante para elucidar o processo de microsporogênese e assim, explicar os sacos polínicos obliterados e destituídos de pólen, das flores funcionalmente femininas.

A análise cuidadosa da ontogênese de órgãos vegetativos e reprodutivos de *R. sellowii* é necessária para tipificação dos laticíferos.

Investigar as principais classes de substâncias que estão presente no exsudato dos coléteres foliares e bracteolares de *R. sellowii* descritos no presente trabalho e, com os dados obtidos realizar um estudo comparativo. Um estudo de microscopia de transmissão pode ser utilizado como ferramenta para descrever o processo de exsudação dos coléteres, sem rompimento da cutícula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANSON. 1763. Familles dês olantes 2. Vincent, Paris.

AGUIAR, S. 2003. Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* Apocynaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66:301-306.

BATISTA, C.V.F.; SCHISPEMA, J.; VEEPORTE, R.; RECHE, S. B., HENRIQUES, A.T. 1996. Indolle alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. Phytochemistry, 41: 969-971.

BAWA, K.S; PERRY, D.R. & BEACH, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. American Journal of Botany 72:331-345.

DAVE, Y.; THOMAS, V. & KURIACHEN, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata* G.Don. Pakistan Journal of Botany 19:243-248.

DEMARCO, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae *s.l.*). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DEMARCO, D.; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. Revista Brasileira de Botânica 29:133-144.

ENDRESS, M.E. & BRUYNS, P.V. 2000. A Revised Classification of Apocynaceae *s.l.* The Botanical Review 66:1-56.

ENDRESS, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, University Press.

ENDRESS, P.K.; JENNY, M. & FALLEN, M.E. 1983. Convergent elaboration of apocarpous gynoecia in higher dicotyledons (Sapindales, Malvales, Gentianales). Nordic Journal of Botany 3:293-300.

ESAU, K. 1965. Plant anatomy. 2 nd. ed., John Wiley & Sons, New York.

FAHN, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.

FAHN, A. 1990. Plant anatomy. 4th. ed., Pergamon Pres, Oxford.

FALLEN, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: Morphological, functional and evolutionary aspects. Botanisher Jahrbücher für Systematik 106:245-286.

FARRELL, B.D.; DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? American Naturalist 138:881-900.

FJELL, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 3:383-392.

GALETTO, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentina Apocynaceae. Flora 192:197-207.

GOMES, S.M. 2006. Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GONÇALVES, C.R. 1962/65. Sobre a anatomia de *Rauvolfia grandiflora* Mart. (Apocynaceae) Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 18:293-306.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2002. Plant Systematics: A Plylogenetic Approach. 2 nd. ed, Sinauer Associates Inc., Massachusetts, U.S.A., 576p.

KATO, L. 2002. Estudos fitoquímicos de espécies brasileiras de *Rauvolfia* (Apocynaceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KINOSHITA, L.S. & Simões, A.O. 2005. Flora da Serra do Cipó, Minas gerais: Apocynaceae s str. (Rauvolfioideae e Apocynoidaeae). Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 23(2): 235-256.

KOCH, I. 2002. Estudos das espécies neotropicais do gênero *Rauvolfia* L. (Apocynaceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KOCH, I.; BITTRICH, V. & KINOSHITA, L.S. 2002. Reproductive biology and functional aspects of the floral morphology of *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae; Rauvolfioideae) – a report of dioecy in Apocynaceae. Botanisher Jahrbücher für Systematik 124:83-104.

KOCH, I. & KINOSHITA, L.S. 2005. Apocynaceae – *Rauvolfia* L. *In.* Flora Fanerogânica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A. M. Giulietti, coords.), Fapesp, Rima, São Paulo, v. 4, pp. 78–79.

KUNZE, H. 1993. Evolution of translator in Periplocaceae and Asclepiadaceae. Plant. Systematcs and Evolution. 185:99-122.

KUNZE, H. 1994. Ontogeny of the translator in Asclepiadaceae s. str. Plant Systematics and Evolution. 193:223-242.

KUNZE, H. 1997. Corona and nectar system in Asclepiadinenae (Asclepiadaceae). Flora 192: 309-316.

KURIASHEN, P.M. & DAVE, Y. 1989. Structural, developmental and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). Journal of Phytological Research 2:7-14.

LIN, S. & BERNARDELLO, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperna quebracho – blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Science 160:869-878.

LOPES, A.V. & MACHADO, I.C. 1999. Pollination and reproductive Biology of *Raulvolfia grandiflora* (Apocynaceae); secondary pollen apresentatation, hercogamy and self-incompatibility. Plant Biology 1:547-553.

MARCONDES-FERREIRA, W. & KINOSHITA, L.S. 1996. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 19:203-214.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. v.2, Claredon Press, Oxford

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. v.1, Claredon Press, Oxford.

MILANEZ, F.R. 1959. Contribuição ao conhecimento anatômico de *Cryptostegia grandiflora* – I. Embrião. Rodriguésia 21/22:347-394.

MIRABELLA, M.A. 1897. Contribuzioni alla conoscenza dei colleteri. Contribuitions from the biological vegetable. Cap.II, p.1-28. Casa editrice Virzi, Palermo.

MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57:389-401.

MURUGAN, V. & INAMDAR, J.A. 1987. Studie in the laticíferos of *Vallaris solanacea* (Roth) O. Ktze. Phytomorphology 37:209-214.

RACHMILEVITZ, T. & FAHN, A. 1973. Ultrastruture of nectary of *Vinca rosea* L., *Vinca major* L. and *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Valencia* and its relation to the mechanism of nectar secretion. Annals of Botany 37: 1-9.

RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the “squamellae” in the light of their ontogeny. Current Science 18:520-522.

RAO, A.S. 1956. A revision of *Rauvolfia* with particular reference to the American species. Annals of the Missouri Botanical Garden 43:253-355.

RAO, V.S. & GANGULI, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society 42:419-435.

RIO, M.C.S. do 2001. Estudos taxonômicos e anatômicos do gênero *Prestonia* R.BR. nom. cons. (Apocynaceae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do 2006. Estudos anatômicos em espécies de cerrado de *Forsteronia* G.Mey. (APOCYNACEAE). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIO, M.C.S. do; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocyancaea). Revista Brasileira de Botânica 25:339-349.

RIO, M.C.S. do; KINOSHITA, L.S. & CASTRO, M. de M. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28:713-726.

RIZZINI, C.T. & MORS, W.B 1976. Botânica econômica brasileira. EPU & USP, São Paulo.

SILVA, A.G. 1990/92. Osmóforos: Retrospectiva dos últimos 20 anos de pesquisa. Rodriguésia 42/44:7-20.

SIMÕES, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers. (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SIMÕES, A.O.; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152:387-398.

SIMÕES, A.O. & KINOSHITA, L.S. 2002. The Apocynaceae *s.str*. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. Darwiniana 40:127-169.

SIMÕES, A.O.; RIO, M.C.S. do; CASTRO, M. de M. & KINOSHITA, L.S. 2007. Gynostegium morphology of Mesechitae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae) as it pertains to the classification of the tribe. International Journal of Plant Science 168:999-1012.

SIMÕES, A.O.; LIVSHULTZ, T.; CONTI, E. & ENDRESS, M. 2007. Phylogeny and systematics of the Rauvolfioideae (Apocynaceae) based on molecular and morphological evidence. Annals of the Missouri Botanical Garden 94:268-297.

SOLEREDER, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Translated by L.A. Boodle & F.G. Fritsch, 2v. Claredon Press, Oxford.

SPINA, A.P. 2004. Estudos taxonômicos, micro-morfologicos e filogenéticos do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae - Plumerieae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 1998. Plant physiology. 4th. ed., Sinauer Associates, Sunderland.

THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of colleter. Annals of Botany 68:287-305.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda canthartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64:201-203.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6:25-29.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32:163-172.

THOMAS, V. & DAVE, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Reportorium 102:23-28.

THOMAS, V.; DAVE, Y. & MENON, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8:493-496.

TORRES, C. & GALETTO, L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127:207-223.

VOGEL, S. 1990. The role of scent glands in pollination on the structure and function of osmophores. Washington, Smithsonian Institution Libraries and the National Science Foundation.

WALKER, D.B. 1975a. Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). I. Light and scanning electron microscopic study of gynocial ontogeny. American Journal of Botany 62:457-467.

WALKER, D.B. 1975b. Postgenital carpel fusion in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). II. Fine structure of the epidermis before fusion. Protoplasma 86: 86:29-41.

WOODSON, R.E. JR. 1936. Studies in Apocynaceae. IV. The American genera of Echitoideae. Annals of the Missouri Botanical Garden 23:169-548.

WOODSON, R.E. JR. & MOORE, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceus flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65:135-165.