

CLÁUDIO SOUZA DE AZEVEDO

**ANATOMIA E ULTRA-ESTRUTURA FOLIAR DE *Pectis brevipedunculata*:
ONTOGENIA DE CAVIDADES SECRETORAS E ESTRUTURA KRANZ**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2007

CLÁUDIO SOUZA DE AZEVEDO

ANATOMIA E ULTRA-ESTRUTURA FOLIAR DE *Pectis brevipedunculata*: ONTOGENIA
DE CAVIDADES SECRETORAS E ESTRUTURA KRANZ

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de março de 2007

Prof. Adilson A. Zacaro
(Co-Orientador)

Prof. Marco Antonio Oliva Cano
(Co-Orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Fernando Henrique Aguiar Vale

Prof^a Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

*À minha família. Meus pais Gildo e
Sahra, minhas irmãs e meus sobrinhos.
Nada se compara à importância da
minha família.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que as coisas aconteçam e por colocar pessoas especiais em meu caminho;

À professora Marília Contin Ventrella, pela orientação;

Ao professor Adilson A. Zacaro, pela amizade, pela disponibilidade e por não medir esforços para a conclusão deste trabalho;

À minha “irmãzinha” Roberta Silva, que se preocupou comigo mais que qualquer um;

À todos os companheiros que conheci neste período, especialmente os amigos e amigas do mestrado, todos muito especiais;

Aos amigos da secretaria do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, que foram verdadeiros;

Às instituições onde trabalho em Governador Valadares, Universidade Vale do Rio Doce e Colégio Presbiteriano, por compreenderem minha condição e se esforçarem para adequar meus horários;

A todos os professores, colegas e amigos que passaram comigo por esta etapa;

À minha amiga Beatriz Brasileiro, que de professora, passou a amiga de trabalho, meu agradecimento especial;

À minha família, que eu tanto amo. Mãe, pai, minhas irmãs e meus sobrinhos, que são o que eu tenho de melhor;

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Viçosa, por ter aberto as portas para que este meu sonho pudesse ser concretizado.

BIOGRAFIA

CLÁUDIO SOUZA DE AZEVEDO, filho de Gildo Alves de Azevedo e Sahra Souza de Azevedo nasceu em Governador Valadares, Minas Gerais, em 29 de abril de 1981.

Em dezembro de 2002, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE.

Em fevereiro de 2005, iniciou o programa de Mestrado em Botânica na Universidade Federal de Viçosa, seguindo a linha de pesquisa de Anatomia de Plantas Vasculares, defendendo tese em março de 2007, sob a orientação da professora Marília Contin Ventrella e co-orientação dos professores Adilson A. Zacaro e Marco Antonio Oliva Cano.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1: Anatomia foliar e caracterização ultra-estrutural da estrutura Kranz em <i>Pectis brevipedunculata</i> (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae)	5
Resumo	5
Introdução	6
Material e Métodos	7
Resultados	10
Discussão	22
Conclusões	25
Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de cavidades secretoras em folhas de <i>Pectis brevipedunculata</i> (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae): anatomia e ultra-estrutura	29
Resumo	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados	33
Discussão	40
Conclusões	42
Referências Bibliográficas	43

RESUMO

AZEVEDO, Cláudio de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007.
Anatomia e ultra-estrutura foliar de *Pectis brevipedunculata*: ontogenia de cavidades secretoras e estrutura Kranz. Orientadora: Marília Contin Ventrella. Co-Orientadores: Adilson A. Zacaro e Marco Antonio Oliva Cano.

Com o uso de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura, este trabalho caracteriza a anatomia foliar de *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae), enfatizando a estrutura Kranz e a ontogenia das cavidades secretoras. A folha é anfiestomática e possui simetria dorsiventral relativamente bem definida. Apresenta mesofilo radiado circundando os feixes vasculares, bainha desenvolvida e dimorfismo estrutural entre os cloroplastos do mesofilo e os cloroplastos da bainha, caracterizando a estrutura Kranz na espécie. Os cloroplastos do mesofilo são menores, têm estrutura granal bem definida, com grãos de amido. As células da bainha do feixe têm disposição centrífuga, seus cloroplastos são maiores, com regiões de tilacóides não empilhados mais evidentes e com grande quantidade de grãos de amido. Plasmodesmos mostram-se abundantes entre as células do mesofilo e as células da bainha. As cavidades secretoras são esquizógenas quanto à origem e desenvolvimento inicial, e lisígenas na fase de maturação. Deste modo, são esquizolisígenas. As células secretoras são caracterizadas por citoplasma elétron-denso com gotas lipídicas, grandes vacúolos com aspecto granular, mitocôndrias com cristas tubulares e plastídios com gotículas de óleo, o que sugere que a secreção seja lipofílica.

ABSTRACT

AZEVEDO, Cláudio de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007.

Leaf anatomy and ultrastructure of *Pectis brevipedunculata*: secretory cavity development and Kranz structure. Adviser:: Marília Contin Ventrella. Co-Advisers: Adilson A. Zacaro and Marco Antonio Oliva Cano.

This work describes the leaf anatomy of *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae), with emphasis in Kranz structure and secretory cavity development, using light microscopy and transmission and scanning electron microscopy techniques. The leaf is amphistomatic and possesses a well determined dorsiventral symmetry. The leaf shows radial mesophyll around the vascular bundle, developed vascular bundle sheaths and structural dimorphism of the mesophyll and the vascular bundle sheath chloroplasts, which determines the Kranz structure of this species. The mesophyll chloroplasts are smaller, shows starch grains and its granal structure is well defined. The vascular bundle sheath are centrifugally arranged, and its chloroplasts are bigger, with stalked tillacoids less pronounced and a large quantity of starch grains. Plasmodesmata are abundant between the mesophyll and bundle sheath cells. The secretory cavities are schyzogenous considering its origin and initial development, nevertheless they are lisigenous in the maturity stage. These features demonstrate that these secretory cavities are schizolisigenous. Secretory cells are characterized by electron dense cytoplasm with lipid drops, large vacuoles with granular content, mitochondria with tubular crystae and plastids with oil droplets, suggesting its that secretion as lipophilic.

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies de *Pectis* (Asteraceae) são utilizadas medicinalmente por comunidades tradicionais contra dores estomacais, cólicas (Schultes & Raffauf, 1990), hipertensão, gripes e resfriados (Agra et al., 2007). O gênero *Pectis* está incluído na tribo *Tageteae*, que compreende 18 gêneros, com 230 a 250 espécies americanas, comuns em locais moderadamente a extremamente xéricos, em solos argilosos ou calcários, sendo os planaltos do México o maior centro de diversificação do grupo. Dos 18 gêneros subordinados à tribo, apenas *Pectis*, *Porophyllum* e *Tagetes* têm representantes no Brasil. *Pectis* é representado por ervas anuais ou perenes, subarbustos ou arbustos com folhas opostas ou alternas, simples, inteiras, bipinatífidas ou pinatissectas, glabras ou pilosas, com longas cerdas nos bordos e com cavidades ou glândulas secretoras perlúcidas, conspícuas, cheias de óleos essenciais de cheiro ativo (Barroso et al., 1991). Analisando a tribo *Tageteae*, Smith & Turner (1975) verificaram que apenas o gênero *Pectis* apresenta a síndrome C₄ em todas as espécies estudadas, o que sugere uma posição distinta deste gênero na tribo *Tageteae*.

Plantas com fotossíntese C₄ ocorrem em muitas famílias e demonstram consideráveis variações estruturais e fisiológicas. As variações estruturais nas plantas C₄ vão desde a compartimentalização extrema de cloroplastos usualmente dimórficos em diferentes células e tecidos até a distribuição destes cloroplastos em regiões distintas de um mesmo tipo de célula (Edwards et al., 2001; Voznesenskaya et al., 2002; Sage, 2002). A estrutura Kranz está relacionada com a compartimentalização de cloroplastos e de enzimas carboxilativas associadas em diferentes regiões. Nesse arranjo anatômico, cloroplastos com organização granal bem definida e geralmente desprovidos de grãos de amido localizam-se no mesofilo, composto por células de disposição radiada em torno do feixe vascular, enquanto que cloroplastos maiores, com predomínio de tilacóides não granais e grãos de amido, localizam-

se em células volumosas da bainha do feixe vascular (Laetsch, 1974; Fahn and Cutler, 1992; Edwards et al., 2001)

Idioblastos, laticíferos, cavidades, canais, tricomas glandulares e osmóforos constituem as principais estruturas secretoras de metabólitos secundários presentes nos diferentes grupos de plantas. Algumas características citológicas que evidenciam alta atividade metabólica são comuns às células secretoras, como paredes primárias delgadas, núcleo grande, citoplasma hialino ou denso, vacúolos pequenos e abundantes e mitocôndrias numerosas (Fahn, 1979). Assim como outras estruturas secretoras, as cavidades presentes em folhas de plantas vasculares são caracteres taxonômicos relevantes e de grande importância, por terem origem, muitas vezes, em famílias relacionadas (Vieira et al., 2001).

Cavidades secretoras são comuns em muitas famílias de Angiospermas, e em Asteraceae (Metcalf & Chalk, 1950), são formadas por grandes espaços intercelulares delimitados por células secretoras especializadas, as quais se originam por separação ou lise de células (Fahn, 1979; Turner, 1999). Embora muitos estudos relacionem as cavidades à produção de material lipídico (Fahn, 1979; Curtis & Lersten, 1986; Roshchina & Roshchina, 1993), a secreção destas estruturas parece ser heterogênea (Cicarrelli et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar anatômica e ultra-estruturalmente a folha de *P. brevipedunculata*, com ênfase na análise da estrutura Kranz e no desenvolvimento das cavidades secretoras.

O trabalho foi redigido na forma de dois capítulos, intitulados: “Anatomia foliar e caracterização ultra-estrutural da estrutura Kranz em *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae)” e “Desenvolvimento de cavidades secretoras em folhas de *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae): anatomia e ultra-estrutura”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. 2007.** Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **111**:383-395.
- Barroso GM, Peixoto AL, Costa CG, Ichaso CLF, Guimarães EF, Lima ACde. 1991.** *Sistemática de angiospermas do Brasil*. v.3. Viçosa: Editora UFV.
- Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. 2001.** Translucent glans and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* **88**: 637-644.
- Curtis JD, Lersten NR. 1986.** Development of bicellular foliar secretory cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **73**: 79-86.
- Edwards GE, Franceschi VR, Ku MSB, Voznesenskaya EV, Pyankov VI, Andreo CS. 2001.** Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C₄ plants. *Journal of Experimental Botany* **52**(356):577-590.
- Fahn A, Cutler DF 1992.** *Xerophytes*. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Oxford: Pergamon Press.
- Laetsch WM. 1974.** The C₄ syndrome: a structural analysis. *Annual Review of Plant Physiology* **25**:27-52.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the dicotyledons*. v.2. Oxford:Clarendon Press.
- Roshchina VV, Roshchina VD. 1993.** *The excretory function of higher plants*. New York: Springer-Verlag.
- Sage RF. 2002.** C₄ photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy. *Trends in Plant Science* **7**(7):283-285.
- Schultes RE, Raffauf RF. 1990.** *The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia*. v.2. Portland. Dioscorides Press.

Smith BN, Turner BL. 1975. Distribution of Kranz' syndrome among Asteraceae.

American Journal of Botany **62**: 541-545.

Turner GW. 1999. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. *The Botanical Review* **65**:1-7.

Vieira RC, Delprete PG, Leitão GG, Leitão SG. 2001. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia Formosa* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **88**: 2151 -2156.

Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE. 2002. Proof of C₄ photosyntheseis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *The Plant Journal* **31**(5):649-662.

CAPÍTULO 1

Anatomia foliar e caracterização ultra-estrutural da estrutura Kranz em *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae)

RESUMO – Este trabalho descreve a anatomia foliar de *Pectis brevipedunculata* e caracteriza a ultra-estrutura da estrutura Kranz, com o uso de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura. A folha é anfiestomática e possui simetria dorsiventral relativamente bem definida. Apresenta mesofilo radiado circundando os feixes vasculares, bainha desenvolvida e dimorfismo estrutural entre os cloroplastos do mesofilo e os cloroplastos da bainha define a estrutura Kranz na espécie. Os cloroplastos do mesofilo são menores, têm estrutura granal bem definida com grãos de amido. As células da bainha do feixe têm disposição centrífuga, seus cloroplastos são maiores, com regiões de tilacóides não empilhados mais evidentes e com grande quantidade de grãos de amido. Plasmodesmos mostram-se abundantes entre as células do mesofilo e as células da bainha.

Introdução

A família Asteraceae é a maior entre as angiospermas, representada por cerca de 25.000 espécies, distribuídas em aproximadamente 1.600 gêneros. A família é cosmopolita e apresenta maior diversidade em formações vegetacionais campestres e montanhosas, sendo baixa sua diversidade em florestas úmidas (Barroso et al., 1991). Segundo Bremer (1994), *Pectis* L. é o gênero da tribo Helenieae que possui maior número de espécies, aproximadamente 100 espécies. A subtribo Pectidinae é geralmente tratada como tribo, sendo na maioria das vezes, citada como tribo Tageteae, onde o gênero *Pectis* está incluído (Bremer, 1994). Segundo este mesmo autor, a tribo Helenieae é representada por ervas de folhas opostas e capítulos amarelos e a subtribo Pectidinae é facilmente reconhecida por visíveis cavidades secretoras perlúcidas na face abaxial das folhas e pela presença de brácteas involucrais dos capítulos. De acordo com Smith & Turner (1975), apenas as espécies do gênero *Pectis* apresentam a estrutura Kranz dentro da tribo *Tageteae*. Isto sugere que o gênero ocupe uma posição distinta dos demais gêneros dentro da tribo.

A estrutura Kranz é comumente associada a plantas C4, onde há formação de ácidos dicarboxílicos com quatro carbonos como produtos primários durante a fotossíntese (Laetsch, 1974). O nome desta síndrome ou padrão anatômico foi estabelecido a partir da disposição radiada das células do parênquima clorofiliano, as quais associam-se a uma bainha de células grandes com cloroplastos proeminentes ao redor do feixe vascular e que, em corte transversal, lembra uma coroa (Kranz, em alemão) (Laetsch, 1974; Fahn, 1989; Fahn & Cuttler, 1992; Larcher, 2004). A presença de cloroplastos morfologicamente diferentes em células parenquimáticas do mesófilo e da bainha indica uma compartimentalização funcional (Edwards et al, 2001). A posição estratégica dos tecidos de assimilação, muito próximos dos tecidos vasculares, evidencia o transporte rápido e eficiente entre essas regiões, evitando a inibição do processo fotossintético pelo acúmulo de produtos finais (Laetsch, 1974).

Embora a estrutura Kranz já tenha sido considerada como caráter essencial para a fotossíntese C₄, vários estudos demonstram que este ciclo fotossintético também pode estar associado a outros padrões anatômicos, desde pequenas variações da estrutura Kranz até a compartimentalização de cloroplastos dimórficos e enzimas carboxilativas em regiões distintas de uma única célula do parênquima clorofiliano (Voznesenskaya et al., 2001, 2002; Edwards et al., 2001; Sage, 2002). Plantas C₄ também podem apresentar consideráveis variações no mecanismo fotossintético. Na família Poaceae, por exemplo, três tipos bioquímicos de plantas C₄ têm sido identificados de acordo com o mecanismo de doação de CO₂ dos ácidos de 4 carbonos para a rubisco (ribulose 1,5 - bisfosfato carboxilase – oxigenase), sendo que para cada um desses tipos existe um conjunto de características anatômicas e ultra-estruturais próprias (Voznesenskaya et al; 2005).

Espécies C₄ são encontradas em muitas famílias de Angiospermas, como Amaranthaceae, Aizoaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Poaceae, Nyctaginaceae, Portulacaceae e Zygophyllaceae, o que mostra sua origem polifilética e recente do mecanismo, embora a maioria das espécies se concentre nas Poaceae e Caryophyllales. Características comuns entre plantas C₄ são sua origem tropical e vasta ocorrência em ambientes xerofíticos (Laetsch, 1974).

Este trabalho tem por finalidade caracterizar a anatomia e a ultra-estrutura da folha de *Pectis brevipedunculata* através de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão, destacando aspectos da estrutura Kranz.

Material e Métodos

Indivíduos jovens e adultos de *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae) foram coletados em áreas urbanizadas do Campus II da Universidade Vale do

Rio Doce (UNIVALE) em Governador Valadares, MG, sempre em áreas abertas e bem iluminadas, como ruas pavimentadas com pedras, beiradas de calçadas e de trilhos de trem.

Várias coletas foram realizadas entre junho de 2005 e outubro de 2006, sendo coletados entre 5 e 10 indivíduos férteis e 15 a 20 plantas jovens a cada coleta. Em todas as coletas realizadas, o material foi encontrado em floração.

Material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, sob a inscrição VIC 9302 e também no Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a inscrição BHCB 38.694, em Belo Horizonte, MG.

Microscopia de Luz

Ramos com folhas em diferentes fases do desenvolvimento foram fixados em FAA₅₀, por 48 horas, e conservados em etanol 70% (Johansen, 1940). Fragmentos de folhas com aproximadamente 0,25cm² foram desidratados em série etílica crescente e incluídos em metacrilato (Historesin-Leica), para a obtenção de seções transversais (2-5µm), longitudinais (2µm) e paradérmicas (2µm), em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica Microsystems Inc., Deerfiel, USA). A coloração dos cortes foi feita com azul de toluidina a 0,05% em tampão fosfato (O'Brien et al., 1964) para análise geral da estrutura foliar. A identificação dos sítios de produção de amido primário na folha foi feita com ácido periódico/reagente de Schiff (PAS, "periodic acid-Schiff") (Feder & O'Brien, 1968). Alguns cortes corados com azul de toluidina também foram seqüencialmente contra-coradas com lugol, também para a detecção de amido primário. A montagem das lâminas foi feita em resina sintética (Permout). Para a identificação de compostos de natureza lipídica, amostras fixadas em FAA₅₀ foram seccionadas em micrótomo de mesa, em seguida tratadas com sudan red B (Brundrett et al., 1991) e montadas em glicerina 50%.

Para o estudo da venação foliar e das células epidérmicas, folhas inteiras foram diafanizadas com clorofórmio por uma hora, tratadas com hidróxido de sódio 10% por duas

horas e hipoclorito de sódio 20% até clarificação completa. Depois de cada um destes tratamentos efetuou-se lavagem das folhas em água corrente. Após a clarificação, as folhas foram coradas com solução aquosa de violeta cristal 1%, desidratadas em série alcoólica/xilólica crescente e montagem em resina sintética (Permount). A técnica de dissociação de epiderme também foi empregada para a análise deste tecido, utilizando-se a solução de Jeffrey (ácido crômico e ácido nítrico 10%, na proporção de 1:1) e azul de astra e safranina como corantes (Johansen, 1940). Em seguida, o material foi desidratado em série etanólica/xilólica crescente e montagem em resina sintética (Permount). A descrição da venação foi feita de acordo com Hickey (1973). As imagens foram obtidas em microscópio de luz (Olympus AX-70) equipado com sistema U-photo acoplado a microcomputador com o programa Spot-Basic, no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram utilizadas folhas completamente expandidas, fixadas em FAA₅₀ por 24 horas e estocadas em etanol 70%. As folhas foram desidratadas em série etílica crescente, secas em ponto crítico com CO₂ (Bal-Tec CPD 030) e fixadas em suportes metálicos (stubs) com fita adesiva dupla-face. Após a metalização com ouro (20nm, Balzers SCA 010), as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP) a 10,6 kV do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O material coletado foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2, por quatro horas a 4°C e lavado no mesmo tampão por seis vezes, 10 minutos cada. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M, por quatro horas a 4°C e lavado no mesmo tampão por seis vezes, 10 minutos cada. Após a

desidratação em série etílica crescente, o material foi embebido em resina epóxi (Spurr). Seções ultrafinas (60-90nm) foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrotomo MT2-B (Du Pont-Sorval), coletadas em grades de cobre cobertas ou não com Formvar e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As seções foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109) a 80kV, do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Resultados

Microscopia de Luz (ML) e Eletrônica de Varredura (MEV)

As folhas de *Pectis brevipedunculata* são opostas e sésseis (Fig. 1A-B), com a base do limbo envolvendo o caule. A epiderme é unisseriada, formada por células volumosas, em ambas as faces da folha. Na face abaxial, as paredes anticlinais das células epidérmicas apresentam-se sinuosas (Fig. 1C, E), e na face adaxial, com contorno curvo (Fig. 1D,F). As células epidérmicas que acompanham a nervura mediana são mais alongadas e com paredes anticlinais retas em ambas as faces (Fig. 1D, 4H). A parede periclinal externa das células epidérmicas é mais espessa que as demais, principalmente na região da nervura principal, com deposição de uma camada delgada de cutícula, que juntamente com a porção mais externa da parede, formam estrias (Fig. 1G, I, 4G, I). A maioria dos estômatos é anisocítico (Fig. 1E-F, 4I), com uma das três células subsidiárias menor que as demais. Os estômatos estão presentes em ambas às faces da folha, dispostos no mesmo nível das demais células epidérmicas e com cristas fortemente cutinizadas (Fig. 1G,H).

Tricomas tectores ocorrem ao longo da nervura mediana, em ambas as faces da folha, mais abundantes na porção basal da folha e ausentes na porção apical. Na face abaxial, os tricomas são unisseriados e, geralmente, formados por três células (Fig. 1J, 4B, E), enquanto

que na face adaxial, são mais alongados e finos, sempre unisseriados e formados por um número maior de células (Fig. 1K, 4H).

O mesofilo é composto por parênquima clorofiliano com discreta diferenciação dorsiventral, organizando-se radialmente em relação aos feixes vasculares (Fig. 2A). Na porção adaxial, as células do parênquima clorofiliano são um pouco mais alongadas e justapostas, enquanto que na face abaxial apresentam formato mais arredondado e maiores espaços intercelulares. No mesofilo ainda ocorre uma camada de células parenquimáticas, dispostas paralelamente à epiderme, na face abaxial da folha, com contorno sinuoso, muitos espaços intercelulares e cloroplastos em pequeno número e tamanho reduzido.

Na nervura mediana (Fig. 2B), o feixe vascular é acompanhado dorsiventralmente por parênquima de preenchimento, compostos por células volumosas, isodiamétricas e sem cloroplastos, mais abundante na porção basal da folha e mais escasso em direção ao ápice. Na região basal da folha, as células da bainha do feixe vascular da nervura mediana também são desprovidas de cloroplastos, assim como algumas células do mesofilo e da bainha dos dois feixes adjacentes.

Os feixes vasculares são colaterais (Fig. 2C), sempre circundados por uma bainha de células parenquimáticas, com muitos cloroplastos em posição centrífuga. Amido é encontrado tanto nos cloroplastos do mesofilo como nos cloroplastos da bainha do feixe vascular, quando submetidos ao teste para amido (Fig. 2C) e para polissacarídeos (Fig. 2D); no entanto, a reação é sempre mais intensa e abundante nas células da bainha.

No bordo foliar encontram-se emergências (Fig. 2E-F, 4A-C), apesar de macroscopicamente semelhantes a tricomas. As emergências são revestidas por células epidérmicas e, no seu interior, observam-se vascularização, fibras e células parenquimáticas. As emergências encontram-se distribuídas da região basal até a região mediana da folha e, o ápice foliar, apresenta uma emergência longa e terminal.

Na superfície abaxial da folha são observadas, macroscopicamente, regiões de coloração mais escura, as quais estão ausentes na face adaxial (Fig. 1B). Estas regiões correspondem às cavidades secretoras e encontram-se distribuídas por todo o mesofilo, estreitamente associadas aos feixes vasculares (Fig. 3A). As cavidades são isodiamétricas, e se projetam em direção à epiderme da face abaxial. As células epidérmicas em contato com o epitélio secretor das cavidades são muito achatadas, menores e menos sinuosas que as demais células epidérmicas nessa face da folha, têm núcleo conspícuo e parede mais delgada, sendo reconhecidas como células de cobertura (Fig. 3B, 4F).

A nervura principal ou de primeira ordem (Fig. 3C-D) é a que mais se destaca macroscopicamente, apresentando elementos traqueais de metaxilema escalariformes e reticulados, além dos elementos do protoxilema anelados e espiralados. A venação é penada do tipo craspedódroma na região basal até parte da região mediana da folha, onde as nervuras secundárias terminam nas margens onde se situam as emergências (Fig. 2F). Em direção ao ápice, a venação é do tipo broquidódroma (Fig. 3D), onde nervuras de segunda ordem fundem-se, formando a nervura intramarginal, a qual se dispõe paralelamente à margem foliar. As nervuras de segunda ordem ramificam-se até duas vezes, e se anastomosam formando aréolas bem desenvolvidas, atravessadas por terminações (“veinlets”) simples ou ramificadas dicotomicamente até duas vezes. As terminações vasculares são compostas por traqueídes e circundadas por células da bainha (Fig. 3D-E).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na face abaxial, as células do mesofilo são sinuosas, apresentam reentrâncias e espaços intercelulares bem definidos (Fig. 5A?). O vacúolo é volumoso e com partículas de material elétron-denso em algumas áreas, restringindo o citoplasma à região parietal, apresenta cloroplastos pequenos contendo grãos de amido e plastídeos com estroma mais elétron-denso e organização não usual. As células do mesofilo em contato direto com a

bainha do feixe vascular, em ambas as faces da folha, apresentam grande vacúolo central e citoplasma restrito à periferia, onde se distribuem os cloroplastos em toda a extensão do citoplasma (Fig. 5B). As paredes das células do mesofilo são mais delgadas que as da bainha do feixe vascular, e grande número de plasmodesmos são encontrados interligando células do mesofilo e da bainha, estabelecendo um *continuum* citoplasmático entre essas duas regiões (Fig. 5B). Nas células da bainha, os cloroplastos são mais numerosos e próximos às paredes internas que têm contato com o feixe vascular e, em posição oposta, um vacúolo volumoso, onde vesículas com partículas eletrondensas são observadas (Fig. 5B). Os cloroplastos do mesofilo (Fig. 6A-B) são relativamente menores que os cloroplastos da bainha (Fig. 6C-D) e também apresentam grãos de amido desenvolvidos e em número variável. A diferença mais marcante entre os cloroplastos do mesofilo e da bainha do feixe é o grau de empilhamento dos tilacóides. Nos cloroplastos do mesofilo, os tilacóides granais são mais abundantes e os grana mais espessos e largos (Fig. 6B), enquanto que nos cloroplastos da bainha, os tilacóides agranais predominam, sendo poucas as áreas onde há empilhamento de tilacóides (Fig. 6D).

Nos feixes vasculares (Fig. 7A) estão presentes elementos de tubo crivado, células companheiras ordinárias e células de transferência, assim como elementos de vaso. Células parenquimáticas de maior diâmetro localizam-se entre os elementos de vaso e as células floemáticas com paredes mais espessadas. Os elementos de tubo crivado apresentam plastídeos contendo amido e plastídeos com depósitos eletrondensos, muito provavelmente, proteínas (Fig. 7B). As células de transferência têm paredes com muitas invaginações, principalmente nas faces voltadas para as células da bainha e para as células parenquimáticas do feixe (Fig. 7C-D). Nas faces voltadas para os elementos de tubo crivado e para as células companheiras ordinárias as invaginações são escassas.

As células de transferência têm vacúolos proeminentes na região central, grandes plastídeos com grãos de amido (Fig. 7C) e o restante do citoplasma próximo as invaginações da parede (Fig. 7D), onde muitas mitocôndrias são observadas (Fig. 7E). As células

companheiras ordinárias também apresentam vacúolos proeminentes, assim como cloroplastos e mitocôndrias. Os elementos de vaso têm diâmetro relativamente pequeno, quando comparado às demais células do feixe vascular (Fig. 7A), e o espessamento da parede secundária é do tipo anelado ou espiralado (Fig. 7F), o que pode ser observado, em corte transversal, pelo formato de semicírculo.

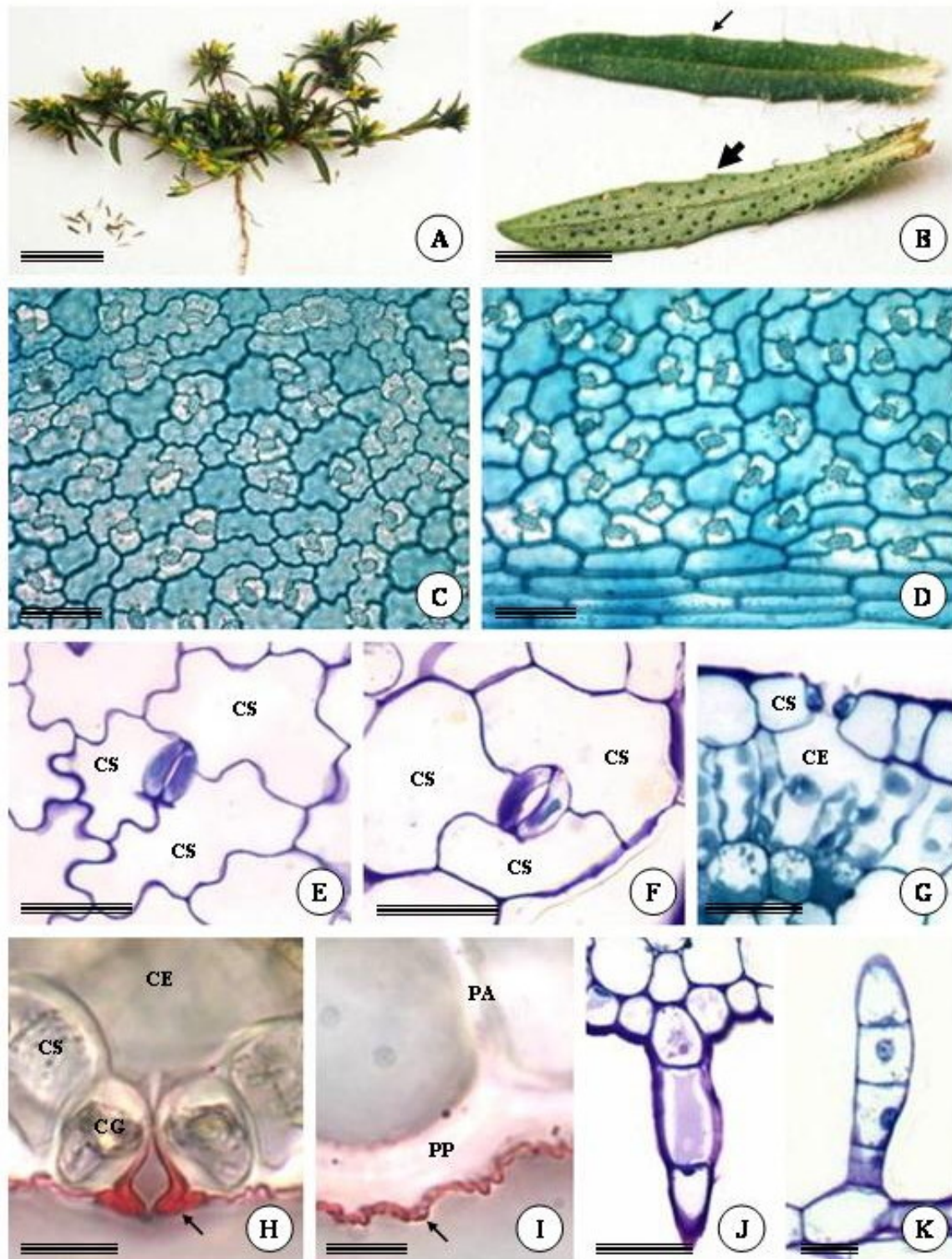


Figura 1. A, Espécime adulto de *Pectis brevipedunculata*. B, aspecto geral da face adaxial (seta estreita) e abaxial (seta larga) da folha. As cavidades secretoras destacam-se na face abaxial da folha como pontos escuros. C-K, fotomicrografias da folha: seções paradérmicas (C-F) e transversais (D-K). C-D, epiderme da face abaxial (C) e da face adaxial (D). As células epidérmicas que acompanham a nervura mediana são mais alongadas que as demais. E-F, estômatos e células subsidiárias na face abaxial (E) e adaxial (F). G-H, complexo estomático corado com azul de toluidina (G) e sudan red B (H). As cristas estomáticas (seta) apresentam-se fortemente cutinizadas. I - detalhe das paredes anticlinal e periclinal externa da epiderme com cutícula (seta) evidenciada pela coloração com sudan red B. J-K, tricoma tector da face abaxial (J) e adaxial (K). CE, câmara subestomática; CG, célula guarda; CS, célula subsidiária; PA, parede anticlinal; PP, parede periclinal externa. Barra: A, 25mm; B, 5mm; C-D, 100µm; E-G, 50µm; H-I, 10µm; J-K, 25µm

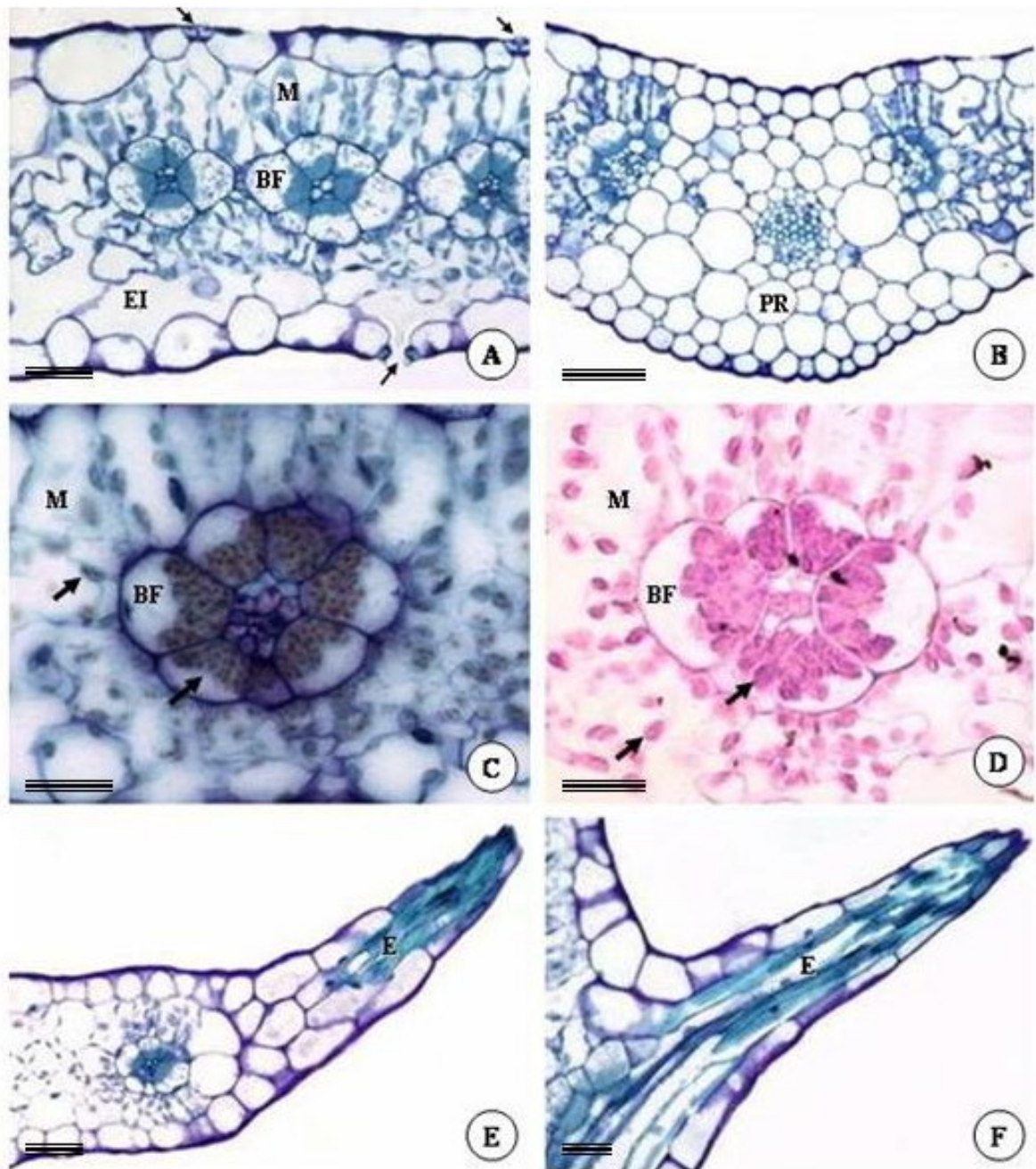


Figura 2. Fotomicrografias de seções transversais (A-E) e paradérmicas (F) da folha de *Pectis brevipedunculata*. A, região do mesófilo com células arranjadas radialmente em relação aos feixes vasculares com estômatos (setas) em ambas as faces. B, região da nervura principal, na base da folha, com grande quantidade de parênquima de preenchimento. C-D, células do mesófilo e da bainha do feixe vascular com grãos de amido (setas) nos cloroplastos. Em C, grãos de amido são corados de marrom pelo lugol e em D, corados de magenta com o teste de PAS. E-F, emergência no bordo foliar, com vascularização e tecido parenquimático. BF, bainha do feixe vascular; E, emergência; EI, espaço intercelular; M, mesófilo; PR, parênquima de preenchimento. Barra: A, E-F, 50 μ m; B, 100 μ m; C-D, 25 μ m

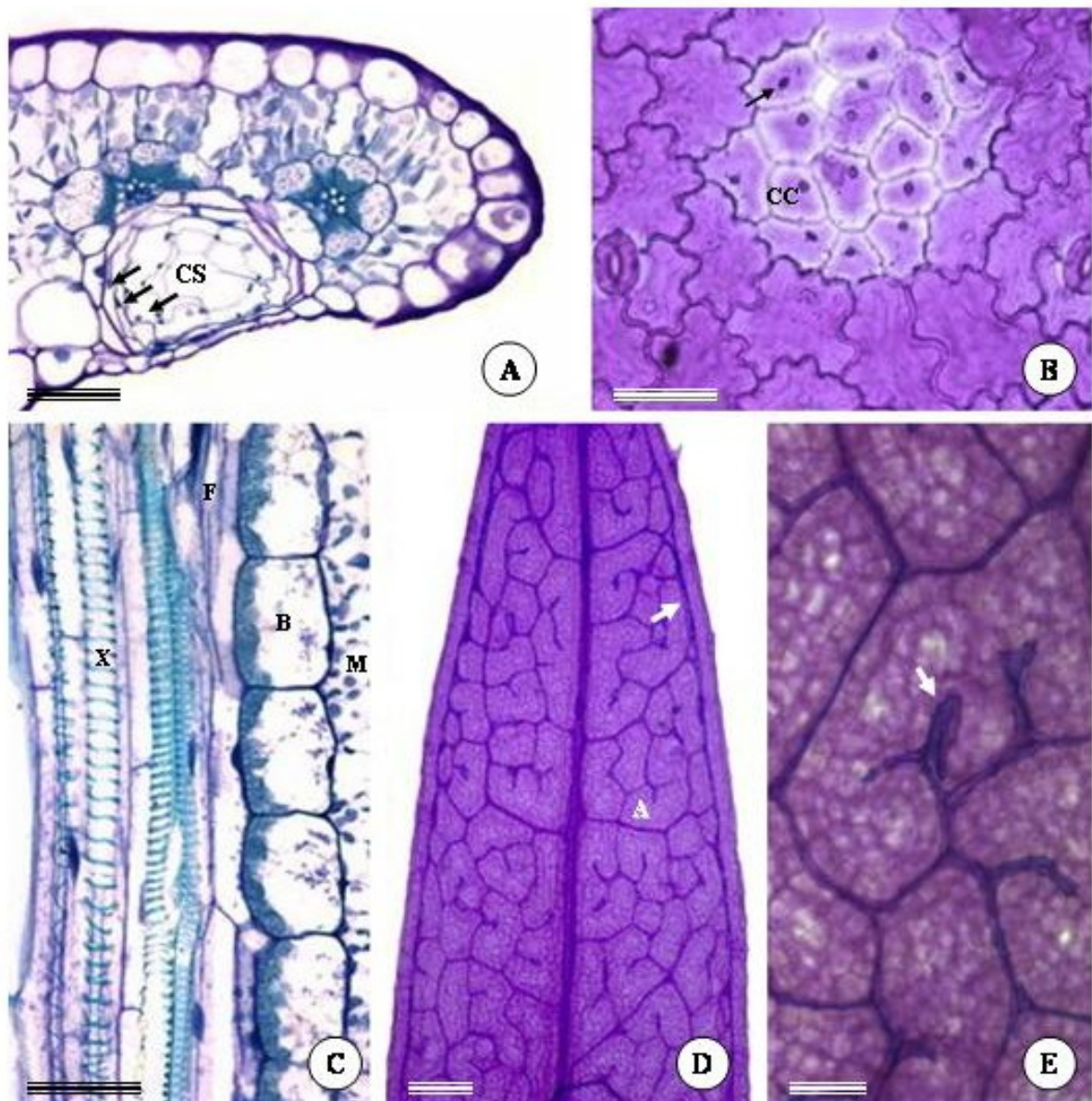


Figura 3. Fotomicrografias de seções transversais (A) e paradérmicas (B-E) da folha de *Pectis brevipedunculata*. A, bordo foliar com cavidade secretora associada a feixes vasculares. As setas indicam as três camadas de células que compõem o epitélio secretor. B, células de cobertura com núcleos conspícuos (seta), associadas à cavidade secretora. C, feixe vascular da nervura principal. D, aspecto geral da venação broquidódroma. A seta indica a nervura intramarginal. E, detalhe das terminações vasculares (seta). A, aréola; B, bainha do feixe vascular; CC, células de cobertura; CS, cavidade secretora; F, floema; M, mesófilo; X, xilema.. Barra: A-C, 50 μ m; D, 200 μ m; E, 100 μ m

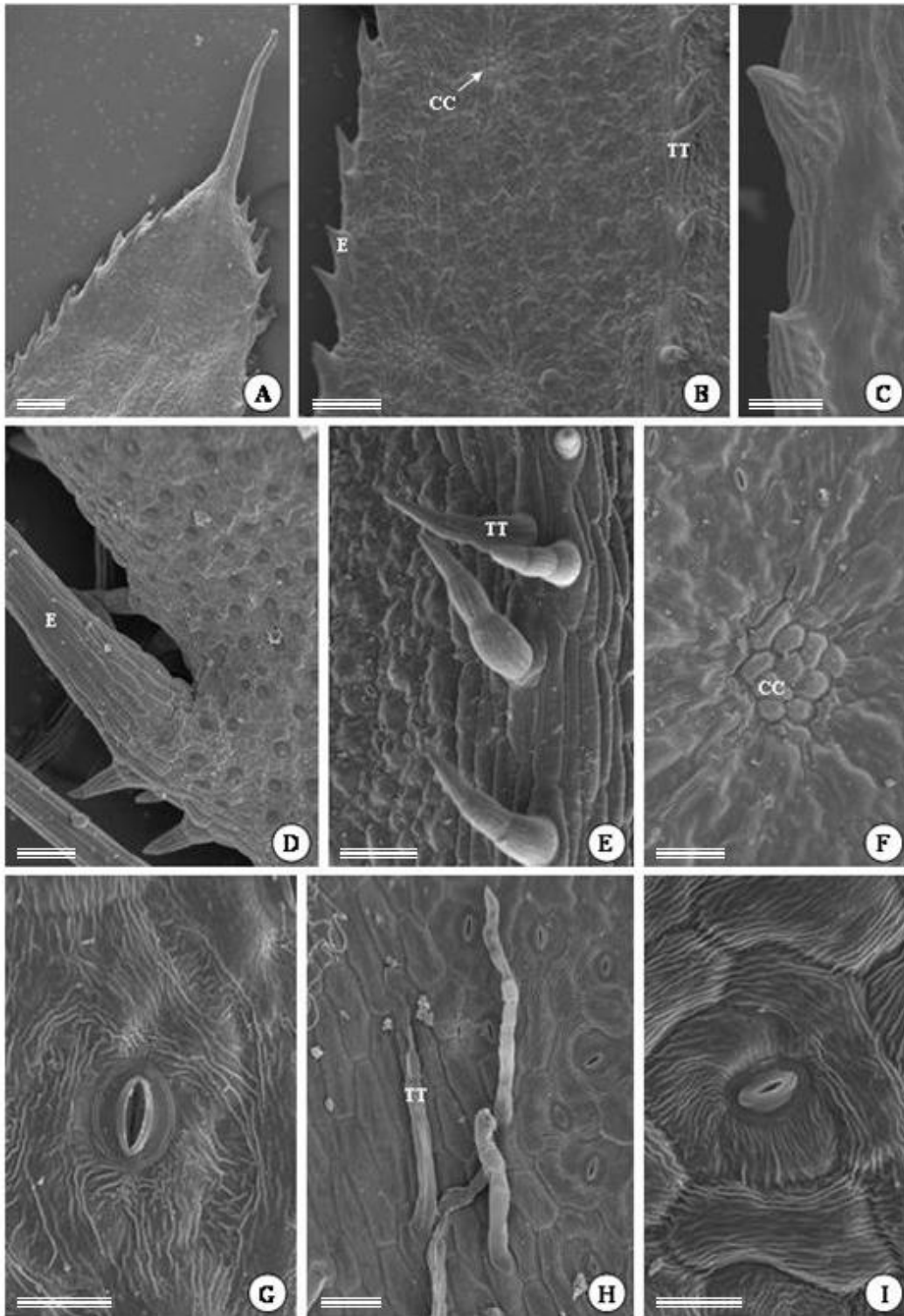


Figura 4. Eletromicrografias de varredura da folha de *Pectis brevipedunculata*. A, porção apical da folha, com emergências curtas no bordo e uma emergência terminal longa no ápice. B, face abaxial da folha, com tricomas tectores ao longo da nervura mediana (seta larga), emergências no bordo (cabeça de seta) e células de cobertura das cavidades (setas estreitas). C, detalhe de emergências curtas do bordo foliar. D, detalhe de emergência longa (seta) na porção basal da folha. E, tricomas tectores (seta) da nervura mediana na face abaxial. F, células de cobertura (seta) das cavidades na face abaxial. G, estômato da face abaxial. H, tricomas tectores (seta) e, à direita, células epidérmicas alongadas que acompanham a nervura principal na face adaxial. I, estômato da face adaxial. Em G e I pode-se notar a cutícula estriada. CC, célula de cobertura; E, emergência; TT, tricoma tector. Barra: A-B, 200 μ m; C, F, H, 50 μ m; D-E, 100 μ m; G, I, 25 μ m

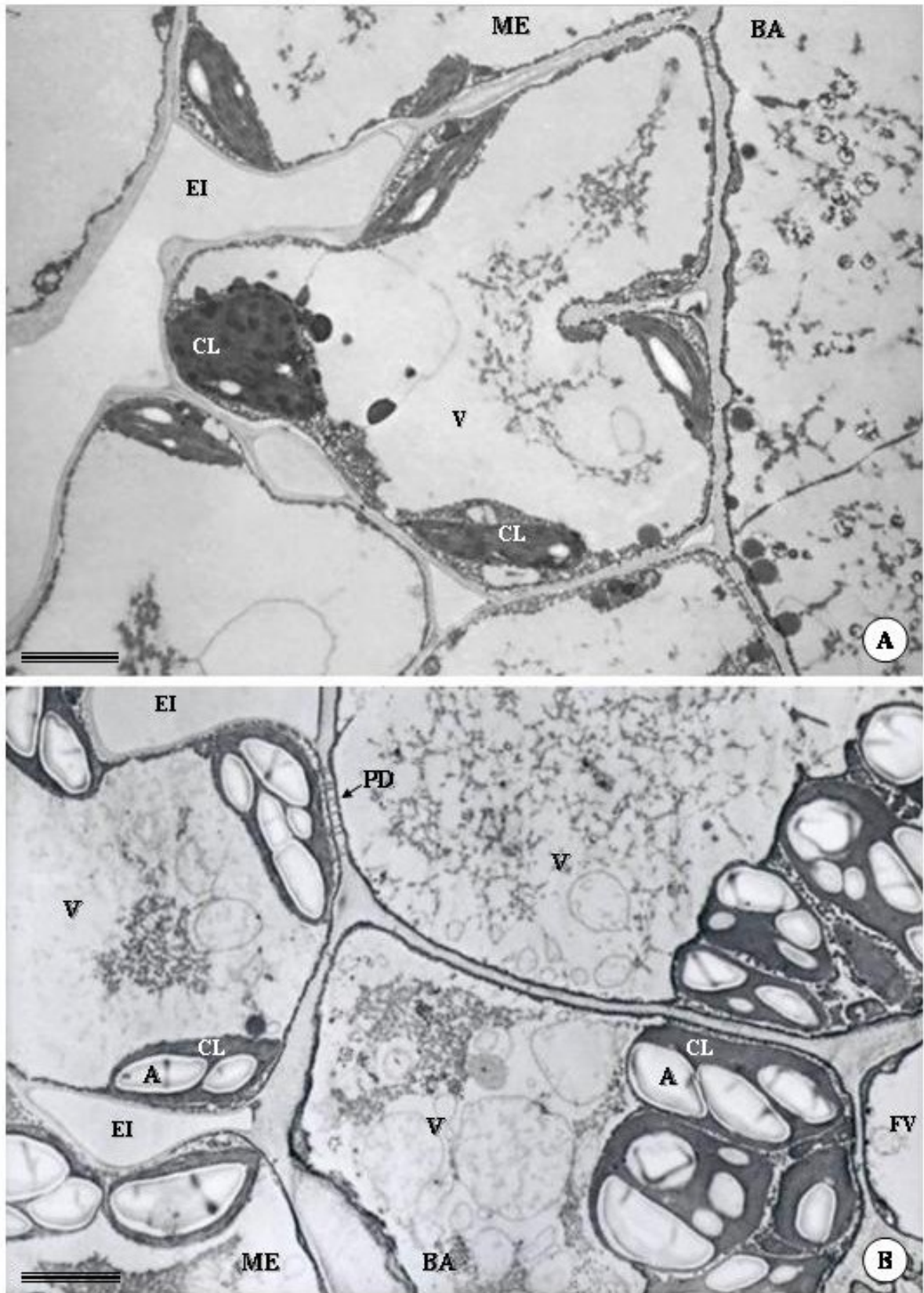


Figura 5. Eletromicrografias de transmissão da folha de *Pectis brevipedunculata*. A, células do mesofilo com cloroplastos e plastídios ao longo da parede, na face abaxial; B, células do mesofilo e da bainha, com cloroplastos voltados para o feixe vascular, na face adaxial. A, amido; BA, bainha; CL, cloroplasto; PL, plastídeo; PD, plasmodesmos; EI, espaço intercelular; ME, mesofilo; V, vacúolo; FV, feixe vascular. Barra: 3 μ m

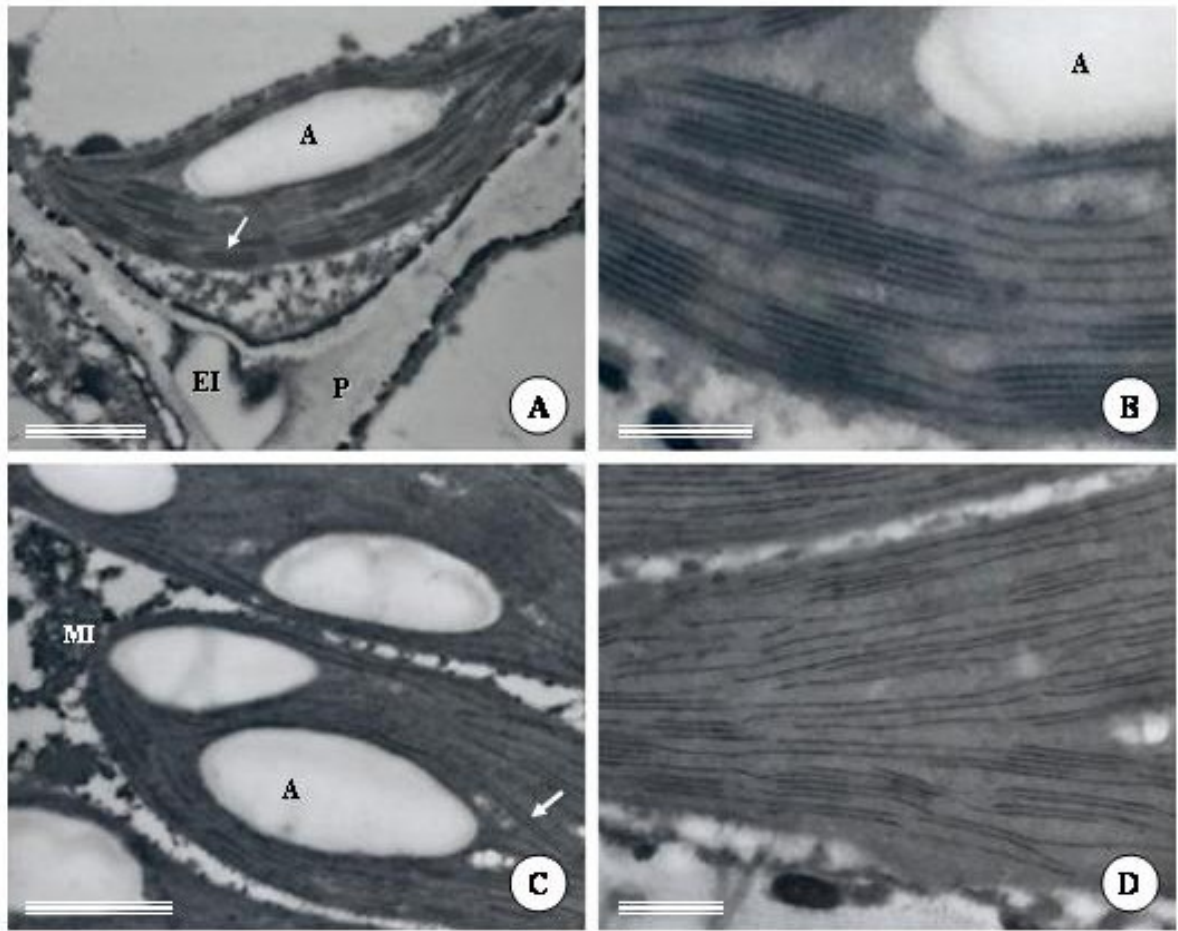


Figura 6. Eletromicrografias de transmissão da folha de *Pectis brevipedunculata*. A, cloroplasto do mesofilo com grão de amido e tilacóides empilhados (seta). B, detalhe da organização dos tilacóides do cloroplasto do mesofilo. C, cloroplasto da bainha com grãos de amido e tilacóides com empilhamento incipiente (seta). D, detalhe da organização dos tilacóides da bainha. A, amido; B, bainha; EI, espaço intercelular; M, mesofilo; MI, mitocôndria; P, parede. Barra: A,C, 1 μ m; B, 200nm; D, 300nm

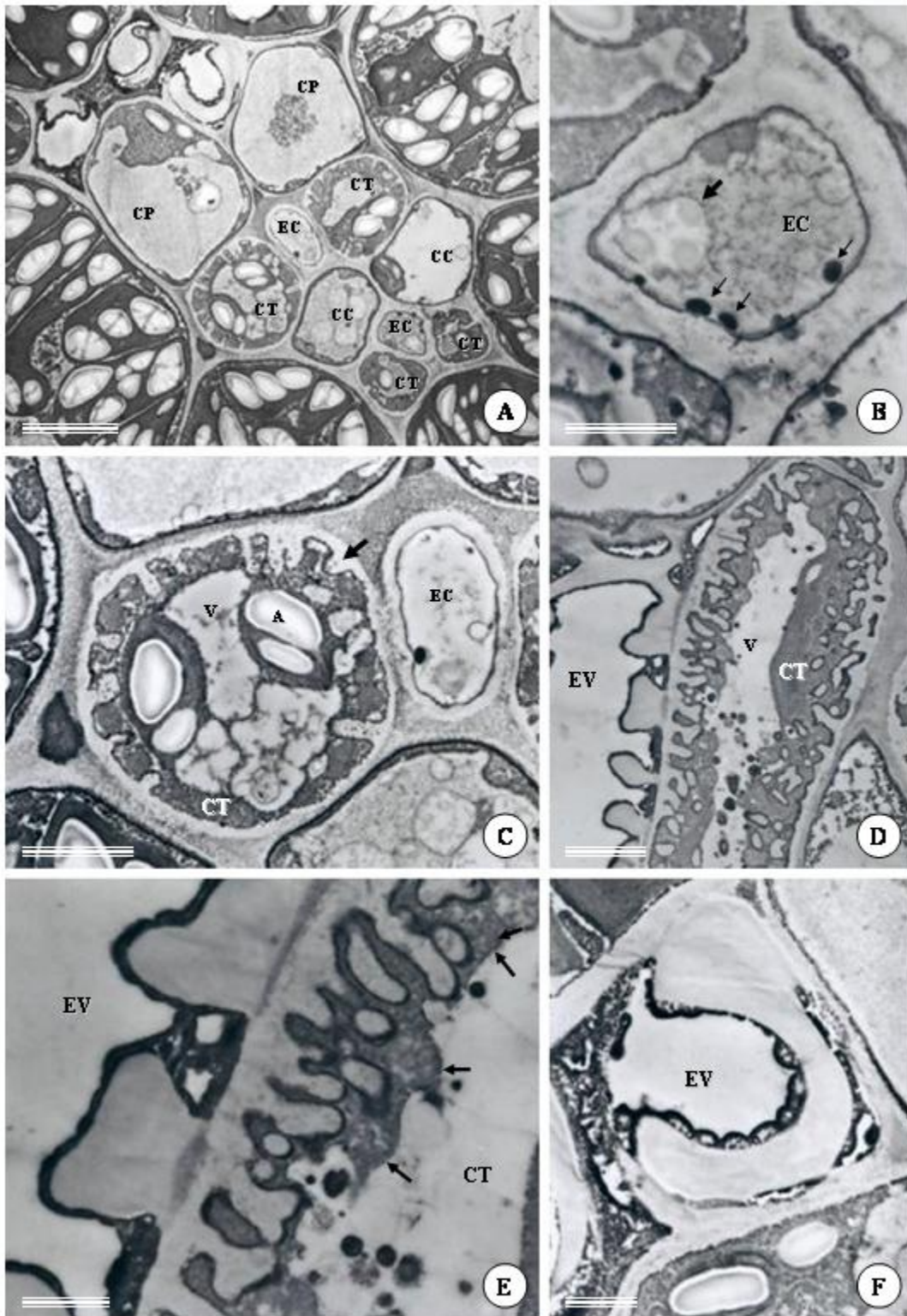


Figura 7. Eletromicrografias de transmissão da folha de *Pectis brevipedunculata* na região do feixe vascular. A, feixe vascular envolto por células da bainha. B, elemento de tubo crivado, com plastídeos contendo amido (seta larga) e proteína (seta estreita). C, célula de transferência contendo plastídeos com grãos de amido, vacúolos na região central e citoplasma eletrondenso voltado para a região parietal, que apresenta muitas invaginações (seta). D, elemento de vaso e célula de transferência. E, detalhe do espessamento do elemento de vaso e das invaginações da parede da célula de transferência. Observar a presença de numerosas mitocôndrias (setas). F, elemento de vaso com parede espessada em forma de arco. A, amido; CC, célula companheira; CP, célula parenquimática; CT, célula de transferência; EC, elemento de tubo crivado; EV, elemento de vaso; V, vacúolo. Barra: A, 5 μ m; B, E-F, 1 μ m; C, 2 μ m; D, 3 μ m

Discussão

P. brevipedunculata é uma espécie comumente encontrada em biomas onde predominam condições xerofíticas (Lisbôa *et al.*, 2000). O estriamento da cutícula e a presença de tricomas nas folhas, pode ser um indicativo de adaptação a ambientes com altas intensidades luminosas (Salatino *et al.* 1986). O fato das paredes anticlinais da epiderme na face abaxial serem mais sinuosas também pode estar relacionado à menor luminosidade que incide sobre essa face da folha durante o processo de ontogenia. Em folhas de sol, o espessamento da cutícula e das paredes é mais rápido, enquanto nas folhas de sombra o espessamento é mais lento, contribuindo para maior plasticidade das paredes celulares tornando-as mais sinuosas (Watson, 1942; Martinez & Medri, 1985).

Folhas inclinadas, como ocorre em *P. brevipedunculata*, diminuem a interceptação da luz solar, gerando um desenvolvimento mais simétrico dos tecidos foliares (Vogelmann *et al.*, 1996). A presença de estômatos em ambas as faces da folha pode ser uma condição mais favorável para o aumento e homogeneidade da difusão gasosa e assimilação de dióxido de carbono no mesofilo (Smith *et al.*, 1997; Parkhurst, 1994). Em *P. brevipedunculata*, a orientação radiada das células do mesofilo ao redor dos feixes vasculares também pode favorecer a absorção de luz e a difusão gasosa, considerando-se que, nessa condição, a maioria das células do mesofilo possui parte de sua superfície associada à epiderme ou aos espaços intercelulares. De acordo com Smith *et al.* (1997), a fotossíntese pode ser maximizada se cloroplastos estiverem situados em locais dentro do mesofilo onde a absorção da luz e a acessibilidade ao dióxido de carbono são otimizadas.

A classificação dos estômatos quanto ao padrão de distribuição e morfologia das células anexas é variável entre as Asteraceae, sendo a maioria classificada como anomocítico e anisocítico (Metcalf & Chalk, 1950). Os estômatos encontrados em *P. brevipedunculata* referem-se ao tipo anisocítico (Metcalf & Chalk, 1950). A distribuição dos estômatos nas duas faces da folha é relatada em trabalhos com espécies de ambiente mesofítico, mas ocorre

também em muitas espécies com características xeromórficas (Mott et al., 1982; Fahn, 1989; Fahn & Cutler, 1992). Não há relação direta entre o número, distribuição e função de células estomáticas em plantas C4 e C3, mas verifica-se que nas C4 os estômatos situam-se muito próximos ao parênquima clorofiliano (Laetsch, 1974), como no caso da espécie em estudo.

As emergências que ocorrem nas folhas de *P. brevipedunculata* são comuns ao gênero, e comumente são descritas como cerdas (Barroso *et al*, 1991). Embora macroscopicamente semelhantes a grandes tricomas ou cerdas, as emergências são estruturas complexas, pois apresentam tecidos vasculares, fibras, células parenquimáticas e epiderme.

As células da bainha do feixe vascular são interligadas com as células do mesofilo por numerosos plasmodesmos, o que possibilita o transporte simplástico de compostos entre o mesofilo e a bainha. Essa conexão simplástica é comum em plantas C4, onde o transporte de material do mesofilo para a bainha é rápido e eficiente (Laetsch, 1974). As células da bainha geralmente são grandes e possuem paredes celulares mais espessas, as quais podem estar relacionadas à segregação das diferentes enzimas fotossintéticas nas células do mesofilo e da bainha de plantas C₄ (Johnson & Brown, 1973; Laetsch, 1974; Voznesenskaya et al., 2005).

Em plantas com estrutura foliar tipo Kranz, os cloroplastos das células da bainha acumulam amido e podem apresentar dimorfismo de tamanho e ultra-estrutural, chegando ao extremo da ausência de grana, ou apenas diferença no tamanho (Laetsch, 1974; Brown & Hattersley, 1989; Buvat, 1989; Fahn e Cutler, 1992; Rodrigues & Estelita, 2003; Voznesenskaya, 2005). Nas folhas de *P. brevipedunculata*, não só os cloroplastos da bainha, os quais apresentam-se orientados centrifugamente, produzem amido, mas também os cloroplastos do mesofilo, que são ligeiramente menores. A produção de amido em ambos os tipos de cloroplasto, sugere que a fixação do dióxido de carbono no ciclo de Calvin ocorre tanto na bainha do feixe vascular como no mesofilo.

Em *P. brevipedunculata*, a organização granal dos tilacóides dos cloroplastos do mesofilo é mais evidente, enquanto que nos cloroplastos da bainha essa organização é mais

discreta, com poucos sítios onde os tilacóides encontram-se empilhados. A presença de grana indica a atividade do fotossistema II (Taiz & Zeiger, 2004) em ambos os tipos de cloroplasto, no entanto, pela organização granal dos tilacóides, esta atividade parece ser mais intensa nos cloroplastos do mesofilo.

Segundo Laetch (1974) e Brown & Hattersley (1989), o arranjo radiado das células do mesofilo e da bainha, e a sua proximidade com os elementos vasculares, propiciam um transporte direto e rápido dos fotoassimilados para o floema e, assim, evitando a inibição da fotossíntese pelo acúmulo de produtos finais. O transporte de solutos da bainha até os elementos de tubo crivado é intermediado por células parenquimáticas especializadas, como as células intermediárias, células de transferência e células companheiras comuns. Em *P. brevipedunculata*, as células de transferências são bem distintas, com paredes internas típicas com muitas invaginações. De acordo com Behnke & Sjolund (1990), Buvat (1989) e Taiz & Zeiger (2004), o aumento da área superficial da membrana e a ausência de plasmodesmos entre estas células e as adjacentes, provavelmente estão relacionadas à captação de solutos do apoplasto.

A arquitetura da venação de *P. brevipedunculata*, também reconhecido por Fellipe & Alencastro (1966) como caspedódroma a broquidódroma, apresenta nervuras secundárias ramificadas bem distribuídas pelo mesofilo e um pequeno número de células entre regiões vasculares adjacentes, sugerindo alta eficiência de condução.

As cavidades secretoras encontradas em *P. brevipedunculata* são comuns ao gênero e foram denominadas por Barroso et al. (1991) de glândulas perlúcidas. Apresentam padrão laminar (Hickey, 1973), distribuídas por toda a face abaxial do mesofilo e estreitamente associadas com os tecidos vasculares e bainhas. Essa proximidade entre as cavidades e o tecido vascular sugere que xilema e floema estejam suprindo diretamente as células epiteliais com substratos a serem utilizados na síntese da secreção. A presença de células íntegras em

todas as camadas do epitélio secretor sugere que a origem dessa cavidade seja esquizógona, isto é, por afastamento de células e não lise.

Conclusões

Os estudos anatômicos e ultra-estruturais da folha de *P. brevipedunculata* apontam para várias características relacionadas à restrição da perda de água e tolerância a altas irradiâncias, as quais permitem uma fixação eficiente de CO₂. Pode-se concluir que esta espécie apresenta estrutura Kranz e sugere-se que a via fotossintética C₄ seja a mais provável.

No entanto, estudos sobre a fisiologia e imunolocalização de enzimas ainda são necessários para melhor esclarecer a via fotossintética de *P. brevipedunculata*.

Referências Bibliográficas

Barroso GM, Peixoto AL, Costa CG, Ichaso CLF, Guimarães EF, Lima ACde. 1991.

Sistemática de angiospermas do Brasil. v.3. Viçosa: Editora UFV.

Behnke HD, Sjolund RD. 1990. *Sieve Elements. Comparative structure, induction and development*. New York. Springer-Verlag.

Bremer K. 1994. *Asteraceae: Cladistics and classification*. Portland: Timber Press.

Brown RH, Hattersley PW. 1989. Leaf anatomy of C₃-C₄ species as related to evolution of C₄ photosynthesis. *Plant Physiology* **91**: 1543-1550.

Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechninc & Histochemistry* **66**:111-116.

- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechninc & Histochemistry* **66**:111-116.
- Buvat R. 1989.** *Ontogeny, cell differentiation, and structure of vascular plants*. New York. Springer-Verlag.
- Edwards GE, Franceschi VR, Ku MSB, Voznesenskaya EV, Pyankov VI, Andreo CS. 2001.** Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C₄ plants. *Journal of Experimental Botany* **52**(356):577-590.
- Fahn A, Cutler DF 1992.** *Xerophytes*. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Fahn A. 1989.** *Plant Anatomy*. 3.ed. Oxford: Pergamon Press.
- Feder N, O'Brien TP. 1968.** Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*. **55**:123-142.
- Fellipe GM, Alencastro FMMR. 1966.** Contribuição ao estudo da nervação foliar das Compositae dos cerrados: I – Tribus Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae e Senecionae. *Na. da Acad. Brasileira de Ciências* **38**: 125-157.
- Hickey LJ. 1973.** Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany* **60**: 17-33.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. London, New York: McGraw-Hill.
- Johnson SC, Brown VW. 1973.** Grass leaf ultrastructural variations. *American Journal of Botany* **60**: 727-735.
- Laetsch WM. 1974.** The C₄ syndrome: a structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 27-52
- Larcher W. 2004.** *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima.
- Lisbôa RM, Bove CP, Senna-Valle. 2000.** Checklist das hidrófitas da subclasse Asteridae ocorrentes na região do alto e médio rio Araguaia, Brasil. In: III SIMPÓSIO SOBRE

RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL. OS DESAFIOS DO NOVO MILÊNIO, 2000. Corumbá. **Anais...** Corumbá, 2000.

Martinez MM, Medri ME. 1985. Alguns aspectos da anatomia ecológica de *Persea americana* Mill. (abacateiro) e interpretações fisio-ecológicas. *Semina* **6**: 140-146.

Metcalf CR, Chalk L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. v.I, II. Oxford: Clarendon Press.

Mott KA, Gibson AC, O'Leary JW. 1982. The adaptative significance of amphistomatous leaves. *Plant Cell and Environment* **5**: 455-460.

O'Brien TP, Feder N, Mccully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.

Parkhurst DF. 1994. Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist* **126**: 449-479.

Rodrigues AC, Estelita MEM. 2003. Origin and structure of the Kranz tissue in bracts of *Cyperus giganteus* Vahl (Cyperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 445-452.

Sage RF. 2002. C₄ photosynthesis in the terrestrial plants does not require Kranz anatomy. *Plant Science* **7**: 283-285.

Salatino A, Oliveira AFM, Meirelles ST. 2003. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **75**: 431-439.

Smith BN & Turner BL. 1975. Distribution of Kranz' syndrome among *Asteraceae*. *American Journal of Botany* **62**: 541-545.

Smith WK, Vogelmann TC, DeLucia, EH, Bell DT, Shepherd KA. 1997. Leaf form and photosynthesis. *BioScience* **47**: 785-793.

Taiz L, Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed.

Vogelmann TC, Nishio JN, Smith WK. 1996. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. *Trends in Plant Science* **1**: 65-70.

Voznesenskaya EV, Artyusheva EG, Franceschi VR, Pyankov VI, Kiirats O, Ku MSB, Edwards GE. 2001. *Salsola arbusculiformis*, a C₃-C₄ intermediate in Salsoleae (Chenopodiaceae). *Annals of Botany* **88**:337-348.

Voznesenskaya EV, Chuong SDX, Kiirats O, Franceschi VR, Edwards GE. 2005. Evidence that C₄ species in genus *Stipagrostis*, family Poaceae, are NADP-malic enzyme subtype with nonclassical type of Kranz anatomy (Stipagrostoid). *Plant Science* **168**: 731-739.

Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE. 2002. Proof of C₄ photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *The Plant Journal* **31**(5):649-662.

Watson RW. 1942. Effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. *New Phytologist* **41**: 223-229.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de cavidades secretoras em folhas de *Pectis brevipedunculata*

(Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae): anatomia e ultra-estrutura

RESUMO – Este trabalho descreve a ontogenia das cavidades secretoras de *P. brevipedunculata*, por meio de material observado após tratamento por técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, com o objetivo de esclarecer a origem e o desenvolvimento desta estrutura e as organelas celulares envolvidas no processo de secreção. As cavidades secretoras são esquizógenas quanto à origem e desenvolvimento inicial, e lisígenas na fase de maturação. Deste modo, são esquizolisígenas. As células secretoras são caracterizadas por apresentar citoplasma eletrondenso com gotas lipídicas, grandes vacúolos com aspecto granular, mitocôndrias com cristas tubulares e plastídios com gotículas de óleo, sugerindo que a secreção seja lipofílica.

Introdução

O gênero *Pectis* (Asteraceae) é representado por, aproximadamente, setenta espécies nativas do Brasil, do oeste da Índia e regiões quentes dos Estados Unidos. As folhas são utilizadas por comunidades tradicionais contra dores estomacais, cólicas (Schultes & Raffauf, 1990), hipertensão, gripes e resfriados (Agra et al., 2007).

Pectis brevipedunculata possui folhas com odor forte e agradável, relacionado à produção de óleos essenciais ricos em terpenos (Jamal et al., 2006). Os terpenos e outras substâncias lipofílicas são comumente sintetizadas e armazenadas em cavidades ou canais secretores (Fahn, 1979), que podem ocorrer em muitas famílias, como em Myrtaceae (Fahn, 1979), Rutaceae (Bennici & Tani, 2004), Rubiaceae (Vieira et al., 2001), Leguminosae (Crow et al., 1997), Polygonaceae (Curtis & Lesrten, 1994), Hypericaceae (Ciccarelli et al., 2001) e Asteraceae (Metcalf & Chalk, 1950; Curtis & Lersten, 1986; Monteiro et al., 1995; Mello-de-Pinna & Menezes, 2002; Lotocka & Geszprych, 2004; Milan et al., 2006). Embora muitos estudos relacionem as cavidades à produção de material lipídico (Fahn, 1979; Curtis & Lersten, 1986; Roshchina & Roshchima, 1993), a secreção destas estruturas pode ser heterogênea (Ciccarelli et al., 2001).

Cavidades e canais secretores podem ter origem esquizógena, apenas por afastamento de células e formação de um lume (Lersten, 1986; Ciccarelli et al., 2001), origem esquizolisígena, com afastamento inicial das células epiteliais e rompimento das células secretoras apenas na maturidade (Curtis & Lersten, 1986; Machado & Carmello-Guerreiro, 2001; Bennici & Tani, 2004; Ciccarelli et al., 2001), ou lisígena, com rompimento de células para a formação do centro da cavidade (Bosabalideis & Tsekos, 1982; Monteiro et al., 1995). Em alguns casos, como em *Citrus* e *Ruta*, há controvérsias sobre a origem das cavidades secretoras, sendo esta, geralmente interpretada tanto como de origem lisígena, esquizógena ou ainda esquizolisígena (Fahn, 1979). Embora a lisigenia e a esquizogenia sejam aceitas como

processos naturais de formação de dutos e cavidades secretoras (Esau, 1965; Fahn, 1979; Mauseth, 1988), Turner (1999) considera a lisigenia absoluta como uma falsa categoria de desenvolvimento glandular, uma vez que imagens que se assemelham à autólise de células na fase inicial do processo de secreção podem ser facilmente produzidas por artefatos, como má fixação, meios de inclusão e de montagem inadequados. Este autor também reconhece que a esquizolisigenia e a esquizogenia também podem se confundir, principalmente em casos onde há observação incompleta das fases de desenvolvimento da cavidade e do processo de secreção, pois, geralmente, a lise de células secretoras ocorre apenas no final do desenvolvimento da glândula.

O processo de secreção em cavidades e outras estruturas pode ser caracterizado por aspectos citológicos particulares e pela presença de determinadas organelas, que variam em abundância e organização de acordo com o estágio de desenvolvimento das células secretoras (Fahn, 1979).

O objetivo deste trabalho é o estudo anatômico e ultra-estrutural das cavidades secretoras de *P. brevipedunculata*, visando o esclarecimento da origem e do desenvolvimento desta estrutura secretora e das organelas celulares envolvidas no processo de secreção.

Material e Métodos

Foram coletadas plântulas e exemplares adultos de *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. (Asteraceae) no Campus II da Universidade do Vale do Rio Doce (UNIVALE) em Governador Valadares e no Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG. Material testemunho foi herborizado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC 9.302), em Viçosa, MG, e no Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB 38.694), em Belo Horizonte, MG.

Microscopia de Luz

Primórdios foliares e folhas em diferentes fases de desenvolvimento foram fixados em FAA₅₀ por 48 horas e conservados em etanol 70% (Johansen, 1940). Amostras de aproximadamente 0,25cm² foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), para a obtenção de seções transversais (2-5µm), longitudinais (2µm) e paradérmicas (2µm), em micrótopo rotativo. A coloração foi feita com azul de toluidina a 0,05% em tampão fosfato (O'Brien et al. 1964) para análise geral da estrutura foliar e das cavidades secretoras. A montagem dos cortes foi realizada com resina sintética (Permount). A análise e os registros das imagens foram obtidos em microscópio de luz (Olympus AX-70), equipado com sistema U-photo acoplado a microcomputador com o programa Spot-Basic (Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amostras de aproximadamente 1mm² de primórdios foliares e folhas em diferentes estádios de desenvolvimento foram fixadas em solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M pH 6,5, por quatro horas a 4°C e lavadas no mesmo tampão por seis vezes, 10 minutos cada. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M, por quatro horas a 4°C e lavado no mesmo tampão por seis vezes, 10 minutos cada. Após a desidratação em série etílica crescente, as amostras foram embebidas em resina epoxy (Spurr). Seções ultrafinas (60-90nm) foram obtidas com navalha de diamante em ultramicrótopo MT2-B (Du Pont-Sorval), coletadas em grades de cobre cobertas com Formvar e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As seções foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109) a 80kV, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Resultados

Os indícios sobre a formação das cavidades secretoras de *P. brevipedunculata* são observados em fases ainda muito precoces do desenvolvimento foliar, onde apenas a protoderme, o meristema fundamental e os cordões procambiais podem ser distinguidos. Nessa fase, os primórdios foliares encontram-se paralelas ao eixo caulinar e muito próximas do meristema apical do caule, ainda protegidas por folhas mais desenvolvidas (Fig. 1A).

Na face abaxial da folha, agrupamentos globulares de células do meristema fundamental, em contato com a protoderme, distinguem-se dos cordões procambiais e do restante do mesofilo indiferenciado pela presença de núcleo conspícuo e citoplasma denso (Fig. 1B). Esse meristemóide sofre divisões periclinais e anticlinais que darão origem às células epiteliais, as quais delimitarão internamente a cavidade e formarão duas camadas mais externas de células da bainha.

As células epiteliais começam a se separar esquizogenamente formando um espaço intercelular no centro da cavidade e, durante este processo, observa-se intumescimento e desintegração da lamela média (Fig. 1C; 2A, B). Nessa fase de desenvolvimento, caracterizada como pré-secretora, tanto as células epiteliais como as células que formam a bainha ao redor da cavidade apresentam núcleos grandes, nucléolos bem evidentes, plastídios com poucos tilacóides, pequenos vacúolos distribuídos pelo citoplasma e paredes delgadas (Fig. 2A-D). As células epiteliais e da bainha começam a se tornar curvas e achatadas à medida que o lume da cavidade cresce (Fig. 1D, E). Em folhas ainda pouco diferenciadas, as cavidades já apresentam uma camada bem definida de células epiteliais e mais duas camadas de células da bainha (Fig. 1E). Algumas células do mesofilo, próximas à cavidade, também se tornam achatadas e se incorporam às camadas que compõem a bainha (Fig. 1E). Até esta fase da ontogenia, as cavidades projetam-se para o exterior, formando saliências proeminentes na superfície foliar.

Em folhas com epiderme, tecidos vasculares e mesofilo diferenciados, as células epiteliais da cavidade tornam-se mais volumosas, vacuolizadas e com citoplasma comprimido próximo à parede (Fig. 1F, G; 3A). Nesta fase, o processo de secreção inicia-se e se tornam aparentes os indícios da formação de uma lacuna periférica, a qual é representada pelo espaço entre a membrana plasmática e a parede em contato com o centro da cavidade (Fig. 1F; 3A-C). Nestas células, gotas lipídicas são observadas tanto no citoplasma como no interior de plastídeos (Fig. 3A-C). Embora não muito bem definidas morfológicamente, observam-se mitocôndrias com cristas tubulares esparsas no citoplasma (Fig. 3C-D). As paredes das células que compõem a bainha são mais espessas que as paredes que delimitam o epitélio secretor. A lacuna periférica aumenta gradativamente com o processo de secreção e desenvolvimento da cavidade, e a compartimentalização das células epiteliais é cada vez mais evidente. A lacuna periférica atinge seu tamanho máximo em folhas totalmente expandidas, quando as células da bainha da cavidade e as células epidérmicas adjacentes encontram-se bastante achatadas (Fig. 2F,G; 4A-C).

Finalmente, quando o material secretado pode ser observado no centro da cavidade, instala-se a fase pós-secretora. As paredes internas do epitélio secretor começam a se desintegrar, e porções dessa parede misturam-se à secreção (Fig. 1G, I). As camadas de células mais externas da bainha e do mesofilo que circundam a cavidade tornam-se descontínuas pelo crescimento do lume, neste momento, todo preenchido pela secreção (Fig. 1J, K). Pode-se observar a estreita proximidade das cavidades em desenvolvimento com os cordões procambiais, e posteriormente, das cavidades já em processo de secreção com os feixes vasculares diferenciados (Fig. 1A-K). Nesta fase, as células da bainha do feixe vascular em contato com a cavidade são extremamente comprimidas (Fig. 1K). Na face abaxial da folha, as células epidérmicas subjacentes à cavidade encontram-se achatadas desde o início do processo de secreção (Fig. 1F). Estas células possuem núcleos conspícuos até a maturidade

das cavidades, além de serem poligonais e menores que as demais células epidérmicas (Fig. 1J-L), denominadas aqui de células de cobertura.

Na maturidade, as cavidades secretoras são morfologicamente esféricas e se projetam um pouco acima do nível da superfície foliar.

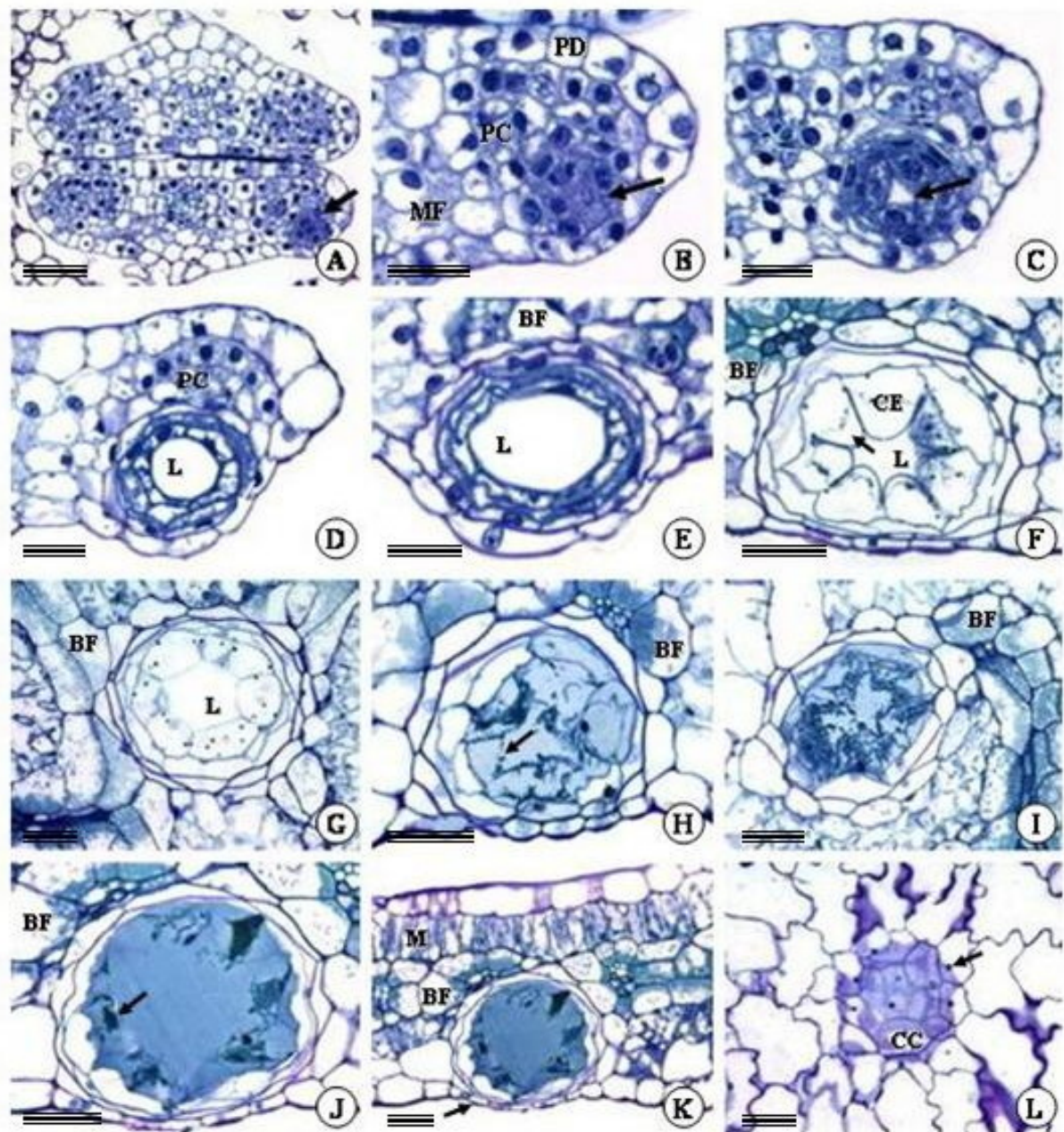


Figura 1. Fotomicrografias de seções transversais (A-F, H, J, K) e paradérmicas (G, I, L) de folhas de *Pectis brevipedunculata* em fases seqüências de desenvolvimento. A, primórdios foliares com grupos de células iniciais da cavidade (seta). B, grupo de células iniciais da cavidade (seta) onde apenas protoderme, cordões procambiais e meristema fundamental podem ser distinguidos. C, início da formação do lume (seta) da cavidade pelo afastamento das células epiteliais em desenvolvimento. D, aumento do número de células do epitélio secretor, que se tornam mais vacuolizadas, e aumento do número de células da bainha e do lume. E, define-se a camada epitelial secretora e as duas camadas de células da bainha que circundam a cavidade; aumenta o lume e a curvatura das células que o delimitam. F, as células epiteliais volumosas e compartimentalizadas com a definição da lacuna periférica (seta). G, fase semelhante a F, em seção paradérmica. H, aumento do lume celular pela presença de secreção e degradação das paredes internas (seta) das células epiteliais. I, fase semelhante a H, em seção paradérmica. J, cavidade madura com o centro preenchido por secreção e vestígios das paredes em desintegração (seta). K, porção da folha com cavidade madura associada às bainhas dos feixes vasculares mais próximos; células de cobertura achatadas (seta). L, seção paradérmica das células de cobertura associadas à cavidade; note o nucléolo (seta) evidente nas células de cobertura. BF, bainha do feixe vascular; CC, células de cobertura; CE, célula epitelial; L, lume; M, mesofilo; MF, meristema fundamental; PD, protoderme; PC, procâmbio. Barra: A, F-L, 50µm; B-E, 25µm

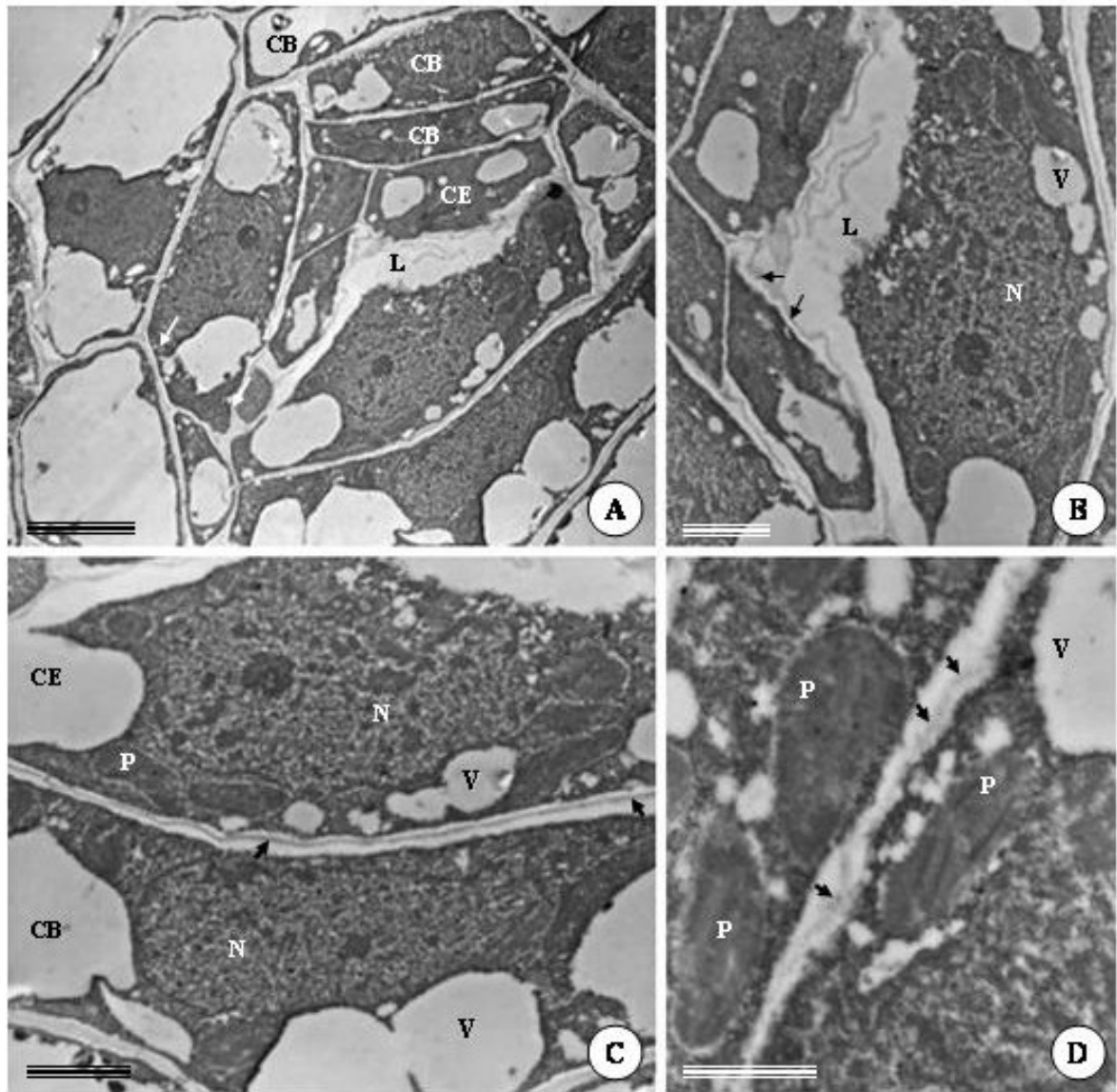


Figura 2. Eletromicrografia de transmissão de cavidades secretoras de folhas de *Pectis brevipedunculata* em fase pré-secretora. A, visão geral de células iniciais que darão origem ao epitélio secretor e às células da bainha que circundam a cavidade; as células iniciais têm citoplasma eletrondenso, núcleo grande, nucléolo evidente, e pequenos vacúolos. B, detalhe de A, que mostra o início da formação do lume da cavidade pelo intumescimento e degradação da lamela média (setas). C, detalhe de A, evidenciando a parede celular (setas) ainda delgada entre uma célula epitelial e uma célula da bainha da cavidade. D, detalhe da interface de duas células da cavidade em diferenciação, evidenciando a parede (setas) e, no citossol, plastídeos com poucos tilacóides. CB, célula da bainha; CE, célula epitelial; L, lume; N, núcleo; P, plastídio; V, vacúolo. Barra: A, 5 μ m; B-C, 2 μ m, D, 1 μ m

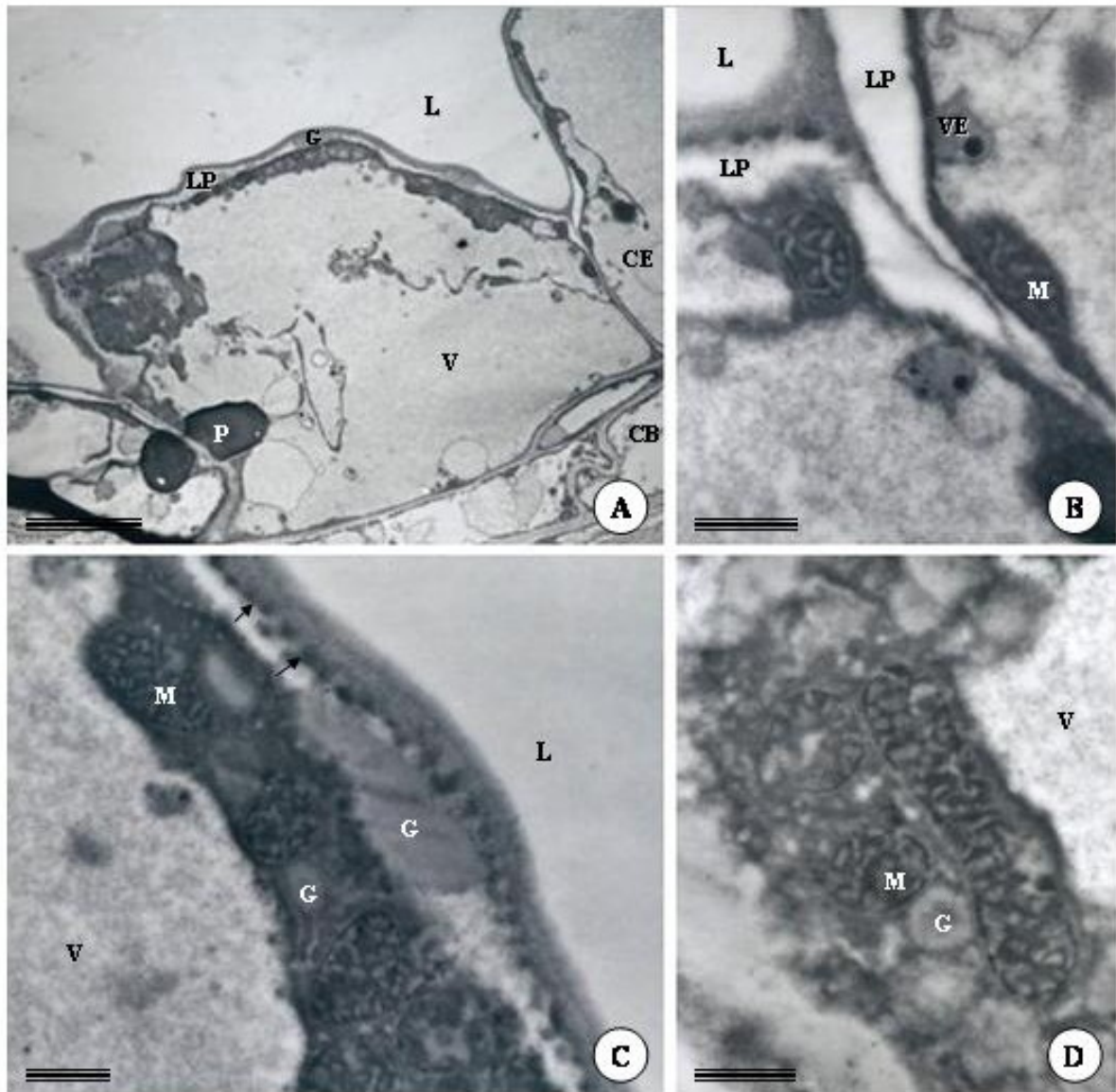


Figura 3. Eletromicrografia de transmissão de cavidades secretoras de folhas de *Pectis brevipedunculata* no início da fase secretora. A, células do epitélio secretor próximas ao lume da cavidade e início da formação da lacuna periférica. Note o vacúolo muito grande e o citoplasma eletrondenso com plastídios próximos à parede. B, mitocôndrias e vesículas com material eletrondenso e formação da lacuna periférica. C, Gota lipídica na lacuna periférica; observe que o citoplasma é eletrondenso, rico em mitocôndrias com cristas tubulares e gotículas de óleo; note a deposição de material eletrondenso (setas) na região interna da parede. D, detalhe de mitocôndrias com cristas tubulares observadas no citossol de uma célula epitelial. CE, célula epitelial; CB, célula da bainha; G, gota lipídica; L, lume; M, mitocôndria; P, plastídio; V, vacúolo; VE, vesícula. Barra: A, 5µm; B-D, 500nm

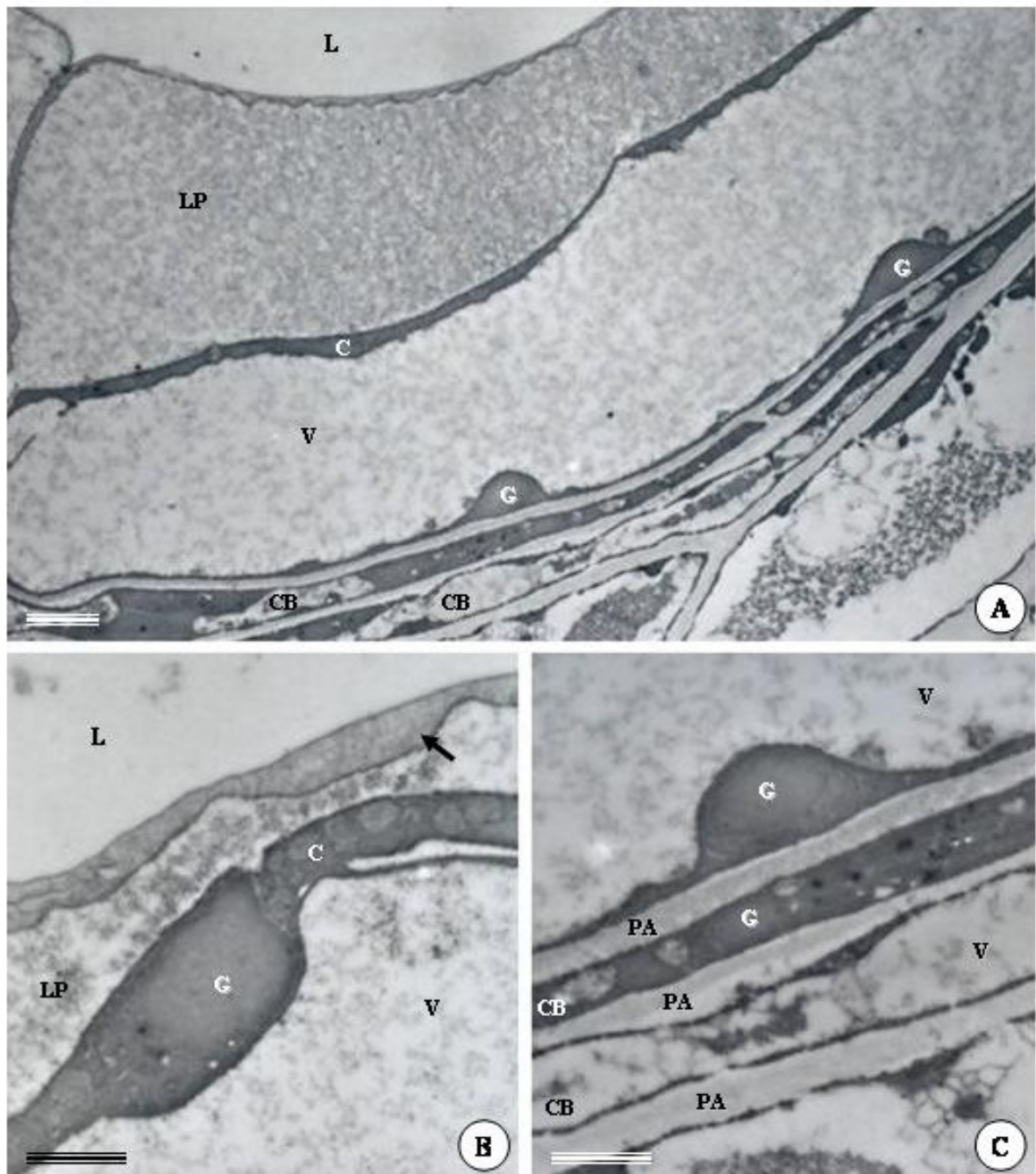


Figura 4. Eletromicrografia de transmissão de cavidades secretoras de folhas de *Pectis brevipedunculata* em fase secretora. A, célula epitelial já compartimentalizada, com lacuna periférica bem evidente; observe que a região interna da célula epitelial é bastante vacuolada, possui grandes gotas lipídicas comprimidas numa fina camada de citoplasma; note também que as células da bainha da cavidade são achatadas e têm paredes espessas. B, detalhe de uma célula epitelial onde é possível observar a lacuna periférica, o vacúolo e o citoplasma eletrondenso com gotas lipídicas; note que a parede celular da célula epitelial voltada para o lume tem contorno irregular e é eletrondensa (seta). C, detalhe da célula epitelial na região de contato com as células da bainha; note que a camada de citoplasma da célula da bainha é mais espessa, apesar de também ser eletrondensa e com gotas lipídicas. C, citoplasma; CB, célula da bainha; G, gota lipídica; L, lume; LP, lacuna periférica; PA, parede celular; V, vacúolo. Barra: A, 2 μ m; B-C, 1 μ m

Discussão

Cavidades secretoras, como as que ocorrem em *P. brevipedunculata*, são denominadas de cavidades subepidérmicas, pela proximidade com a epiderme e pela associação desse tecido no processo de eliminação da secreção (Curtis & Lersten, 1994).

Algumas cavidades secretoras originam-se a partir de células protodérmicas, como em *Polygonum* (Curtis & Lersten, 1994) e em Myrtaceae (Fahn, 1979), mas também têm origem a partir de células do meristema fundamental, como em *Lysimachia nummularia* (Lersten, 1986) e *Hypericum perforatum* (Ciccarelli et al., 2001), assim como ocorre em *P. brevipedunculata*. Em alguns casos, como em *Citrus sinensis* e *C. limon*, células do meristema fundamental e também da protoderme participam da formação dos meristemóides que irão formar as cavidades secretoras (Bennici e Tani, 2004).

Em Myrtaceae, uma única célula epidérmica com citoplasma denso e núcleo grande, chamada de meristemóide, torna-se distinta das outras células do mesmo tecido e sofre sucessivas divisões periclinais e anticlinais, para formar um epitélio que delimita um espaço central (lume) e uma bainha de células periféricas (Fahn, 1979).

A origem de cavidades e canais secretores pode ser esquizógena, apenas por afastamento de células e formação de um lume, como em *Hypericum perforatum* (Ciccarelli et al., 2001) e *Lysimachia nummularia* (Lersten, 1986), esquizolisígeno, com afastamento inicial das células epiteliais e rompimento das células secretoras apenas na maturidade, como em *Eupatorium rugosum* (Curtis & Lersten, 1986), *Schinus terebentifolius* (Machado & Carmello-Guerreiro, 2001); *Citrus sinensis* e *C. limon* (Bennici & Tani, 2004) e *Hypericum perforatum* (Ciccarelli et al., 2001), ou lisígena, com rompimento de células para a formação do centro da cavidade, como em *Porophyllum lanceolatum* (Monteiro et al., 1995) e *Citrus deliciosa* (Bosabalideis & Tsekos, 1982).

A origem das cavidades secretoras de *Polygonum hydropiper* também é esquizógena, com formação de camadas epiteliais que delimitam um lume (Curtis & Lersten, 1994). Com o desenvolvimento da cavidade, as células da camada epitelial mais interna tornam-se intumescidas e há retração do citoplasma para as paredes externas e a formação de uma região vacuolada voltada para as paredes internas, que Curtis & Lersten (1994) denominam de lacuna periférica. Esses mesmos autores observaram a deposição de uma nova camada de parede celular entre a lacuna periférica e o citoplasma comprimido próximo à parede externa. Neste caso, o lume da cavidade madura é definido pela desintegração das paredes internas da lacuna periférica e fica delimitado pela porção do epitélio secretor que ficou compartimentalizado pela deposição da nova camada de parede. Embora as cavidades secretoras de *P. brevipedunculata* tenham origem a partir de células do meristema fundamental, seu desenvolvimento é muito semelhante ao que ocorre em *Polygonum hydropiper*.

O afastamento inicial das células epiteliais (esquizogenia) e rompimento das células secretoras (lisigenia) apenas no final do desenvolvimento das cavidades de *P. brevipedunculata* caracterizam o processo como esquizolisígeno, também denominado de pseudo-esquizógeno por Curtis & Lersten (1994), como ocorre em cavidades de *Eupatorium rugosum* (Curtis & Lersten, 1986), *Lysimachia nummularia* (Lersten, 1986), *Citrus sinensis* e *C. limon* (Bennici & Tani, 2004) e canais de *Schinus terebentifolius* (Machado & Carmello-Guerreiro, 2001) e *Hypericum perforatum* (Ciccarelli et al., 2001).

A proximidade e associação das cavidades secretoras de *P. brevipedunculata* com os feixes vasculares provavelmente está associada ao fornecimento de substratos para a síntese da secreção.

Pelas características morfológicas das duas camadas de células da bainha que envolve a cavidade, tais como a presença de plastídeos, mitocôndrias e gotas lipídicas, pode-se admitir que estas células também tenham papel importante na continuidade do processo de secreção,

mesmo após o rompimento parcial das células epiteliais. As gotas lipídicas encontradas nas células epiteliais sugerem que a secreção das cavidades seja lipofílica. Terpenos como citral, citronelol, linalol e geraniol são encontrados na composição do óleo essencial extraído de folhas de *P. brevipedunculata* (Jamal et al., 2006) e sustentam essa hipótese.

Vários autores atribuem a cavidades, canais e outras estruturas secretoras funções de defesa, principalmente em regiões jovens (Curtis & Lersten, 1994; Ciccarelli et al., 2001). Em *P. brevipedunculata*, o desenvolvimento das cavidades secretoras inicia-se em fases ainda muito precoces da ontogenia foliar, no entanto, as cavidades tornam-se maduras e secretoras somente em folhas totalmente expandidas e diferenciadas. Embora isto possa significar que as cavidades não tenham papel de proteção nas fases iniciais do desenvolvimento foliar, deve-se considerar que, até a maturidade das cavidades, as folhas ainda permanecem muito próximas do meristema apical da parte aérea, as quais estão totalmente protegidas por folhas mais velhas.

Conclusões

As cavidades secretoras de *P. brevipedunculata* são esquizógenas quanto à origem e desenvolvimento inicial, e lisígenas na fase de maturação. Deste modo, são esquizolisígenas.

Citoplasma eletrondenso, mitocôndrias com cristas tubulares, plastídios com gotículas de óleo, gotas lipídicas e grandes vacúolos com aspecto granular caracterizam as células secretoras e sugerem que a secreção seja lipofílica.

Referências Bibliográficas

- Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. 2007.** Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **111**:383-395.
- Bennici A, Tani C. 2004.** Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora* **199**: 464-475.
- Bosabalidis A, Tsekos I. 1982.** Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. *Protoplasma* **112**: 55 – 62.
- Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. 2001.** Translucent gland and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* **88**:637-644.
- Crow E, Stirton GH, Cutler DF. 1997.** Leaf anatomy of the genus *Psoralea* sensu stricto (Psoraleae, Papapilionoideae, Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **124**:155-182.
- Curtis JD, Lersten NR. 1986.** Development of bicellular foliar secretory cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **73**: 79-86.
- Curtis JD, Lersten NR. 1994.** Developmental anatomy of internal cavities of epidermal origin in leaves of *Polygonum* (Polygonaceae). *The New Phytologist* **127**:761-770.
- Esau K. 1965.** *Plant anatomy*. New York. Wiley.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Oxford: Pergamon Press.
- Jamal CM, Brasileiro BG, Azevedo CSde, Matos DS. 2006.** Caracterização química do extrato e do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae). In: *XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*. Salvador. **Anais...** Salvador, 2006.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.

- Lersten NR. 1986.** Re-investigation of secretory cavity development in *Lysimachia* (Primulaceae). *The New Phytologist* **102**:193-197.
- Lotocka B, Geszprych A. 2004.** Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **144**:207-233.
- Machado SR, Carmello-Guerreiro SM. 2001.** Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebentifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Acta Botânica Brasílica* **15**(2):189-195.
- Mauseth JD. 1988.** *Plant Anatomy*. Menlo Park/ Califórnia: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Mello-de-Pinna GFA, Menezes NL. 2002.** Vegetative organ anatomy of *Ianthopappus corymbosus* Roque & Hind (Asteraceae-Mutisieae). *Revista Brasileira de Botânica* **25**(4):505-514.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the dicotyledons*. v.2. Oxford:Clarendon Press.
- Milan P, Hayashi AH, Appezzato-da-Glória B. 2006.** Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**(1):135-144.
- Monteiro WR, de Moraes Castro M, Fahn, A, Caldeira W. 1995.** Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). *Nordic Journal of Botany* **15**: 69-76.
- O'Brien TP, Feder N, Mccully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.
- Roshchina VV, Roshchina VD. 1993.** The excretory function of higher plants. New York: Springer-Verlag.
- Schultes RE, Raffauf RF. 1990.** *The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia*. v.2. Portland. Dioscorides Press.

Turner GW. 1999. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. *The Botanical Review* 65(1): 1-7.

Vieira RC, Delprete PG, Leitão GG, Leitão SG. 2001. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 88(12):2151-2156.