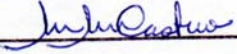


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Fabiano Machado Martins

**Glândulas foliares e florais em três espécies de
Apocynaceae – Apocynoideae de cerrado**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  _____ e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

M366g	Martins, Fabiano Machado Glândulas foliares e florais em três espécies de Apocynaceae – Apocynoideae de cerrado / Fabiano Machado Martins. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadores: Marília de Moraes Castro, Luiza Sumiko Kinoshita. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Apocynaceae. 2. Anatomia vegetal. 3. Coléteres. 4. Histoquímica. I. Castro, Marília de Moraes, 1953-. II. Kinoshita, Luiza Sumiko, 1947-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
-------	--

Título em inglês: Foliar and floral glands in three species from Apocynaceae - Apocynoideae of cerrado.

Palavras-chave em inglês: Apocynaceae; Plant anatomy; Colleters; Histochemistry.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marília de Moraes Castro, Renata Maria Strozi Alves Meira, Washington Marcondes Ferreira Neto, André Olmos Simões, Maria Carolina Scatolin do Rio.

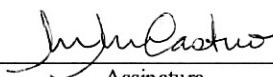
Data da defesa: 29/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 29 de agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA

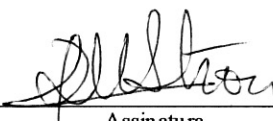
Profa. Dra. Marília de Moraes Castro(Orientadora)


Assinatura

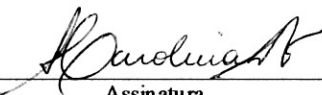
Dra. Solange Cristina Mazzoni Viveiros

Assinatura

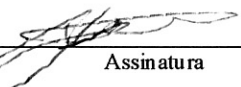
Profa. Dra. Renata Maria Strozi Alves Meira


Assinatura

Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio


Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões


Assinatura

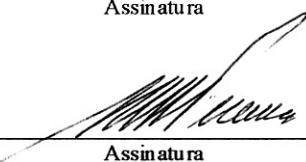
Profa. Dra. Sueli Maria Gomes

Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

Assinatura

Dr. Washington Marcondes Ferreira Neto


Assinatura

Agradecimentos

À minha orientadora, profa. Dra. Marília de Moraes Castro pelos ensinamentos, apoio e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita pela co-orientação e identificação do material botânico.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e ao Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, por terem proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da pré-banca e banca, Prof. Dr. André Olmos Simões, Profa. Dra. Renata Maria S. Alves Maira, Dr. Washington Marcondes-Ferreira Neto e Dra. Maria Carolina Scatolin Rios, pelas sugestões para melhorar a tese.

Ao Sebastião Henrique Militão, técnico do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela colaboração e disposição em atender todas as minhas solicitações.

Aos colegas de laboratório pelo agradável convívio.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em especial ao Pró-Reitor, Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pelo incentivo e apoio para conclusão da tese.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo durante toda minha formação profissional e principalmente durante o doutorado.

À minha esposa Alessandra, pelo amor e dedicação, pela luta e apoio nos momentos mais difíceis, pela superação de todos os obstáculos.

Índice

Resumo	1
Abstract	3
Introdução Geral	5
Estruturas secretoras em Apocynaceae.....	5
Estrutura floral.....	8
Justificativa do trabalho	9
Objetivos	10
Objetivos específicos	10
Estrutura da Tese.....	11
Capítulo I	13
Ontogênese e histoquímica dos coléteres foliares e calicinais de <i>Odontadenia lutea</i> (Vell.)	
Markgr. (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae)	13
Introdução.....	13
Material e métodos	14
Resultados.....	17
Coléteres vegetativos	17
Coléteres calicinais.....	19
Histoquímica dos coléteres calicinais	20
Discussão.....	41
Referências bibliográficas	46
Capítulo II	51
Distribuição e estrutura dos coléteres foliares e calicinais de <i>Temnadenia violacea</i> (Vell.)	
Miers (Apocynaceae – Apocynoideae – Echiteae)	51
Introdução.....	51
Material e métodos	52
Resultados.....	54
Coléteres foliares.....	54
Coléteres calicinais.....	56
Discussão.....	65
Referências bibliográficas	70
Capítulo III	75
Glândulas em órgãos vegetativos e florais de <i>Secondatia densiflora</i> A.DC. (Apocynaceae – Apocynoideae - Odontadenieae)	75
Introdução.....	75
Material e métodos	76
Resultados.....	79
Discussão.....	91
Idioblastos.....	91
Laticíferos.....	92
Coléteres.....	94
Nectários	95
Referências Bibliográficas	97
Capítulo IV	103
Ginostégio de três espécies de Apocynaceae do cerrado.....	103

Introdução.....	103
Material e Métodos	104
Resultados.....	107
Discussão.....	122
Referências bibliográficas	125
Discussão e Considerações Finais	129
Referências bibliográficas	135

Resumo

No Brasil, Apocynaceae está representada por 90 gêneros e cerca de 850 espécies distribuídas em diversas formações vegetais, incluindo o cerrado. Esta família destaca-se por ter grande importância econômica ou medicinal, característica relacionada à presença de vários tipos de estruturas secretoras em suas espécies. Vinculado ao projeto temático BIOTA/FAPESP (proc. nº 00/12469-3) que estudou a morfologia, anatomia, histoquímica e ultra-estrutura de plantas do cerrado do estado de São Paulo, este estudo elegeu *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr., *Secondatia densiflora* A.DC. e *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers com o propósito de efetuar um levantamento de tipos de estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos.

Os coléteres ocorrem nos ápices vegetativos e reprodutivos das três espécies estudadas. Coléteres foliares ocupam posição peciolar, interpeciolar e intraestipular; vascularização ocorre no coléter axilar de *O. lutea* e no coléter marginal distal interpeciolar de *T. violacea*. Tipos inéditos de coléteres – laminar tripartido e assimétrico – são relatados para os botões florais de *O. lutea*. A secreção produzida pela epiderme em paliçada do coléter calicinal de *O. lutea* é heterogênea, sendo sintetizada mucilagem em uma primeira fase e compostos fenólicos em etapa posterior.

Idioblastos secretores são estruturas comuns nos órgãos vegetativos e florais de *O. lutea* e *S. densiflora*, estando ausentes em *T. violacea*, sendo encontrados no parênquima fundamental e associados ao floema. No caule secundário de *S. densiflora*, ocorre uma hipoderme secretora com secreção de aspecto denso semelhante ao dos idioblastos. Os

laticíferos são do tipo anastomosado, sendo observados em todos os órgãos estudados. Eles têm diâmetro variável e sua parede é geralmente mais espessa que as das células parenquimáticas. A secreção do laticífero tem aspecto denso, sendo corada pela safranina.

Em *S. densiflora*, os nectários florais têm origem receptacular, são unidos na base e livres na região apical constituindo cinco unidades. O nectário é composto por epiderme coberta por fina cutícula, parênquima nectarífero e feixes vasculares. Na região terminal, os estômatos liberam o néctar para o meio externo.

Nas três espécies estudadas, o ginostégio apresenta diferenças morfológicas. Não foi observada adnação entre a cabeça do estilete e conectivo expandido em *S. densiflora*. *O. lutea* e *T. violacea* ocorre adnação da epiderme em paliçada do conectivo com a epiderme em paliçada do anel parenquimático da cabeça do estilete. As estruturas secretoras das três espécies em estudo mostram ser relevantes à taxonomia e podem auxiliar na delimitação de tribos da subfamília Apocynoideae.

Abstract

Apocynaceae is represented in Brazil by 90 genera and approximately 850 species distributed among diverse vegetation formations, including the *cerrado*. This family has significant economic and medicinal importance that is related to the presence of different types of secretory structures (glands) among their species. The present study, linked to the thematic project BIOTA/FAPESP entitled “Morphology, anatomy, histochemistry, and ultrastructure of *cerrado* vegetation in the state of São Paulo, Brazil” (proc nº 00/12469-3), focuses on a survey of the glands found in vegetative and floral organs of *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr., *Secondatia densiflora* A.DC., and *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers.

The colleters are located on the vegetative and floral apices of the three species studied. Foliar colleters are found on the petiole, as well as the interpetiolar and intra-stipular regions; vascularization is observed in the axial colleter of *O. lutea* and in the marginal distal interpetiolar colleter of *T. violacea*. New types of colleters – laminar tripartite and asymmetrical – are observed on the floral buds of *O. lutea*. The palisade epidermis of the calycine colleter of *O. lutea* produces a heterogeneous secretion, composed of mucilage and phenolic compounds. The mucilage is synthesized in a primary phase and the phenolic compounds are produced in a second phase.

Secretory idioblasts are common structures in vegetative and floral organs of *O. lutea* and *S. densiflora*, but absent in *T. violacea*. These idioblasts are found in fundamental parenchyma and associated with phloem. In secondary stem of *S. densiflora*, a secretory hypodermis remains as a continuous layer, which is interrupted only by stomatal complex regions, and the secretory cells are filled with dense material. The

lactiferous are of the anastomose type, and are observed in all organs studied. They have variable diameters and their walls are generally thicker than those of the parenchyma cells. The secretion of the lactiferous is dense and stains with Safranin.

The floral nectaries of *S. densiflora* originate from the receptacle and are united at the base but free in the apical region, forming five units. The nectary is composed of nectariferous epidermis, nectariferous parenchyma and vascular bundles. The nectar is liberated through stomata found on the terminal region of the nectaries.

The gynostegium of the three species studied are morphologically different. Adnation between the style head and the expanded connective is only observed in *O. lutea* and *T. violacea*. The secretory structures of the three species examined are taxonomically relevant, and might aid the delimitation of the subfamily Apocynoideae tribes.

Introdução Geral

A família Apocynaceae foi descrita por Jussieu em 1789, então denominada Apocynae, na qual estava incluída a família Asclepiadaceae (Endress & Bruyns 2000). Posteriormente, Brown (1810 *apud* Endress & Bruyns 2000) diferenciou Asclepiadaceae de Apocynaceae. A principal característica utilizada para justificar a separação destas taxa foi a presença de polinário e polínias nas espécies de Asclepiadaceae e sua ausência em Apocynaceae.

Estudos recentes, envolvendo dados morfológicos e moleculares, confirmam que a separação desses taxa não reflete um arranjo natural (Judd *et al.* 1999). Desta forma, Endress & Bruyns (2000) propuseram a inclusão de Asclepiadaceae em Apocynaceae e Apocynaceae s.l. passou a ser constituída por 424 gêneros distribuídos em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae.

No Brasil, Apocynaceae está representada por cerca de 90 gêneros e aproximadamente 850 espécies (Souza & Lorenzi 2005), distribuídas em diversas formações vegetais, incluindo o cerrado (Joly 1977).

Estruturas secretoras em Apocynaceae

Os representantes de Apocynaceae destacam-se por terem grande importância econômica ou medicinal devido à presença de látex, glicosídeos cardiotônicos e alcalóides (Rizzini & Mors 1976; Oliveira & Akissue 1989; Riet-Corra *et al.* 1993; Bruneton 1999). Dentre as espécies de valor medicinal, podem ser citadas *Strophanthus hispidus* que

produz glicosídeos cardiogênicos, *Catharanthus roseus* que possui alcalóides anticarcinogênicos e *Rauvolfia serpentina* cujos alcalóides tem efeito hipotensor e sedativo (Oliveira & Akissue 1989; Bruneton 1999). Espécies tóxicas e venenosas também são encontradas como, por exemplo, *Asclepias curassavica* que possui látex composto por glicosídeos digitálicos (Riet-Correa et al. 1993) e *Nerium oleander*, a popular espiirradeira (Joly 1977).

Muitas estruturas secretoras estão envolvidas na produção de diferentes compostos do metabolismo secundário nas espécies desta família, podendo ser citados: tricomas, idioblastos, laticíferos, coléteres, cavidades, epiderme da cabeça dos estiletes, nectários e osmóforos (Solereider 1908; Woodson & Moore 1938; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1883; Fallen 1986; Thomas 1991; Galleto 1997; Torres & Galleto 1998; Sennblad *et al.* 1998; Lin & Bernardello 1999). Para as Apocynaceae da flora brasileira, estas estruturas secretoras foram anatomicamente caracterizadas em cerca de 50 espécies (Appezato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Aguiar 2003; Simões 2004; Demarco 2005; Gomes 2006; Demarco *et al.* 2006; Simões *et al.* 2006, 2007; Marasca 2008; Gomes et al. 2008).

Tricomas glandulares ocorrem na base da lâmina e no pecíolo em muitos membros da Apocynaceae; já os idioblastos com conteúdo granuloso semelhante a látex estão presentes no mesofilo das folhas, formando uma camada abaixo do parênquima paliçádico, e os idioblastos taníferos nos raios medulares e medula de poucas espécies (Metcalfe & Chalk 1950).

Tanto os laticíferos não articulados (Mahlberg 1963, Yoder & Mahlberg 1976, Wilson & Mahlberg 1878, Appezato-da-Glória & Estelita 1997) quantos os articulados (Wilson &

Maxan 1987, Demarco *et al.* 2006) já foram descritos para as Apocynaceae. Eles estão presentes no caule, nas folhas e no córtex das raízes da maioria dos seus representantes; a cor do conteúdo varia de acordo com o gênero ou espécie, podendo ser esverdeada, amarela brilhante ou vermelha pálida (Metcalf & Chalk 1950).

Dentre as várias estruturas presentes em Apocynaceae, os coléteres destacam-se não só pela função, como pela importância taxonômica nos diferentes níveis hierárquicos (Woodson & Moore 1938; Thomas 1991).

Coléteres

O termo coléter tem origem no grego *kolla* e foi introduzido por Hanstein (1848 *apud* Thomas 1991) referindo-se à secreção pegajosa liberada por esta estrutura. Segundo Fahn (1979), os coléteres podem estar presentes em órgãos vegetativos ou reprodutivos, liberando uma secreção viscosa (mucilagínosa ou resinosa) que protege e lubrifica meristemas em início de desenvolvimento. A semelhança estrutural dos coléteres com outras estruturas secretoras levou pesquisadores a confundi-los com nectários extraflorais e glândulas de resina (Arekal & Ramakrishna 1980; Mohan & Inamdar 1986; Subramanian *et al.* 1989; Thomas 1991). Por este motivo, a realização de testes histoquímicos é fundamental para detectar a mucilagem na secreção e identificar a estrutura como coléter. Em levantamento realizado por Thomas (1991), os coléteres ocorrem em 41 gêneros sob a forma de emergências ou glândulas persistentes em Apocynaceae, sendo observados na margem da lâmina foliar e/ou na base do pecíolo, bráctea, bractéola e sépala.

Para as Apocynaceae da flora brasileira, alguns trabalhos têm sido realizados com essas estruturas. Dentre eles, pode-se ressaltar o de Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) que observaram o desenvolvimento, estrutura e distribuição dos coléteres foliares em

Mandevilla illustris e *M. pohliana* (Stadelm.) A.H. Gentry (= *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson; Rio *et al.* (2002) que estudaram a distribuição e anatomia dos coléteres foliares de *Prestonia coalita*; Demarco (2005) que realizou estudo ontogenético e histoquímico dos coléteres de *Blepharodon bicuspidatum*; Rio *et al.* (2005) e Rio (2006) que descreveram os coléteres foliares e florais de cinco espécies de *Forsteronia*; Simões *et al.* (2006) que estudaram os coléteres calicinais de sete espécies da tribo Mesechitae e Marasca (2008) que descreveu os coléteres foliares e bracteolares de *Rauvolfia sellowii*.

Estrutura floral

O trabalho mais abrangente envolvendo a morfologia e vascularização floral de 59 espécies de Apocynaceae foi realizado por Woodson & Moore (1938). Trabalhos posteriores efetuados por Fallen (1986), Galetto (1997), Torres & Galetto (1998), Lin & Bernardello (1999), Simões (2004), Demarco (2005), Rio (2006), Gomes (2006), Simões *et al.* (2006, 2007) e Marasca (2008) registraram a presença de epiderme secretora na cabeça do estilete, coléteres, laticíferos, nectários e osmóforos.

Fallen (1986) estudou a estrutura floral de 69 espécies de Apocynaceae *s.s.* e constatou uma variação na estrutura da cabeça do estilete destas espécies, e propôs quatro tipos com base na morfologia, histologia e complexidade funcional. No tipo um, a cabeça do estilete é morfologicamente indiferenciada e coberta por uma camada uniforme de epiderme secretora, sendo essa a forma mais simples; o tipo dois possui um anel superior de tricomas longos, um corpo cilíndrico com epiderme secretora composta por células colunares curtas e uma coroa inferior de tricomas longos; o tipo três apresenta a mesma organização do anterior mas com anteras adnatas à cabeça do estilete constituindo

o tipo mais complexo estruturalmente e o tipo quatro é semelhante ao dois pela perda secundária das estruturas que capturam o pólen na base da cabeça e do anel superior de tricomas.

Em Apocynoideae os nectários formam um anel contínuo basal ao redor do ovário, frequentemente bi ou pentalobado na porção apical (Woodson & Moore 1938) sendo caracterizado de natureza receptacular (Galletto 1997) ou apendicular (Gomes 2006; Gomes *et al.* 2008). Em *Aspidosperma quebracho-blanco*, o disco presente na base do ovário não tem atividade secretora e o néctar é produzido em nectários encontrados na superfície externa do cálice e da corola (Lin & Bernardello 1999). Os osmóforos são citados como fazendo parte da estrutura floral (Torres & Galletto 1998), sendo anatomicamente descritos apenas por Marasca (2008).

Justificativa do trabalho

As espécies contempladas neste estudo, *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr. (Odontadenieae), *Secondatia densiflora* A.DC. (Odontadenieae) e *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers (Echiteae), pertencentes a subfamília Apocynoideae estão incluídas em uma ampla pesquisa realizada por professores e alunos do Departamento de Botânica/IB da Universidade Estadual de Campinas, que tem o objetivo de estudar aspectos morfológicos e histoquímicos das estruturas secretoras de espécies de Apocynaceae. Além disso, o presente trabalho esteve vinculado ao projeto temático intitulado “Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais em plantas do cerrado (*senso lato*) do estado de São Paulo”, que pesquisou espécies representativas de cerrado pertencentes a diversas famílias de angiospermas incluindo Apocynaceae (Biota/FAPESP proc. nº 00/12469-3).

Além disso, os gêneros selecionados para esse trabalho tem já foram alvo de estudos filogenéticos que visam avaliar o seu posicionamento dentro da subfamília Apocynoideae.

Objetivos

Este estudo tem o propósito de efetuar um levantamento de tipos de estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de *Odontadenia lutea*, *Secondatia densiflora* e *Temnadenia violacea* – ocorrentes nos cerrados paulistas. As estruturas secretoras inventariadas são anatomicamente caracterizadas, visando melhor conhecer e buscando padrões estruturais nos representantes de Apocynaceae. Enfoque especial é concedido aos coléteres foliares e florais, que são investigados quanto à sua origem, estrutura, posição e histoquímica.

Objetivos específicos

- verificar a ocorrência de coléteres em órgãos vegetativos e reprodutivos de *O. lutea*, *T. violacea* e *S. densiflora*;
- descrever a estrutura e distribuição dos coléteres em órgãos vegetativos e reprodutivos de *O. lutea*, *T. violacea* e *S. densiflora*;
- descrever a ontogênese dos coléteres intraestipulares de *O. lutea*;
- caracterizar a secreção dos coléteres calicinais de *O. lutea* histoquimicamente;
- avaliar o potencial taxonômico dos coléteres e outras estruturas para Apocynaceae;

- caracterizar as estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de *S. densiflora*;
- identificar as principais classes de compostos químicos presentes nos idioblastos de *S. densiflora*;
- descrever a estrutura do ginostégio de *O. lutea*, *T. violacea* e *S. densiflora*;
- caracterizar a secreção da epiderme da cabeça do estilete de *O. lutea* e *S. densiflora*.

Estrutura da Tese

Os resultados obtidos são apresentados em quatro capítulos:

O primeiro capítulo tem como tema os coléteres vegetativos e reprodutivos de *O. lutea*. São descritos quatro tipos de coléteres vegetativos e quatro reprodutivos. Ainda nesse capítulo, é estudada a ontogenia dos coléteres intraestipulares e a histoquímica dos coléteres calicinais.

O segundo capítulo descreve os coléteres vegetativos e calicinais de *T. violaceae*. São descritos aspectos estruturais como origem, forma e posição; além da realização de testes histoquímicos para verificar a ocorrência de mucilagem na secreção.

O terceiro capítulo faz um levantamento das estruturas secretoras no ápice vegetativo e reprodutivo de *S. densiflora*. É relatada a ocorrência de coléteres vegetativos, idioblastos, laticíferos e nectários florais. Ainda nesse capítulo, testes histoquímicos são aplicados para caracterizar a natureza da secreção dos idioblastos.

O quarto capítulo descreve a estrutura do ginostégio das três espécies investigadas nesta tese. São realizados uma série de testes histoquímicos para caracterizar a secreção da epiderme da cabeça do estile.

Capítulo I

Ontogênese e histoquímica dos coléteres foliares e calicinais de *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr. (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae)

Introdução

As estruturas secretoras variam quanto a sua morfologia, posição, tipo de substâncias que secretam e função (Fahn 1979). Assim, o estudo da composição química do material secretado, associado à caracterização anatômica dessas estruturas, pode contribuir para compreensão do seu papel e da função do produto secretado para planta (Schnepf 1974). Além disso, é necessário efetuar estudos histoquímicos para analisar as principais classes químicas dos metabólitos que compõem o exsudado, uma vez que a identificação das estruturas secretoras esta baseada no tipo de substância predominante no secretado (Fahn 1979).

A semelhança estrutural dos coléteres com outras estruturas secretoras e a falta de estudos para identificar o tipo de secreção levou pesquisadores a confundir coléteres com nectários e glândulas de resina (Arekal & Ramakrisna 1980, Mohan & Inamdar 1986, Subramanian *et al.* 1989, Thomas 1991).

Os coléteres exercem uma função extremamente importante para o crescimento da planta, pois são responsáveis pela secreção que protege e lubrifica o meristema (Fahn 1979). A secreção liberada pelo coléter pode ser composta apenas por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou por uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas, inclusive terpenos (Fahn 1990). Em Apocynaceae, outras substâncias foram detectadas além da mucilagem, designadas como: resina (Subramanian *et al.* 1989), lipídios (Appezato-da-

Glória & Estelita 2000), proteínas (Thomas *et al.* 1989), mucopolissacarídeos (Dave *et al.* 1987, Thomas *et al.* 1989), compostos fenólicos (Rio *et al.* 2002, Rio 2006, Demarco 2005) e ácidos graxos (Demarco 2005). Alguns trabalhos foram realizados para descrever a ontogenia e histoquímica dos coléteres, entretanto em número reduzido. Entre eles, pode-se ressaltar aqueles realizados com espécies brasileiras: Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) descreveram o desenvolvimento, a estrutura e distribuição dos coléteres de *Mandevilla illustris* e *M. pohliana* (Stadelm.) A.H. Gentry (= *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson; Rio *et al.* (2002) caracterizaram a anatomia dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* e Simões *et al.* (2006) descreveram a anatomia dos coléteres calicinais de sete espécies de Apocynaceae.

Com o propósito de contribuir para o conhecimento dos coléteres de Apocynaceae, esse trabalho tem como objetivos descrever a ontogenia dos coléteres vegetativos e calicinais, e caracterizar a histoquímica da secreção dos coléteres calicinais de *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.

Material e métodos

O material de estudo foi coletado em duas áreas de cerrado do estado de São Paulo: Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu e Horto Botânico de Bauru. Material testemunha proveniente de quatro indivíduos foi incorporado ao Herbário UEC. São Paulo: Bauru, 10/II/2004, F. Martins (147884 UEC); São Paulo: Mogi-Guaçu, 22/II/2004, F. Martins (147886 UEC); 22/II/2004, F. Martins (147885 UEC); 22/II/2004, F. Martins (147883 UEC). Todo o material foi identificado pela Profa. Dra. Luiza Sumiko

Kinoshita da Universidade Estadual de Campinas e pelo Prof. Dr. André Olmos Simões da Universidade de São Paulo.

Ramos vegetativos com ápices caulinares, primórdios foliares, inflorescências portadoras de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e flores em antese foram coletados. O material foi fixado em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940); FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Lillie 1948 *in* Clark 1973) e SFF (solução de sulfato ferroso, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Johansen 1940). Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois transferido para álcool etílico 70%.

As peças foram isoladas e transferidas para álcool butílico terciário 70, onde permaneceram por aproximadamente sete dias, desidratadas em série butílica e incluídas em parafina histológica (Histosec/Merck; Johansen 1940). Secções seriadas transversais e longitudinais com espessura de aproximadamente 10µm foram realizadas com uso micrótomo rotativo.

No estudo ontogenético dos coléteres, as secções foram coradas com safranina alcoólica 1,5% e azul de astra aquoso 1% (Gerlarch 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética (Permout/Fisher).

Os testes histoquímicos dos coléteres calicinais foram aplicados em cortes seriados provenientes de botões com 15mm e 30mm de comprimento: fixados em FAA quando o objetivo foi evidenciar polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos hidrossolúveis; fixados em FNT para identificação de lipídios totais e compostos fenólicos lipossolúveis; fixados em SFF para todas as classes de compostos fenólicos. Os tratamentos realizados

foram: reação PAS (pararosalina CI 42510) para polissacarídeos totais (Periodic-Acid-Schiff's reaction; McManus 1948), vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989), ácido tânico/cloreto férrico para mucilagem (Pizzolato 1977) e azul de alciano (CI 74240) para mucopolissacarídeos ácidos (Pearse 1985); reagente de lugol para amido (Johansen 1940); azul de bromofenol mercúrico (Mazia *et al.* 1953), azul brilhante de comassie (CI 42660 – Fisher 1968) e preto de amido B (CI 20470) para proteínas totais (Fisher 1968); preto de Sudão B (CI 26150) e Sudão IV (CI 26105) para lipídios totais (Pearse 1985), sulfato azul do Nilo (CI51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947), reagente de Nadi para essências e ácidos resiníferos (David & Carde 1964) e acetato de cobre/ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969); cloreto férrico (Johansen 1940) e dicromato de potássio (Gabe 1968) para compostos fenólicos e reagente de Wagner para alcalóides (Furr & Mahlberg 1981). As lâminas foram montadas com gelatina glicerizada.

O controle dos testes para substâncias lipofílicas foi realizado com solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v, High 1948). As amostras foram submetidas a essa solução por um período de 48 horas em temperatura ambiente, logo em seguida fixadas em FAA e FNT e submetidas aos mesmos tratamentos das demais peças. Os controles para os testes de substâncias hidrofílicas seguem o descrito no método.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX51 utilizando-se filme Kodak Pro Image 100 e as imagens digitais realizadas em microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera digital Olympus E330. As imagens provenientes de fotomicrografias foram digitalizadas no Software Adobe Photoshop 9.0. As escalas das figuras foram obtidas

através da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações. As medidas de comprimento dos coléteres foram realizadas com três ápices vegetativos e florais de cada indivíduo em câmara clara. A classificação dos coléteres esta de acordo com Lersten (1974).

Resultados

Coléteres foliares (Figuras 01-30)

Ápices vegetativos com cerca de 5mm de comprimento e aproximadamente sete nós foram utilizados nesse estudo. Os coléteres são encontrados a partir do quarto nó (figura 01), sendo a origem e o tipo semelhante para todos os nós com coléteres.

A formação dos coléteres intraestipulares e intrapeciolares é assincrônica. Os coléteres intraestipulares começam o seu desenvolvimento no quarto nó; eles são observados na face adaxial da estípula (figuras 05-12; 23-28). As células meristemáticas que iniciam a formação dos coléteres apresentam protoplasto denso corado pela safranina e núcleo bem evidente (figuras 23-28). As células da protoderme dividem-se apenas no plano anticlinal, possibilitando o crescimento do coléter em superfície e as do meristema fundamental possuem as mais variadas orientações de divisão, promovendo o crescimento em altura e diâmetro. Nessa fase, os coléteres ainda não estão secretando e as células da epiderme apresentam aspecto denso e formato retangular (figura 28). No quinto e sexto nós, o coléter está em fase secretora e as células da epiderme em paliçada estão repletas de secreção corada pela safranina. O mecanismo de liberação da secreção não foi evidenciado, entretanto não há sinais de rompimento da cutícula. A partir do sétimo nó, os

coléteres não apresentam mais secreção no interior das células epidérmicas e a secreção pode ser evidenciada no meio externo. Não há sinais necrose nos coléteres vegetativos.

Em cada nó (figuras 05-12), podem ser encontrados de 68 a 80 coléteres. Por primórdio, apenas um coléter tem origem axilar, 3-5 intrapeciolares e 12-16 intraestipulares (figuras 09-11). O número de coléteres intrapeciolares e intraestipulares pode variar em diferentes nós de um mesmo ápice e entre ápices no mesmo indivíduo.

Ocorrem quatro tipos de coléteres: padrão (figura 02), padrão bipartido, sésil (figura 03) e sésil bipartido. Eles podem ocupar posição intrapeciolar (figuras 19-22), intraestipular (figuras 13-18) ou axilar (figura 02). Todos os tipos são constituídos por um núcleo central de células parenquimáticas, o qual é revestido por epiderme secretora uniestratificada em paliçada. Cristais estão presentes no parênquima do coléter axilar (figura 04). Vascularização é observada apenas no coléter axilar do tipo padrão. O coléter bipartido bifurca-se ao atingir dois terços do seu comprimento total, dando assim origem a dois segmentos que divergem apenas nas dimensões. As células epidérmicas secretoras em paliçada têm cutícula fina, núcleo relativamente grande e citoplasma denso. No eixo parenquimático dos coléteres, os idioblastos secretores apresentam citoplasma denso fortemente corado pela safranina.

O maior coléter encontrado foi o axilar, sendo ele do tipo padrão e atingindo cerca de 800µm de comprimento. Os coléteres intrapeciolares e intraestipulares do tipo bipartidos e padrão atingem no máximo 420µm.

Os testes realizados com vermelho de rutênio (figura 29) e ácido tânico/cloreto férrico (figura 30) evidenciam mucilagem no interior das células da epiderme em paliçada.

Coléteres calicinais (Figuras 31-79)

A descrição e as ilustrações dos coléteres calicinais foram realizadas a partir de botões florais com 15mm e 30mm de comprimento.

Os coléteres têm origem na base do cálice (figura 31). Em *O. lutea*, o cálice é formado por cinco peças desiguais, duas peças externas, duas internas e uma imbricada, caracterizando prefloração quincuncial sinistrorsa. Os coléteres ocorrem nas margens das sépalas internas e apenas um coléter na porção interna da peça imbricada. Devido à posição marginal, os coléteres podem ser considerados alternissépalos (figura 32).

No cálice, quatro tipos de coléteres são observados, três tipos ocorrem nas peças internas e um na porção interna da sépala imbricada. Na porção mais marginal da sépala interna, surge um coléter de dimensões reduzidas do tipo sésil (figuras 32; 37-40; 65). Após o aparecimento do primeiro, surge outro coléter sésil posicionado entre o primeiro e a própria sépala, dando a impressão de que o mesmo está situado internamente a esta peça (figuras 32; 41-45). O segundo coléter apresenta morfologia semelhante ao primeiro, entretanto possui dimensões maiores (figura 65).

Por último, forma-se o coléter laminar tripartido sésil. A primeira parte a se formar esta localizada entre o segundo coléter e o tubo da corola (figuras 32-33; 43). Ao atingir a metade do seu comprimento, ele bifurca (figuras 34; 46) e se divide novamente ao se aproximar do terço apical (figuras 35-36; 48-49). Todas as bifurcações são desiguais, sempre originando seguimentos de tamanhos distintos (figuras 69-71).

O quarto tipo de coléter ocorre na porção interna da sépala imbricada. Assim como o coléter anterior, este não apresenta uma formação homogênea, sendo considerado assimétrico. A porção do coléter mais próxima à margem da sépala forma-se primeiro (figuras 50-53; 68) e representa um terço do tamanho da estrutura. A porção menor, que

se diferencia primeiro, separa-se da porção maior do coléter, formando uma bifurcação (figuras 54-58). Ao atingir a metade do comprimento total, a porção maior bifurca-se novamente (figuras 59-60) e próximo do terço apical do coléter ocorre mais uma divisão desigual (figuras 61-64).

Todos os coléteres calicinais são formados por um núcleo de células parenquimáticas revestido pela epiderme secretora uniestratificada em paliçada e recoberto por cutícula (figura 75). As células secretoras possuem parede fina, núcleo evidente e citoplasma denso. O tecido vascular está presente apenas nos coléteres laminares (figura 66-67).

Histoquímica dos coléteres calicinais

Os testes histoquímicos demonstram que não ocorre o rompimento da cutícula no processo de eliminação da secreção (figuras 74, 77). É possível também verificar que não ocorre a distensão da cutícula, ficando a secreção provavelmente acumulada no espaço localizado entre a parede periclinal externa e o protoplasto (figuras 74-77). A secreção é evidenciada no interior das células epidérmicas secretoras no coléter de botões de 15mm (figura 72) e no meio externo no coléter de botões de 30mm (figura 73) de comprimento.

Os resultados obtidos nos testes para detecção de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis estão apresentados na tabela I. A mucilagem é evidenciada pela reação PAS (figura 74), pelo ácido tânico/cloreto férrico (figura 75) e vermelho de rutênio (figura 76) em botões com 15mm e 30mm. A mucilagem é menos evidenciada nos botões mais desenvolvidos, indicando que ocorre diminuição ou até mesmo o término da fase secretora

de mucilagem. Compostos fenólicos são evidenciados pelo cloreto férrico e dicromato de potássio (figuras 78-79) apenas nos coléteres de botões com 30mm de comprimento.

Os coléteres calicinais apresentam duas fases distintas de secreção, a primeira com a síntese de mucilagem e a segunda com a produção de compostos fenólicos.

Tabela 1. Resultados dos testes histoquímicos aplicados em coléteres calicinais de botões florais de *Odontadenia lutea* com 15mm e 30mm de comprimento.

Tratamentos	Substâncias a serem detectadas	Resultados	
		15mm	30mm
reação PAS	polissacarídeos totais	+++ (fig. 74)	+
ácido tânico/cloreto férrico	mucilagem	+++ (fig. 75)	+
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+++ (fig. 76)	-
azul de alcião	mucopolissacarídeos ácidos	-	-
reagente de Lugol	amido	-	-
azul brilhante de comassie	proteínas totais	-	-
azul de bromofenol mercúrico	proteínas totais	-	-
preto de amido B	proteínas totais	-	-
preto de Sudão B	lipídios totais	- (fig. 77)	+++
Sudão IV	lipídios totais	+	+
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos e neutros	-	-
Acetato de cobre/ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-
reagente de Nadi	terpenos	-	-
sulfato ferroso em formalina	compostos fenólicos totais	-	+
cloreto férrico	compostos fenólicos	-	++ (fig. 78)
dicromato de potássio	compostos fenólicos	-	++ (fig. 79)
reagente de Wagner	alcalóides	-	-

Legenda: - = negativo; + = fracamente positivo; ++ = positivo; +++ = fortemente positivo.

Legendas

Figuras 1-4. Seções longitudinais do ápice caulinar de *Odontadenia lutea*. 1. Vista geral. 2. Coléter axilar. 3. Coléteres intraestipulares. 4. Cristais no parênquima do coléter axilar. Legenda: G – gema; PF – primórdio foliar; C – caule. Escalas: 100µm (1); 50 µm (2-4).

Figuras 5-12. Seções transversais do quarto nó e entrenó do ápice vegetativo de *Odontadenia lutea*. 5-6. Primórdio foliar no quarto nó. 7-8. Região basal dos coléteres. 9-12. Região do entrenó, porção mediana e apical dos coléteres. Legenda: G – gema; PM – primórdio foliar; P – pecíolo; C – caule. Escala: 200 µm.

Figuras 13-22. Seções transversais dos coléteres intraestipulares (13-18) e intrapeciolares (19-22) de *Odontadenia lutea*. 13-14. Região basal do coléter bipartido. 15-16. Início da bifurcação. 17. Segmentos do coléter bipartido de dimensões distintas. 18. Porção apical do coléter bipartido. 19. Base o coléter intrapeciolar bipartido. 20. Início da bifurcação. 21. Segmentos do coléter bipartido intrapeciolar de dimensões distintas. 22. Porção apical dos segmentos do coléter. Escala: 100 µm.

Figuras 23-28. Ontogênese do coléter intraestipular de *Odontadenia lutea*. 23. Células meristemáticas no início da formação do coléter (cabeça de seta). 24-27. Divisões celulares no meristema fundamental e na protoderme (seta), presença dos idioblastos (*) no início da formação do coléter. 28. Coléter em fase pré-secretora. Legendas: Seta – células em divisão; Asterisco – idioblasto. Escala: 50 µm.

Figuras 29-30. Seções longitudinais dos coléteres vegetativos de *Odontadenia lutea*. 29. Coléter submetido ao tratamento com vermelho de rutênio. 30. Coléteres tratados com ácido tânico/cloreto férrico. Escalas: 200 μm .

Figuras 31-36. Seções transversais dos botões florais de *Odontadenia lutea*. 31. Coléter na porção interna da peça imbricada. 32. Base dos coléteres localizados nas peças internas do cálice; coléter com formação assimétrica. 33-34. Coléteres laminares tripartidos; primeira divisão. 35. Coléteres laminares tripartidos; segunda divisão. 36. Porção terminal dos coléteres laminares tripartidos. Legenda: Seta – divisões dos coléteres; Cabeça de seta – coléter assimétrico; CE – Cabeça do estilete; TC – tubo da corola; N – nectário; O - ovário. Escala: 100 μm .

Figuras 37-49. Seções transversais dos botões florais de *Odontadenia lutea*. 37-39. Detalhe da estrutura do coléter séssil reduzido. 40-44. Coléter séssil localizado entre a sépala e o coléter laminar. 45- 47. Primeira divisão do coléter laminar. 48-49. Segunda divisão do coléter laminar. Legendas: 1 – Primeiro coléter; 2 – Segundo coléter; S – Sépala; C – Corola. Escala: 50 μm .

Figuras 50-64. Seções transversais dos botões florais de *Odontadenia lutea*; detalhe da estrutura do coléter laminar assimétrico. 50-54. Coléter com estrutura assimétrica. 55-57. Primeira divisão do coléter. 58-61. Segunda divisão do coléter. 62-63. Terceira divisão do coléter. 64. Porção apical do coléter. Escala: 50 μm .

Figuras 65-68. Seções transversais dos botões florais de *Odontadenia lutea*. 65. Primeiro e segundo coléteres formados na peça interna do cálice. 66. Xilema no coléter laminar. 67. Coléter laminar tripartido. 68. Coléter localizado na porção interna da sépala imbricada. Escalas: 50µm (65); 100µm (66-68).

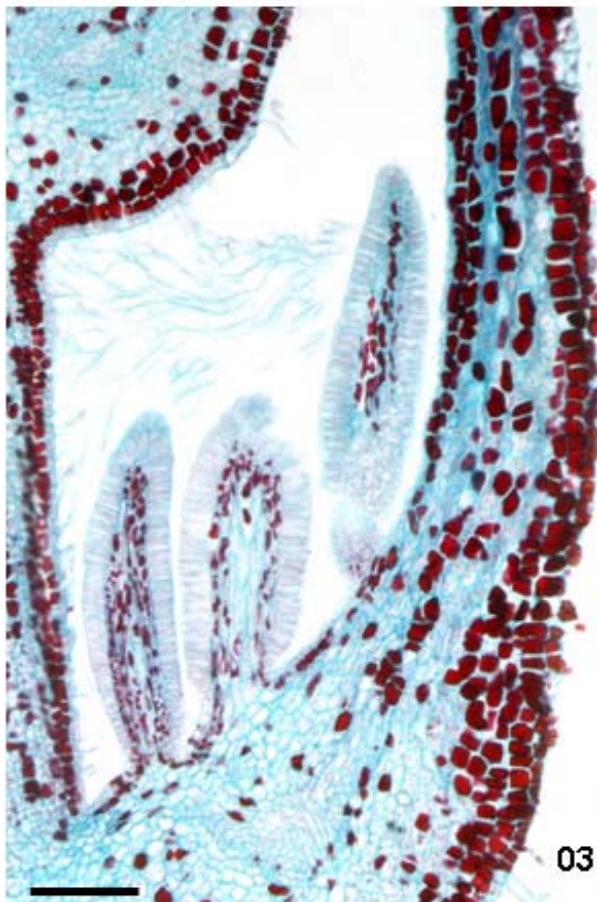
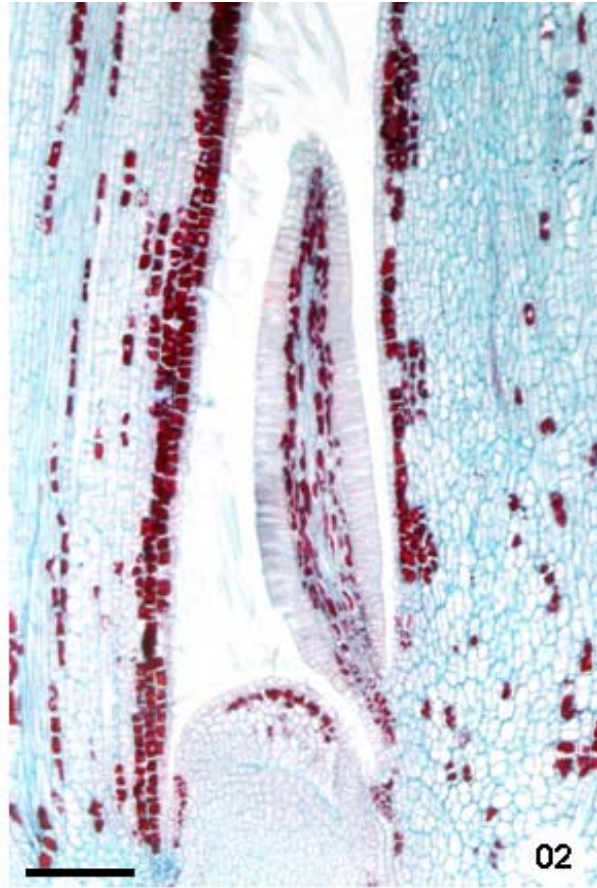
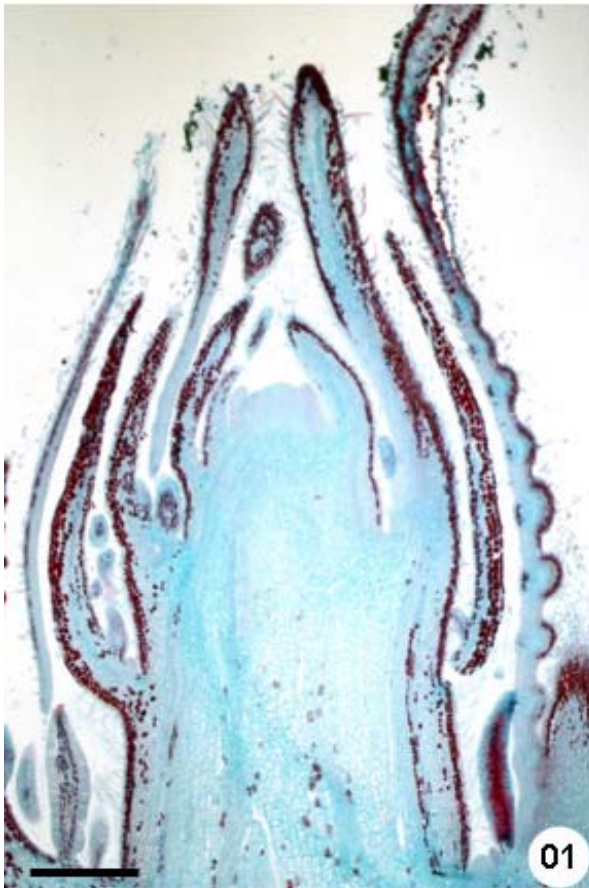
Figuras 69-71. Seções longitudinais do coléter calicinal tripartido de *Odontadenia lutea* evidenciando bifurcação do coléter. Legendas: Seta – segmento maior; Cabeça de seta – segmento menor. Escala: 100µm.

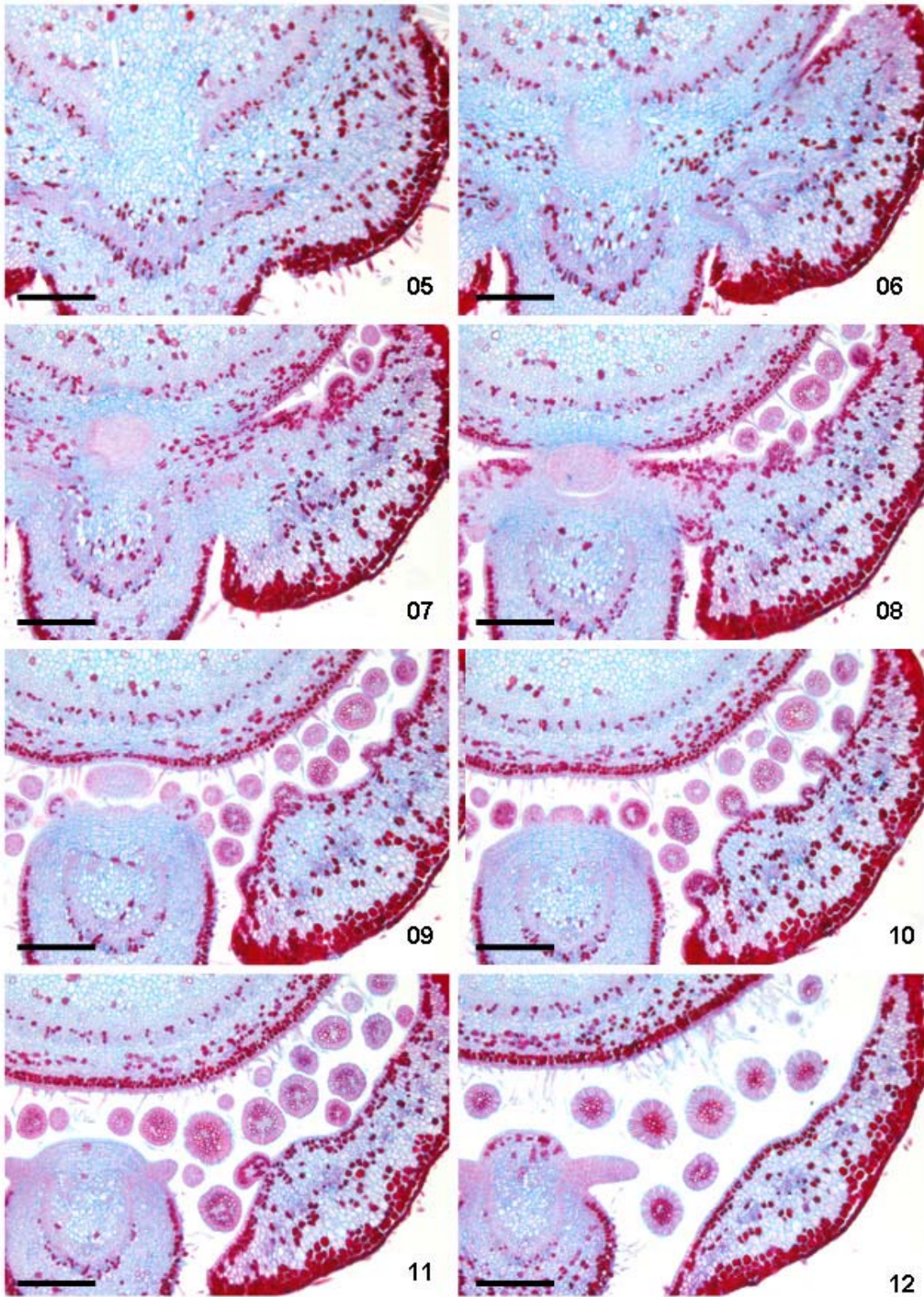
Figuras 72-73. Seções longitudinais dos coléteres calicinais de *Odontadenia lutea*. 72. Coléter no botão floral de 15mm. 73. Coléter no botão floral de 30mm, observar secreção no meio externo. Legenda: Seta – compostos fenólicos corados pela safranina; Asterisco – secreção corada pelo azul de astra. Escala: 200µm.

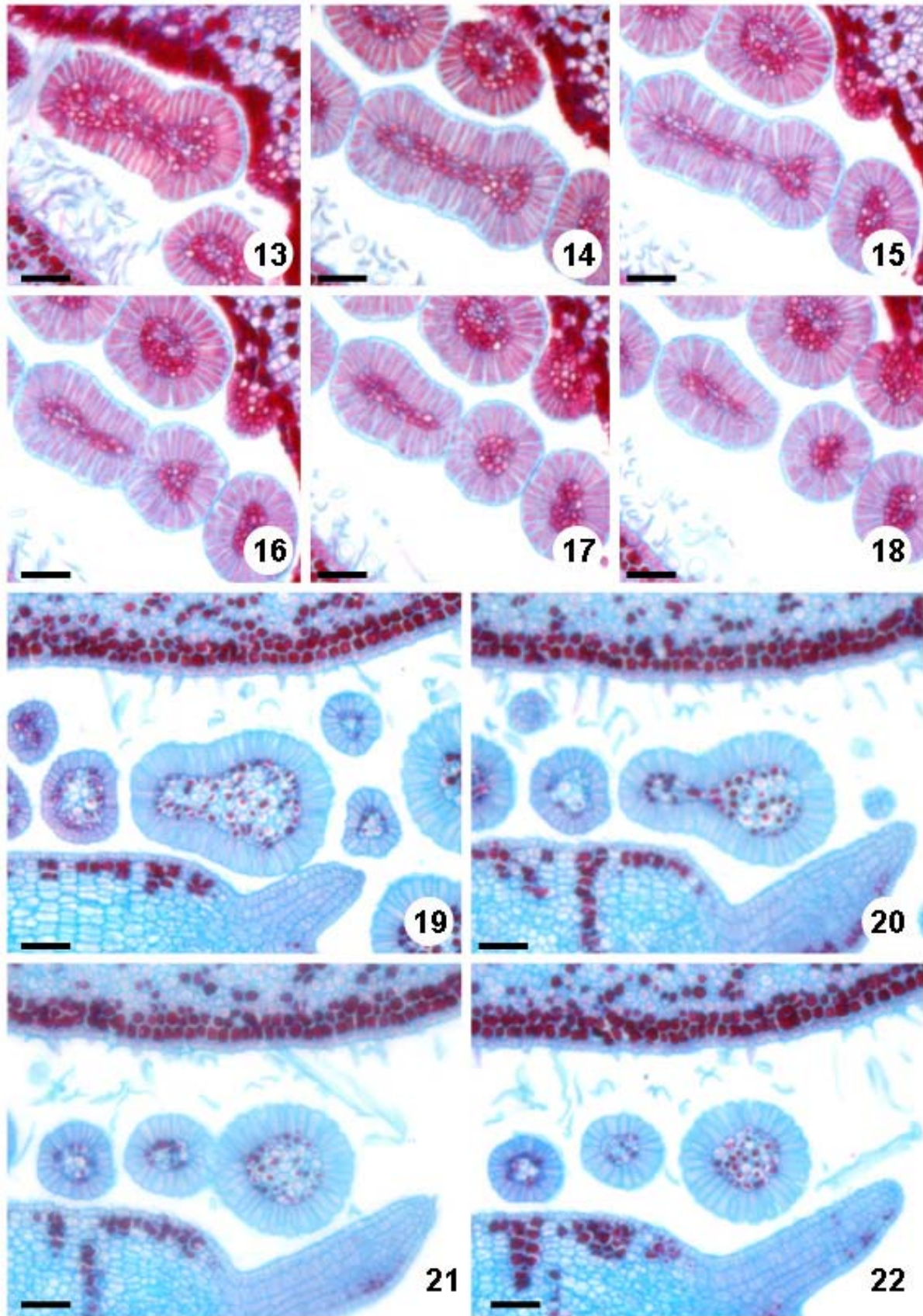
Figuras 74-75. Seções longitudinais dos coléteres calicinais de *Odontadenia lutea*. 74. Secreção evidenciada pela reação PAS. 75. Coléter tratado com ácido tânico/cloreto férrico. Escala: 200µm.

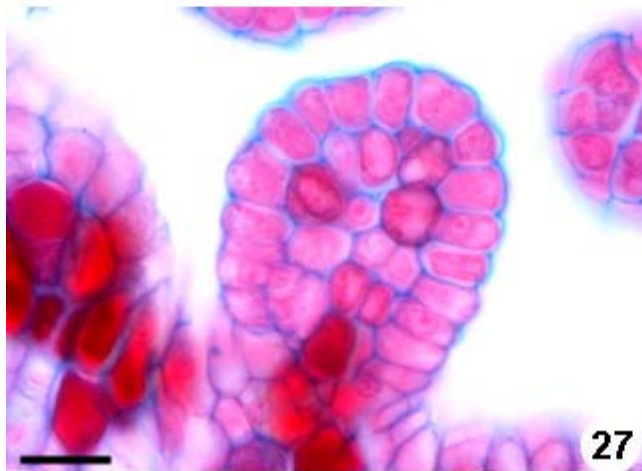
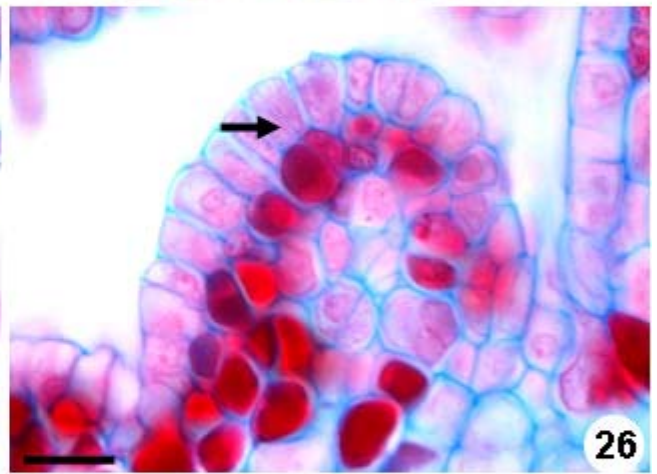
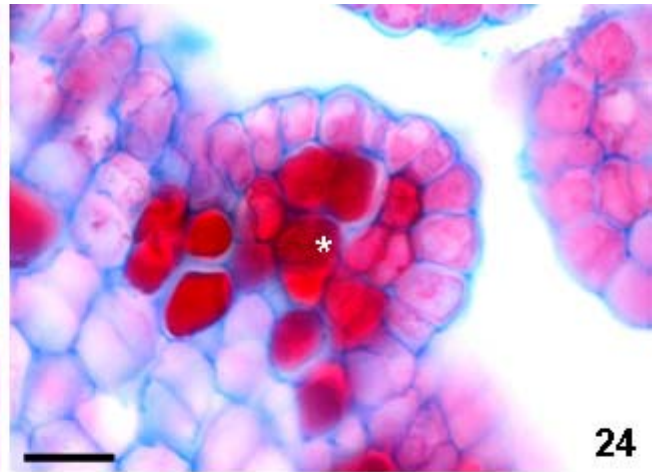
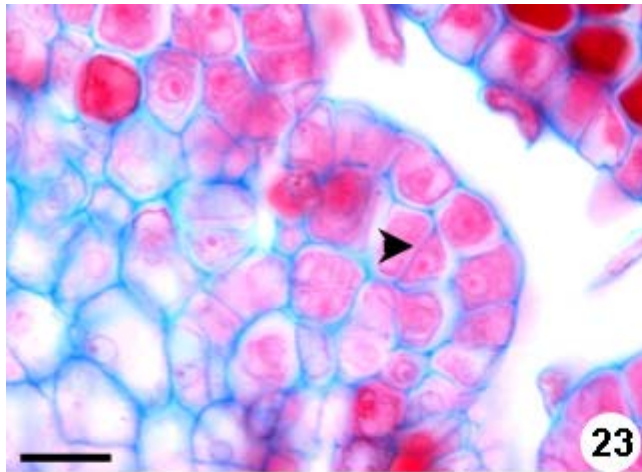
Figuras 76-77. Seções longitudinais dos coléteres calicinais de *Odontadenia lutea*. 76. Coléter submetido ao vermelho de rutênio. 77. Coléter tratado com preto de Sudão B, observar reação positiva apenas na cutícula. Escala: 200µm.

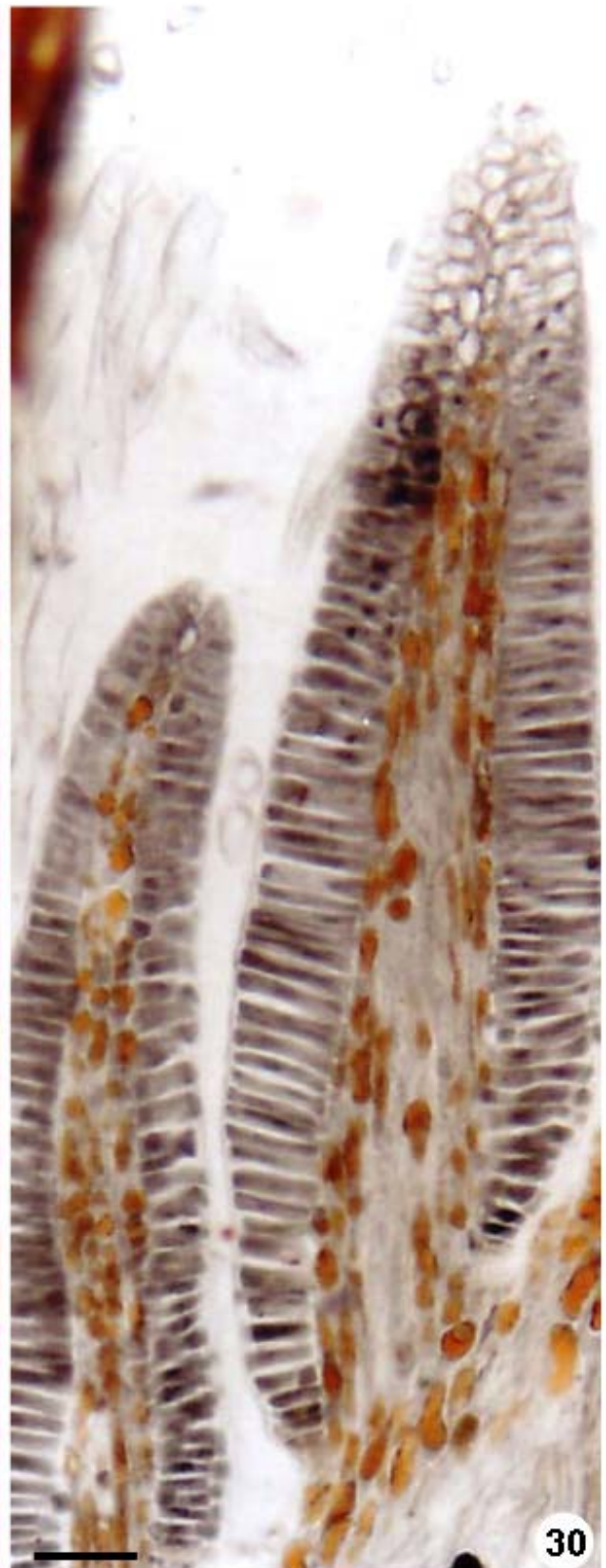
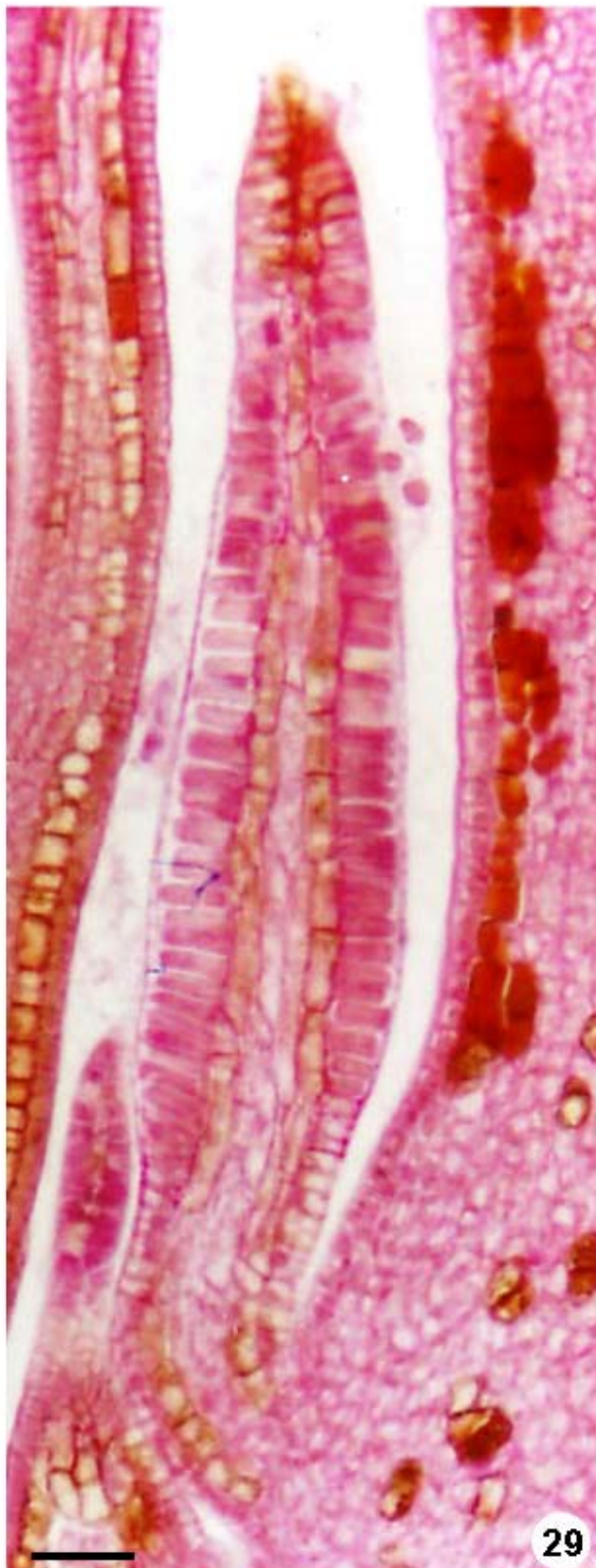
Figuras 78-79. Seções longitudinais dos coléteres calicinais de *Odontadenia lutea*. 78. Coléter submetido ao cloreto férrico. 79. Coléter tratado com dicromato de potássio. Escala: 200µm.

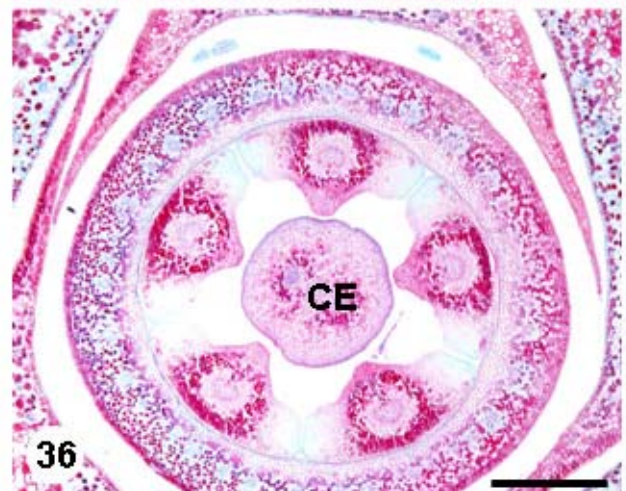
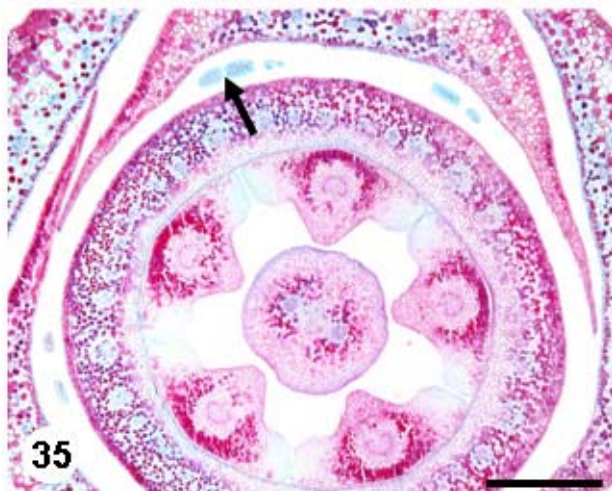
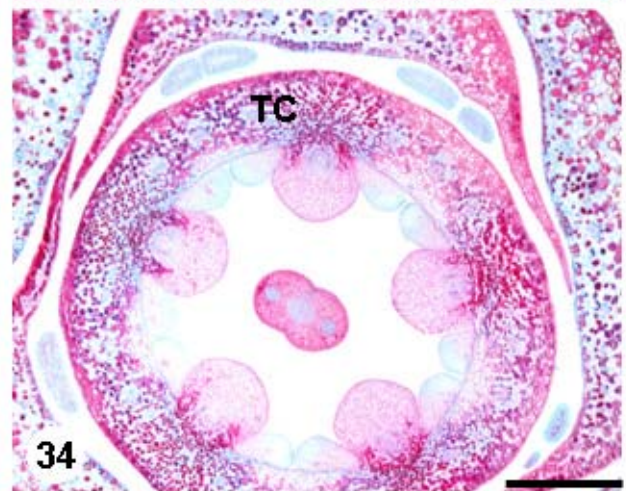
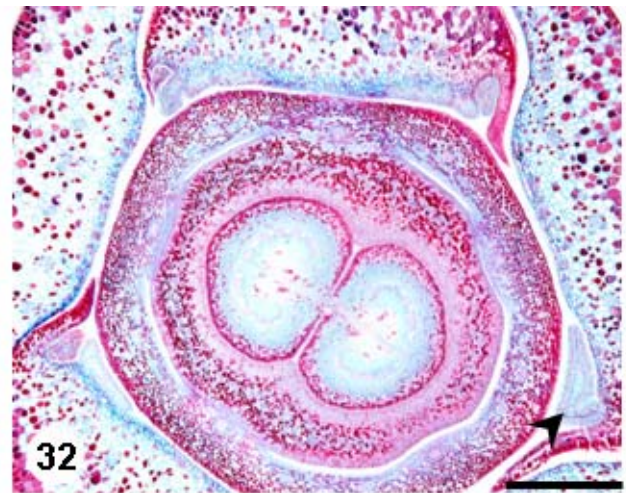
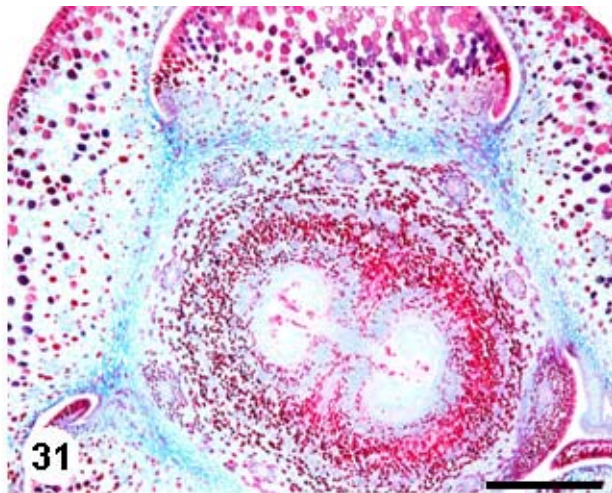


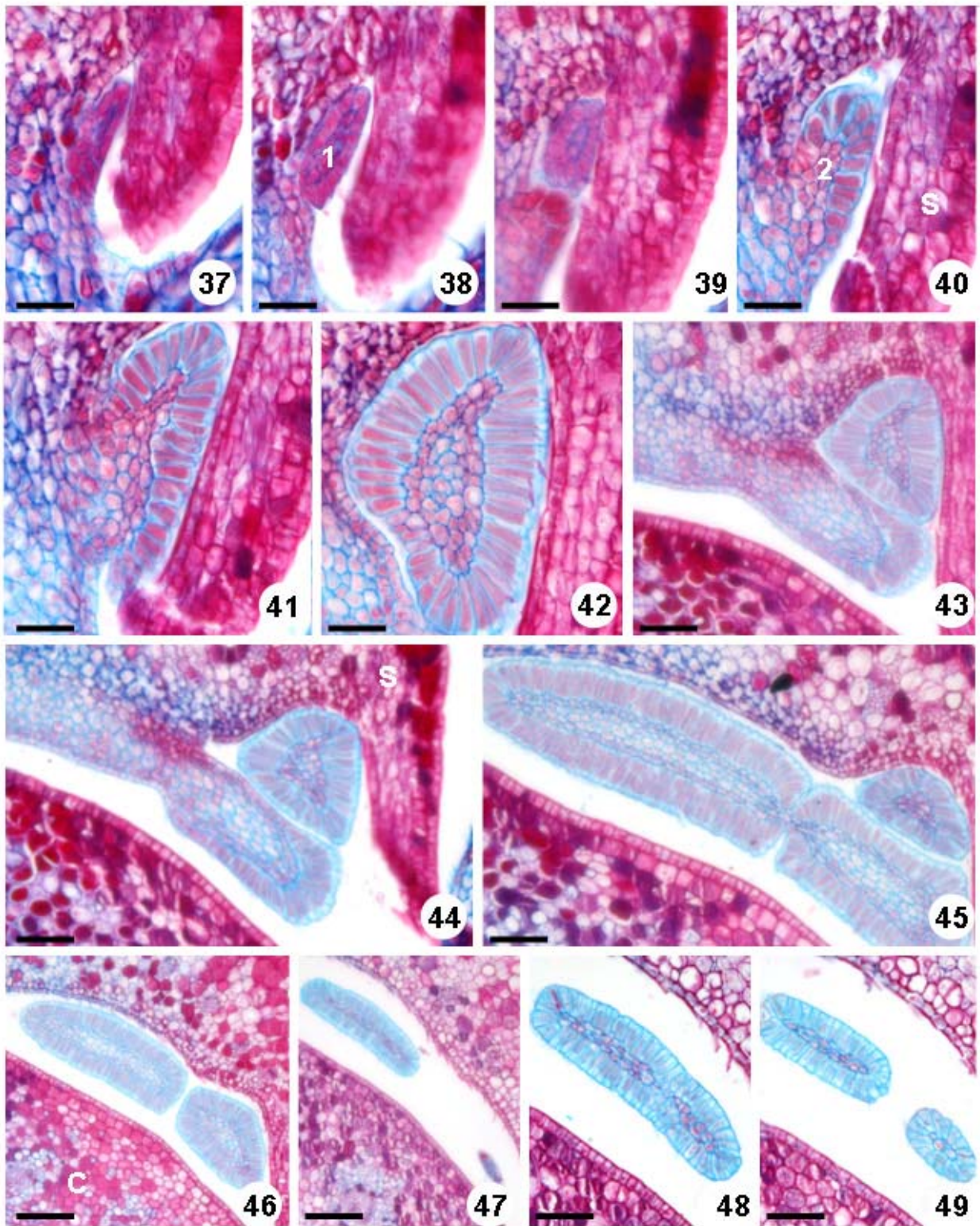


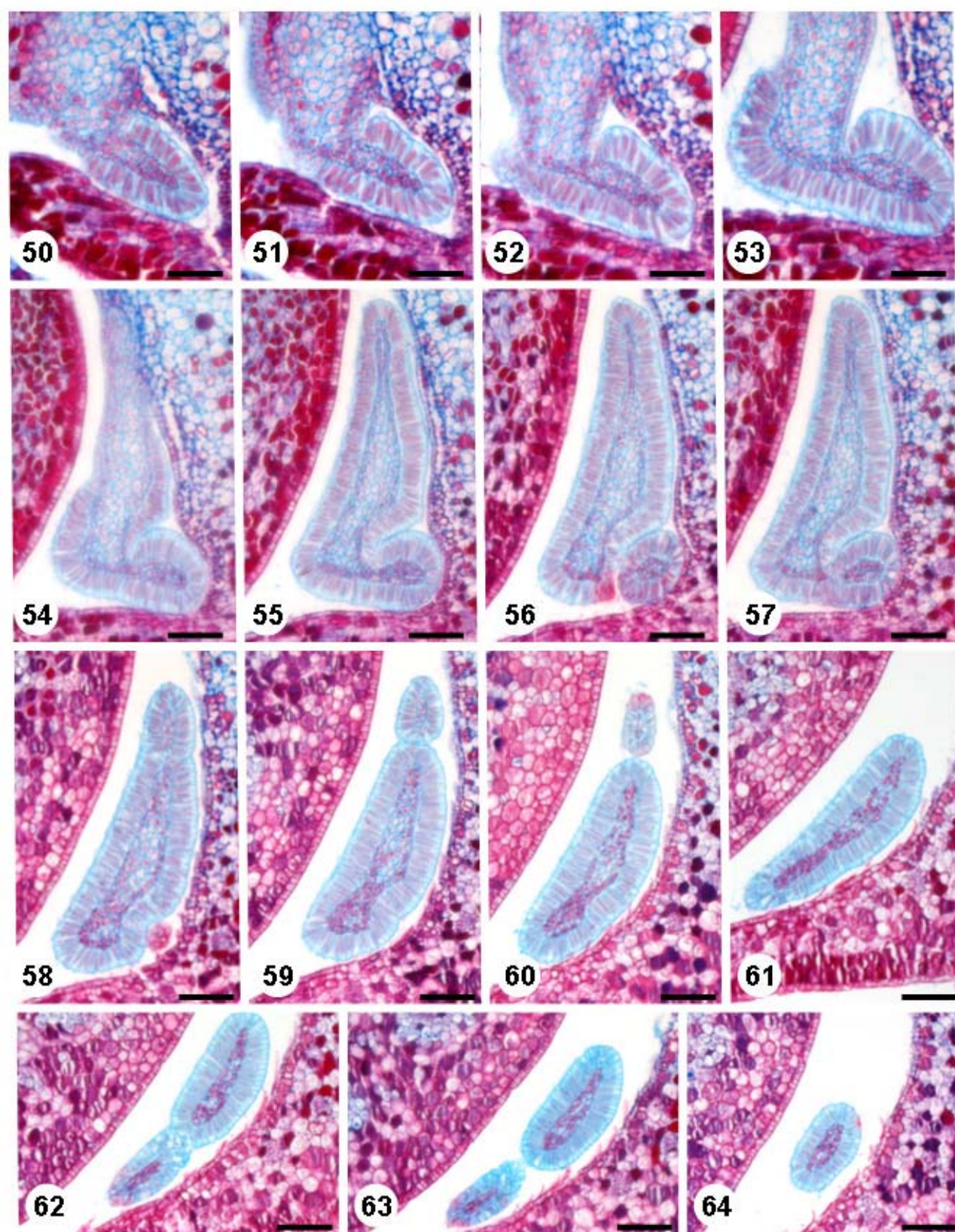


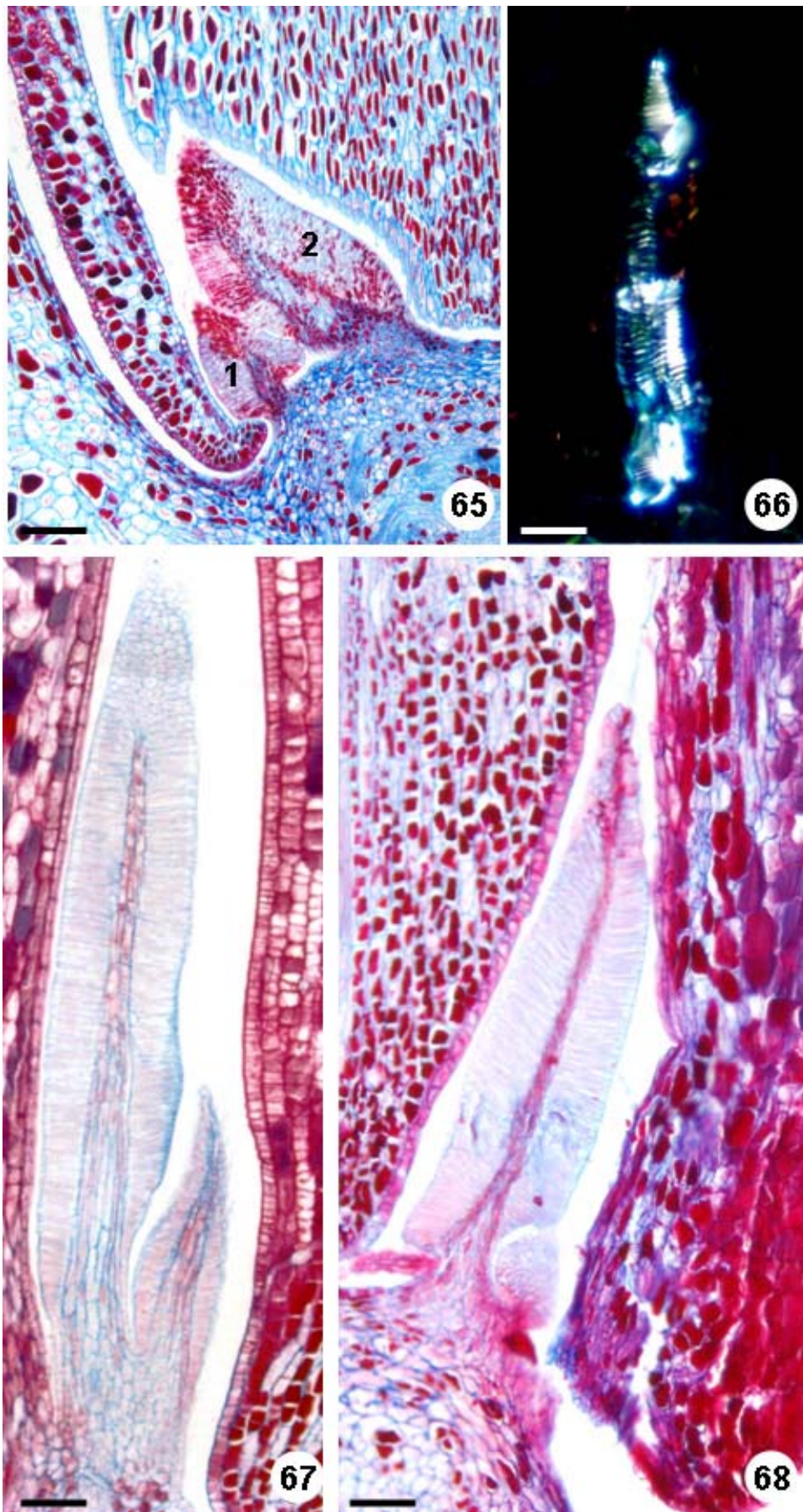


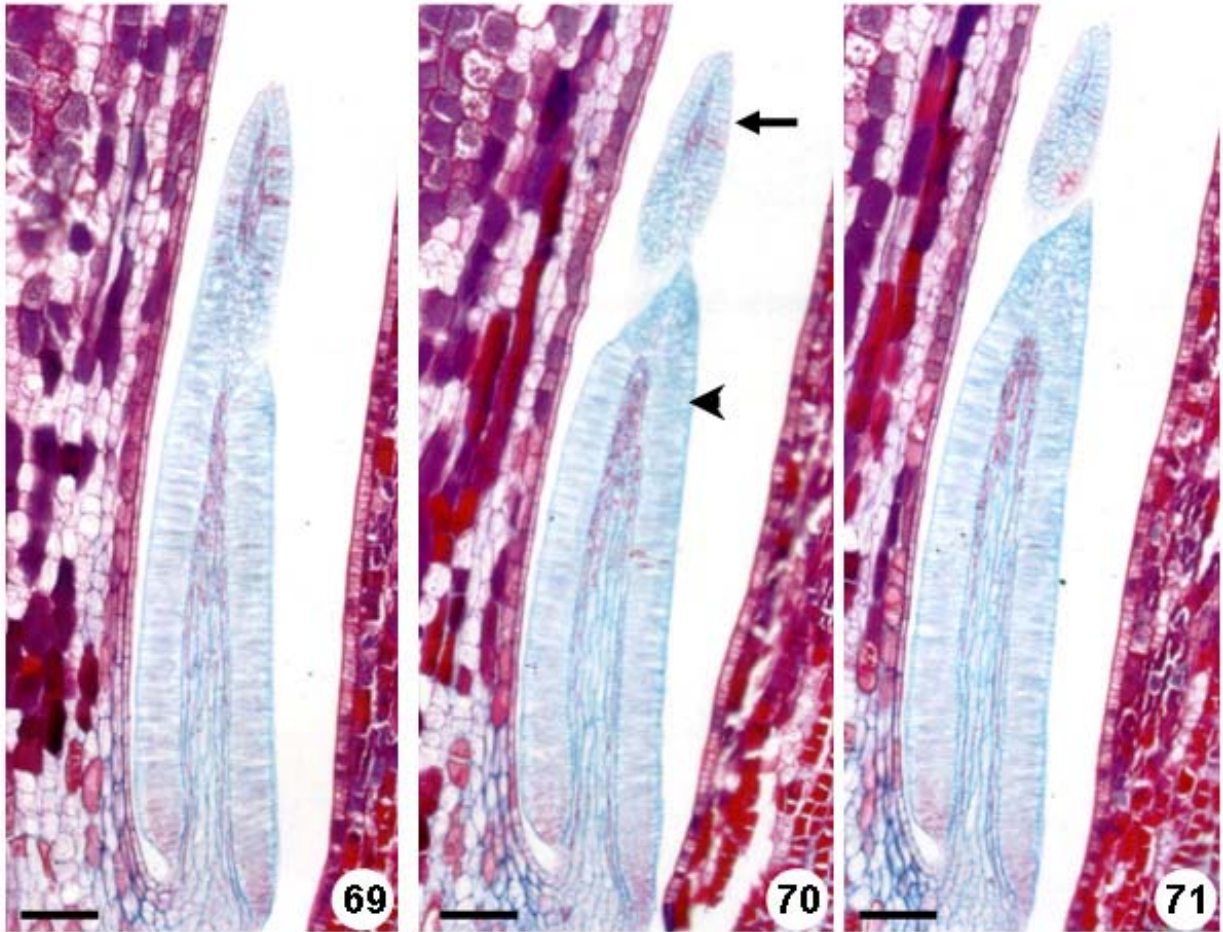


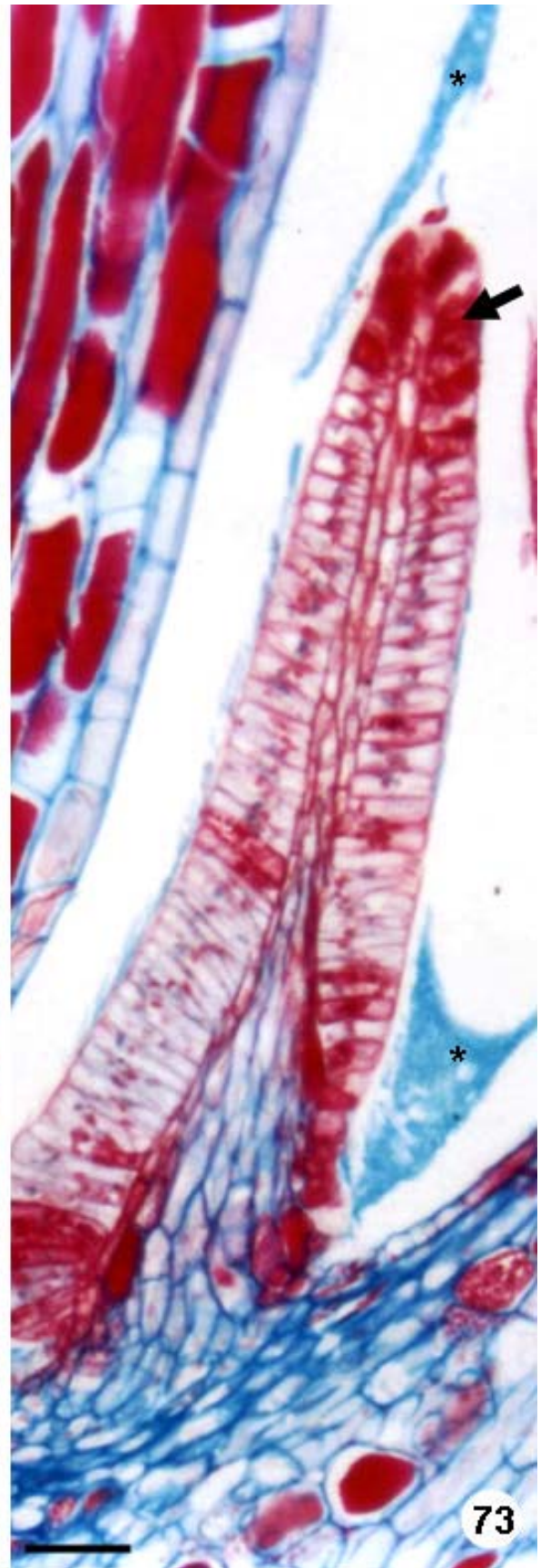
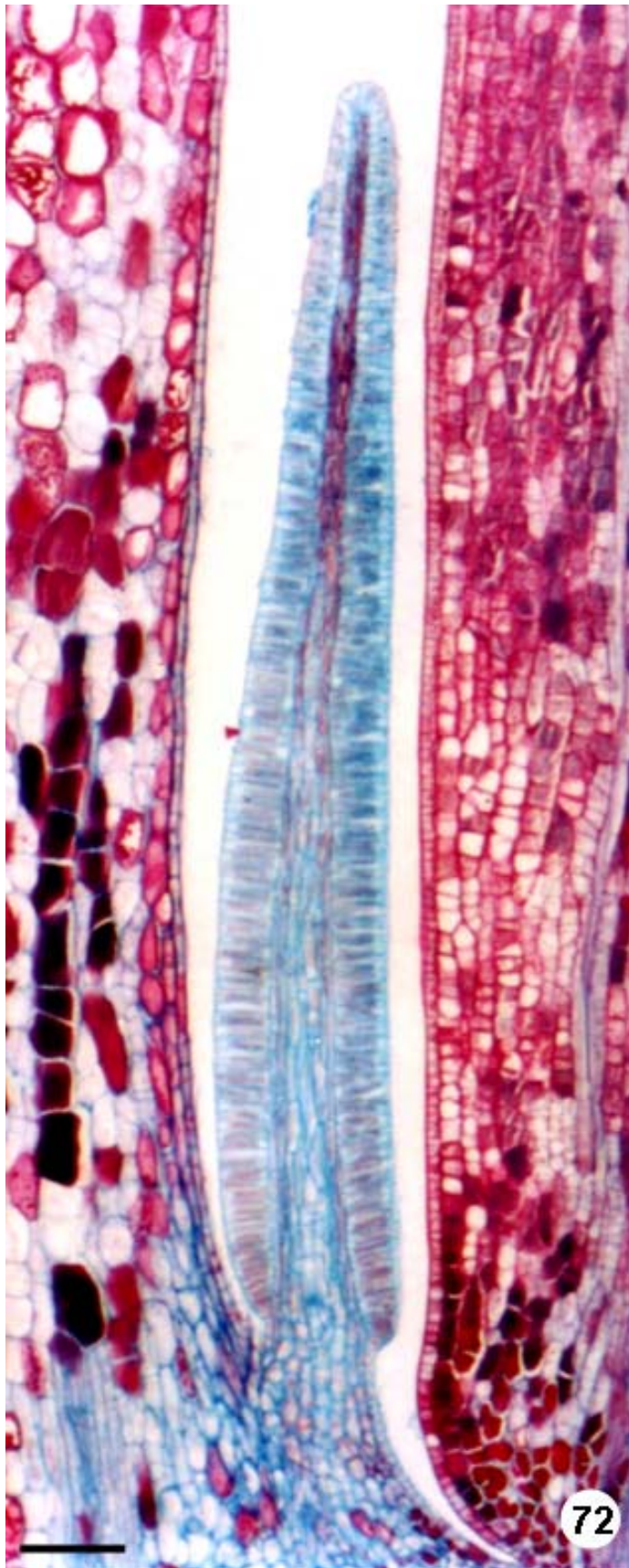








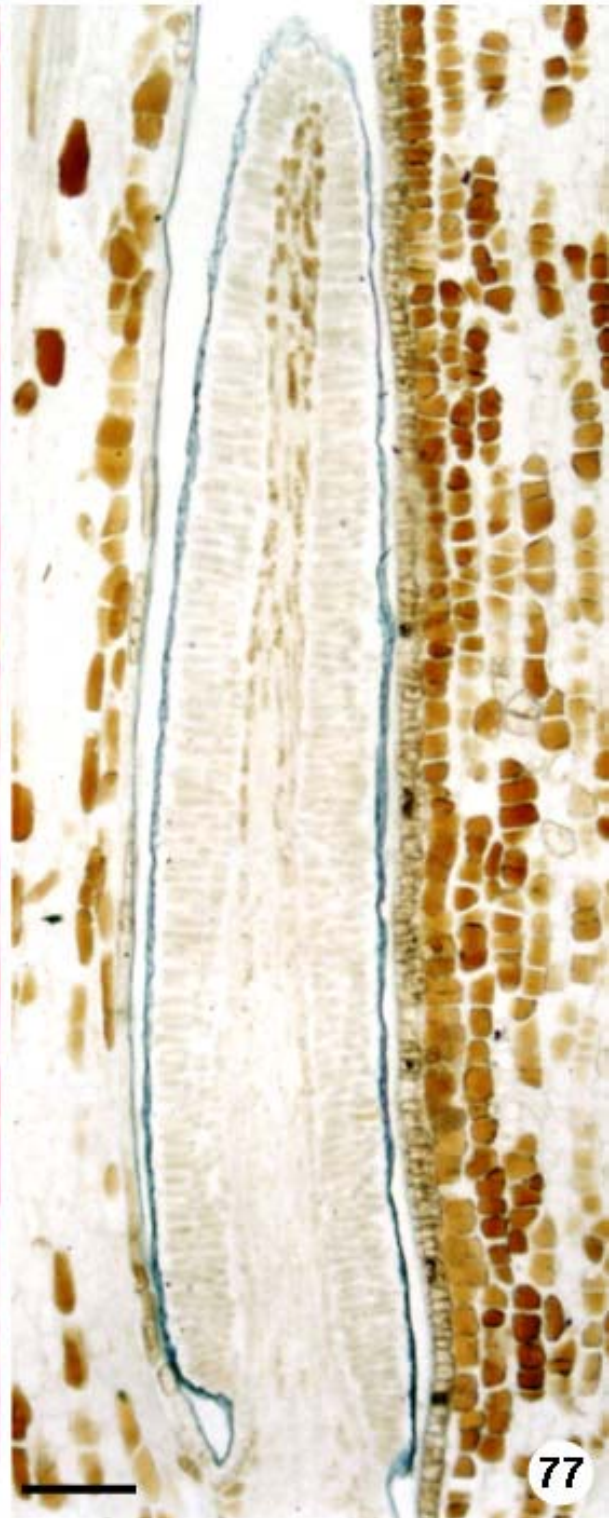








76



77



Discussão

Coléteres em órgãos vegetativos e reprodutivos são estruturas freqüentes em Apocynaceae (Thomas 1991) e foram registrados em 25 gêneros de Apocynoideae (Endress & Bruyns 2000). O gênero *Odontadenia* foi reposicionado recentemente por Livshultz *et al.* (2007) em uma nova tribo composta por cinco gêneros onde apenas *Secondatia* foi estudado anatomicamente (Simões 2004).

Odontadenia apresenta uma característica pouco comum a outros gêneros da família, que é a presença de estípulas interpeciolares. Nessa estrutura, um grande número de coléteres é observado. Em muitas espécies de Apocynaceae, os coléteres são de origem estipular como proposto por Woodson & Moore (1938) que afirmaram que os coléteres são uma categoria de estípula, inclusive com a retenção do sistema vascular; tal como ocorre em *Mandevilla illustris* e *M. pohliana* (Stadelm.) A.H. Gentry (= *M. velutina* (Mart. ex Stadelm. Woodson, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000) e *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002). Em *O. lutea*, os inúmeros coléteres se originam na face adaxial de uma estípula interpeciolar. A ocorrência destes coléteres nas estípulas ainda não tinha sido descrita em Apocynaceae e, por isso, receberam o nome de intraestipulares devido à sua localização.

Uma variação no número dos coléteres vegetativos foi observada. Essa variação ocorre com freqüência em Apocynaceae (Ramayya & Bahadur 1968, Thomas & Dave 1989a, Fjell 1983, Thomas 1991). Segundo Thomas (1991), o número dos coléteres de uma mesma espécie pode variar com a distribuição geográfica; desta forma, tal caráter não têm valor taxonômico por ser plástico. Essa grande variação é aceitável e pode ser explicada pelo elevado número de coléteres que ocorrem em um mesmo nó.

No que se refere ao tamanho dos coléteres, nota-se uma grande variação no comprimento independente de serem inter ou intraestipular. Em um amplo trabalho,

Lersten (1975) estudou mais de 296 espécies de Rubiaceae de diferentes continentes e observou consideráveis diferenças no tamanho dos coléteres de uma mesma espécie.

Característica marcante encontrada em *O. lutea* foi à ocorrência de quatro tipos de coléteres em um mesmo botão floral. Além disso, foi constatado que eles apresentam desenvolvimento assincrônico. No estudo ontogenético realizado em *Blepharodon bicuspidatum*, a ocorrência de uma iniciação assincrônica foi evidenciada nos coléteres vegetativos (Demarco 2005).

A ocorrência de coléteres em órgãos reprodutivos diferentes dos órgãos vegetativos em uma mesma espécie contraria a teoria de Woodson & Moore (1938). Segundo eles, os coléteres calicinais e foliares apresentam a mesma natureza, ou seja, são estruturas homólogas. Uma das afirmações destes autores é que a posição alternissépala dos coléteres calicinais é semelhante à daqueles dos nós vegetativos em relação ao pecíolo. Se levarmos em consideração que as estípulas de *O. lutea* tem correspondência com os coléteres calicinais, referendamos a teoria de Woodson & Moore (1938); entretanto, torna-se difícil explicar a ausência de um coléter na porção externa da sépala imbricada assim como a variação estrutural nos coléteres calicinais. É possível que a ocorrência de um coléter assimétrico esteja relacionada à fusão entre um coléter laminar tripartido e um coléter sésil reduzido.

Em várias espécies de Apocynaceae, a presença de tecido em coléteres vascular já foi observada; isto se deve em muitos casos à retenção da vascularização das estípulas, como em *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002). Coléteres vascularizados já foram evidenciados em *Wattakala volubilis* (Arekal & Ramakrishna 1980), *Aganosma caryophyllata* (Dave *et al.* 1987), *Mandevilla illustris* e *M. pohliana* (Appezato-da-Glória &

Estelita 2000). Entretanto, varias espécies de Apocynaceae não apresentam coléteres vascularizados, como em *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana*, *Vinca minor* (Fjell 1983), *Allamanda cathartica* (Thomas & Davis 1989a) e *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989). Em *O. lutea*, vascularização ocorre apenas no coléter axilar do ápice caulinar e no laminar do ápice floral. Segundo Demarco (2005), a presença de tecido vascular pode variar até mesmo dentre os diferentes tipos de coléteres encontrados no mesmo órgão. Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) observaram que os coléteres interpeciolares de *Mandevilla* possuem vascularização e os coléteres foliares podem ou não apresentar tecido vascular. Woodson & Moore (1938) consideraram a ausência de vascularização uma característica predominante nos coléteres calicinais de espécies de Apocynaceae. Assim como *O. lutea*, outras espécies da família possuem vascularização (Rao & Ganguli 1963, Dave *et al.* 1987, Thomas & Dave 1989b).

A vascularização está presente nos maiores coléteres de *O. lutea*. Para Carlquist (1969), o tecido vascular em uma estrutura é diretamente proporcional ao seu tamanho e não esta necessariamente relacionado a um estágio de desenvolvimento. Segundo Appezzato-da-Glória & Estelita (2000), a vascularização independe do tamanho do coléter sejam eles peciolares ou axilares. A presença de idioblastos parece ser um caráter comum em Apocynaceae, estando presentes em vários órgãos da mesma planta (Metcalf & Chalk 1950, 1983). Desta forma, não surpreende a presença de idioblastos nos coléteres vegetativos e calicinais dessa família, assim como ocorre em *O. lutea*. Idioblastos cristalíferos foram observados em *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989) e *Thevetia peruviana* (Fjell 1983); idioblastos taníferos em *Himatanthus* (Barros 1988), *Mandevilla*

illustris e *M. pohliana* (Appezato-da-Glória & Estelita 2000) e nos coléteres vegetativos de *Forsteronia glabrescens*, *F. pubescens*, *F. thyrsoides* (Rio *et al.* 2005).

O acúmulo de secreção no espaço periplasmático e a liberação para o meio externo através da parede e cutícula pode ser a forma de liberação da secreção, pois não ocorre distensão ou tampouco rompimento da cutícula. Essa forma de liberar o exsudado foi apontada para os coléteres vegetativos de *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005). Apenas com trabalhos de ultra-estrutura é possível ter certeza do processo de liberação da secreção pelos coléteres.

Os coléteres são estruturas que produzem uma secreção viscosa composta por mucilagem (Fahn 1979, Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979). A função de proteger os meristemas atribuída aos coléteres por Thomas (1991) pode ser justificada pela natureza da secreção. A presença da mucilagem no meristema em desenvolvimento não permite a dessecação em uma região onde a cutícula é muito fina. A presença da mucilagem foi detectada nos coléteres de *Plumeria rubra* (Mohan & Inamdar 1986), *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989), *Allamanda cathartica* (Thomas & Davis 1989a), *Mandevilla illustris* e *M. pohliana* (Appezato-da-Glória & Estelita 2000), *Prestonia coalita* (Rio 2001), *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005) e *Forsteronia glabrescens* (Rio 2006).

Entretanto, a presença da mucilagem é um atrativo a organismos oportunistas como fungos e bactérias, o que pode acarretar em danos estruturais do meristema. Em várias espécies de Rubiaceae, ocorre a infecção e inclusive processos de nodulação por bactérias em meristemas apicais (Lersten 1974, 1975) o que pode indicar uma íntima relação entre a espécie hospedeira e a nodulante, promovendo benefícios a ambos em um processo

simbiótico. Uma forma de evitar essa contaminação é o fato de ocorrer uma segunda fase secretora, com a secreção de compostos fenólicos. Segundo Harbone (1988), os compostos fenólicos podem assegurar a imunização da planta a infecção de fungos ou bactérias. A secreção de compostos fenólicos em uma segunda fase secretora foi evidenciada em *Roupelia grata* (Thomas *et al.* 1989) e *Forsteronia glabrescens* (Rio 2006). A secreção de compostos fenólicos e mucilagem ocorre de forma simultânea nos coléteres foliares e calicinais de *Blepharodon bicuspidatum* (Demarco 2005).

Referências bibliográficas

- Appezzato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23: 113-120.
- Arekal, G.D. & Ramakrishna, T.M. 1980. Extrafloral nectaries of *Caloptropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. *Phytomorphology* 30: 303-306.
- Barros, C.F. 1988. *Himatanthus lacifolius* (Muell-Arg) Woodson (Apocynaceae): Anatomia foliar. *Rodriguésia* 64/66: 25-31
- Cain, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88: 383-392.
- Carlquist, S. 1969. Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. *Phytomorphology* 19: 332-362.
- Clark, G. 1973. Staining procedures. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Dave, Y.; Thomas, V. & Kuriachem, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata*. *Pakistan Journal of Botany* 19: 243-248.
- David, R. & Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L' Academie des Sciencies (Paris), Série D* 258: 1338-1340.
- Demarco, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne (Apocynaceae s.l.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Endress, M.E. & Bruyns, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae s.l. *The Botanical Review* 66: 1-56.

- Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press Inc., London.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16:92-96.
- Fjell, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3: 383-392.
- Furr, M. & Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie, Paris.
- Ganter, P. & Jollés, G. 1969. Histologie normale et pathologique. Vols I e II. Gauthier-Villars, Paris.
- Gerlarch, D. 1969. Botanische mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgart.
- Gregory, M. & Baas, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- Harbone, J.B. 1988. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London.
- High, O.B. 1984. Lipid histochemistry. Oxford University Press, New York.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- 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.
- Lersten, N.R. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Bot. J. Linn. Soc.* 71: 311-319.

- Livshults, T.; Middleton, D.J.; Endress, M.E. & Williams, J.K. 2007. Phylogeny of Apocynoideae and the APSA Clade (Apocynaceae *s.l.*). *Ann. Miss. Bot. Garden* 94: 342-359.
- Mazia, D.; Brewer, P. A. & Alfert, M. 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuris bromophenol blue. *Biological Bulletin* 104: 57-67.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C. R. & Chalk, L. 1983. *Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction*. Clarendon Press, Oxford.
- Mohan, J.S.S. & Inamdar, J. R. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectarines of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany* 57: 389-401.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol II. Livingstone, Edinburgh.
- Pizzolato, T.D. 1977. Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid-ferric chloride. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104: 277-279.
- Pizzolato, T.D. & Lillie, R.D. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21: 56-64.
- Ramayya, N. & Bahadur, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. *Current Science* 18: 520-522.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42: 419-435.

- Rio, M.C.S. 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 *Forsteronia* G.Mey (Apocynaceae) de cerrado. 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 foliares de *Prestonia colata* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). 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.
- Schnepf, E. 1974. Gland cells. In: Dynamic aspects of plant ultrastructure (A.W. Robards ed.) MacGraw-Hill Book Co., Maidenhead.
- 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 colleter of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152: 387-398.
- Subramanian, R.B.; Murugan, V.; Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretions of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99: 423-429.

- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68: 287-305.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleter of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64: 201-203.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989b. 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 Repertorium* 102: 23-28.
- Thomas, V; Dave, Y. & Menon, A.R.S. 1989. Anatomy and hystochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8: 493-496.
- Woodson, R.E. & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-165.

Capítulo II

Distribuição e estrutura dos coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers (Apocynaceae – Apocynoideae – Echiteae)

Introdução

O termo coléter tem origem no grego *kolla* e foi introduzido por Hanstein (1848 *apud* Thomas 1991) referindo-se à secreção pegajosa liberada por essa estrutura. A secreção liberada pelo coléter pode ser composta apenas por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou por uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas, inclusive terpenos (Fahn 1990). Segundo Fahn (1979), essa estrutura pode estar presente em órgãos vegetativos e reprodutivos e tem a função de proteger e lubrificar os meristemas em início de desenvolvimento.

Os coléteres receberam diferentes denominações ao longo do tempo, dentre as quais podemos ressaltar: “squamellae” (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahudur 1968), “glandular shaggy hair” (Solender 1908, Metcalfe & Chalk 1950, 1979) e glândulas resiníferas (Subramanian *et al.* 1989). Além dessa diversidade de nomenclaturas, os coléteres também já foram confundidos com outras estruturas secretoras, tais como nectários extraflorais e glândulas de resina (Dave & Patel 1975; Mohan & Inamdar 1986). Além disso, a denominação coléter pode ser apenas atribuída mediante a realização de testes histoquímicos que assegurem a presença da mucilagem no produto secretado.

Na família Apocynaceae, os coléteres foram observados em 71 gêneros, ocorrendo na forma de emergências ou glândulas persistentes em ápices vegetativos, folhas, brácteas, bractéolas e sépalas (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968; Silva *et al.* 1975; Fjell 1983; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a, b, c, 1990, 1991, Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006, Rio *et al.* 2002, 2005; Schwarz & Furlan 2002; Simões 2004; Demarco 2005; Simões *et al.* 2006). Apesar de vários trabalhos relatarem a ocorrência dos coléteres em Apocynaceae, essas estruturas podem estar ausentes em alguns gêneros (Marcondes-Ferreira 1998, Sennblad *et al.* 1998; Demarco 2005).

Apocynaceae é uma família que não possui estípulas e segundo a teoria estipular de Woodson & Moore (1938) tanto os coléteres dos nós vegetativos quanto os calicinais pertencem à categoria de estípulas.

Nos últimos anos, apesar do número de publicações que descrevem a estrutura e distribuição dos coléteres em espécies brasileiras de Apocynaceae ter aumentado, as informações a respeito deles ainda são reduzidas. Este trabalho tem como propósito descrever a estrutura e distribuição dos coléteres vegetativos e calicinais em *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers e avaliar o potencial uso destas estruturas para taxonomia da tribo Echiteae.

Material e métodos

O material de estudo foi coletado em quatro áreas de cerrado do estado de São Paulo: Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, Estação Ecológica e

Experimental de Itirapina e Horto Botânico de Bauru. Material testemunha proveniente de 5 indivíduos foi incorporado ao Herbário UEC: BRASIL: São Paulo: Itirapina, 23/III/2003, F. Martins (147875 UEC); BRASIL: São Paulo: Itirapina, 23/III/2003, F. Martins (147874 UEC); : BRASIL: São Paulo: Mogi-Guaçu, 17/IV/2003, F. Martins (147873 UEC); BRASIL: São Paulo: Campinas, 25/IV/2003, F. Martins (147871 UEC); : BRASIL: São Paulo: Bauru, 26/VI/2003, F. Martins (147872 UEC). O material foi identificado pela Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita da Universidade Estadual de Campinas e pelo Prof. Dr. André Olmos Simões da Universidade de São Paulo.

Ramos vegetativos com ápices caulinares, primórdios foliares, folhas, inflorescências portadoras de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e flores em antese foram coletados. As amostras foram fixadas em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Lillie 1948 *in* Clark 1973). Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois transferido para álcool etílico 70%.

As peças foram isoladas e transferidas para álcool butílico terciário 70, onde permaneceram por aproximadamente sete dias, desidratadas em série butílica e incluídas em parafina histológica (Histosec/Merck; Johansen 1940). Secções seriadas transversais e longitudinais com espessura de aproximadamente 10µm foram realizadas com uso micrótomo rotativo.

Para o estudo estrutural, as secções foram coradas com safranina alcoólica 1,5% e azul de astra aquoso 1% (Gerlarch 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética (Permout/Fisher). Para evidenciar a presença da mucilagem nas secreções,

secções de material fixado em FAA foram coradas com vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) e submetidas à reação PAS (Periodic-Acid-Schiff's reaction; McManus 1948). O controle da reação PAS foi realizado pela supressão do tratamento dos cortes com ácido periódico. As lâminas foram montadas em gelatina glicerina.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX51 utilizando-se filme Kodak Pro Image 100 e as imagens digitais realizadas em microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera digital Olympus E330. As imagens provenientes de fotomicrografias foram digitalizadas no Software Adobe Photoshop 9.0. As escalas das figuras foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações. As medidas de comprimento dos coléteres foram realizadas em três ápices vegetativos e florais de cada indivíduo em câmara clara. A classificação dos coléteres está de acordo com Lersten (1974).

Resultados

Coléteres foliares (Figuras 01-14)

Os coléteres vegetativos são encontrados nos estádios iniciais do desenvolvimento no ápice caulinar vegetativo. Eles não estão presentes no primeiro nó, podendo ser observados apenas a partir do terceiro. Sendo assim, a descrição dos coléteres teve como base o terceiro nó do ápice vegetativo caulinar (figura 01), considerando o primeiro nó visível.

Em cada nó podem ser encontrados de 09 a 11 coléteres por primórdio e até 22 coléteres por nó. Por primórdio apenas um coléter tem origem axilar. Ele é o primeiro a se desenvolver e atinge até 400µm de comprimento (figuras 01 a 06).

O número de coléteres marginais varia entre indivíduos e em diferentes nós no mesmo indivíduo. Ocorrem de 09 a 10 coléteres por primórdio foliar. Esses coléteres variam de 650 a 1200µm de comprimento. Os primeiros coléteres marginais a serem formados iniciam o desenvolvimento a partir da região interna da estípula e adquirem uma posição intercalar em relação ao coléter axilar e o último coléter marginal que se forma. Os últimos coléteres marginais que se formam ficam mais distais além de serem os maiores (figuras 05 a 06).

Quanto a posição, 5 coléteres possuem localização peciolar, isto é, 1 axilar e 4 marginais; sendo os demais de posição interpeciolar (figuras 01 e 06).

Todos os coléteres são constituídos por uma porção alongada, formada por um núcleo central de células parenquimáticas rodeado por epiderme secretora uniestratificada em paliçada com fina cutícula (figuras 07 a 10). O coléter axilar e os marginais distais possuem pedúnculo curto formado por uma epiderme unisseriada não secretora com células de formato retangular, sendo classificados como tipo “standard” (figura 07). Os coléteres marginais intercalares não possuem pedúnculo, podendo ser considerados sésseis. Os marginais distais possuem na sua face abaxial apenas metade da epiderme secretora recobrimdo o parênquima (figuras 09 e 10). Nessa região podem ser observados pelos tectores unicelulares.

Outra característica presente apenas no coléter marginal distal (interpeciolar) é a presença de tecido vascular. É possível observar a manutenção do feixe vascular (xilema e floema) na região central do coléter (figura 09).

A mucilagem foi evidenciada no meio extracelular e no interior das células epidérmicas em paliçada que recobrem todos os coléteres observados (figura 10) no início do desenvolvimento dos primórdios foliares. A secreção foi observada também do primeiro ao quarto nó visível (figuras 11-14). A cutícula das células da epiderme secretora permaneceu intacta após o período secretor.

Coléteres calicinais (Figuras 15-22)

A descrição e ilustração dos coléteres foi realizada a partir de botões florais com 4mm e 30mm de comprimento. Ocorrem 3 coléteres opostos a cada uma das cinco lacínias do cálice. Os coléteres têm origem na base do cálice (figura 15) e por isso são considerados calicinais. Todos os três coléteres são sésseis, sendo apenas um deles tripartido (figuras 16 e 20). No primeiro terço do seu comprimento, o coléter fimbriado inicia o processo de ramificação, partindo-se em três partes desiguais (figura 16).

Os coléteres estão constituídos por um núcleo central de células parenquimáticas revestido por epiderme secretora uniestratificada formada por células em paliçada e recoberta por fina cutícula em toda a sua extensão (figura 21). Não foi observada a presença de tecido vascular. A epiderme secretora em paliçada do coléter possui células com parede fina, núcleo evidente e citoplasma denso. Na porção basal, a epiderme apresenta células menores, mas com as mesmas características de uma célula secretora (figura 21). O comprimento do coléter no botão floral de 30mm variou entre 720µm e

840 μ m. Esse coléter não apresenta vascularização e foram observados laticíferos de pequeno calibre no parênquima.

A mucilagem foi evidenciada nos coléteres calicinais tanto no interior das células epidérmicas em paliçada (figura 21) quanto no meio extracelular. Nos botões com menos de 4mm, coléteres não apresentam atividade secretora evidente. Naqueles presentes em botões com mais de 4mm a secreção está contida no interior das células epidérmicas, enquanto nos botões com mais de 35mm, os coléteres possuem epiderme secretora com aspecto senescente e muitas células já apresentam a parede celular rompida (figura 22).

Legendas

Figuras 1-6. Secções transversais do primórdio foliar do terceiro nó vegetativo de *Temnadenia violacea*. 1. Início da formação do coléter axilar (asterisco). 2. Coléter formado a partir da região interna da estípula (seta). 3-5. Coléteres marginais de posição peciolar. 6. Coléteres marginais de posição peciolar e interpeciolar. Legendas: Ca – caule; G – gema; MP – coléter marginal de posição peciolar; MI – coléter marginal de posição interpeciolar. Escala: 85µm.

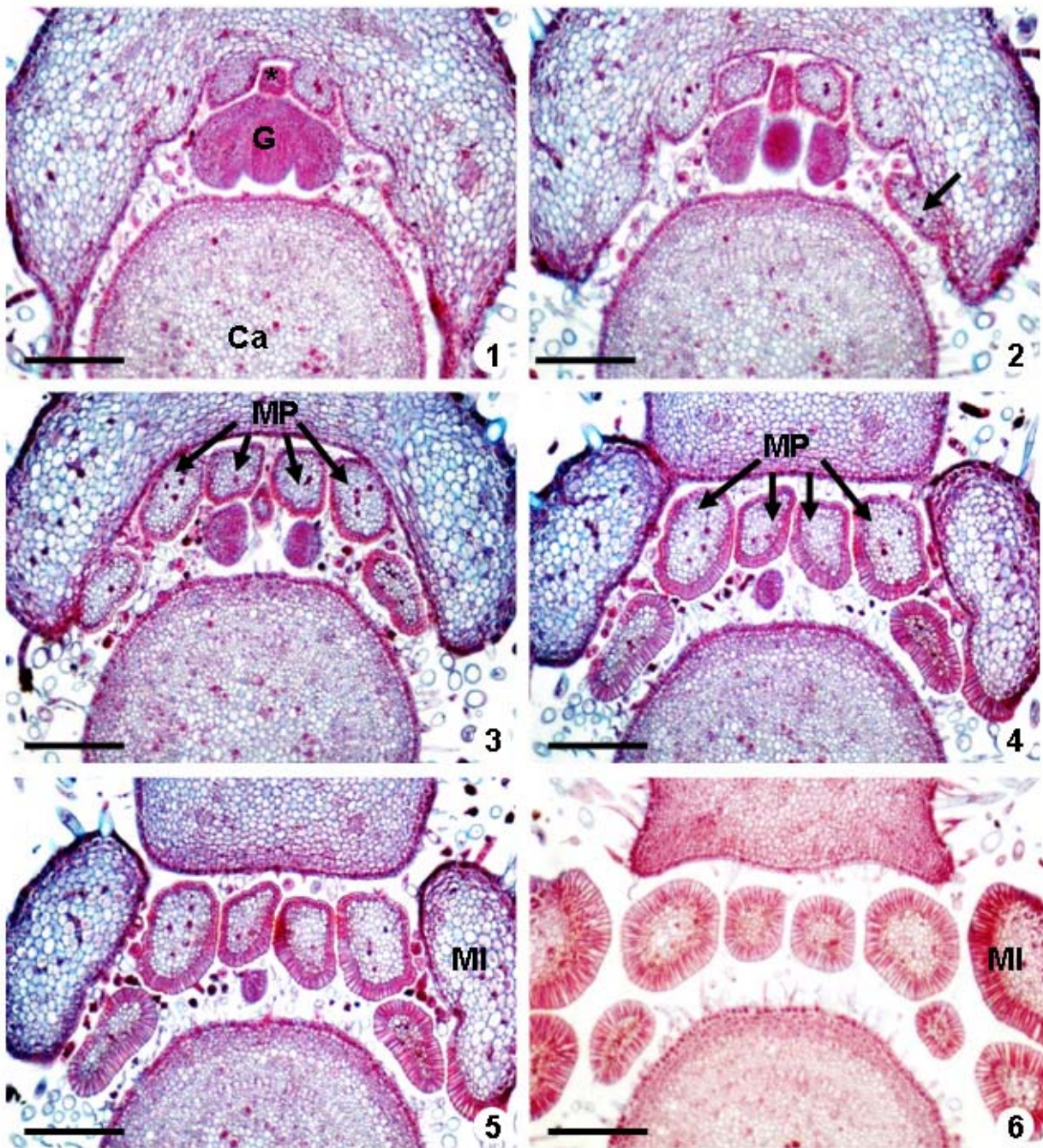
Figuras 7-8. Secções longitudinais do primórdio foliar vegetativo de *Temnadenia violacea*. 7. Coléter axilar. 8. Coléter marginal. Legendas: G – gema; EP – epiderme secretora. Escala: 70µm.

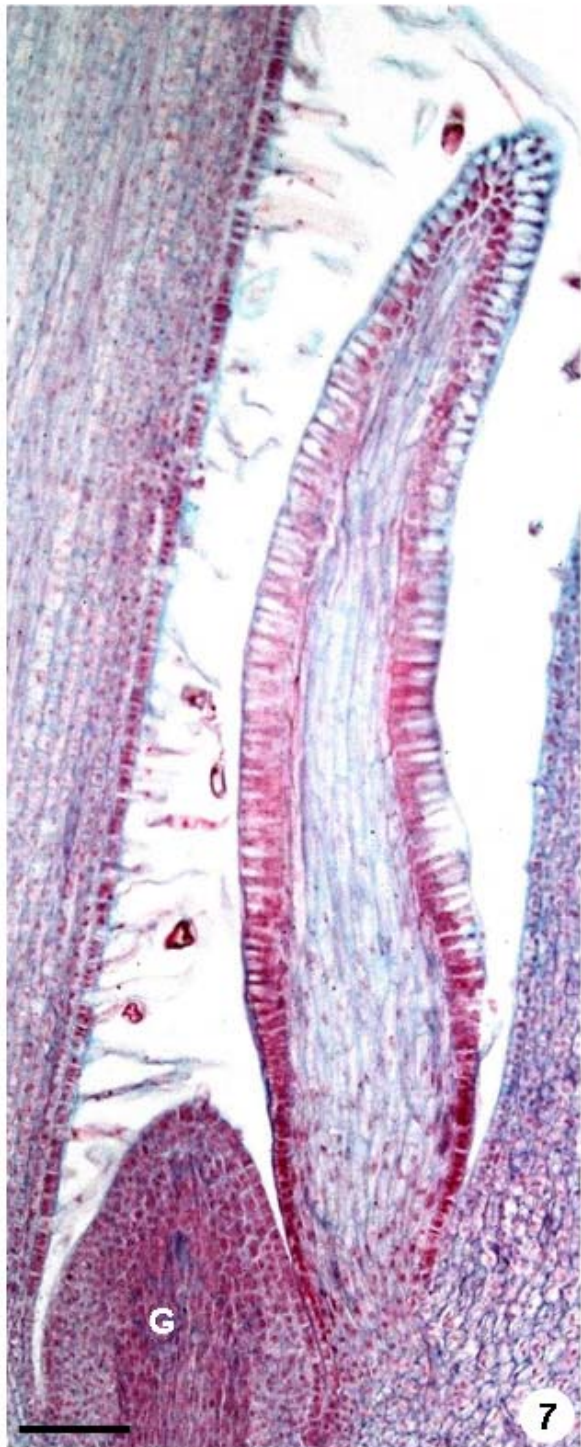
Figuras 9-10. Secções longitudinais do primórdio foliar vegetativo de *Temnadenia violacea*. 9. Coléter marginal com tecido vascular evidente. 10. Coléter axilar submetido a reação PAS. Legendas: X – xilema; Asterisco – secreção. Escala: 70µm.

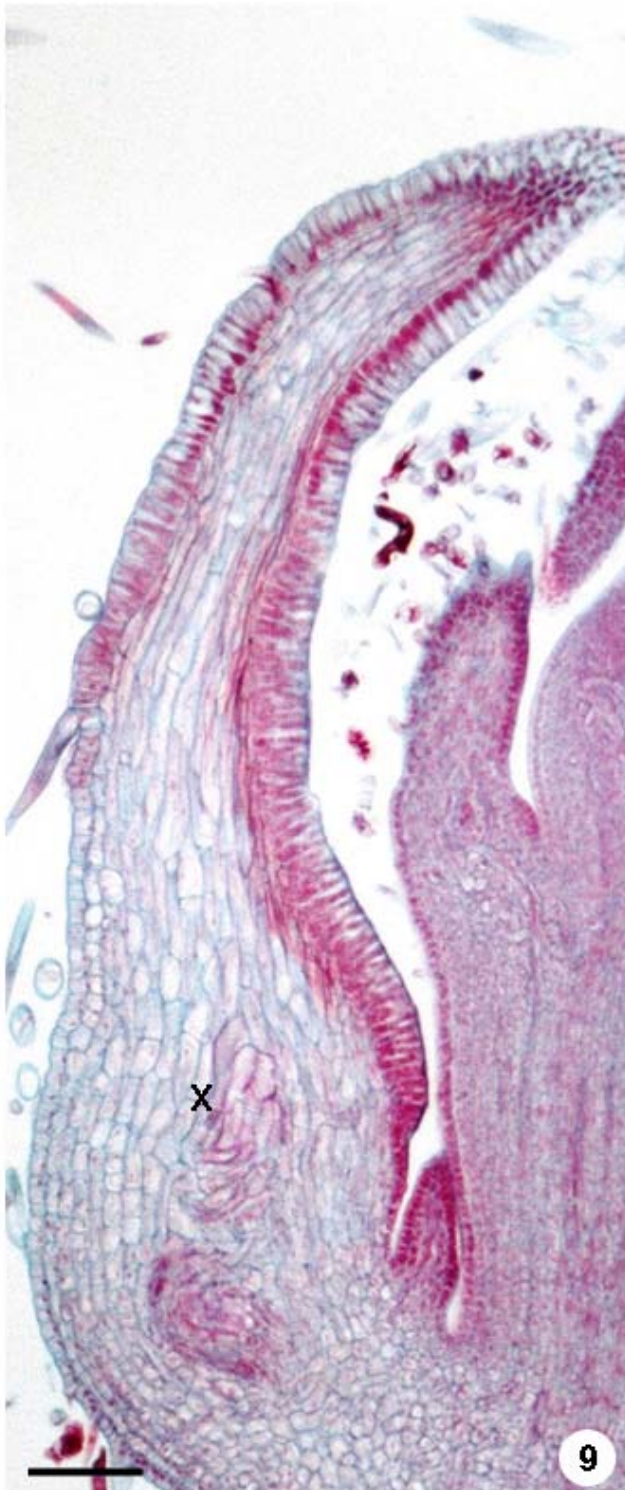
Figuras 11-14. Secções longitudinais do caule de *Temnadenia violacea*. 11. Primeiro nó visível; secreção no meio externo. 12. Segundo nó visível. 13. Terceiro nó visível. 14. Quarto nó visível. Legenda: Asterisco – secreção. Escala: 70µm.

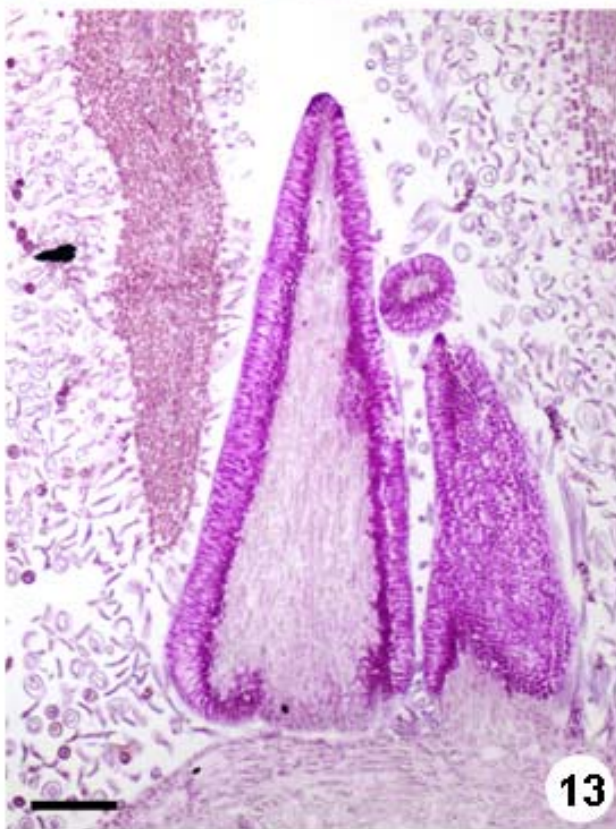
Figuras 15-20. Secções transversais do botão floral de *Temnadenia violacea*. 15. Base dos coléteres evidenciando sua origem. 16-17. Início da ramificação do coléter tripartido. 18-19. Bifurcação do coléter tripartido (seta). 20. Coléteres opostos a lacínias do cálice. Legendas: TC – tubo da corola; CT - coléter tripartido; CP – coléter padrão. Escala: 85µm.

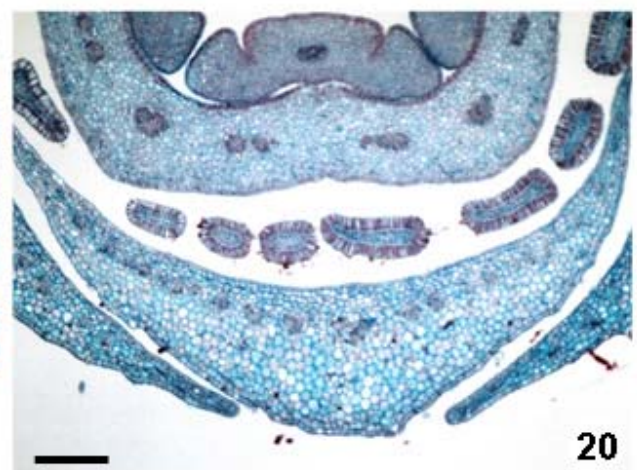
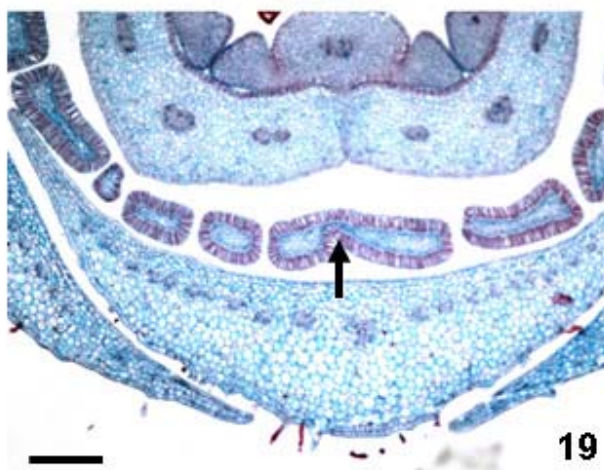
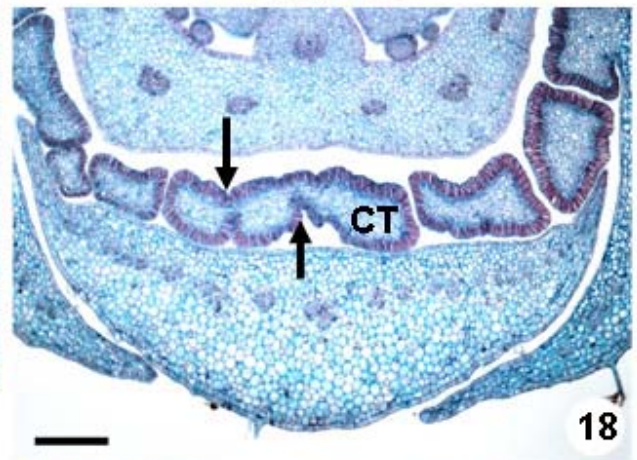
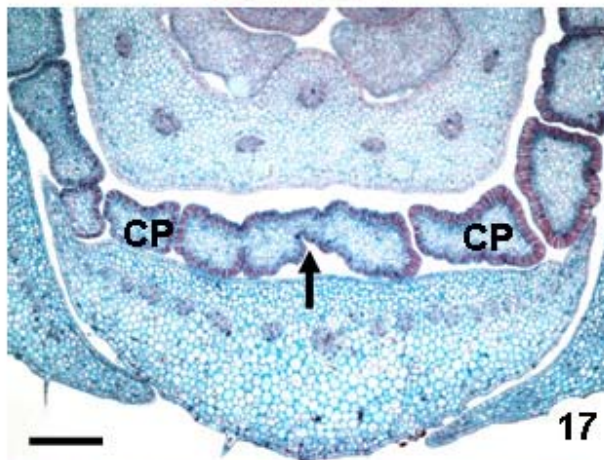
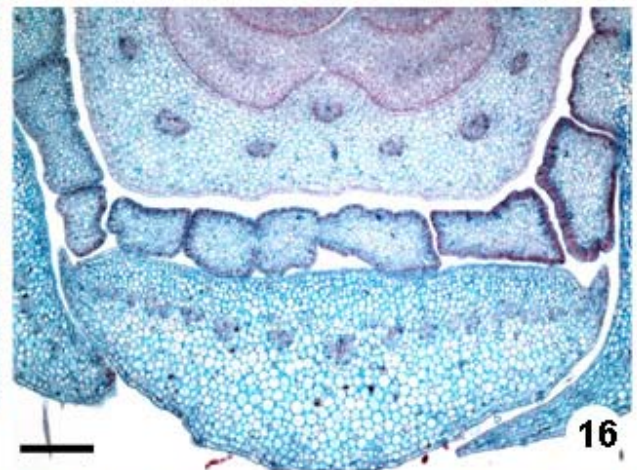
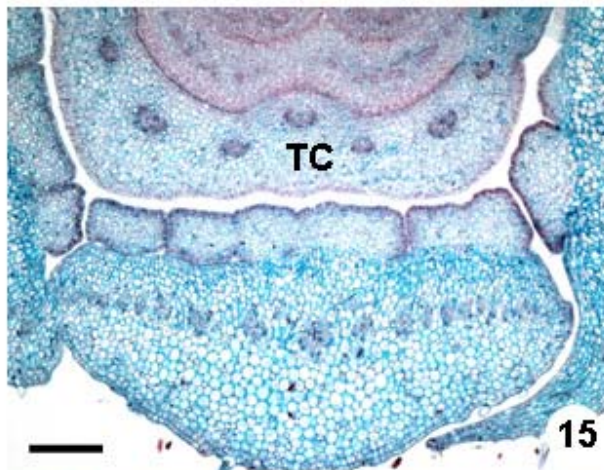
Figuras 21-22. Secções longitudinais do botão floral de *Temnadenia violacea*. 21. Coléter sésil no botão floral com 15mm de comprimento; secreção no meio externo. 22. Coléter sésil no botão floral com 30mm de comprimento; células secretoras em senescência. Legenda: Asterisco – secreção; Seta - laticífero. Escala: 70µm













Discussão

Coléteres foliares e calicinais foram registrados para espécies pertencentes a 25 gêneros da subfamília Apocynoideae (Endress & Bruyns 2000): *Adenium*, *Aganosma*, *Anodendron*, *Apocynum*, *Baissea*, *Beaumontia*, *Chonemorpha*, *Forsteronia*, *Funtumia*, *Holarrhena*, *Ichnocarpus*, *Mandevilla*, *Mascarenhasia*, *Mesechites*, *Nerium*, *Parsonia*, *Prestonia*, *Secondatia*, *Stephanostema*, *Strophanthus*, *Thenardia*, *Trachelospermum*, *Urceola*, *Vallaris* e *Wrightia* (Woodson & Moore 1938; Rao & Ganguli 1963; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Daves 1989 a,b,c, 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Simões *et al.* 2006).

O coléter tipo “padrão” observado no ápice vegetativo de *T. violacea* foi evidenciado para outros gêneros de Apocynaceae e inclusive para tribo Echitaea. Rio *et al.* (2002) descreveram a presença de coléteres do tipo padrão em *Prestonia coalita*. Os coléteres interpeciolares de *P. coalita* (Rio *et al.* 2002) e *T. violacea* apresentam características muito semelhantes, tais como a presença de pelos tectores e epiderme não secretora na face dorsal do coléter atingindo a metade do comprimento do coléter. Nesses dois gêneros, esse tipo coléter demonstra um caráter unificador, entretanto, é necessário o estudo dos demais gêneros a fim de observar a consistência unificadora dessa característica.

Nos botões florais *T. violacea* foram observados coléteres sésseis e sésseis tripartidos. Esses dois tipos já foram observados em Apocynaceae, tais como em *Prestonia coalita* (Rio 2001), *Forsteronia* (Rio 2006), *Mandevilla pycnantha*, *M. tenuifolia* (Simões *et*

al. 2006). Existe uma grande confusão na terminologia utilizada para descrever coléteres; em muitos casos coléteres tripartidos e coléteres fimbriados são sinônimos.

A primeira classificação da tipologia de coléteres proposta por Lersten (1974) para família Rubiaceae e amplamente utilizada para outras famílias não contempla vários tipos de coléteres, principalmente no que diz respeito à Apocynaceae. Segundo Simões *et al.* (2006), a terminologia tradicionalmente utilizada para caracterizar e descrever os coléteres calicinais em Apocynaceae é um tanto confusa e ajustes são necessários para evitar interpretações equivocadas. Esses autores propõem tipologias que derivam do coléter padrão original, tendo como mecanismo fundamental para as mudanças a separação, proliferação ou alongamento das células do coléter. Assim ocorreria separação em partes distintas nos coléteres bifurcado e fimbriado.

O número de coléteres foliares marginais de *T. violacea* varia entre 09 e 10 por primórdio. Essa variação foi observada em algumas espécies da família. Em *Allamanda cathartica*, Ramayya & Bahadur (1968) registraram de 10 a 13 coléteres e Thomas & Dave (1989a) observaram apenas 4 a 6 coléteres foliares para a mesma espécie. Um número diferente de coléteres peciolares foi observado em *Thevetia peruviana* por Fjell (1983) e por Thomas (1991). Para Thomas (1991), o número dos coléteres de uma mesma espécie pode variar com a distribuição geográfica. A variação observada no número de coléteres foliares não foi identificada nos coléteres calicinais. Em todos os indivíduos estudados, o número sempre foi constante. Apesar disso, uma variação no número de coléteres calicinais foi descrita por Ramayya & Bahadur (1968) em *Tabernaemontana divaricata* e por Demarco (2005) em *Blepharodon bicuspidatum*.

Em *T. violácea*, os coléteres são opostos aos lobos do cálice. Essa distribuição foi observada em outros gêneros de Apocynaceae, tais como em *Cerbera*, *Nerium* (Rao & Ganguli 1963), *Tabernaemontana* (Rao & Ganguli 1963; Ramayya & Bahadur 1968) e *Prestonia* (Sennblad *et al.* 1998; Rio 2001). Além de coléteres calicinais opostos à corola, outras formas de distribuição ocorrem em Apocynaceae. Coléteres alternos à corola foram observados em *Aganosma*, *Vallaris* (Rao & Ganguli 1963), *Holarrhena*, *Wrightia* (Rao & Ganguli 1963, Sennblad *et al.* 1998), *Periploca*, *Secamone* e *Stephanostema* (Sennblad *et al.* 1998) e coléteres contínuos distribuídos pela base do cálice formando uma franja foram evidenciados em *Mascarenhasia*, *Nerium*, *Picralima*, *Thevetia* e *Trachelospermum* (Sennblad *et al.* 1998) e *Forsteronia* (Rio 2006). Variações quanto ao número e posição foram observadas nos gêneros *Beaumontia*, *Funtumia* e *Nerium* (Sennblad *et al.* 1998). Woodson & Moore (1938) afirmaram que coléteres alternos representam uma condição basal, enquanto os opostos uma condição derivada.

Embora o número e a posição dos coléteres já tenham sido referidos como caracteres taxonômicos relevantes para espécies de Apocynaceae (Woodson & Moore 1938) há necessidade de estudos quantitativos para verificar a relevância desse caráter para taxonomia. Simões *et al.* (2004) considerou que o número de coléteres calicinais juntamente com outras características pode ser útil como ferramenta auxiliar em estudos filogenéticos.

Apenas nos coléteres foliares marginais foi observado tecido vascular. Segundo Demarco (2005), a presença de tecido vascular pode variar até mesmo entre os diferentes tipos de coléteres encontrados nos órgãos vegetativos. Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) observaram que os coléteres interpeciolares de *Mandevilla* possuem vascularização

e os coléteres foliares podem ou não ter tecido vascular. Rio *et al.* (2002) descreveram a ocorrência de coléteres intercalares vascularizados em *Prestonia coalita*. A ausência de vascularização nos coléteres calicinais em espécies de Apocynaceae foi considerada uma característica predominante por Woodson & Moore (1938), entretanto, coléteres calicinais vascularizados foram observados em *Funtumia*, *Strophanthus* (Woodson & Moore 1938), *Holarrhena*, *Vallaris*, *Wrightia* (Rao & Ganguli 1963), *Aganosma* (Dave *et al.* 1987) e *Nerium oleander* (Thomas & Dave 1989c).

A presença de tricomas tectores nos coléteres foi observada em outros gêneros de Apocynaceae. Dave *et al.* (1987) descreveram a ocorrência de tricomas multicelulares em *Aganosma* e Rio *et al.* (2002) relataram a existência de tricomas multisseriados nos coléteres foliares intercalares de *P. coalita*. Outra característica marcante é a presença de laticíferos. Eles estão presentes nos coléteres de vários gêneros de Apocynaceae, tendo sido registrados em *Plumeria*, *Vallaris* (Murugan & Inamdar 1987a,b), *Allamanda* (Thomas & Dave 1989a, Subramanian *et al.* 1989), *Nerium* (Thomas & Dave 1991) e *Mandevilla* (Appezato-da-Glória & Estelita 1997, 2000). Thomas & Dave (1991) consideram que características como vascularização e a presença de tricomas são um passo evolutivo entre os coléteres de Apocynaceae.

A presença da mucilagem na secreção dos coléteres em estádios iniciais de desenvolvimento foliar é descrita também em outras espécies de Apocynaceae (Appezato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2002; Demarco 2005; Rio 2006). Segundo Thomas (1991), os coléteres começam a secretar antes da expansão da lâmina foliar. A presença dessa mucilagem na fase inicial do desenvolvimento do primórdio está relacionada à função de lubrificar e proteger as gemas (Fahn 1979).

O fato de não ter sido observado rompimento da cutícula no coléteres em fase secretora pode indicar que a liberação do exsudato ocorre através de fendas na cutícula. Esse mecanismo de liberação foi descrito em *Allamanda* (Thomas & Dave 1989a), *Plumeria* (Mohan & Inamdar 1986), *Mandevilla* (Appezato-da-Glória & Estelita 2000) e *Blepharodon* (Demarco 2005). Segundo Fahn (1990), a ruptura da cutícula é uma característica comum no mecanismo de liberação da secreção que não foi evidenciada para *T. violacea*.

Referências bibliográficas

- Appenzato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 1997. Laticifers systems in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66: 301-306.
- Appenzato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23: 113-120.
- Clark, G. 1973. Staining procedures. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Dave, Y.; Thomas, V. & Kuriachem, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata*. *Pakistan Journal of Botany* 19: 243-248.
- Dave, Y.S. & Patel, N.D. 1975. A developmental study of extrafloral nectaries in slipper spurge (*Pedilanthus tithymaloides*, Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 62: 808-812.
- Demarco, D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne (Apocynaceae s.l.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Endress, M.E. & Bruyns, P.V. 2000. A revised classification of Apocynaceae s.l. *The Botanical Review* 66: 1-56.
- Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press Inc., London.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- 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, Stuttgart.

- Gregory, M. & Baas, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- 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.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject*. Clarendon Press, Oxford.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987a. Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea*. *Phytomorphology* 37: 209-214.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987b. Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba*. *Proceedings of the Indian Academic of Sciences* 97: 25-31.
- Ramayya, N. & Bahadur, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. *Current Science* 18: 520-522.
- Rao, V.S. & Ganguli, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. *Journal of the Indian Botanical Society* 42: 419-435.
- Rio, M.C.S. 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 *Forsteronia* G.Mey (Apocynaceae) de cerrado. 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 foliares de *Prestonia colliata* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). 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.
- Schwarz, E.A. & Furlan, A. 2002. Coléteres foliares de *Oxypetalum* R.Br. (Asclepiadoideae, Apocynaceae) – aspectos ultraestruturais e anatômicos úteis à taxonomia das espécies do Paraná (Brasil). Acta Biológica Paranaense 31: 79-97.
- Sennblad, B.; Endress, M.E. & Bremer, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe *Wrightieae* (Apocynaceae) revised. American Journal of Botany 85: 1143-1158.
- Silva, N.M.F.; Valente, M. da C.; Alencastro, F.M.M.R de; Pereira, J.F. & Sucre, B.D. 1975. Contribuição ao estudo das Asclepiadaceae brasileiras. Estudo taxonômico e anatômico de: *Gonioanthela odorata* (Decne.) Malme e *Gonioanthela hilariana* (Fourn.) Malme. Revista Brasileira de Biologia 35: 745-756.
- Simões, A.O. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Simões, A.O.; Castro, M. de M. & Kinoshita, L.S. 2006. Calycine colleter of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 152: 387-398.
- Solereder, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- Subramanian, R.B.; Murugan, V.; Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretions of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99: 423-429.
- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68: 287-305.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleter of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64: 201-203.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989b. The colleter of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6: 25-29.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989c. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32: 163-172.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1990. Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). Phytion 30: 209-212.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Repertorium 102: 23-28.
- Thomas, V; Dave, Y & Menon, A.R.S. 1989. Anatomy and hystochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). Nordic Journal of Botany 8: 493-496.

Woodson, R.E. & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-165.

Capítulo III

Glândulas em órgãos vegetativos e florais de *Secondatia densiflora* A.DC. (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae)

Introdução

Apocynaceae *sensu lato* é uma das maiores e mais representativas famílias de Angiospermas, contando com cerca de 300 gêneros e 4000 espécies (Judd *et al.* 2002). Ela apresenta uma estrutura floral complexa caracterizada por uma progressão estrutural que tem início na subfamília Rauvolfioideae, considerada a mais basal até Asclepiadoideae, a mais derivada (Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000).

Além da estrutura floral complexa, essa família é caracterizada por possuir uma grande diversidade de estruturas secretoras. **Idioblastos** estão presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, ocupando as mais diversas posições (Appenzato-da-Glória & Estelita 1992, Galetto 1997, Rio *et al.* 2005).

Os **laticíferos** têm ocorrência universal na família (Solereder 1908, Metcalfe & Chalk 1950) e muitos trabalhos descreveram a sua presença em Apocynaceae (Metcalfe & Chalk 1983, Mahlberg 1993). Apesar disso, são motivo de grande divergência quanto a sua tipologia e origem (Mahlberg 1963, Milanez 1977, Demarco *et al.* 2006). Eles ocorrem em órgãos vegetativos (Appenzato-da-Glória & Estelita 1997, Rio *et al.* 2005) e reprodutivos (Murugan & Inamdar 1987 a, b; Thomas & Dave 1994; Demarco 2005).

Os **coléteres** estão presentes na maior parte dos membros da família (Thomas 1991), não ocorrendo em poucos gêneros de Apocynaceae (Demarco 2005). Eles estão distribuídos nos ápices vegetativos e florais, podem apresentar grande diversidade de

formas, ocorrendo desde tipologias mais simples até coléteres mais complexos (Simões *et al.* 2006) como os que ocorrem nas flores de *Odontadenia lutea* (capítulo 1). Por esses motivos, essa estrutura possui importância taxonômica, sendo útil na diferenciação de gêneros e espécies (Woodson & Moore 1938; Endress & Bruyns 2000; Rio & Kinoshita 2005; Rio *et al.* 2005; Simões *et al.* 2006).

Os **nectários** não apresentam uma distribuição tão ampla quanto os coléteres. Na subfamília Apocynoideae, eles ocorrem na forma de um anel basal contínuo que circunda o ovário e pode apresentar lobos na porção apical (Woodson & Moore 1938). Além dos nectários na base do ovário, a existência de nectários não estruturados no cálice e na corola foi mencionada para *Aspidosperma quebracho-blanco* (Lin & Bernardello 1999).

A presente investigação tem por objetivo caracterizar anatomicamente as glândulas localizadas em órgãos vegetativos e reprodutivos de *Secondatia densiflora* A.DC. e identificar as principais classes de compostos químicos presentes nos idioblastos e na secreção dos coléteres vegetativos.

Material e métodos

O material de estudo foi coletado em duas áreas de cerrado do estado de São Paulo: Horto Botânico de Bauru e uma área de cerrado no município de Campinas pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron do Cnpq. Material testemunha proveniente de sete indivíduos foi incorporado ao Herbário UEC: São Paulo: Bauru, 11/VI/2004, F. Martins (147877 UEC); São Paulo: Bauru, 11/VI/2004, F. Martins (147876 UEC); São Paulo: Campinas, 05/VI/2004, F. Martins (147879 UEC); São Paulo: Bauru, 20/VI/2004, F. Martins (147882 UEC); São Paulo: Bauru, 20/VI/2004, F. Martins (147881

UEC); São Paulo: Bauru, 20/VI/2004, F. Martins (147880 UEC); São Paulo: Bauru, 20/VI/2004, F. Martins (147878 UEC). O material foi identificado pela Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita da Universidade Estadual de Campinas e pelo Prof. Dr. André Olmos Simões da Universidade de São Paulo.

Ramos vegetativos com ápices caulinares, primórdios foliares, folhas completamente expandidas, inflorescências portadoras de botões florais com 5mm, 8mm e 10mm de comprimento e flores em antese com 12mm de comprimento foram coletados. A coleta foi realizada com lâmina aquecida para preservar a secreção do laticífero. O material foi fixado em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940), FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Lillie 1948 *in* Clark 1973) e SFF (solução de sulfato ferroso, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Johansen 1940). Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois transferido para álcool etílico 70%.

As peças foram isoladas e transferidas para álcool butílico terciário 70, onde permaneceram por aproximadamente sete dias, desidratadas em série butílica e incluídas em parafina histológica (Histosec/Merck; Johansen 1940). Cortes seriados transversais e longitudinais com espessura de aproximadamente 10µm foram realizadas com uso micrótomo rotativo. Os cortes foram corados com safranina alcoólica 1,5% e azul de astra aquoso 1% (Gerlarch 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética (Permunt/Fisher).

Testes histoquímicos foram realizados para identificar as principais classes de compostos químicos na secreção dos idioblastos. Os tratamentos foram: ácido tânico/cloreto férrico III para mucilagem (Pizzolato & Lillie 1973, Pizzolato 1977); reação

PAS (pararosalina CI 42510) para polissacarídeos totais (Periodic-Acid-Schiff's reaction; McManus 1948); preto de amido B (CI 20470) para proteínas (Fisher 1968); preto de Sudão B (CI 26150) para lipídios totais (Pearse 1985); azul do Nilo (CI 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947); cloreto férrico III (Johansen 1940) para compostos fenólicos e reagente de Wagner para alcalóides (Furr & Mahlberg 1981). Os compostos fenólicos também foram evidenciados pelo SFF.

O controle dos testes para substâncias lipofílicas foi realizado com solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v, High 1948). As amostras foram submetidas a essa solução por um período de 48 horas em temperatura ambiente, logo em seguida fixadas em FAA ou em FNT e submetidas aos mesmos tratamentos das demais peças. Os controles para os testes de substâncias hidrofílicas seguem as recomendações metodológicas, com supressão do tratamento pelo cloreto férrico (Pizzolato 1977) e do tratamento com ácido periódico (McManus 1948).

Para evidenciar a presença da mucilagem na secreção dos coléteres, secções de material fixado em FAA foram coradas com vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) e submetidas à reação PAS (McManus 1948).

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX51 utilizando-se filme Kodak Pro Image 100 e as imagens digitais realizadas em microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera digital Olympus E330. As imagens provenientes de fotomicrografias foram digitalizadas no Software Adobe Photoshop 9.0. As escalas das figuras foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações. As medidas de comprimento dos coléteres foram

realizadas com três ápices vegetativos e florais de cada indivíduo em câmara clara. A classificação dos coléteres esta de acordo com Lersten (1974).

Resultados

Os **idioblastos** de *S. densiflora* estão distribuídos por todos os órgãos aéreos da planta (figuras 1-40). Nas folhas jovens, eles ocorrem no parênquima fundamental e associados ao floema. No caule primário e secundário, estão presentes no córtex e na medula. Nos botões florais, os idioblastos são encontrados em todas as peças (figuras 29-32). Eles ocorrem no parênquima das sépalas, pétalas, estames, nectários e carpelos. Os idioblastos também são observados no parênquima dos coléteres foliares (figuras 24,27-28) e florais. Uma hipoderme secretora com conteúdo de aspecto denso semelhante ao dos idioblastos é observada na folha jovem; entretanto, tal estrutura não está presente nas folhas adultas (figuras 01-04). No caule, a hipoderme permanece no estágio secundário, sendo interrompida apenas pela presença das câmaras subestomáticas (figuras 05-06).

O conteúdo na maioria das vezes é denso (figura 8) e fortemente corado pela safranina. Alguns idioblastos apresentam secreção de aspecto granuloso (figura 7). Não há diferença na distribuição entre os idioblastos de conteúdo granuloso e denso. Os testes histoquímicos evidenciaram apenas compostos fenólicos (figura 10).

Os **laticíferos** são do tipo anastomosado (figuras 11-22) podendo ser observados em todos os órgãos estudados. Eles estão presentes na lâmina foliar e pecíolo, localizados próximos ao feixe vascular. No caule, eles são observados tanto na região cortical como na medular. Nos botões florais, eles estão presentes em todas as peças (figuras 29-32). Eles

ocorrem no receptáculo floral, dispersos entre os feixes vasculares, no parênquima das sépalas, pétalas, nectário floral e carpelos.

Laticíferos podem ser facilmente identificados pelo seu conteúdo diferenciado e, em alguns casos, pela presença de paredes celulares mais espessas que as paredes das células parenquimáticas (figuras 13-14). O diâmetro é variado e os laticíferos de maior calibre são observados logo abaixo do ápice vegetativo (figura 11) e na medula do caule (figura 12).

A secreção apresenta aspecto denso sendo fortemente corada pela safranina e evidenciando sua natureza acidófila (figuras 12-13). O látex tem cor branca e aspecto leitoso, sendo extravasada logo que a planta é lesionada.

Os **coléteres** vegetativos são encontrados nos estágios iniciais do desenvolvimento no ápice caulinar vegetativo (figuras 15-22). A descrição dos coléteres foi realizada no segundo nó, pois todos os coléteres estão desenvolvidos nesse estágio. Em cada nó, 18-19 coléteres são observados, ocorrendo 9-10 coléteres por primórdio (figura 15). Por primórdio, um coléter tem origem axilar e os demais têm origem marginal (figuras 17-22). O número de coléteres marginais varia entre indivíduos. Ocorre também uma variação no tamanho dos coléteres; o axilar atinge no máximo 400µm e os marginais variam entre 360µm e 1300µm de comprimento.

Os primeiros coléteres a se desenvolverem são os intrapeciolares, incluindo o axilar. Outros seis coléteres surgem a partir da porção interna da estípula, ocupando posição interpeciolar (figura 20). Os últimos a se formarem também ocupam posição interpeciolar, entretanto estão localizados mais externamente ao caule. Todos os coléteres são destituídos de vascularização.

Os coléteres são do tipo padrão, formados por uma porção alongada que se afina em direção à extremidade. A epiderme secretora em paliçada delimita um núcleo parenquimático e o curto pedúnculo é coberto por epiderme não secretora de formato retangular (figuras 23-24). Todo coléter é recoberto por cutícula fina. A secreção é observada no interior das células corada pela safranina e no meio externo corada pelo azul de astra (figuras 23; 25). A mucilagem é constatada tanto no interior das células secretoras quanto no meio extracelular pelo vermelho de rutênio e pela reação PAS (figuras 27-28).

Os **nectários** florais são fundidos na base e livres na região apical constituindo assim cinco unidades distintas (figuras 34-37). Eles têm origem receptacular, possuem uma epiderme que envolve toda estrutura, parênquima nectarífero e feixes vasculares (figura 38; 40). Os idioblastos estão no parênquima do nectário ocupando principalmente posição central (figura 39); nas demais estruturas estudadas, eles ocupam posição subepidérmica. Na porção apical dos nectários, os estômatos são observados em maior concentração e provavelmente estão envolvidos na secreção do néctar. As células parenquimáticas subepidérmicas apresentam protoplasto denso e fortemente corado pela safranina, que pode indicar a atividade secretora dessas células.

Legendas

Figuras 1-6. Secções transversais de órgãos vegetativos de *Secondatia densiflora*. 1. Nervura mediana da folha jovem. 2. Idioblastos em posição subepidérmica na folha jovem. 3. Nervura mediana da folha adulta. 4. Folha adulta sem idioblastos em posição subepidérmica. 5. Caule em estágio secundário, notar idioblastos na região medular e abaixo da epiderme. 6. Reação positiva a SFF nos idioblastos do caule. Escalas: 1; 3 - 150µm; 2; 4; 5; 6 - 75µm.

Figuras 07-10. Idioblastos no ápice caulinar de *Secondatia densiflora*. 7. Idioblastos com secreção de aspecto granulado. 8. Idioblasto com secreção densa. 9. Coloração natural de um idioblasto fixado em FNT. 10. Reação positiva ao teste com cloreto férrico. Escalas: 15µm.

Figuras 11-14. Secção longitudinal e transversal do ápice caulinar de *Secondatia densiflora*. 11. Vista geral do ápice caulinar. 12. Laticíferos na medula do caule. 13. Detalhe do laticífero, notar secreção (asterisco) corada pela safranina. 14. Laticífero (cabeça de seta) com parede celular mais espessa (seta) que as paredes das células parenquimáticas. Escalas: 11- 150µm; 12 - 80 µm; 13;14; 25 µm.

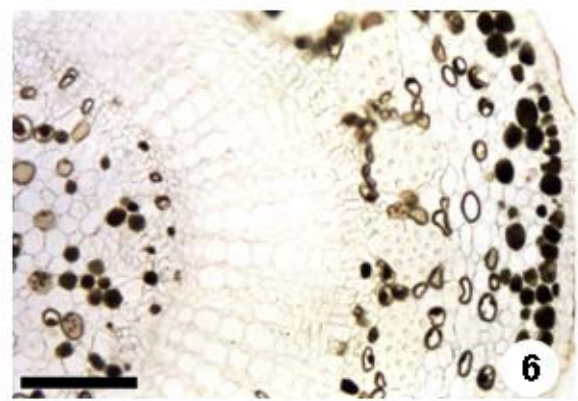
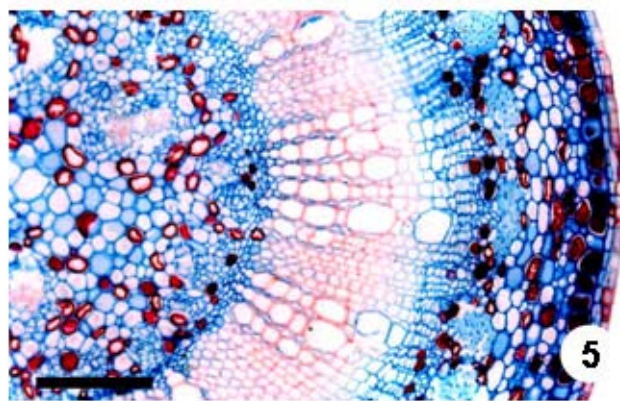
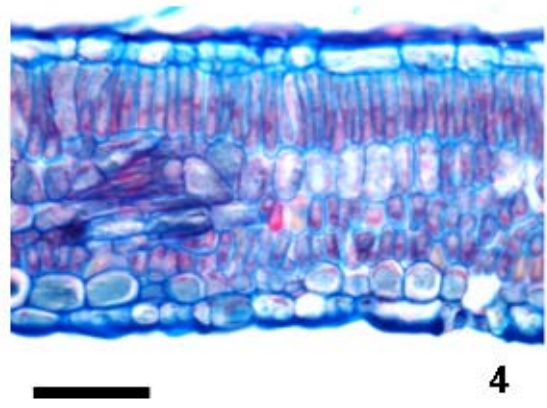
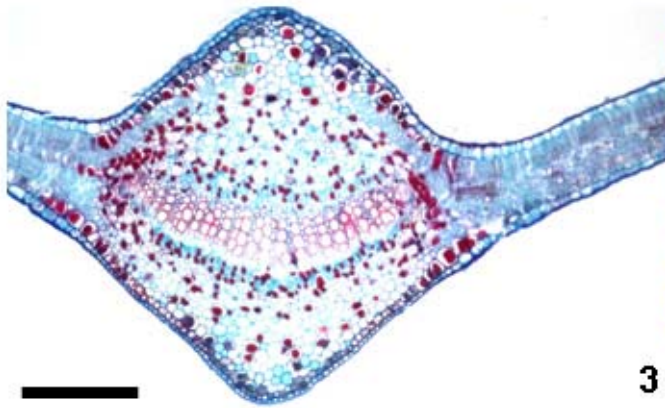
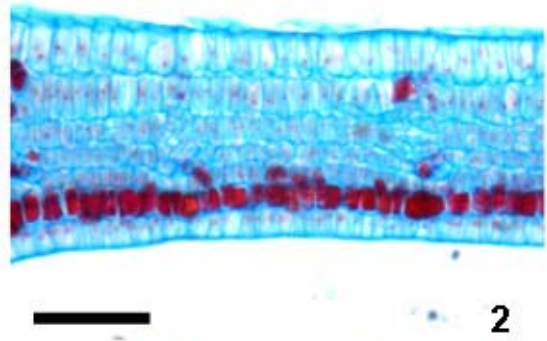
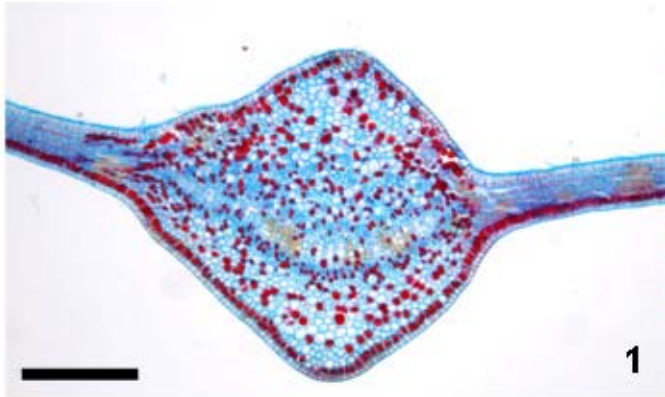
Figuras 15-22. Secção transversal do ápice caulinar de *Secondatia densiflora*. 15. Meristema apical (asterisco) do caule. 16. Primeiro primórdio foliar (PF1) evidenciando o surgimento dos coléteres intrapeciolares (seta). 17-22. Coléteres axilares, coléteres

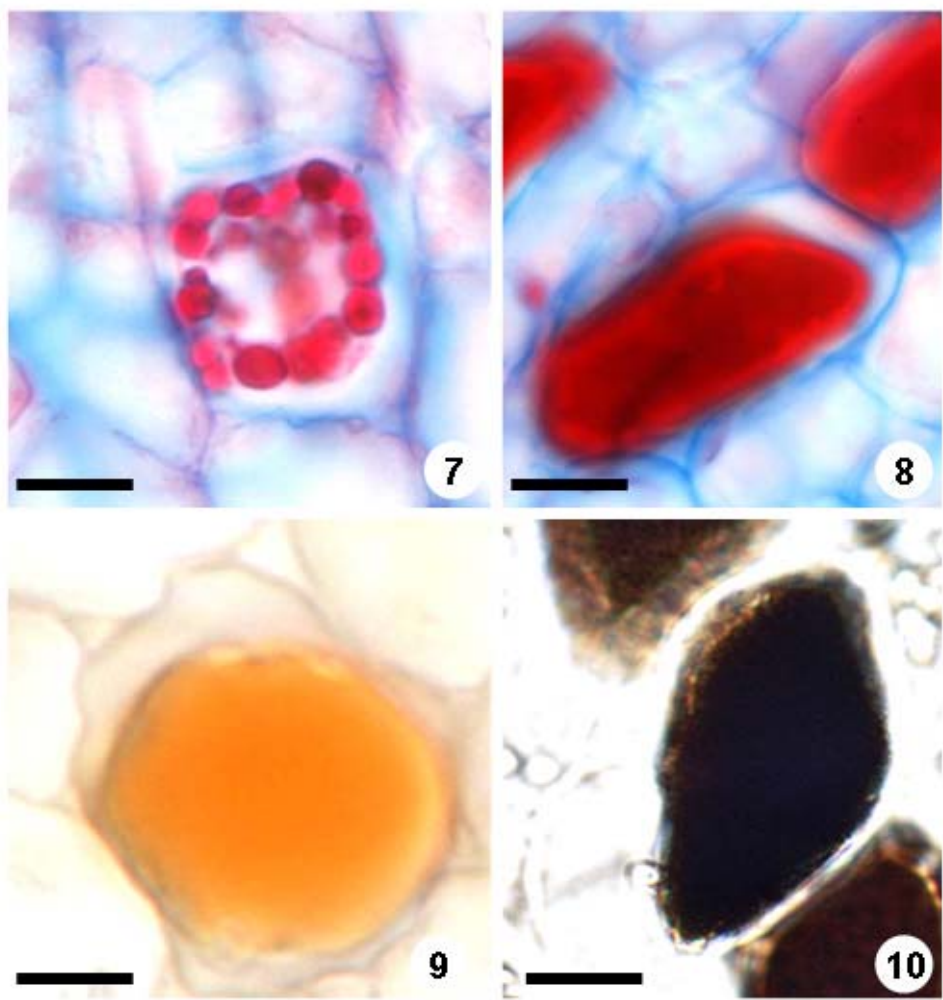
marginais peciolares (MP) e coléteres marginais interpeciolares (MI) no segundo primórdio foliar (PF2). Legenda: Ca – caule. Escalas: 85µm.

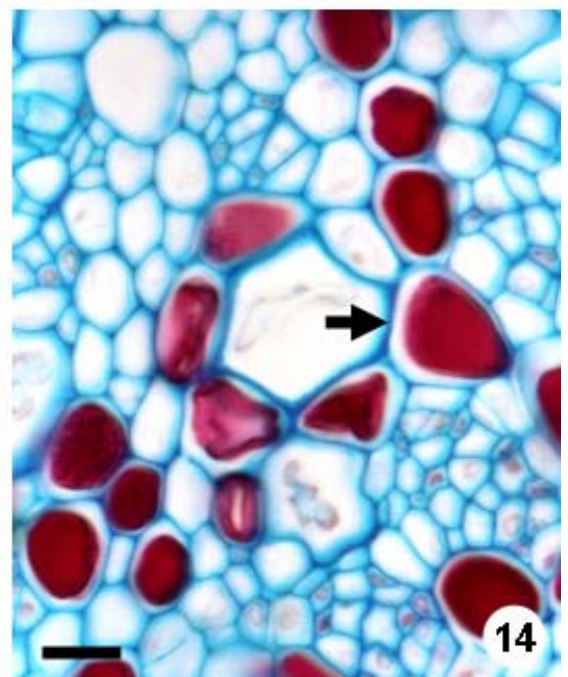
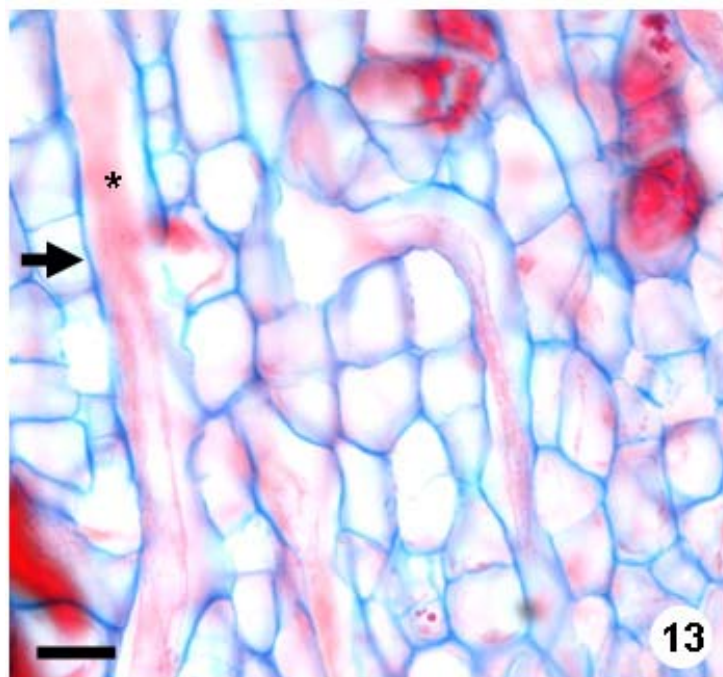
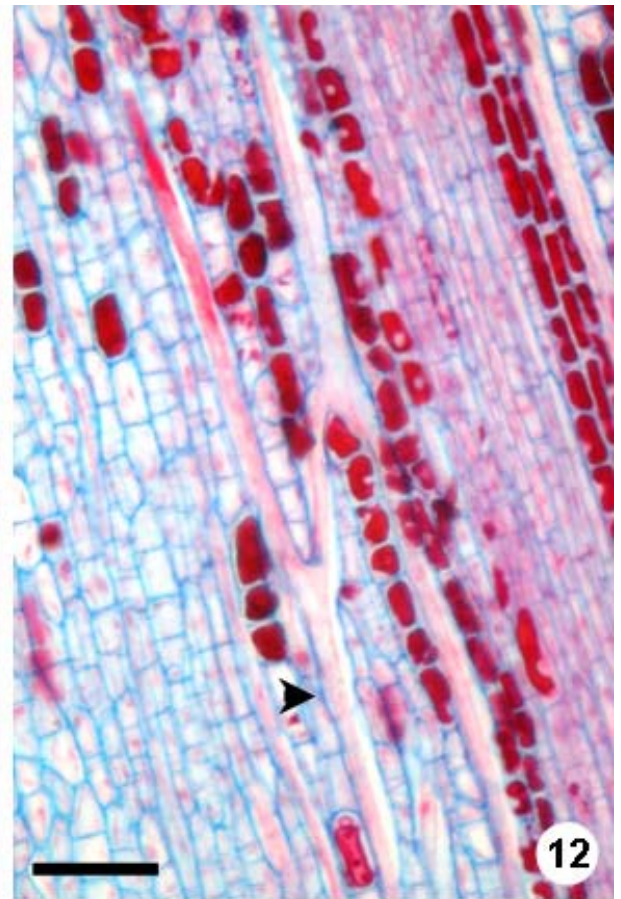
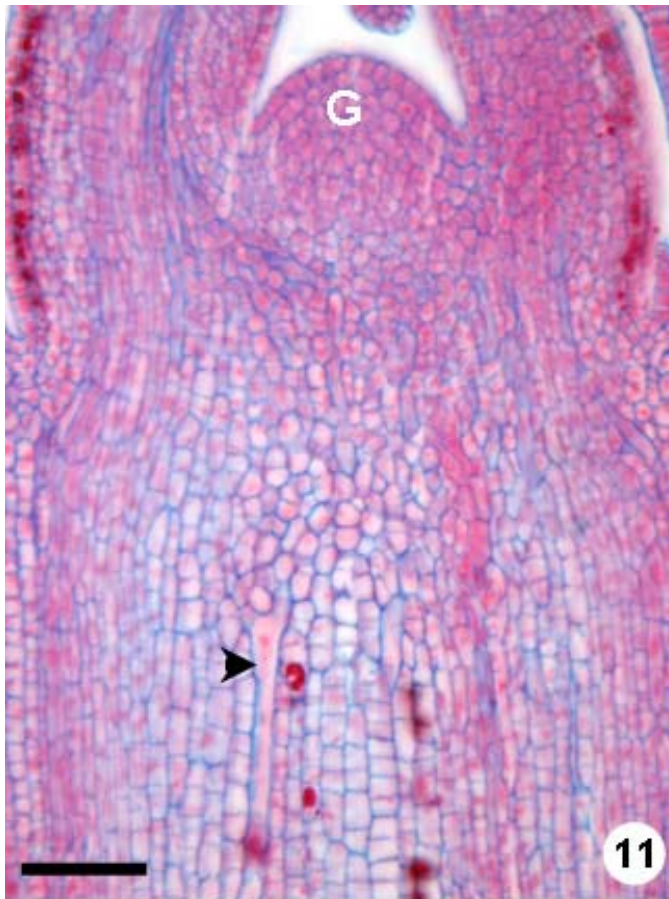
Figuras 23-26. Secção longitudinal e transversal dos coléteres vegetativos de *Secondatia densiflora*. 23. Coléter axilar; secreção nas células epidérmicas e no meio extracelular (asterisco). 24. Coléter marginal interpeciolar em fase pós-secretora; notar laticífero (seta). 25. Coléteres marginais; secreção evidenciada pelo azul de astra. 26. Polissacarídeos evidenciados na secreção (asterisco) pela reação PAS. Escalas: 50µm.

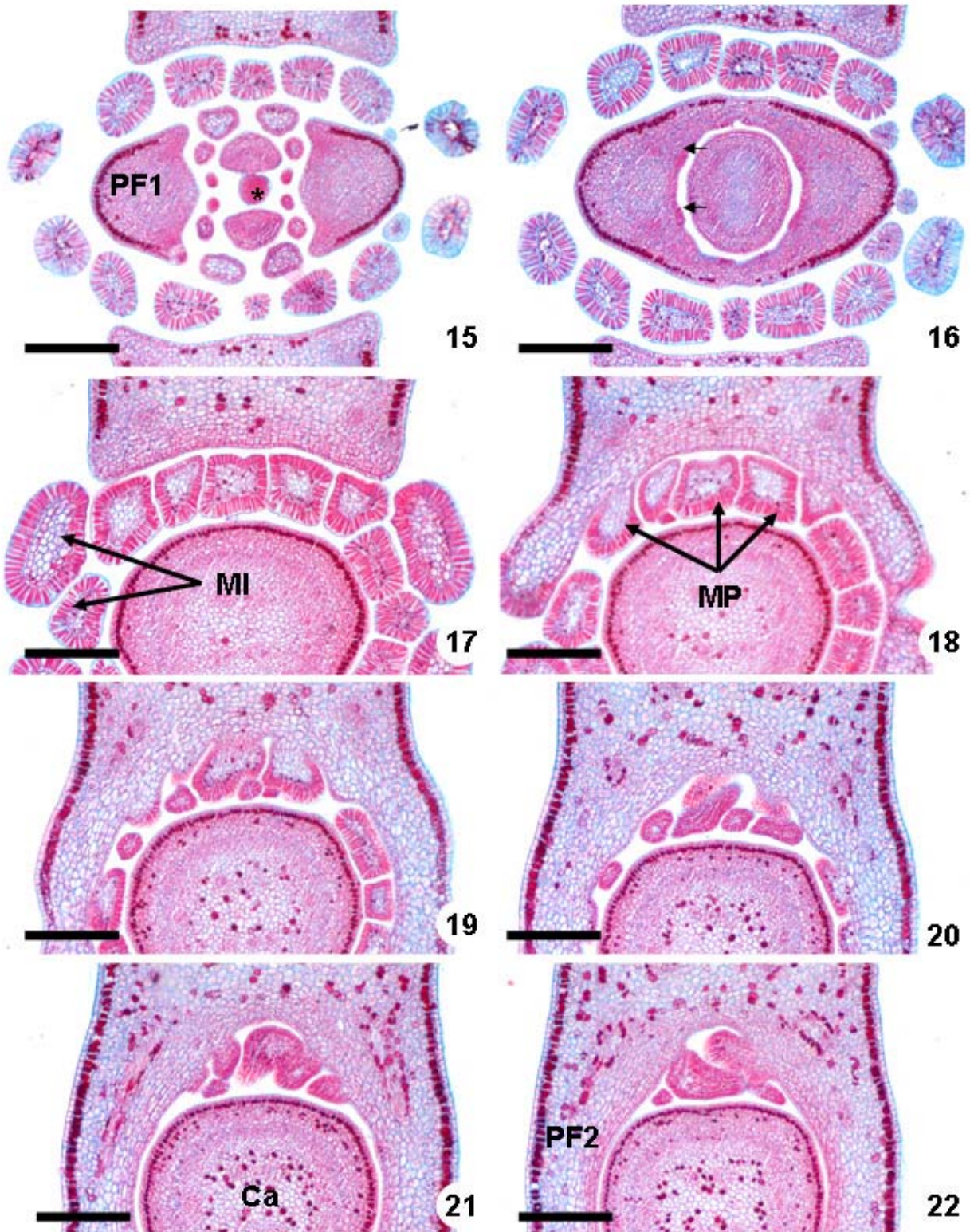
Figuras 27-28. Secção longitudinal dos coléteres vegetativos de *Secondatia densiflora* submetidos à reação PAS. 27. Coléter com células epidérmicas em fase pré-secretora no segundo nó. 28. Coléter em fase pós-secretora no terceiro nó. Escalas: 50µm.

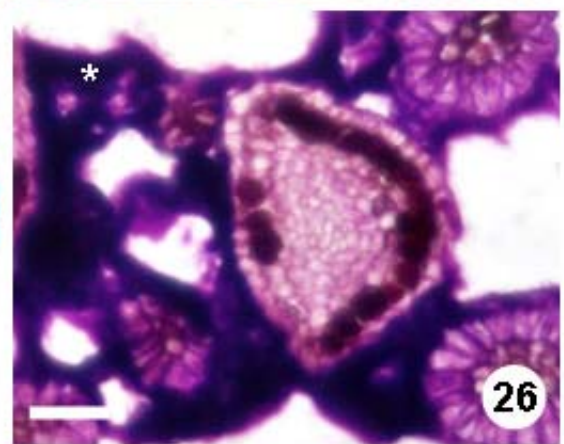
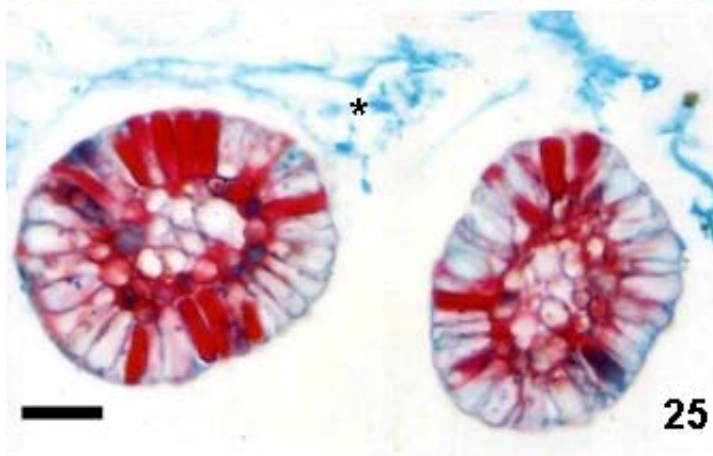
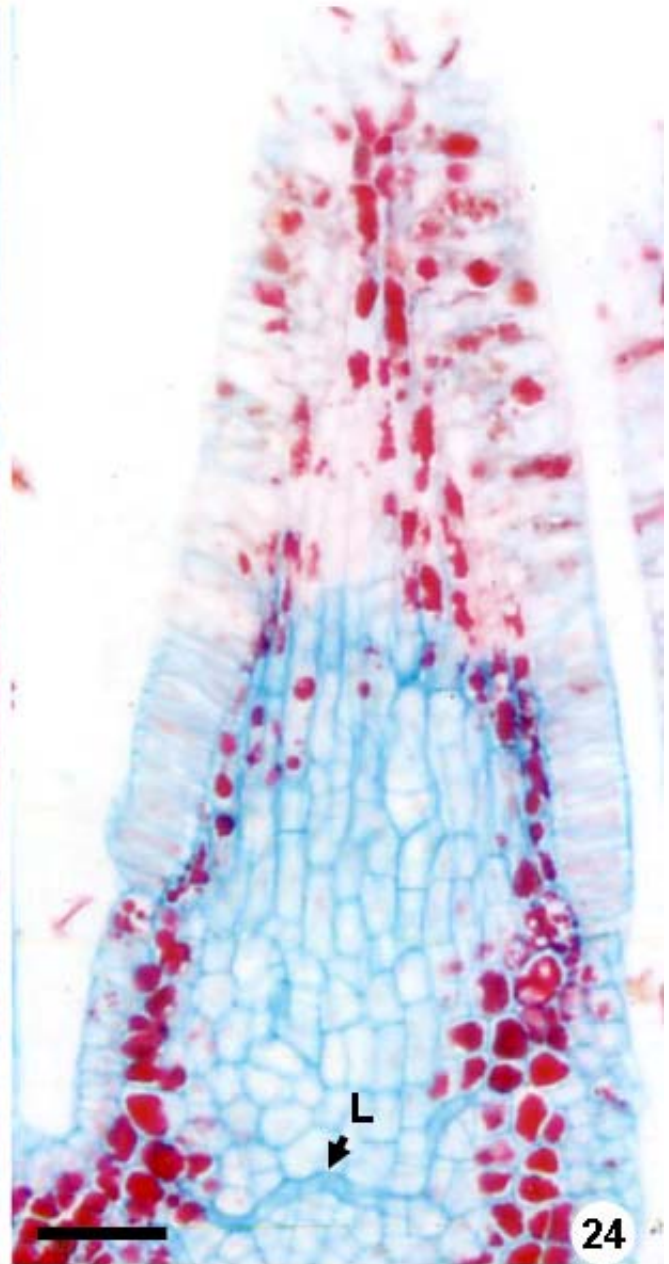
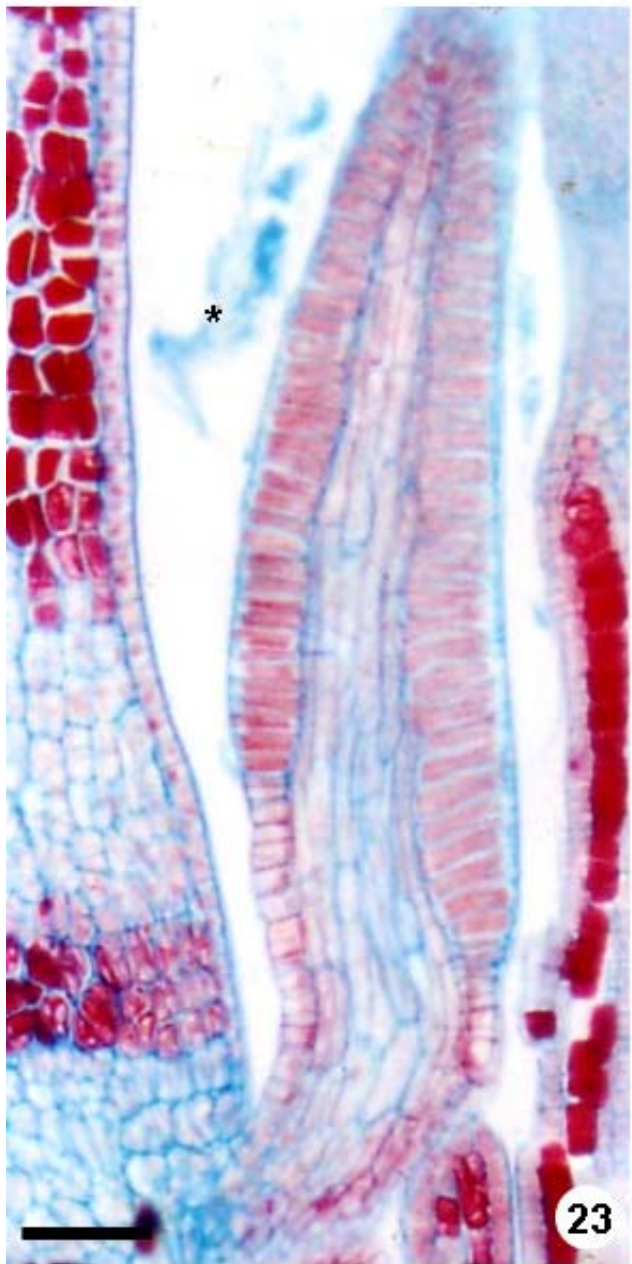
Figuras 29-35. Secção transversal e longitudinal do botão floral de *Secondatia densiflora*. 29, 31. Vista geral do botão floral. 30. Coléter calicinal (Co) e secreção no meio externo. 32, 33. Detalhe do nectário (N) floral. 34. Notar estômato (seta) e idioblastos (cabeça de seta). 35. Vascularização do parênquima nectarífero. Legenda: Seta – laticífero; T–tubo da corola; C–carpelo; X–xilema. Escalas: 50µm.



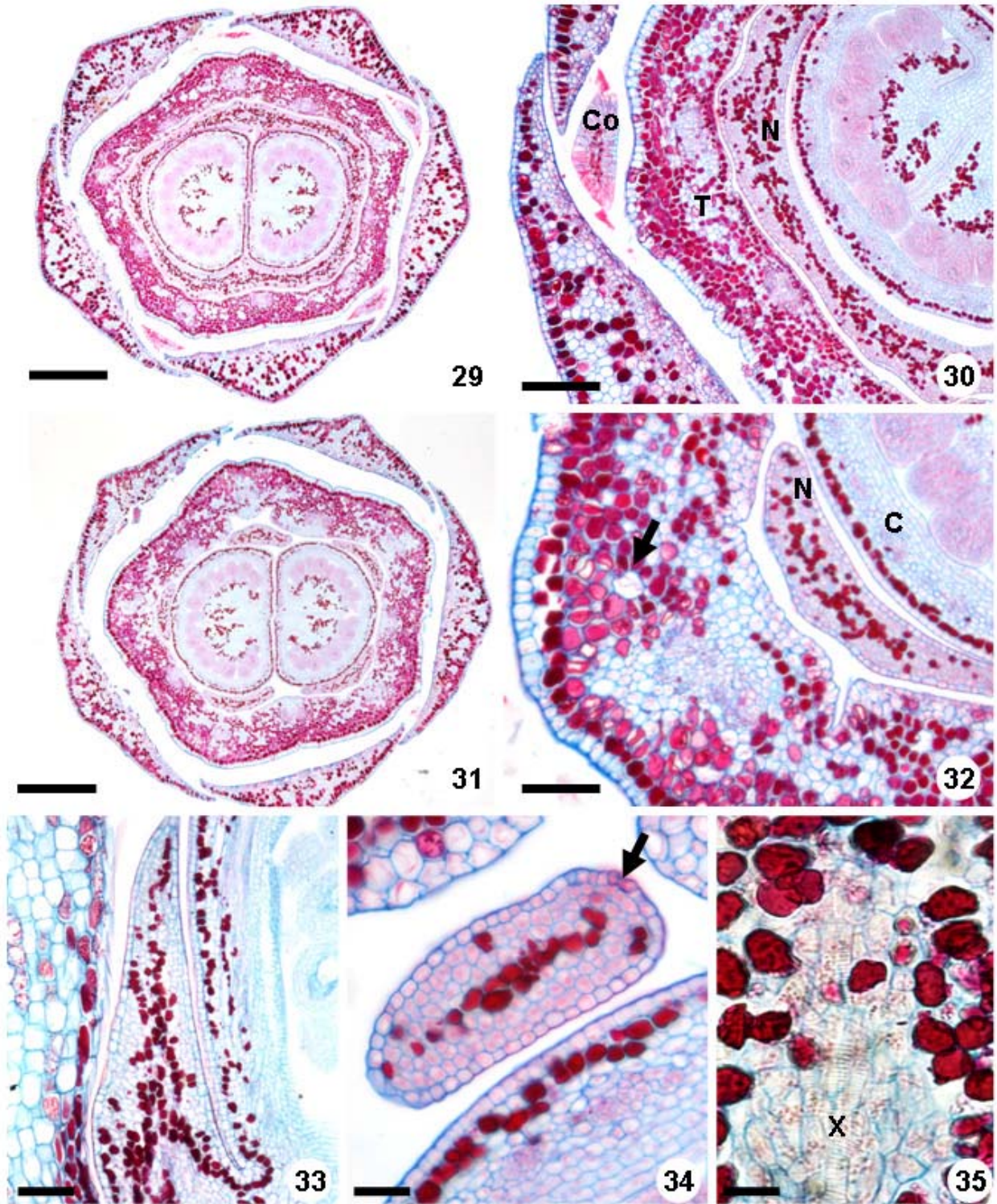












Discussão

Idioblastos

Os idioblastos estão presentes em todos os órgãos estudados de *Secondatia densiflora*. Eles são observados ocupando posição hipodérmica nos órgãos adultos de *Forsteronia glabrescens* (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla pentlandiana* (Galetto 1997) e *Mandevilla pohliana* (Appezato-da-Glória & Estelita-Teixeira 1992). Em *S. densiflora*, a formação de uma hipoderme secretora ocorre apenas no caule, pois na folha adulta os idioblastos não estão distribuídos de forma contínua como no órgão jovem. Castro & Demarco (2008) afirmam que células secretoras distribuídas de forma contínua em órgãos jovens que mantem a mesma distribuição em órgãos adultos constituem uma epiderme ou hipoderme secretora. Idioblastos ocorrem dispersos no parênquima em *Forsteronia australis*, *F. pubescens*, *F. thyrsoides* (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Appezato-da-Glória & Estelita 2000). Eles são encontrados no parênquima dos coléteres vegetativos de *Forsteronia glabrescens*, *F. pubescens*, *F. thyrsoides* (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla illustris*, *M. velutina* (Appezato-da-Glória & Estelita 2000) e no parênquima dos coléteres florais de *Mandevilla pycnantha*, *Macrosiphonia longiflora* e *Mesechites mansoana* (Simões *et al.* 2006).

Alguns autores identificaram compostos fenólicos nos idioblastos (Appezato-da-Glória & Estelita 2000; Rio *et al.* 2005). Em *S. densiflora*, a presença de compostos fenólicos foi comprovada pelo SFF e pela reação positiva ao cloreto férrico; além disso, outra evidência da presença desses compostos foi a forte coloração pela safranina. Segundo Gardner (1975), precipitados intracelulares aparecem após a aplicação de corantes básicos como a safranina. A presença desses compostos fenólicos pode estar relacionada à defesa da planta contra o ataque de herbívoros e o crescimento de fungos,

pois são substâncias adstringentes e tóxicas (Bruneton 1999, Simões *et al.* 2004). Sugere-se que as células secretoras de compostos fenólicos localizadas na corola possam desempenhar a função de guias de néctar para polinizadores pela sua capacidade de refletir raios ultravioleta (Thompson *et al.* 1972; Kay *et al.* 1981)

Laticíferos

Os laticíferos estão presentes em diversas famílias de angiospermas, entre elas Apocynaceae (Metcalf & Chalk 1983). Muitas dessas famílias não apresentam relações taxonômicas, o que sugere que a capacidade de produzir látex surgiu mais de uma vez ao longo da evolução desses grupos (Fahn 1979). É uma estrutura constante em Apocynaceae e ocorre em órgãos vegetativos e reprodutivos (Wilson & Mahlberg 1978; Thomas & Dave 1989; Rio *et al.* 2005; Valente & Costa 2005).

Eles foram observados em todos os órgãos estudados de *S. densiflora*. Laticíferos já foram encontrados no mesofilo foliar de *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana*, *Vinca minor* (Fjell 1983), *Mateleia maritima* (Valente 1996) e espécies de *Forsteronia* (Rio *et al.* 2005); parênquima cortical e medular do caule *Mandevilla pohliana* (Appezato-da-Glória & Estelita-Teixeira 1992), *Mandevilla illustris*, *M. velutina* (Appezato-da-Glória & Estelita 1997) e no receptáculo floral, verticilos estéreis e carpelos de *Marsdenia loniceroides* (Valente & Costa 2005).

Segundo Fahn (1979), os laticíferos podem ser formados por uma única célula sendo assim considerados não articulados ou formados por uma fileira de células sendo denominados articulados. Os laticíferos não articulados têm origem a partir de uma única

célula que apresenta crescimento intrusivo através de espaços intercelulares por todos os tecidos da planta (Mahlberg 1993).

A maioria dos laticíferos de Apocynaceae é descrita como do tipo não-articulado (Mahlberg 1963, Wilson & Malhberg 1978; Inamdar *et al.* 1988; Appezzato-da-Glória & Estelita 1997). Existe grande divergência quando ao tipo e desenvolvimento dos laticíferos descritos para as espécies desta família. Demarco *et al.* (2006) afirmaram que os laticíferos de *Aspidosperma australe* e *Blepharodon bicuspidatum* são articulados após análise cuidadosa. Segundo eles, este tipo de laticífero tem rápida dissolução da parede terminal, o que pode levar a conclusões equivocadas. Um exemplo desse problema ocorre na divergência entre Milanez (1977) e Mahlberg (1963) em relação ao laticíferos de *Nerium oleander*. O primeiro autor afirmou que eles são do tipo articulado, já o segundo do tipo não-articulado. Há casos onde laticíferos articulados e não-articulados ocorrem na mesma espécie, tal como em *Stapelia bella* (Wilson & Maxam 1987). Laticíferos articulados também foram observados em *Vinca sardoa* (Sacchetti *et al.* 1999) e *Mandevilla atrovioleacea* (Lopes 2007). O estudo dos laticíferos em órgãos adultos não possibilita determinar sua origem e por isso é necessário que esse tipo de investigação seja realizado em regiões meristemáticas. Mesmo com a análise das regiões meristemáticas de vários indivíduos, não foi possível determinar a origem dos laticíferos de *S. densiflora*. Talvez a ampliação do número de indivíduos seja necessária para tipificar os laticíferos desta espécie.

Em *S. densiflora*, os laticíferos apresentaram paredes celulares finas e raramente espessadas, o que está de acordo com Mahlberg (1993), que afirmou que as paredes dos laticíferos podem ser tão finas quanto a parede das células parenquimáticas ou muito

grossas. A parede é sempre primária e pode possuir substâncias que selam o sistema laticíferos dos demais tecidos (Fahn 1990).

Muitas funções já foram atribuídas aos laticíferos. Devido à sua distribuição pelo corpo da planta, ele foi comparado ao tecido sanguíneo dos animais. Por estar próximo ao floema, acreditava-se que ele desempenhava a função de auxiliar na translocação de assimilados. Posteriormente, atribuíram a ele a função de reserva nutritiva para planta. Entretanto, foi provado que o material presente no interior do laticífero não era mobilizado em condições desfavoráveis. Atualmente, sabe-se que ele é uma estrutura secretora e que produz várias substâncias que não são reutilizadas no metabolismo primário da planta. Provavelmente, os laticíferos selem ferimentos e protejam as plantas contra o ataque de herbívoros e microorganismos (Fahn 1979).

Coléteres

Coléteres vegetativos são amplamente descritos para Apocynaceae (Thomas 1991; Endress & Bruyns 2000). Em *S. densiflora*, ocorrem de a 9 a 10 por primórdio foliar; essa variação é pequena e pode ser observada em outras espécies da família. Segundo Thomas (1991), o número de coléteres de uma mesma espécie pode variar com a distribuição geográfica.

O coléter do ápice vegetativo do tipo padrão de *S. densiflora* está presente também em *Odontadenia lutea* (capítulo I), ambos os gêneros da tribo Odontadenieae. O coléter padrão ocorre amplamente em gêneros de outras tribos, tais como *Prestonia* (Rio *et al.* 2002) da tribo Echiteae, *Forsteronia* (Rio *et al.* 2005) e *Mandevilla* (Apezato-da-Glória & Estelita 2002) da Mesechiteae. Os coléteres de *S. densiflora* não apresentaram

vascularização, entretanto, há relatos de tecido vascular em coléteres foliares. Martins (Capítulo I) descreveu a presença de xilema no coléter marginal distal (interpeciolar) de *Temnadenia violacea*. Appezzato-da-Glória & Estelita (2000) observaram vascularização nos coléteres interpeciolares de *Mandevilla*. Rio *et al.* (2002) relataram vascularização nos coléteres marginais de *Prestonia coalita*. Segundo Demarco (2005), a presença de tecido vascular pode variar até mesmo entre os diferentes tipos de coléteres encontrados nos órgãos vegetativos. Os coléteres calicinais de *S. densiflora* foram descritos por Simões *et al.* (2006) e por esse motivo não fizeram parte desse estudo.

Nectários

Os nectários de *S. densiflora* são semelhantes ao de outras espécies de Apocynoideae, apresentando-se unido na base e lobados no ápice. Em um dos primeiros estudos realizados, Woodson & Moore (1938) descreveram os nectários florais de Apocynaceae como sendo uma estrutura anelar contínua. Trabalhos mais recentes realizados por Galetto (1997), Torres & Galetto (1998) e Lin & Bernardello (1999) evidenciaram a ocorrência de nectários contínuos na porção basal, mas que se partem formado até cinco lobos na porção apical. Sakane & Shepherd (1986) utilizaram a morfologia do nectário para identificar espécies de *Allamanda*, citando a ocorrência de um disco carnosos que pode ser liso, aneliforme ou lobado. Simões (2004) descreveu a ocorrência de nectários bilobados em *Mandevilla tenuifolia*.

Outra questão divergente é quanto à origem dos nectários. Woodson & Moore (1938) afirmaram que a natureza do nectário é carpelar. Rao & Ganguli (1963) contestaram estes autores e afirmaram a origem receptacular dos nectários; entretanto,

sugeriram que nectários carpelares podem ocorrer em um pequeno grupo de Apocináceas. Fahn (1979) mencionou que a posição e a vascularização dos nectários sugerem origem carpelar para *Vinca rosea* (Apocynaceae). Galetto (1997) estudando espécies de *Mandevilla* e Lin & Bernardello (1999) descrevendo a estrutura floral de *Aspidosperma quebracho-blaco* afirmaram que estes nectários têm origem receptacular. Apesar de ambos apontarem origem receptacular, o nectário é inconspícuo e não vascularizado em *A. quebracho-blaco*, grande e vascularizado por xilema e floema nas espécies de *Mandevilla*.

Referências Bibliográficas

- 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.
- Appezzato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 23: 113-120.
- Appezzato-da-Glória, B. & Estelita-Teixeira, M.E. 1992. Anatomia do sistema aéreo vegetativo de *Mandevilla pohliana* (Stadelm.) A. Gentry (Apocynaceae). *Hoehnea* 19: 39-50.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants. 2nd ed. Intercept, Hampshire.
- Cain, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88: 383-392.
- Clark, G. 1973. Staining procedures. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Castro, M. de M. & Demarco, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structure in plants: a brief review. *Natural product communications* 3: 1205-1376.
- 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.

- Fallen, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 106: 245-286.
- Fahn, A. 1979. *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press Inc., London.
- Fahn, A. 1990. *Plant Anatomy*. Pergamon Press, Oxford.
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16:92-96.
- Fjell, I. 1983. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 3: 383-392.
- Furr, M. & Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.
- Galetto, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192: 127-207.
- Gardner, R.O. 1975. Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology* 50: 315-317.
- Gerlarch, D. 1969. *Botanische mikrotechnik: Eine Einführung*. Georg Thieme, Stuttgart.
- High, O.B. 1948. *Lipids histochemistry*. Oxford University Press, New York.
- Inamdar, J.A.; Murugan, V. & Subramanian, R.B. 1988. Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. *Annals of Botany* 62: 583-588.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Judd, W.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.E. 2002. *Plant Systematics, a phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Kay, Q.O.N.; Daoud, H.D. & Stirton, C.H. 1981. Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Botanical Journal of Linnean Society* 83: 57-84.

- Lersten, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). American Journal of Botany 61: 973-981.
- Lin, S. & Bernardello, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidorperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Science 160: 869-878.
- Lopes, K.L.B. 2007. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Mandevilla atrovioleacea* (Stadelm.) Woodson (Apocynaceae, Apocynoideae) em um afloramento rochoso no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Mahlberg, P.G. 1963. Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander*. II. Origem and development of the nonarticulated laticifers. American Journal of Botany 48: 90-99.
- Mahlberg, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. The Botanical Review 59: 1-23.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technology 23: 99-108.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1983. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- Milanez, F.R. 1977. Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Nerium oleander*. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975: 343-379.
- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987a. Studies in the laticifers of *Vallaris solanacea*. Phytomorphology 37: 209-214.

- Murugan, V. & Inamdar, J.A. 1987b. Organographic distribution, structure and ontogeny of laticifers in *Plumeria alba*. Proceedings of the Indian Academic of Sciences 97: 25-31.
- Pearse, A.G.E. 1985. Histochemistry: theoretical and applied. Vol II. Livingstone, Edinburgh.
- Pizzolato, T.D. 1977. Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid-ferric chloride. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104: 277-279.
- Pizzolato, T.D. & Lillie, R.D. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21: 56-64.
- 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; Castro, M. de M. & Kinoshita, L.S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia colata* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25: 339-349.
- Rio, M.C.S. do; Kinoshita, L.S. 2005. *Prestonia* (Apocynaceae) 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 como subsídio para taxonomia das espécies de *Forsteronia* G.Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28: 713-726.
- Sacchetti, G.; Ballero, M; Serafini, M.; Romagnoli, C.; Bruni, A. & Poli, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in *Vinca sadoa* (Apocynaceae), and endemic plant of Sardinia (Italy). Phytom 39: 265-275.
- Sakane, M. & Shepherd, G.J. 1986. Uma revisão do gênero *Allamanda* L. (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 9: 125-149.

- 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, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P. de; Mentz, L.A. & Petrovick, P. 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^a ed., Editora da UFRGS / Editora da UFSC, Porto Alegre / Florianópolis.
- Solereder, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* 68: 287-305.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989. Histochemistry and senescence of colleter of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). *Annals of Botany* 64: 201-203.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1994. Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 63:9-20.
- Thompson, J.D.; Meinwald, J.; Aneshansley, D. & Eisner, T. 1972. Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science*. 177: 528-530.
- 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.
- Valente, M. da C. 1996. *Mateleia maritima* subsp. *gangliosa* (Vell.) Font. *Anatomia Vegetal* (Asclepiadaceae). *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 34: 145-176.

- Valente, M. da C. & Costa, C.G. 2005. Estudo anatômico da flor de *Marsdenia loniceroidees* E. Fournier (Asclepiadoideae – Apocynaceae). *Rodriguésia* 56: 51-66.
- Wilson, K.J. & Mahlberg, P.G. 1978. Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 65: 98-109.
- Wilson, K.J. & Maxam, T.E. 1987. Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). *American Journal of Botany* 74: 628-638.
- Woodson, R.E. & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-165.

Ginostégio de três espécies de Apocynaceae do cerrado

Introdução

Apocynaceae é caracterizada por possuir uma estrutura floral complexa, com uma progressiva especialização morfológica e funcional de suas partes. Suas flores possuem uma sincronização progressiva do gineceu e androceu em diferentes níveis de fusão posgenital entre essas estruturas, dando origem ao ginostégio. Esse termo foi originalmente usado apenas para membros de Asclepiadaceae, entretanto Fallen (1986) expandiu o uso do termo para Apocynaceae (subfamília Apocynoideae) justificando que apesar de ser uma estrutura com menor complexidade, ela possui morfologia similar e mesma funcionalidade que em Asclepiadaceae. Para Fallen (1986), existe uma evolução progressiva do ginostégio e ela propõe quatro tipos com base na complexidade morfológica, histológica e funcional. No **tipo um**, a cabeça do estilete é morfológicamente indiferenciada e coberta por uma camada uniforme de epiderme secretora, sendo essa a forma mais simples; o **tipo dois** possui um anel superior de tricomas longos, um corpo cilíndrico com epiderme secretora composta por células colunares curtas e uma coroa inferior de tricomas longos; o **tipo três** apresenta a mesma organização do anterior mas com anteras adnadas à cabeça do estilete constituindo o tipo mais complexo e o **tipo quatro** que é semelhante ao dois pela perda secundária das estruturas que capturam o pólen na base da cabeça e do anel superior de tricomas.

O ginostégio tem sido freqüentemente utilizado como uma importante característica nas chaves de identificação taxonômica de Apocynaceae e estudos de filogenia (Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000; Simões & Kinoshita 2002; Simões *et al.* 2007). Apesar disso, poucos são os trabalhos que caracterizam a anatomia de forma detalhada (Woodson & Moore 1938, Rao & Gangulli 1963, Fallen 1986, Galetto 1997, Torres & Galetto 1998, Lin & Bernardello 1999, Simões 2004, Demarco 2005, Rio 2006, Gomes 2006, Simões *et al.* 2007, Marasca 2008). Este trabalho tem o objetivo de descrever a estrutura do ginostégio de *Secondatia densiflora* A.DC., *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr. e *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers e caracterizar a secreção da epiderme da cabeça do estilete de *O. lutea* e *S. densiflora*.

Material e Métodos

Inflorescências com flores em antese e botões florais de diversos estádios de desenvolvimento de *S. densiflora*, *O. lutea* e *T. violacea* foram coletadas em quatro áreas de cerrado do estado de São Paulo: Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, Estação Ecológica e Experimental de Itirapina, Horto Botânico de Bauru e uma área de cerrado no município de Campinas pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Sincroton do CNPq. O material testemunha proveniente de 16 indivíduos foi incorporado ao Herbário UEC: *Odontadenia lutea* (Vell.) Markgr.: Bauru, 10/II/2004, F. Martins (147884 UEC); Mogi-Guaçu, 22/II/2004, F. Martins (147883 UEC; 147885 UEC; 147886 UEC); *Secondatia densiflora* A.DC.: Bauru, 11/VI/2004, F. Martins (147876 UEC; 147877 UEC), 20/VI/2004, F. Martins (147880 UEC; 147881 UEC; 147882 UEC; 147878 UEC); Campinas, 05/VI/2004, F. Martins (147879 UEC); *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers: Bauru,

26/VI/2003, F. Martins (147872 UEC); Campinas, 25/IV/2003, F. Martins (147871 UEC); Itirapina, 23/III/2003, F. Martins (147874 UEC; 147875 UEC); Mogi-Guaçu, 17/IV/2003, F. Martins (147873 UEC). Todo o material foi identificado pela Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita da Universidade Estadual de Campinas e pelo Prof. Dr. André Olmos Simões da Universidade de São Paulo.

O material coletado foi fixado em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Lillie 1948 *in* Clark 1973). Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois de transferido para álcool etílico 70%.

Flores em antese e botões florais foram transferidos para álcool butílico terciário 70 onde permaneceram por aproximadamente sete dias, desidratados em série butílica e incluídos em parafina histológica (Histosec/Merck; Johansen 1940). Secções seriadas transversais e longitudinais com espessura entre 10µm e 14µm foram obtidas em micrótomo rotativo.

Para o estudo estrutural, as secções foram coradas com safranina (CI 50240) alcoólica 1,5% e azul de astra aquoso 1% (Gerlarch 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética (Permout/Fisher).

Testes histoquímicos foram realizados para evidenciar a natureza da secreção produzida pela cabeça do estilete das flores de *O. lutea* e *S. densiflora*. Os testes histoquímicos não foram realizados em *T. violacea* devido à dificuldade em localizar um número mínimo de indivíduos. Os tratamentos realizados foram: vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989); ácido tânico/cloreto férrico para mucilagem

(Pizzolato 1977); azul de alcão (CI 74240) para mucopolissacarídeos ácidos (Pearse 1985); reação PAS (Periodic acid–Schiff reaction; pararosalina CI 42510) para polissacarídeos totais (McManus 1948); reagente de Lugol para amido (Johansen 1940); azul de bromofenol mercúrico (Mazia *et al.* 1953), azul brilhante de comassie (CI 42660) e preto de amido B (CI 20470) para proteínas totais (Fisher 1968); preto de Sudão B (CI 26150) e Sudão IV (CI 26105) para lipídios totais (Pearse 1985); sulfato azul do Nilo (CI 51180) para lipídios ácidos e neutros (Cain 1947); reagente de Nadi para essências e ácidos resiníferos (David & Carde 1964); acetato de cobre/ácido rubeânico para ácidos graxos (Ganter & Jollés 1969); cloreto férrico (Johansen 1940) e dicromato de potássio (Gabe 1968) para compostos fenólicos e reagente de Wagner para alcalóides (Furr & Mahlberg 1981). As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada.

O controle dos testes para substâncias lipofílicas foi realizado com solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v, High 1948). Os materiais foram submetidos a essa solução por um período de 48 horas em temperatura ambiente, logo em seguida fixados em FNT e submetidos aos mesmos tratamentos das demais peças. Os controles para os testes de substâncias hidrofílicas seguem o descrito nos protocolos.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX51 utilizando-se filme Kodak Pro Image 100 e as imagens digitais realizadas em microscópio Olympus BX51 acoplado a câmera digital Olympus E330. As imagens provenientes de fotomicrografias foram digitalizadas no Software Adobe Photoshop 9.0. As escalas das figuras foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

Resultados

O estilete é longo, delgado e cilíndrico em todas as espécies estudadas, sendo delimitado pela porção apical do ovário e pela região basal da cabeça do estilete (Figuras 1, 8, 17-18). A cabeça do estilete pode ser diferenciada em corpo principal e apêndices apicais. O corpo principal tem formato que varia entre cilíndrico e cônico; em seção longitudinal, a cabeça do estilete é cilíndrica (figuras 01, 04, 08, 17-18). Na porção superior da cabeça do estilete, os apêndices apicais são formados pela separação dos carpelos. Na porção inferior do corpo principal da cabeça do estilete das três espécies, um anel formado pela expansão do parênquima fundamental é observado (figuras 01, 04, 08, 10, 17).

A cabeça do estilete é coberta por epiderme secretora nas espécies estudadas. Ela é formada por células alongadas na sua maioria, com paredes finas, citoplasma denso e núcleo evidente (figuras 02, 09, 20). A epiderme secretora recobre os apêndices apicais, inclusive na sua face interior (figura 08, 15-16, 27). A epiderme que recobre o anel na base da cabeça do estilete em todas as espécies não é secretora, sendo inclusive formada por células justapostas, entretanto, é possível observar o acúmulo de secreção na superfície dessas células.

O androceu é formado por cinco estames (figuras 5-7, 11, 12, 22, 24-26) e estão inseridos no tubo da corola (figuras 01, 22). Cada estame é composto por antera, conectivo e filete. A antera de *O. lutea* e *S. densiflora* apresenta um parênquima fundamental de arranjo frouxo, onde é possível observar uma grande quantidade de idioblastos com conteúdo fortemente corado pela safranina (figuras 05, 24). Em contraste, *T. violacea* não possui idioblastos e seu parênquima é compacto (figuras 11-16). Células

com paredes lignificadas são observadas nos tecidos da antera e conectivo de *S. densiflora* (figura 05).

A epiderme da antera voltada para o tubo da corola de *S. densiflora* (figura 05) é formada por células retangulares bem desenvolvidas; na mesma região das demais espécies, a epiderme possui células quadrangulares (figuras 12, 26). Na porção mediana da antera de *S. densiflora*, a expansão do conectivo promove apenas uma aproximação da epiderme secretora da cabeça do estilete e da epiderme do conectivo, não ocorrendo adnação entre estas estruturas (figuras 3-4, 6).

Na porção inferior do conectivo expandido e ao nível do anel da cabeça do estilete de *O. lutea* e *T. violacea*, a epiderme em paliçada do conectivo projeta-se em direção ao anel (figuras 10, 19-21, 25). Essa projeção promove adnação entre estas estruturas (figuras 10, 19) e a formação de regiões delimitadas que apresentam a característica de uma câmara (figuras 06, 24).

Secreção é observada no interior das células epidérmicas (figuras 28, 34) e na superfície externa que reveste a cabeça do estilete. Ela é fortemente corada pela safranina em *T. violacea* (figuras 08-10) e fracamente corada em *O. lutea* e *S. densiflora* (figura 02). Os testes histoquímicos aplicados em *O. lutea* e *S. densiflora* revelaram a presença de uma secreção composta por polissacarídeos e lipídios. A reação positiva ao preto de Sudão B (figuras 32, 37) e ao Sudão IV (figura 38) é observada pela coloração da secreção principalmente no meio externo, sobre as células epidérmicas secretoras (figuras 32, 37-38). As células da epiderme coram-se de azul pelo sulfato azul do Nilo (figuras 33, 39), indicando a presença de lipídios ácidos. A presença de polissacarídeos, incluindo

mucilagem, é constatada pelo resultado fortemente positivo à reação PAS (figura 29), reação de Mayer (figuras 31, 36) e pelo vermelho de rutênio (figuras 30, 35).

Tabela 1. Resultados dos testes histoquímicos aplicados na epiderme secretora da cabeça do estilete de *Odontadenia lutea* e *Secondatia densiflora*.

Tratamentos	Substâncias a serem detectadas	Resultados	
		<i>O. lutea</i>	<i>S. densiflora</i>
reação PAS	polissacarídeos totais	+++ (fig. 29)	+
vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	+ (fig. 30)	+++ (fig. 35)
ácido tânico/cloreto férrico	mucilagem	+++ (fig. 31)	+ (fig. 36)
azul de alcião	mucopolissacarídeos	-	-
	ácidos		
reagente de Lugol	amido	-	-
azul brilhante de comassie	proteínas totais	-	-
azul de bromofenol mercúrico	proteínas totais	-	-
preto de amido B	proteínas totais	-	-
preto de Sudão B	lipídios totais	+++ (fig. 32)	+++ (fig. 37)
Sudão IV	lipídios totais	++	+++ (fig. 38)
sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos	+++ (fig. 33)	+++ (fig. 39)
acetato de cobre/ácido rubeânico	ácidos graxos	-	-
reagente de Nadi	terpenos	-	-
cloreto férrico	compostos fenólicos	-	-
dicromato de potássio	compostos fenólicos	-	-
reagente de Wagner	alcalóides	-	-

Legenda: - = negativo; + = fracamente positivo; ++ = positivo; +++ = fortemente positivo.

Legendas

Figuras 01-03. Secção longitudinal da flor de *Secondatia densiflora*. 01. Vista geral. 02. Epiderme secretora da cabeça do estilete. 03. Epiderme em paliçada do conectivo expandido. A – antera; CE – cabeça do estilete; E – estilete; C – conectivo; Asterisco – secreção. Aumentos: 200µm (1); 100 µm (2-3).

Figuras 04-07. Secção longitudinal e transversais do ginostégio de *Secondatia densiflora*. 04. Cabeça do estilete com epiderme secretora e epiderme em paliçada do conectivo expandido. 05. Região fértil da antera, notar epiderme do conectivo próxima à epiderme da cabeça do estilete. 06. Epiderme em paliçada do conectivo expandido. 07. Porção terminal do estilete evidenciando os apêndices da antera. Asterisco – secreção; A – antera; CE – cabeça do estilete; E – estilete; C – conectivo. Aumentos: 200µm (4); 100µm (5-7).

Figuras 8-10. Seção longitudinal do ginostégio de *Temnadenia violacea*. 08. Vista geral da cabeça do estilete evidenciando os apêndices apicais. 09. Epiderme secretora em paliçada da cabeça do estilete, secreção corada pela safranina. 10. Epiderme em paliçada do anel parenquimático da cabeça do estilete adnata à epiderme em paliçada do conectivo expandido. A – antera; AP – anel parenquimático; CE – cabeça do estilete; Asterisco – secreção; Seta – apêndice apical. Aumentos: 200µm (8); 100µm (9-10).

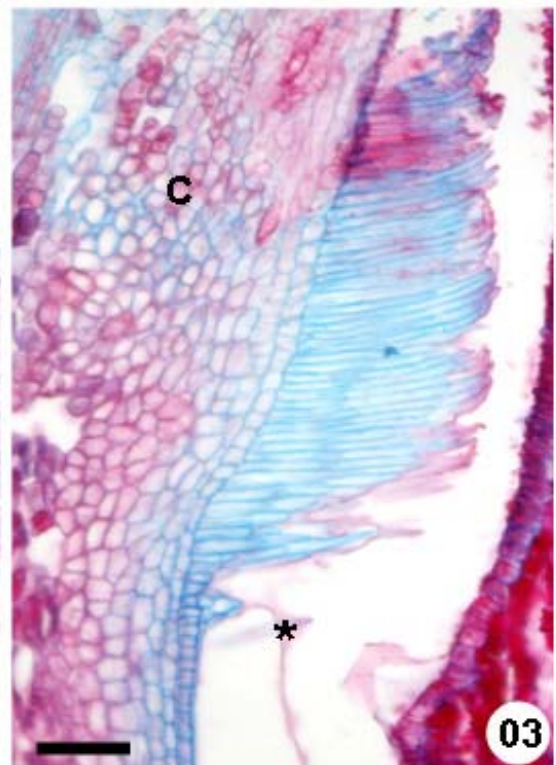
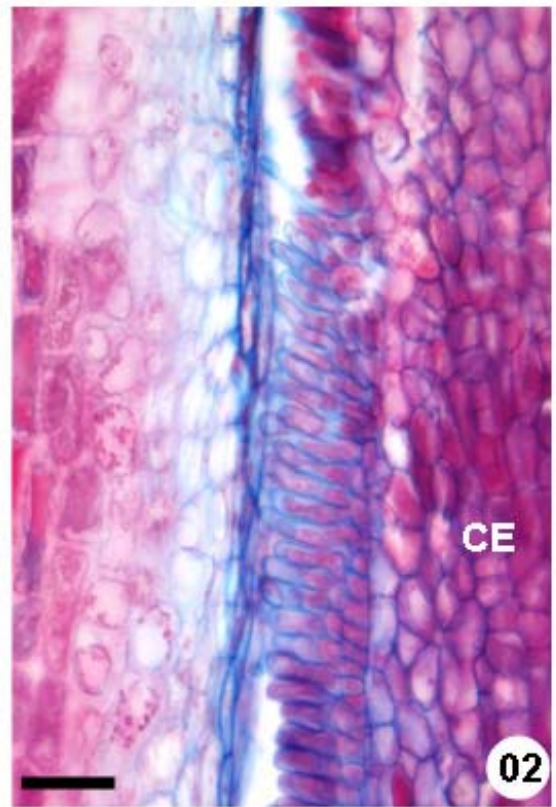
Figuras 11-16. Seção transversal do ginostégio de um botão com 15mm de comprimento de *Temnadenia violacea*. 11. Apêndices apicais. 12. Epiderme secretora da cabeça do estilete. 13. Porção inferior da antera. 14. Epiderme em paliçada do conectivo. 15. Detalhe das células em paliçada do conectivo expandido. 16. Filetes das anteras e estilete. A – antera; AA – apêndice apical; CE – cabeça do estilete; F – filete; C – conectivo. Aumento: 150 μ m.

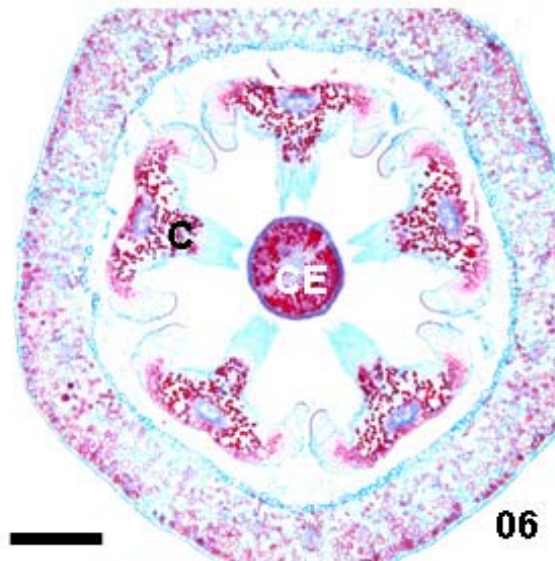
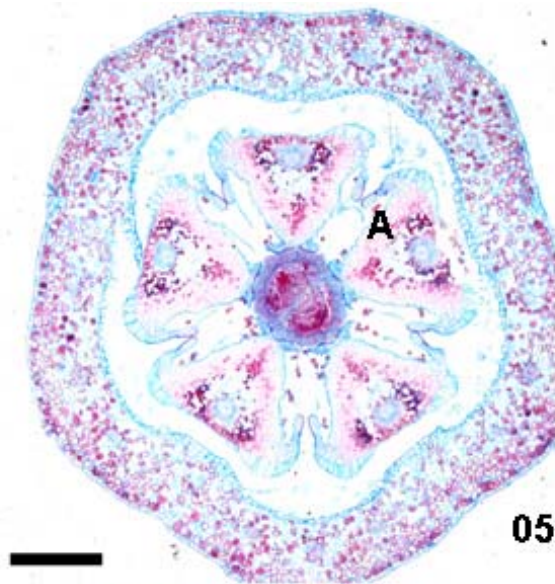
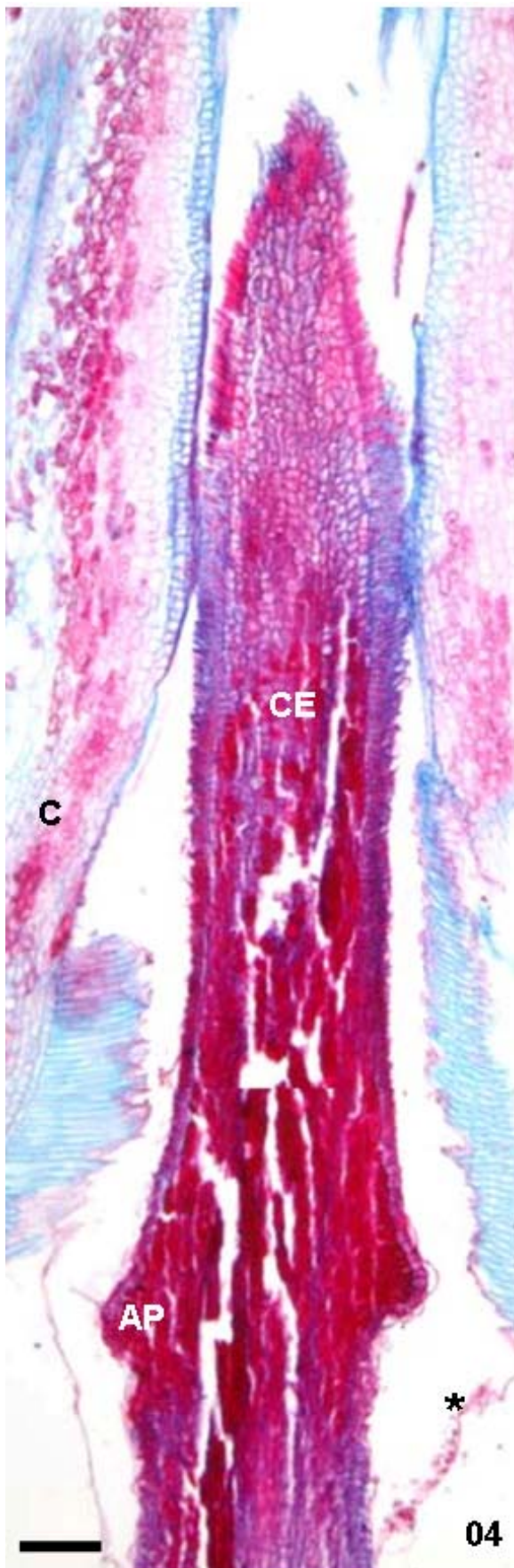
Figura 17-21. Secções longitudinais e transversais do ginostégio de *Odontadenia lutea*. 17. Epiderme secretora e anel parenquimático. 18. Apêndice apical e epiderme secretora da cabeça do estilete. 19. Detalhe da adnação entre epiderme do anel parenquimático e epiderme em paliçada do conectivo expandido. 20-21. Detalhe da epiderme da cabeça do estilete e da epiderme do conectivo expandido. A – antera; AP – anel parenquimático da cabeça; C – conectivo; CE – cabeça do estilete. Aumentos: 150 μ m (17-18); 100 μ m (19-21).

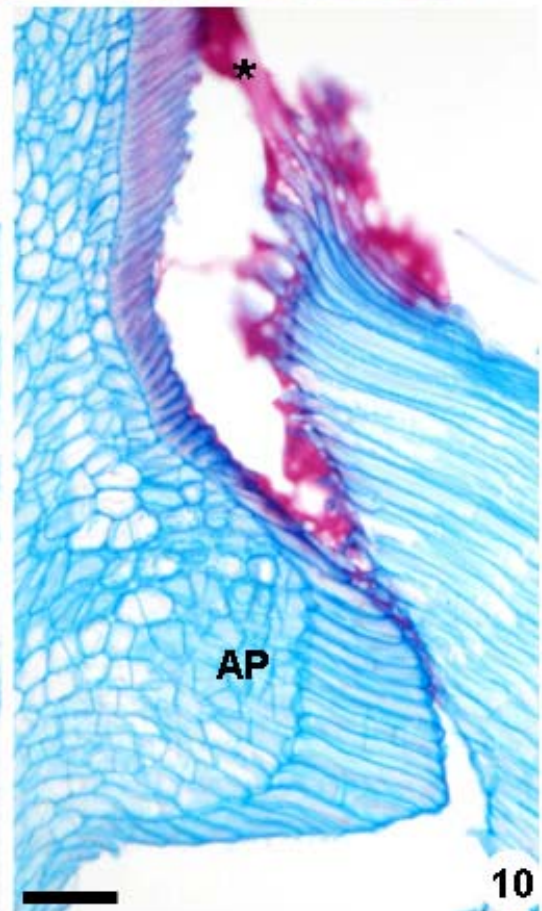
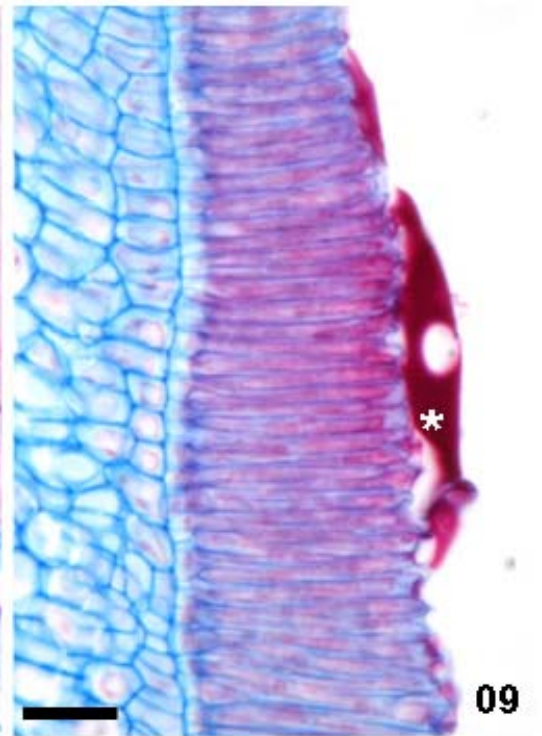
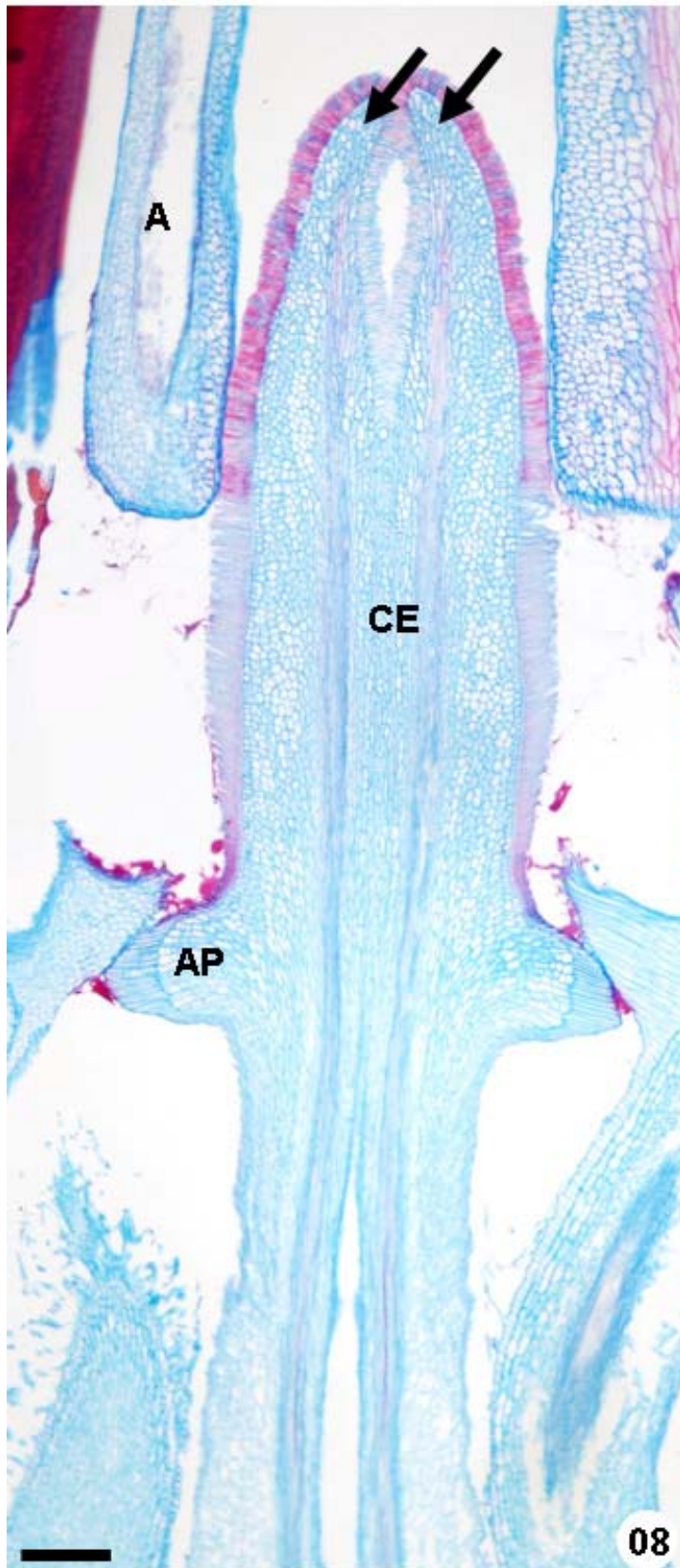
Figuras 22-27. Secções transversais do ginostégio de *Odontadenia lutea*. 22. Tricomas na epiderme do conectivo. 23. Detalhe da porção terminal do estilete. 24. Adnação entre epiderme do conectivo expandido e epiderme da cabeça do estilete. 25. Detalhe da figura 24. 26-27. Região fértil da antera. 27. Pormenor dos apêndices apicais da cabeça do estilete. A – antera; AA – apêndice apical; CE – cabeça do estilete; C – conectivo. Aumentos: 150 μ m (22, 23, 26); 80 μ m (24, 25, 27).

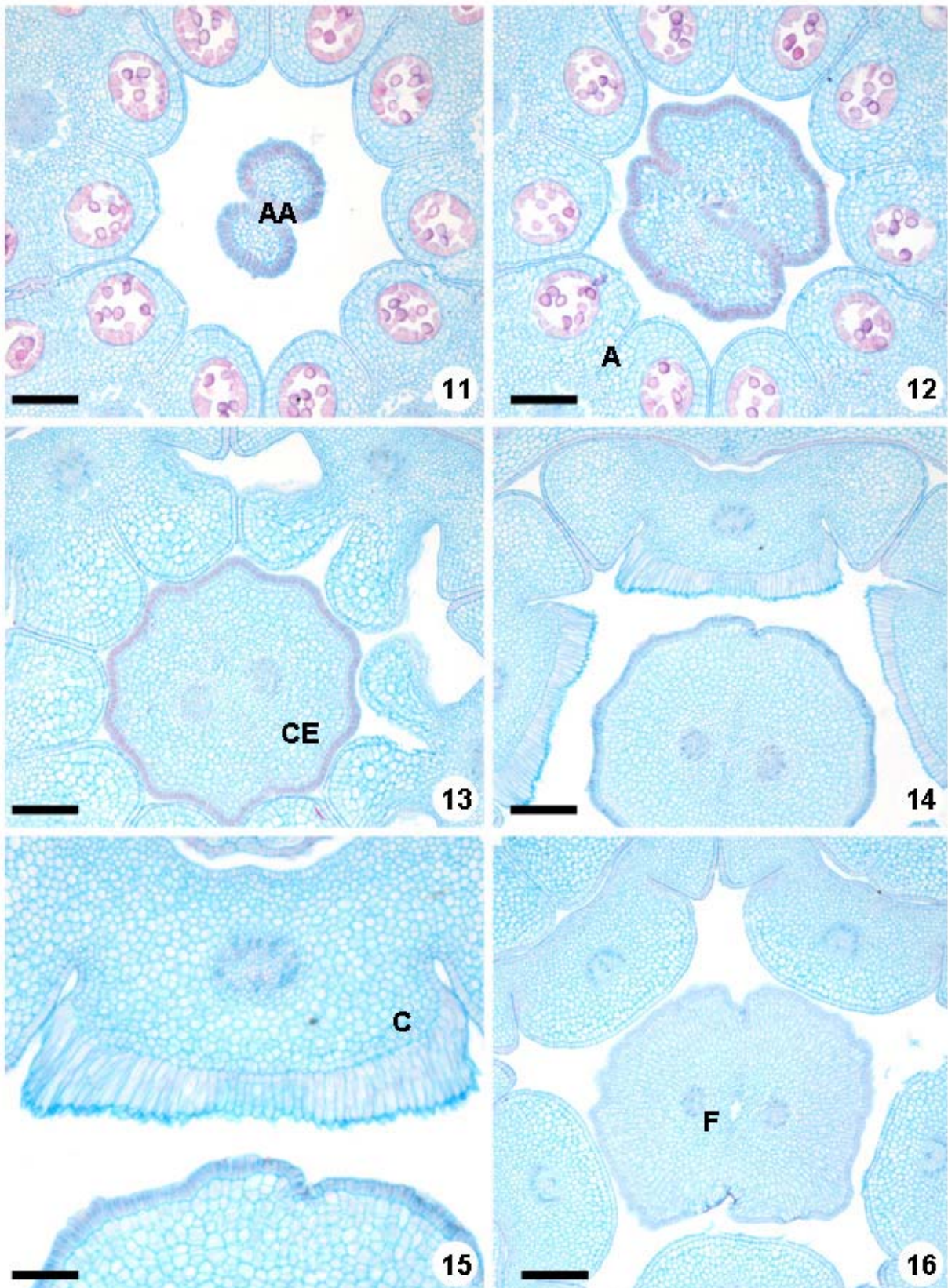
Figuras 28-33. Testes histoquímicos aplicados na epiderme secretora da cabeça do estilete de *Odontadenia lutea*. 28. Azul de astra e safranina. 29. Reação PAS, notar secreção no meio externo. 30. Vermelho de rutênio, secreção nas células epidérmicas. 31. Ácido tânico/cloreto férrico. 32. Preto de Sudão B evidenciando cutícula e secreção nas células epidérmicas. 33. Sulfato azul do Nilo. Asterisco – secreção. Aumento: 50µm.

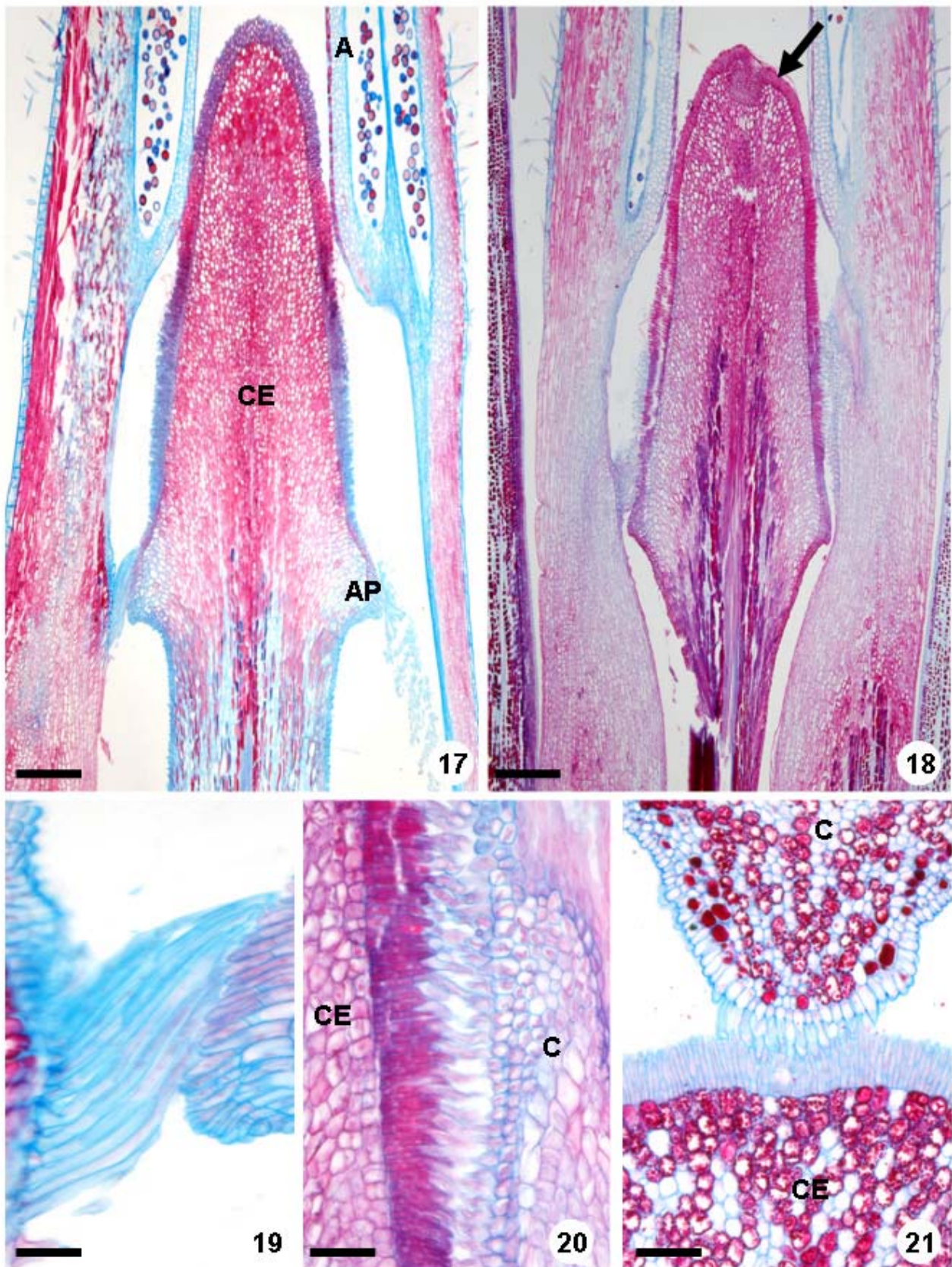
Figuras 34-39. Testes histoquímicos aplicados na epiderme secretora da cabeça do estilete de *Secondatia densiflora*. 34. Azul de astra e safranina. 35. Vermelho de rutênio. 36. Ácido tânico/cloreto férrico. 37. Preto de Sudão B. 38. Sudão IV. 39. Sulfato azul do Nilo. Aumento: 50µm.

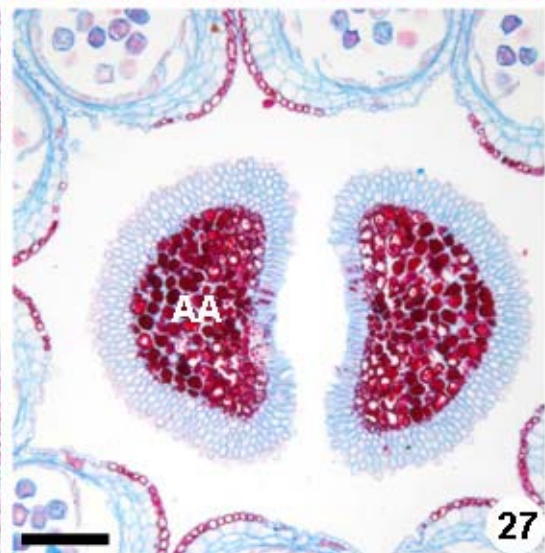
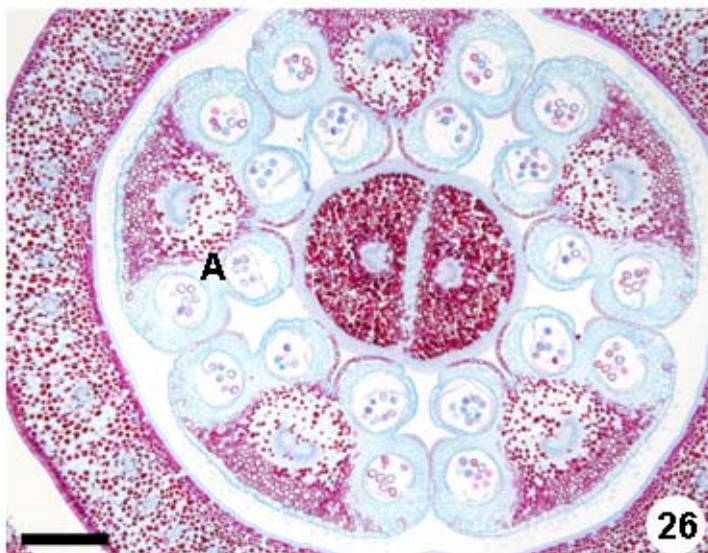
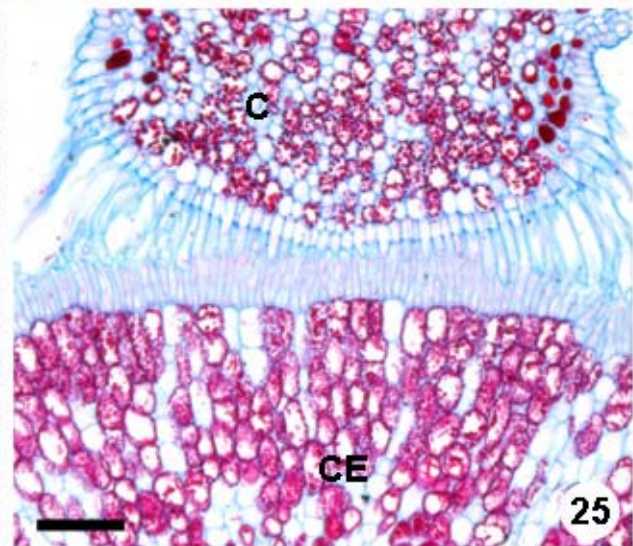
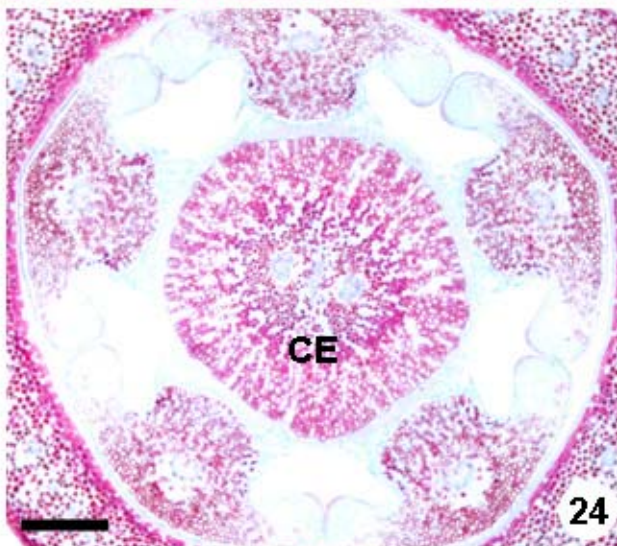
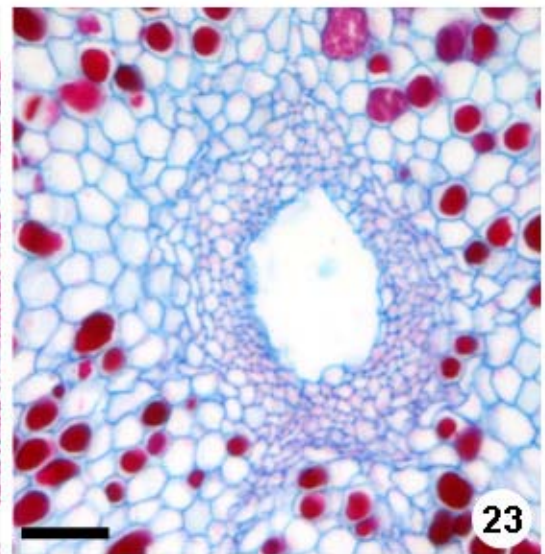
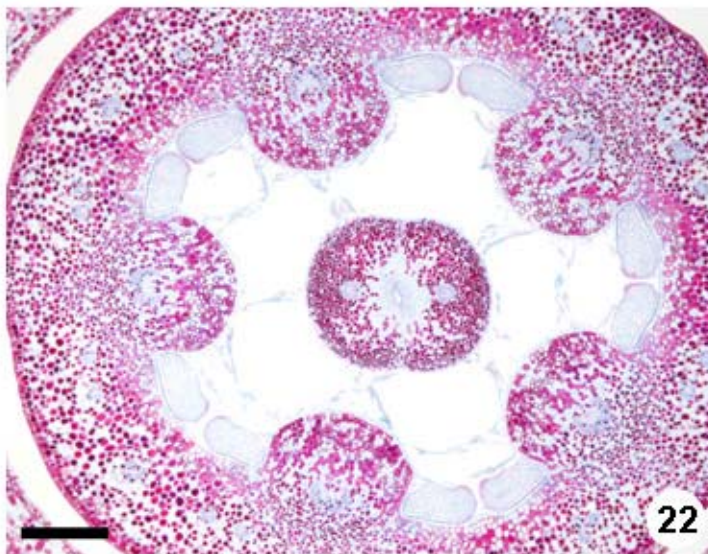


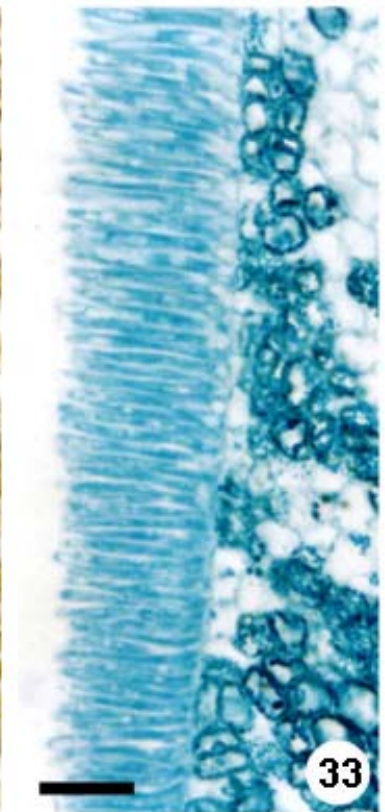
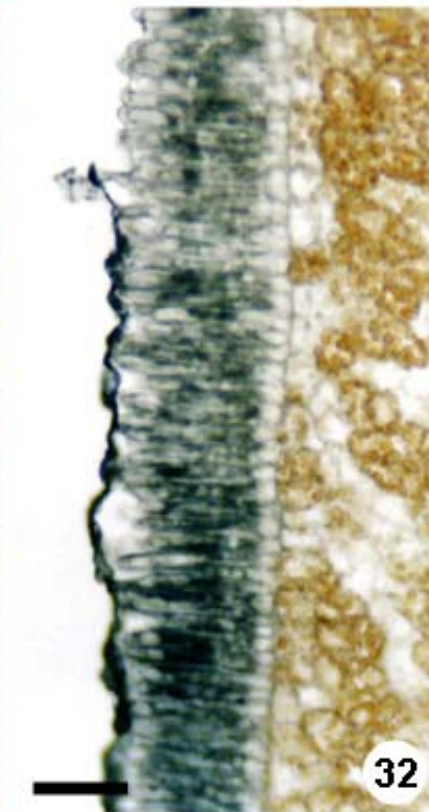
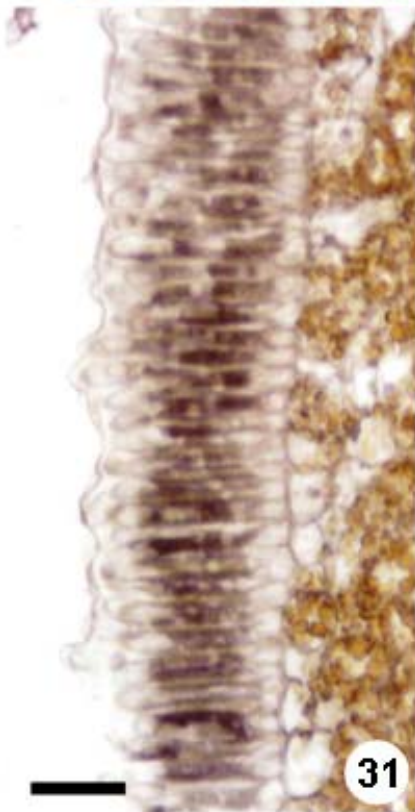
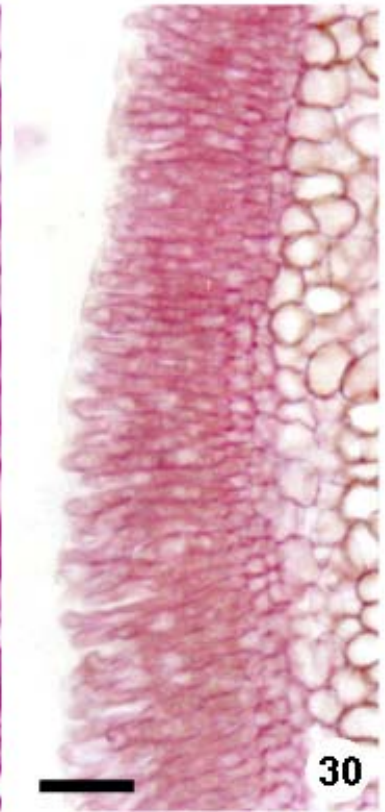
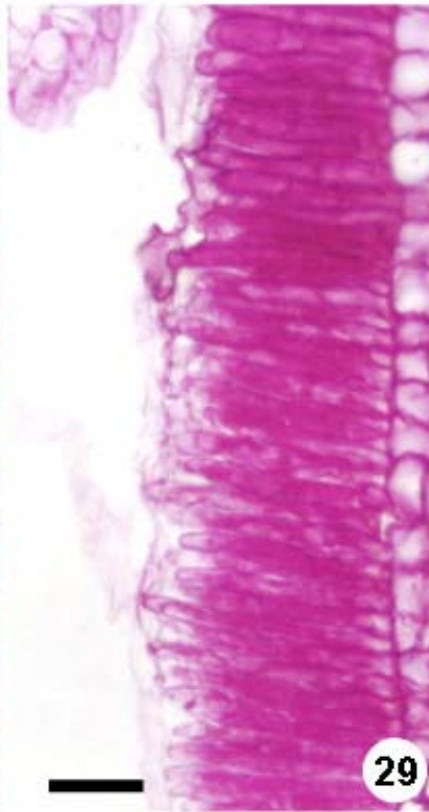
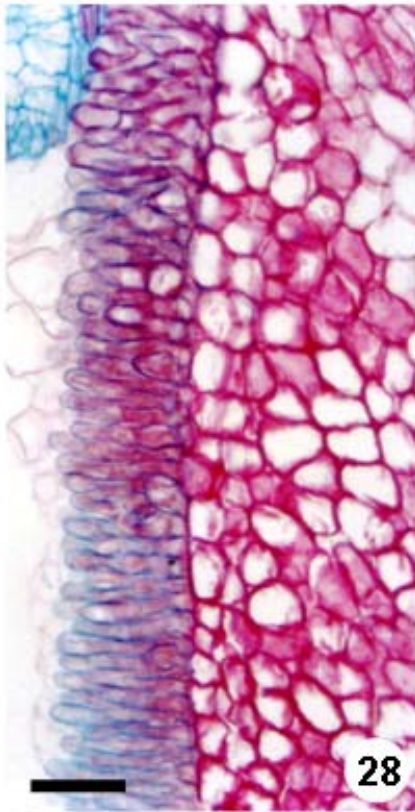


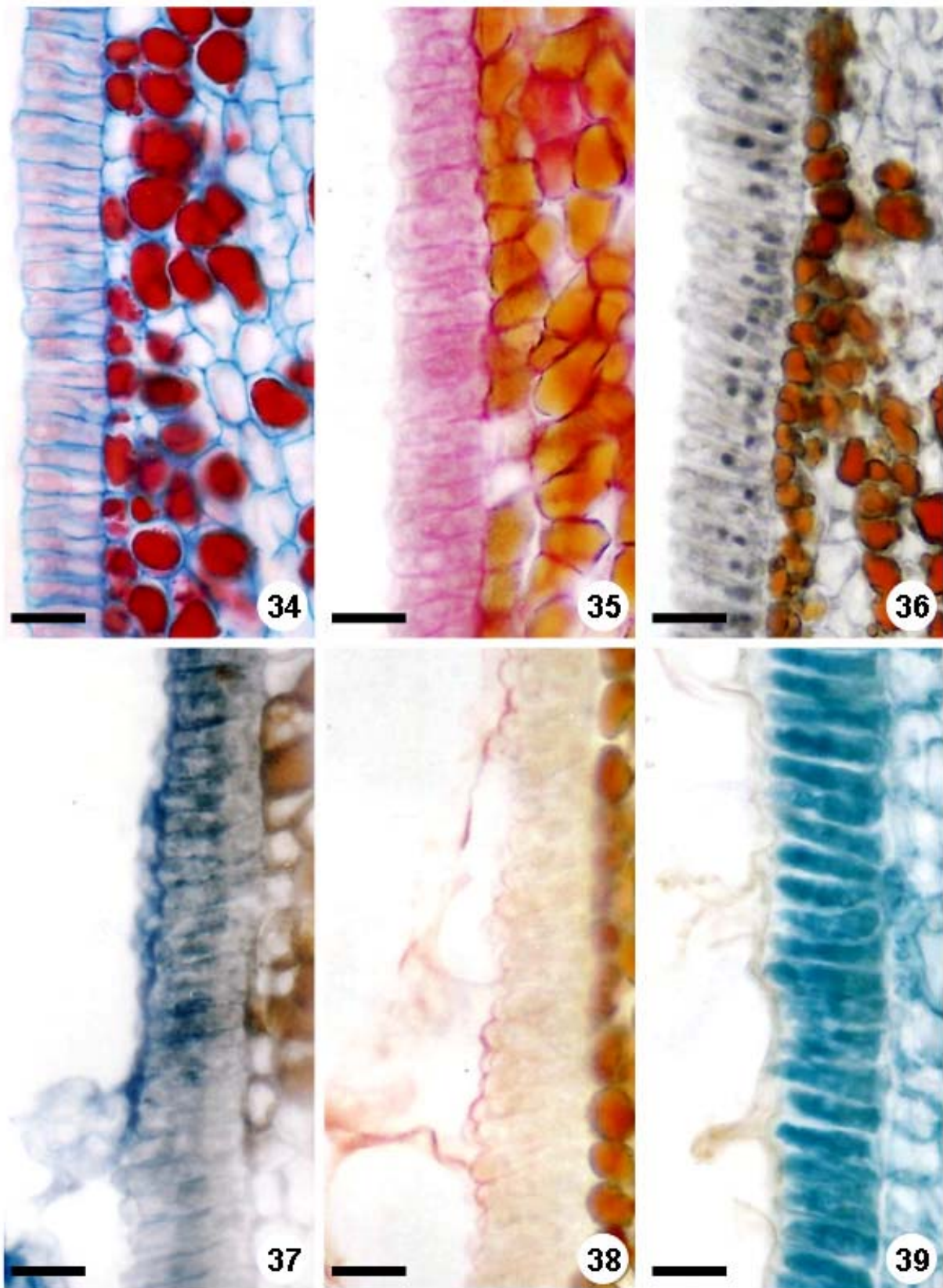












Discussão

A forma da cabeça do estilete das três espécies estudadas apresenta similaridade considerando-se a epiderme secretora, os apêndices apicais e o anel parenquimático. O gênero *Secondatia* foi recentemente reposicionado a partir de análises filogenéticas realizadas por Livshultz *et al.* (2007); esses autores excluíram o gênero da tribo Mesechiteae e incluíram em Odontadenieae, uma nova tribo composta por cinco gêneros, entre eles *Odontadenia*. Simões (2004) descreveu a tribo Mesechiteae como tendo retináculo estaminal constituído por células curtas e fortemente unidas à cabeça do estilete, característica não observadas em *S. densiflora*.

A presença de *Odontadenia* e *Secondatia* na mesma tribo é bem sustentada, pois em ambos há uma similaridade na estrutura da antera e pela presença dos idioblastos fortemente corados pela safranina. Pichon (1950) foi o primeiro a reconhecer a afinidade entre *Secondatia* e *Odontadenia* a partir da similaridade entre o ginostégio dos dois gêneros. A cabeça do estilete de *Odontadenia hoffmannseggiana* foi descrita por Allorge (1976) e mostrou o mesmo padrão descrito para *Secondatia*.

A região formada pela adnação da cabeça do estilete ao estame foi chamada por Pichon (1948) de retináculo. Entretanto Simões *et al.* (2007) discordam dessa denominação por considerar que esse termo é usado para descrever a porção do polinário das subfamílias Asclepiadoideae e Secamonideae que difere na estrutura, composição e origem. Esses autores denominam a estrutura – anteriormente chamada de retináculo por Pichon (1948) – de retináculo estaminal. Em *S. densiflora* e *O. lutea*, o retináculo estaminal promove uma aproximação entre a antera e a cabeça do estilete, entretanto a não ocorre adnação.

Em *T. violacea*, ocorre adnação entre a cabeça do estilete e antera. Isso está de acordo com o descrito por Gomes (2006) para *Prestonia coalita* e *Rhodocalix rotundifolius*, espécies que pertencem à tribo Echiteae. Segundo a autora, a adnação dos tecidos ocorre na região da antera e da cabeça do estilete por células epidérmicas em paliçada.

Os resultados obtidos em todos estes trabalhos justificam a segregação de *Secondatia* proposta inicialmente por Simões (2004) e complementada posteriormente por Livshults *et al.* (2007). Apesar disso, a descrição do comprimento do estilete de *Secondatia* foi divergente do realizado neste trabalho e concorda com o citado por Gomes (2006). Simões *et al.* (2007) descreveram o estilete como sendo uma estrutura curta, o que não foi confirmado aqui. Uma possível explicação para tal diferença pode ser o fato das amostras utilizadas em ambos os trabalhos estarem em diferentes estádios de desenvolvimento ou então uma variação da espécie, entretanto, tal variação não é mencionada na descrição da espécie na Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (Kinoshita *et al.* 2005).

A estrutura da antera observada em *O. lutea* e *S. densiflora* é semelhante. Nestas espécies, o parênquima da antera tem arranjo frouxo, possui vários idioblastos fortemente corados pela safranina e algumas células com parede secundária lignificada. Essa forte coloração pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, já que segundo Gardner (1975), precipitados intracelulares aparecem após a aplicação de corantes básicos como a safranina. A presença desses compostos pode estar relacionada à defesa da planta contra ataque de herbívoros (Bruneton 1999).

Apenas em *O. lutea* e *T. violacea*, a epiderme em paliçada da porção inferior do conectivo expandido projeta-se em direção ao anel parenquimático e estabelece adnação

com a cabeça do estilete. Segundo Gomes (2006), essa é uma segunda zona de adnação e está localizada em uma região estéril. Essa epiderme em paliçada pode estar relacionada com o processo de polinização. Os testes histoquímicos realizados evidenciaram a presença de uma secreção quimicamente heterogênea composta lipídios e polissacarídeos. Esta secreção pode estar relacionada ao processo de polinização, promovendo a adesão do grão de pólen ao agente polinizador e a transferência do pólen a outra flor. Segundo Schick (1982), a morfologia do ginostégio de Apocynaceae está relacionada com o processo de polinização e foi dividido por ele em três regiões funcionais: câmara estigmática, zona de aderência e a zona depositária de pólen.

Referências bibliográficas

- Allorge, L. 1976. Morphologie et biologie florales des Apocynacées – applications taxonomiques. École Pratique des Hautes Études, Paris.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants. 2nd ed. Intercept, Hampshire.
- Cain, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science 88: 383-392.
- Clark, G. 1973. Staining procedures. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- David, R. & Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus de L' Academie des Sciencies (Paris), Série D 258: 1338-1340.
- 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): 1-56.
- Fallen, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. Botanische Jahrbücher für Systematik 106: 254-286.
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92-96.
- Furr, M. & Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products 44: 153-159.
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie, Paris.

- Galetto, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192: 197-207.
- Ganter, P. & Jollés, G. 1969. Histologie normale et pathologique. Vols I e II. Gauthier-Villars, Paris.
- Gardner, R.O. 1975. Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology* 50: 315-317.
- Gerlarch, D. 1969. Botanische mikrotechnik: Eine Einführung. Georg Thieme, Stuttgart.
- Gregory, M. & Baas, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125-174.
- Gomes, S. M. 2006. Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae *s.l.* Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Kinoshita, L. S.; Simões, A. O.; Koch, I.; Sales, M. F.; Rio, M. C. S.; Marcondes-Ferreira, W. 2005. Apocynaceae. *In* Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Wanderly, M. G. L.; Shepherd, G. L.; Giulietti, A. M. (Editores). Rima, São Paulo.
- High, O.B. 1948. Lipids histochemistry. Oxford University Press, New York.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Livshults, T.; Middleton, D.J.; Endress, M.E. & Williams, J.K. 2007. Phylogeny of Apocynoideae and the APSA Clade (Apocynaceae *s.l.*). *Ann. Miss. Bot. Garden* 94: 342-359.
- Lin, S. & Bernardello, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidorperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Science* 160: 869-878.

- Marasca, R. M. 2008. Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.
- Mazia, D.; Brewer, P. A. & Alfert, M. 1953. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin* 104: 57-67.
- Pearse, A.G.E. 1985. *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. II, 4th ed., C. Livingstone, Edinburgh.
- Pichon, M. 1948. Classification de Apocynacées: XIX. Le rétinacle des Echitoïdées. *Bull Mus Nat Hist Nat* 22: 211-216.
- Pichon, M. 1950. Classification de Apocynacées. XXV. Echitoïdées. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., Sér. B., Bot.* 1:1-143.
- Pizzolato, T.D. 1977. Staining of *Tilia* mucilages with Mayer's tannic acid-ferric chloride. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104: 277-279.
- 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 2006. Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey (Apocynaceae) de cerrado. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Schick, B. 1982. Untersuchungen über die Biotechnik der Apocynaceenblüte II. Bau und Funktion des Bestäubungsapparates. *Flora* 172: 347-371.

- 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. 2004. Estudos filogenéticos e anatômicos da tribo Mesechiteae Miers (Apocynaceae, Apocynoideae). Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Simões, A.O; Rio, M.C. do; Castro, M.M, de; 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.
- Torres, C. & Galetto, L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 127: 207-223.
- Woodson, R.E. & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65: 135-165.

Discussão e Considerações Finais

A família Apocynaceae possui uma grande diversidade de estruturas secretoras, que estão distribuídas em órgãos vegetativos e reprodutivos, como coléteres, laticíferos, idioblastos, epiderme da cabeça do estilete e nectários (Solereider 1908; Woodson & Moore 1938; Metcalfe & Chalk 1950, 1979, 1983; Fallen 1983; Thomas 1991; Endress 1994).

A presença de **coléteres** nos ápices vegetativos e reprodutivos da subfamília Apocynoideae foi registrada para todos os gêneros estudados até o momento: *Adenium*, *Aganosma*, *Apocynum*, *Basseia*, *Beumontia*, *Forsteronia*, *Holarrhenia*, *Ichnocarpus*, *Mandevilla*, *Mesechites*, *Nerium*, *Odontadenia*, *Parsonia*, *Prestonia*, *Secondatia*, *Stephanostema*, *Strophanthus*, *Thernardia*, *Temnadenia*, *Trachelospermum*, *Urceola*, *Vallaris* e *Wrightia* (Hansen 1985; Dave *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1989; Thomas & Dave 1989a,b,c, 1991; Thomas 1991; Sennblad *et al.* 1998; Apezato-da-Glória & Estelita 2000; Rio 2001, 2006; Rio *et al.* 2002, 2005; Simões 2004; Simões *et al.* 2006; Capítulo I, II e III).

Os coléteres dessa subfamília foram observados ocupando posição peciolar e interpeciolar, entretanto, eles ocorrem em *O. lutea* numa posição nunca relatada para família (Capítulo I). Essa posição diferenciada pode ser justificada pela persistência das estípulas, ausentes nos demais gêneros estudados. Os coléteres são frequentemente utilizados para justificar novos arranjos taxonômicos entre tribos de Apocynoideae; recentemente Simões *et al.* (2007) justificaram a mudança de *Secondatia* para tribo Odontadenieae e sua exclusão de Mesechiteae com base na estrutura floral; posteriormente Livshults *et al.* (2007) promoveram um rearranjo nas tribos de

Apocynaceae e uniram os gêneros *Secondatia* e *Odontadenia* da tribo Odontadenieae. Apesar da divergência de *Secondatia* com os demais gêneros de Mesechiteae, não ocorre correspondência entre *Odontadenia* e *Secondatia* no que se refere aos coléteres foliares. Além disso, a existência de quatro tipos de coléteres calicinais em *O. lutea* que se diferenciam completamente dos presentes nos órgãos vegetativos coloca a teoria de Woodson & Moore (1938) em questionamento. Essas diferenças evidenciam a importância de um estudo anatômico mais amplo com os demais gêneros de Odontadenieae para identificar caracteres que possam contribuir para consistência taxonômica desta tribo.

Os coléteres vegetativos de *T. violacea* apresentam similaridade estrutural com os de *Prestonia coalita* (Rio *et al.* 2002). Uma característica marcante entre as duas espécies é a presença de tricomas tectores e epiderme não secretora na face dorsal do coléter. Esse é um caráter unificador para a tribo Echiteae, entretanto, um número bem maior de espécies deve ser estudado para confirmar esse caráter, pois apenas estas duas espécies dessa tribo foram estudadas.

Outra característica observada nesse estudo e que difere do proposto como padrão para Apocynaceae foi à morfologia dos coléteres. Segundo Thomas (1991), os coléteres dessa família seriam do tipo padrão, entretanto uma série de trabalhos tem demonstrado que existe diversidade estrutural de coléteres vegetativos e reprodutivos em Apocynaceae e tipos inéditos são descritos à medida que novos trabalhos são realizados. Na subfamília Apocynoideae, coléteres fimbriados foram observados em *Prestonia coalita* (Rio 2001), bifurcados em *Mandevilla pycnantha* e *M. tenuifolia*, laminares em *M. scabra* e sésseis em *Mesechites mansoana* (Simões *et al.* 2006), ramificados em *Forsteronia pubescens* (Rio 2006).

A presença de vascularização nos coléteres calicinais é outra característica divergente do proposto por Woodson & Moore (1938). Esses autores descreveram esses coléteres como sendo desprovidos de vascularização. Em *O. lutea* e *T. violacea*, tecido vascular foi evidenciado e tal característica é comum para família; coléteres calicinais vascularizados foram observados em *Aganosma*, *Funtumia*, *Holarrhena*, *Nerium*, *Prestonia*, *Strophanthus*, *Vallaris* e *Wrightia* (Woodson & Moore 1938; Rao & Gangulli 1963; Dave *et al.* 1987; Thomas & Dave 1989; Rio *et al.* 2002).

Coléteres das três espécies estudadas apresentaram variação no número. A variação numérica foi demonstrada em outros gêneros e desta forma torna-se um caráter de pouco valor taxonômico, devendo ser evitado como caráter diagnóstico para gêneros e espécies da família.

Segundo Fahn (1979), os coléteres liberam uma secreção viscosa (mucilagínosa ou resinosa) que protege e lubrifica meristemas em início de desenvolvimento evitando a sua dessecação. Não houve diferença entre o produto secretado pelos coléteres foliares e os calicinais. A presença de mucilagem nos coléteres das três espécies estudadas confirma a sua função. Além de evitar a dessecação, Demarco (2005) afirmou que eles são capazes de proteger a planta contra o ataque de fitófagos. A liberação da secreção não ocorre por ruptura da cutícula, ao contrário do proposto por Fahn (1990). Estudos ultra-estruturais talvez possam elucidar o processo de liberação da secreção para o meio externo.

Laticíferos do tipo anastomosado estão presentes nos ápices vegetativos e reprodutivos das três espécies estudadas e têm ocorrência universal na família. Eles são motivo de grande divergência quanto à tipologia e origem (Mahlberg 1963, Milanez 1977, Demarco *et al.* 2006). Os laticíferos podem ser formados por uma única célula sendo assim

considerados não articulados ou formados por uma fileira de células sendo denominados articulados (Fahn 1979). Trabalhos realizados por Mahlberg (1963), Wilson & Malhberg (1978), Inamdar *et al.* (1988) e Appezzato-da-Glória & Estelita (1997) descrevem a ocorrência de laticíferos do tipo não-articulado. Em *Aspidosperma australe* e *Blepharodon bicuspidatum*, Demarco *et al.* (2006) descreveram a presença de laticíferos articulados. Segundo eles, a confusão é gerada pela dificuldade em observar a rápida dissolução da parede terminal e que pode levar a conclusões equivocadas. Esse problema ocorreu entre Milanez (1977) e Mahlberg (1963) em relação ao laticíferos de *Nerium oleander*. O primeiro autor afirmou que eles são do tipo articulado, já o segundo do tipo não-articulado.

Para tornar o estudo dos laticíferos mais difícil, laticíferos articulados e não-articulados podem ocorrer na mesma espécie, tal como em *Stapelia bella* (Wilson & Maxam 1987). Um fator relevante para determinar o tipo de laticífero é o estudo de regiões meristemáticas e não de órgãos adultos.

Os laticíferos são estruturas de grande importância, sendo a eles atribuída à função de proteção contra ataque de predadores como herbívoros, fungos e ainda selar ferimentos (Fahn 1979, 1990). Por esses motivos, a presença de laticíferos pode conferir vantagem sobre outras espécies concorrentes que não possuam a estrutura.

Os idioblastos estão presentes nas subfamílias Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae. Em Apocynoideae, eles estão restritos às tribos Apocyneae, Odontadenieae e Mesechiteae. No representante de Echiteae deste estudo, a presença de idioblastos não foi observada; esse resultado está de acordo com o descrito por Rio (2001) para *Prestonia coalita* e pode ser uma característica relevante para delimitação desta tribo. Em *S. densiflora*, uma hipoderme secretora com secreção de aspecto denso semelhante ao

dos idioblastos ocorre no caule secundário. Essa estrutura também foi observada nas folhas adultas de *Forsteronia glabrecens* (Rio *et al.* 2005), *Mandevilla pentlandiana* (Galletto 1997) e *Mandevilla pohliana* (Appenzato-da-Glória & Estelita-Teixeira 1992).

A secreção dos idioblastos parecer ser constituída por compostos fenólicos na maioria das espécies estudadas. Além dos testes histoquímicos realizados, a coloração pela safranina é um forte indicio da presença desses compostos. A ocorrência desses compostos em idioblastos de posição cortical pode ser considerada uma forma de defesa da planta, principalmente contra o ataque de herbívoros, pois são substâncias adstringentes. Os gêneros de Apocynaceae que possuem idioblastos nessa posição e laticíferos podem ser considerados como portadores de duas formas de defesa química. A ocorrência dos idioblastos em órgão reprodutivos pode assegurar a preservação das estruturas diretamente relacionadas à reprodução, como na antera e ovário de *O. lutea* e *S. densiflora*.

O **nectário** de *S. densiflora* têm origem receptacular, sendo semelhante ao descrito em outros membros de Apocynoideae. A formação de lobos a partir de um anel contínuo foi observado por Galletto (1997) em três espécies de Apocináceas da Argentina; Torres & Galletto (1998) em *Mandevilla pentlandiana* e Lin & Bernardello (1999) para *Aspidosperma quebracho-blanco*. Sakane & Sheperd (1986) utilizaram as características do nectário para diferenciação de espécies nativas de *Allamanda*, confirmando o valor taxonômico dessas glândulas para Apocynaceae.

A **cabeça do estilete** é uma estrutura típica de Apocynaceae e possui um grande valor taxonômico (Fallen 1986; Endress & Bruyns 2000; Simões *et al.* 2007). Mudanças na posição de gêneros foram efetuadas por Simões *et al.* (2007) após analisar a estrutura da

cabeça do estilete de *S. densiflora*; esse estudo levou a exclusão desse gênero da tribo Mesechiteae e sua inclusão em Odontadenieae juntamente com *O. lutea*. Já em *T. violacea*, a morfologia da cabeça do estilete é semelhante à de *Prestonia coalita* e *Rhodocalix rotundifolius* (Gomes 2006), todas espécies de Echiteae. Além da similaridade da cabeça do estilete entre espécies da mesma tribo, a ausência de idioblastos é outra característica marcante, que contribui para delimitação desse grupo.

Essa nova delimitação taxonômica é sustentada pela morfologia da cabeça do estilete, sendo que tal afinidade já tinha sido observada por Pichon (1950) e Allorge (1976). Esse estudo concorda com o novo posicionamento taxonômico dos gêneros *Secondatia* e *Odontadenia*, a presença de idioblastos secretores e a estrutura da antera em ambas as espécies corroboram para isso. No que se refere aos coléteres e a cabeça do estilete, há diferenças entre essas duas espécies.

Apesar de um número relativamente grande de espécies de Apocynaceae já ter sido estudado anatomicamente, é necessário que novos trabalhos sejam realizados, principalmente para verificar se as novas proposições taxonômicas podem ser sustentadas por caracteres anatômicos. Além disso, o estudo anatômico poderá contribuir para o esclarecimento de espécie com posicionamento incerto.

Referencias bibliográficas

- Aguiar, S. 2003. Morfologia e ontogenia de frutos e sementes de espécies de Apocynaceae do cerrado do estado de São Paulo. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Allorge, L. 1976. Morphologie et biologie florales des Apocynacées – applications taxonomiques. École Pratique des Hautes Études, Paris.
- 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.
- Appezzato-da-Glória, B. & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 23: 113-120.
- Appezzato-da-Glória, B. & Estelita-Teixeira, M.E. 1992. Anatomia do sistema aéreo vegetativo de *Mandevilla pohliana* (Stadelm.) A. Gentry (Apocynaceae). Hoehnea 19: 39-50.
- Arekal, G.D. & Ramakrishna, T.M. 1980. Extrafloral nectaries of *Caloptropis gigantea* and *Wattakaka volubilis*. Phytomorphology 30: 303-306.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants. 2nd ed. Intercept, Hampshire.
- Dave, Y.; Thomas, V. & Kuriachem, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosma caryophyllata*. 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): 1-56.
- Endress, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biological of tropical flower. University Press, Cambridge.
- Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press Inc., London.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- Fallen, M.E. 1986. Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 106: 254-286.
- Galetto, L. 1997. Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora* 192: 197-207.
- Gomes, S. M. 2006. Ontogênese floral com ênfase no estudo do gineceu em Apocynaceae s.l. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Gomes, S.M.; Kinoshita, L.S.; Castro, M. do M. 2008. Hemisincarpia e nectário apendicular enfocados através de ontogênese floral em *Mandevilla velame* (A.St.-Hil.) Pichon, Apocynoideae. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 81-93.
- Hansen, B.F. 1985. A monographic revision of *Forsteronia* (Apocynaceae). PhD Thesis. University of South Florida, Tampa.

- Inamdar, J.A.; Murugan, V. & Subramanian, R.B. 1988. Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. *Annals of Botany* 62: 583-588.
- Joly, A.B. 1977. Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. 4ª Ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional.
- Judd, W.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.E. 2002. Plant Systematics, a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc, Sunderland.
- Lin, S. & Bernardello, G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidorperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. *International Journal of Plant Science* 160: 869-878.
- Livshults, T.; Middleton, D.J.; Endress, M.E. & Williams, J.K. 2007. Phylogeny of Apocynoideae and the APSA Clade (Apocynaceae s.l.). *Ann. Miss. Bot. Garden* 94: 342-359.
- Mahlberg, P.G. 1963. Embriogeny and histogenesis in *Nerium oleander*. II. Origem and development of the nonarticulated laticifers. *American Journal of Botany* 48: 90-99.
- Marasca, R. M. 2008. Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1983. Anatomy of the dicotyledons. Wood structure and conclusion of the general introduction. Clarendon Press, Oxford.

- Milanez, F.R. 1977. Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Nerium oleander*. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975: 343-379.
- Mohan, J.S.S. & Inamdar, J. R. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectarines of *Plumeria rubra* L. Annals of Botany 57: 389-401.
- Oliveira, F. de & Akissue, G. 1989. Fundamentos da Farmacobotânica. Livraria Atheneu, São Paulo.
- Pichon, M. 1950. Classification de Apocynacées. XXV. Echitoïdées. Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., Sér. B., Bot. 1:1-143.
- 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 *Forsteronia* G.Mey (Apocynaceae) de cerrado. 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 foliares de *Prestonia coliata* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica 25: 339-349.
- Rio, M.C.S. do & Kinoshita, L.S. 2005. *Prestonia* (Apocynaceae) no Sul e Sudeste do Brasil. Hoehnia 32(2): 233-258.

- 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(4):713-726.
- Riet-Correa, F.; Mendez, M. C. & Schild, A. L. 1993. Intoxicação por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Hemisfério Sul do Brasil, Porto Alegre.
- Rizzini, C.T. & Mors, W. B. 1976. Botânica econômica brasileira. EDU, São Paulo.
- Sakane, M. & Shepherd, G.J. 1986. Uma revisão do gênero *Allamanda* L. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 9: 125-149.
- Sennblad, B.; Endress, M.E. & Bremer, B. 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe *Wrightieae* (Apocynaceae) revised. *American Journal of Botany* 85: 1143-1158.
- 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 colleter of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 387-398.
- Simões, A.O; Rio, M.C. do; Castro, M.M, de; 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.E. 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. Clarendon Press, Oxford.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2005. Botânica sistemática., Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Subramanian, R.B.; Murugan, V.; Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1989. Optical microscopic studies on the structure and secretions of resin glands in some Apocynaceae. Proceedings of Indian Academy Sciences (Plant Sciences) 99: 423-429.
- Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. Annals of Botany 68: 287-305.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989a. Histochemistry and senescence of colleter of *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae). Annals of Botany 64: 201-203.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989b. The colleter of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). Indian Botanical Contactor 6: 25-29.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989c. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland Apocynaceae). Korean Journal of Botany 32: 163-172.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1990. Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). Phytion 30: 209-212.
- Thomas, V. & Dave, Y. 1991. Comparative and phylogenetic significance of colleters in Apocynaceae. Feddes Repertorium 102: 23-28.
- Thomas, V; Dave, Y & Menon, A.R.S. 1989. Anatomy and hystochemistry 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.

- Wilson, K.J. & Mahlberg, P.G. 1978. Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 65: 98-109.
- Wilson, K.J. & Maxam, T.E. 1987. Ultrastructure of articulated laticifers in *Stapelia bella* (Asclepiadaceae). American Journal of Botany 74: 628-638.
- Woodson, R.E. & Moore, J.A. 1938. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. Bulletin of the Torrey Botanical Club 65: 135-165.
- Yoder, L.R. & Mahlberg, P.G. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), American Journal of Botany 63: 1167-1173.