

VALÉRIA FERREIRA FERNANDES

**ESTRUTURAS SECRETORAS FOLIARES EM CASEARIA JACQ.:
UMA ABORDAGEM ANATÔMICA, ULTRAESTRUTURAL E TAXONÔMICA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F363e
2016

Fernandes, Valéria Ferreira, 1980-

Estruturas secretoras foliares em *Casearia Jacq* : uma abordagem anatômica, ultraestrutural e taxonômica / Valéria Ferreira Fernandes. – Viçosa, MG, 2016.

xiv, 102f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Salicaceae. 2. *Casearia Jacq*. 3. Coléteres. 4. Plantas - Anatomia. 5. Plantas - Identificação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.65

VALÉRIA FERREIRA FERNANDES

**ESTRUTURAS SECRETORAS FOLIARES EM *CASEARIA* JACQ.:
UMA ABORDAGEM ANATÔMICA, ULTRAESTRUTURAL E TAXONÔMICA**

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

APROVADA: 08 de março de 2016.


Arister Alves Azevedo


Elder Antônio Sousa e Paiva


João Marcos de Araújo


Ronaldo Marquete


Renata M. Strozi Alves Meira
(Orientadora)

Aos meus pais, João e Gerusa, pelo amor incondicional, compreensão e incentivos.

"Se nunca abandonas o que é importante para ti, se te importas tanto a ponto de estares disposto a lutar para obtê-lo, asseguro-te que tua vida estará plena de êxito. Será uma vida dura, porque a excelência não é fácil, mas valerá a pena."

Richard Bach

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida, bênçãos recebidas, oportunidades e força diária para enfrentar os obstáculos. Muito obrigada por me permitir discernir que um “não” muitas vezes é um “sim” e por colocar pessoas especiais no meu caminho.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa Pós-Graduação em Botânica, pelo aprendizado proporcionado.

A CAPES, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado.

Ao Projeto Floresta-Escola SECTES/UNESCO/HidroEX/FAPEMIG), sob coordenação do Prof. Dr. João Meira Neto, pelo suporte financeiro.

Aos meus queridos pais, João e Geresa, por acreditarem em meus sonhos e ideais, pelos exemplos de determinação, honestidade e pelo amor incondicional. Lembro-me, desde criança, de enfatizarem que o conhecimento é a maior riqueza que uma pessoa pode conquistar e tenho certeza que estavam certos. A vocês, minha eterna gratidão e amor.

As minhas irmãs, Emília e Fernanda, pelo amor, carinho, apoio e incentivos. A minha sobrinha, Maria Eduarda, por me mostrar uma nova forma de amor. Titia TE AMA “minha estrelinha”!!!!!!

À minha orientadora, Profa. Renata Maria Strozi Alves Meira, um exemplo de profissional e pessoa. Muito obrigada pela excelente orientação, pelos ensinamentos, discussões, questionamentos que enriquecerem o nosso trabalho e pela confiança depositada. Como esquecer a famosa frase “Tá tudo dominado???” rrsrrsrr. Tenho muito orgulho de ter sido sua orientada e como mesmo fala: “Uma vez orientadora sempre orientadora”. Espero que nossa parceria continue e que ainda possamos desvendar o “mundo encantador das estruturas secretoras”, seja numa escala micrométrica ou nanométrica.

Às minhas coorientadoras, Marcela Thadeo e Valdneá Dalvi (Dya embora não seja formalmente, também te considero minha coorientadora), pelo imenso apoio ao longo deste trabalho, por estarem sempre dispostas a ajudar. Muito obrigada pelos esclarecimentos durante as análises do laminário e pelos questionamentos, sugestões e críticas durante nossas trocas de e-mails. Tenham certeza que foi desafiador e gratificante trabalhar com vocês, pois admiro o excelente trabalho que desempenham.

Aos professores do departamento de Biologia Vegetal, pelos ensinamentos valiosos, em especial à Profa. Aristéa Azevedo, pelo exemplo de profissional, pelas maravilhosas aulas e atenção durante às vezes que estive em sua sala para esclarecer algumas dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Biologia Vegetal, Luciene, Mauro e Marcele pela atenção e cordialidade e, em especial ao Ângelo Valentim, por ser sempre prestativo e atencioso.

Aos meus estagiários (Helenice, Julianna e Lucas) pela dedicação ao longo do trabalho e pelos maravilhosos momentos de descontração.

À “minha aquisição mineira” Luana, amiga para todas as horas, pelo ombro amigo, incentivos e pelas sábias palavras nos momentos certos. Tenho certeza que o carinho que compartilhamos é maior que a distância que pode nos separar. Obrigada pelos excelentes cortes no micrótomo de mesa que enriqueceram os resultados da análise histoquímica.

À Martielly (Marty) pela companhia agradável, seja na Bahia ou em Minas, pelo cuidado diário, carinho, pelos ótimos momentos compartilhados e pelo apoio. Nesses anos de convivência comemoramos juntas cada vitória e nos fortalecemos diante dos obstáculos.

Ao Ivan, pela amizade e carinho. Muito obrigada pela “companhia” nas longas viagens Ilhéus-Viçosa ou Viçosa-Ilhéus através de mensagens ou ligações. Nunca esquecerei a famosa frase “Amanhã faço companhia no aeroporto” seja no Galeão ou no Tancredo Neves hehehehe. Admiro sua fé e determinação.

À Lays (Lala) pela amizade, companheirismo, generosidade e troca de informações. Mineirinha admiro sua doçura e bondade. Muito obrigada pelas dicas no Corel que foram essenciais para agilizar as preparações das pranchas.

Ao Guilherme (Gui) pela amizade, carinho e pelos “papos cabeças” nos nossos cafezinhos (no meu caso, sem café srsrsr).

As minhas “irmãs acadêmicas”, Marinalva (Mary), Isabel, Dayana, Katiúscia e “irmão acadêmico”, Ítalo, pelo companheirismo, apoio e por tornarem os meus dias mais felizes. Ahhh Mary, muito obrigada pela companhia nos domingos, na salinha do micrótomo, lembro-me das suas palavras de incentivo nos momentos de cansaço “Valéria vai dar tudo certo” e deu.

Ao Ronaldo Marquete e Roseli Torres, por compartilharem os seus conhecimentos acerca das Casearia, pela generosidade e por estarem sempre dispostos a ajudar. Ronaldo muito obrigada por toda a atenção ao longo do desenvolvimento deste trabalho, das inúmeras vezes que disponibilizou o seu tempo para discutirmos os resultados ou para esclarecer algumas dúvidas. Nunca esquecerei a famosa frase “Diga baiana” srrsr.

A minha querida amiga Patrícia Casaes, pelos momentos maravilhosos de descontração, pelo carinho e atenção ao longo dessa década de amizade.

À Aline Lavinsky (Alinoca) pela amizade e acolhida carinhosa na minha chegada à Viçosa.

À Caroline Jezler (Carol) pelo companheirismo e agradável amizade que construímos em Viçosa.

Aos amigos baianos (Alba, Alberto, Ana Paula, Celso, Cristina, Fábio, Gilmara, Jaci, Jane, Luís Alberto, Stella, Vânia, Vanda e Zé Maria) pelos incentivos e os ótimos momentos compartilhados.

Aos amigos que fiz em Viçosa (Álvaro, Andrea, Brenda, Cristielle, Daniela, Deborah, Eliza, Fernanda Farnese, Ivanilson, Karina, Kelem, Larisse, Thamires, Priscila, Samara, Sarah (Sarão), Tiago e Vanessa).

A Aurora e Patrícia, técnicas do laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, pelos auxílios e agradável convivência. Muito obrigada pelas palavras de incentivo, carinho e pelos ótimos momentos que compartilhamos.

Aos professores e amigos (Delmira, Eduardo, Larissa e Pedro) do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Santa Cruz, por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização das coletas na Bahia. Vocês são “os culpados” pela minha paixão pela microscopia eletrônica e serei eternamente grata pelos valiosos ensinamentos, incentivos e amizade. Prof^a. Delmira, minha primeira orientadora, muito obrigada pelas excelentes aulas que despertaram minha paixão pela anatomia vegetal, por toda confiança depositada e carinho.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Santa Cruz, Lucas, Lane e Jaci, pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM), Carla Ribeiro, Carlota Barroca e Gilmar Valente, pelos auxílios nas análises de microscopia eletrônica.

E a todos que, direta ou indiretamente, incentivaram e colaboraram com a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

BIOGRAFIA

VALÉRIA FERREIRA FERNANDES, filha de João Francisco Santos Fernandes e Gerusa Possidônio Ferreira Fernandes, nascida em Ilhéus, BA, em 25 de setembro de 1980. Ingressou na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em 2003 e concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas em 2006. Durante a graduação desempenhou atividades de monitoria em anatomia vegetal e bolsista de Iniciação Científica.

No período 2006 a 2011 atuou como técnica de laboratório na área de microscopia eletrônica no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC. Em março de 2010, iniciou o Mestrado em Produção Vegetal, pelo Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Santa Cruz, concluindo em fevereiro de 2012.

Iniciou o doutorado pelo Programa de Pós- Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa em abril de 2012, concluindo o trabalho com a defesa da tese intitulada “Estruturas secretoras foliares em *Casearia Jacq*: uma abordagem anatômica, ultraestrutural e taxonômica”, em março de 2016.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
ARTIGO I: COLLETTERS IN CASEARIA (SALICACEAE): A NEW INTERPRETATION FOR THE THEOID TEETH	7
ABSTRACT	8
INTRODUCTION	9
MATHERIAL AND METHODS	12
RESULTS	13
DISCUSSION	15
ACKNOWLEDGMENTS	19
REFERENCES	21
FIGURES	27
APPENDIX	31
ARTIGO II: COMO DISTINGUIR DUCTOS DE CAVIDADES? UM ESTUDO DE CASO EM CASEARIA JACQ. (SALICACEAE)	33
RESUMO	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	38
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	46
QUADRO	51
FIGURAS	53
MATERIAL SUPLEMENTAR	61
ARTIGO III: ESTRUTURAS SECRETORAS EM CASEARIA SYLVESTRIS SW. (SALICACEAE): MECANISMOS DE PRODUÇÃO E ELIMINAÇÃO DA SECREÇÃO	64

RESUMO	65
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	68
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83
FIGURAS.....	91
CONCLUSÕES GERAIS	102

RESUMO

FERNANDES, Valéria Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Estruturas secretoras foliares em Casearia Jacq: uma abordagem anatômica, ultraestrutural e taxonômica.** Orientadora: Renata Maria Strozi Alves Meira. Coorientadora: Marcela Thadeo

Casearia Jacq. é um dos maiores gêneros de Salicaceae com aproximadamente 180 espécies, das quais 50 ocorrem no Brasil, distribuídas em diferentes formações vegetacionais, sendo 21 endêmicas. Apesar das descrições taxonômicas relatarem a ocorrência de pontos e traços translúcidos nas lâminas foliares e glândulas nos ápices nos dentes marginais, estudos anatômicos caracterizando as estruturas secretoras são escassos. Os pontos e traços translúcidos foram descritos como cavidades e ductos em apenas seis espécies. O tipo de estrutura secretora tem sido utilizado, com sucesso, como marcador morfológico para estabelecimento de parentescos, bem como auxiliando o esclarecimento de problemas taxonômicos. Adicionalmente, a elucidação dos sítios de síntese/acúmulo de compostos, assim como a identificação da natureza química da secreção, podem corroborar os estudos fitoquímicos, indicando os locais responsáveis pela produção dos compostos secundários de interesse medicinal. Este trabalho teve os seguintes objetivos: (1) Identificar as estruturas secretoras que correspondem aos pontos e traços translúcidos das folhas das espécies de Casearia e verificar se presença, o tipo e a posição destas variam entre as espécies; (2) Caracterizar anatomicamente as glândulas dos ápices dos dentes marginais das espécies de Casearia; (3) Identificar os locais de síntese e/ou acúmulo de compostos secundários responsáveis pelas propriedades medicinais de *C. sylvestris*, espécie amplamente utilizada na medicina popular, e identificar a natureza química da secreção; (4) Elucidar os mecanismos de produção e eliminação das secreções produzidas nas diferentes estruturas secretoras de *C. sylvestris*. Em relação à descrição da presença de pontos e traços translúcidos na lâmina foliar, foi possível confirmar a correlação entre os mesmos com cavidades e ductos, respectivamente. Tais estruturas estavam presentes em 41 das 45 espécies analisadas. As três espécies da seção Piparea (*C. commersoniana*, *C. javitensis* e *C. spruceana*) estudadas, bem como *C. eichleriana*, não apresentam cavidades e ductos, o que sugere uma revisão do posicionamento destas espécies. Também foi possível estabelecer padrões de distribuição das cavidades/ductos no gênero. Os dados anatômicos

possibilitaram identificar os sítios de síntese e/ou acúmulo dos compostos secundários de *C. sylvestris*. A localização, estrutura anatômica, atividade secretora precoce e a natureza polissacarídica/proteica da secreção, permitem reconhecer as glândulas associadas aos dentes marginais das folhas de *Casearia* como coléteres do tipo padrão. A secreção produzida pelos mesmos tem sido relacionada com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, lubrificando e protegendo contra a dessecação e/ou contra o ataque de patógenos. Os dados ultraestruturais das diferentes estruturas permitiram compreender o papel das organelas nos processos de síntese, possibilitando correlacionar a ultraestrutura com a natureza química dos produtos secretados.

ABSTRACT

FERNANDES, Valéria Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Foliar secretory structures in *Casearia Jacq.*: an anatomical, ultrastructural and taxonomic approach.** Adviser: Renata Maria Strozi Alves Meira. Co-adviser: Marcela Thadeo.

Casearia Jacq. is one of the largest genera in Salicaceae, with ca. 180 species, among them 50 occur in Brazil in some vegetation types, 21 of them are endemic. Despite that taxonomic descriptions have reported the occurrence of pellucid–punctuations or –lines on the leaf blade and the glands at the apex of marginal leaf teeth, anatomical studies characterizing secretory structures, are scarce. Only for six species the pellucid–punctuations and pellucid–lines have been anatomically reported as cavities and ducts, respectively. The type of secretory structure has been successfully used as a morphological characters to establish relationships as well as to clarify taxonomic problems. In addition, elucidating the sites of synthesis/accumulation of compounds, as well as identifying the chemical nature of the secretion, may aid phytochemical studies by indicating the specific sites responsible for the production of secondary metabolites in medicinal plants. This work aimed to: (1) Identify the secretory structures that correspond to the pellucid–punctuations and –lines on leaves of *Casearia* species and verify whether the presence, type and position of these structures vary among species; (2) Anatomically characterize the glands at the apex of the marginal leaf teeth in *Casearia* species; (3) Identify the sites of synthesis and/or accumulation of the secondary metabolites responsible for the medicinal properties of *C. sylvestris*, a widely used species in folk medicine, as well as identify the chemical nature of the secretion; and (4) Elucidate the mechanisms of production and exudation of the secretions produced by the different secretory structures in leaves of *C. sylvestris*. The correlation of pellucid–punctuations and –lines on the leaf blade with cavities and ducts, respectively, was confirmed. These structures were present in 41 of the 45 analyzed species. *C. commersoniana*, *C. javitensis*, *C. spruceana* (the three studied species from section *Piparea*) and *C. eichleriana* do not have cavities or ducts, which suggests the need for a revision of the taxonomical positioning of these species. Distribution patterns of cavities and ducts in the genera were also established. The anatomical data allowed the identification of the sites of synthesis and/or accumulation of the secondary

metabolites in *C. sylvestris*. The placement, anatomical structure, precocious secretory activity and the polysaccharide/protein production allow recognize the glands associated with the marginal leaf teeth in *Casearia* as standard-type colleter. Colleter secretion has been suggested to be related with the protection of apical meristems and developing organs, by lubricating them and thus protecting them against desiccation, and/or also protecting them against pathogen. The ultrastructural data on the different secretory structures allowed the comprehension of the role played by organelles on the synthesis processes, thus it was possible to stablish correlation between the ultrastructure with the chemical nature of the secreted products.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Casearia Jacq. com aproximadamente 180 espécies é um dos maiores gêneros de Salicaceae. Possui distribuição pantropical (APG II, 2003; Stevens, 2001), com 75 espécies presentes em regiões tropicais e subtropicais das Américas (Sleumer, 1980). No Brasil aproximadamente 50 espécies (21 endêmicas) estão distribuídas em diferentes formações vegetacionais, como cerrado, caatinga, restinga e floresta (Sleumer, 1980; Marquete e Vaz, 2007; Marquete, 2010). A ampla distribuição geográfica e a grande variação morfológica dificultam, em alguns casos, a identificação correta de algumas espécies (Torres e Yamamoto, 1986).

Casearia foi organizado nas seções *Crateria*, *Guidonia*, *Endoglossum*, *Gossypiospermum*, *Piparea* e *Casearia*, sendo esta última subdividida em seis grupos informais: *Ilicifoliae*, *Nitidae*, *Singulares*, *Arboreae*, *Aculeatae* e *Decandrae* (Sleumer, 1980). Tradicionalmente incluído na família *Flacourtiaceae* DC, *Casearia* foi transferido para *Salicaceae* Mirbel em um estudo realizado com base em dados moleculares e morfológicos (Chase et al., 2002).

Salicaceae destaca-se pela diversidade de estruturas secretoras tendo sido descritas: idioblastos taníferos, ductos, cavidades (Thadeo et al., 2009, 2014), glândulas de óleo (Absy e Scavone, 1973), glândulas resinosas e nectários (Curtis e Lersten, 1974, 1978, 1980; Wilkinson 2007; Thadeo et al., 2008; Escalante-Pérez et al., 2012).

Embora nas descrições taxonômicas de *Casearia* seja comum a utilização dos termos pontos e traços translúcidos na lâmina foliar (Sleumer, 1980; Torres e Yamamoto, 1986; Marquete e Vaz, 2007; Marquete, 2010; Marquete e Mansano 2012, 2013) em apenas seis espécies, os mesmos foram caracterizados como cavidades e ductos, respectivamente (Thadeo et al., 2009, 2014). Adicionalmente idioblastos também foram observados, sendo o tipo e a posição destas estruturas secretoras taxonomicamente importantes para o gênero (Thadeo et al., 2014).

A ocorrência de glândulas nos ápices dos dentes marginais é relatada no gênero (Sleumer, 1980; Marquete, 2010; Marquete e Mansano, 2010, 2013). Entretanto, tais descrições foram efetuadas com base em observações em campo e análises em estereomicroscópio de amostras frescas e herborizadas, permitindo apenas uma descrição morfológica destas estruturas, do que resultou denominá-las, de modo genérico, como glândula. A identificação na natureza química da secreção, bem como a

caracterização anatômica dessas glândulas, podem contribuir para compreensão da função dessas estruturas, bem como dos produtos secretados.

A diversidade de estruturas secretoras relatada para *Casearia* pode fornecer dados relevantes para estudos taxonômicos e filogenéticos, pois estas podem variar quanto à morfologia, órgão em que ocorrem, posição, anatomia, natureza do material secretado e função que desempenham (Schnepf, 1974; Fahn, 1979; Evert, 2006). Diversos estudos comprovaram a importância das estruturas secretoras no esclarecimento de problemas taxonômicos (Coutinho et al., 2013; Dalvi et al., 2013), bem como em abordagens evolutivas (Vitarelli et al., 2015).

As espécies de *Casearia* Jacq. que são popularmente conhecidas como “guaçatonga” possuem importância medicinal (Pio Corrêa, 1984). *Casearia sylvestris* Sw. é uma dessas espécies, sendo largamente utilizada na medicina tradicional (Lorenzi e Matos, 2008; Ferreira et al., 2011). Alguns estudos relatam que as propriedades medicinais se devem aos compostos fenólicos e terpenóides presentes nas folhas (Sértie et al., 2000; Esteves et al., 2005). A identificação dos sítios de síntese e/ou armazenamento de substâncias bioativas tem importância para o entendimento da biologia da secreção e para o esclarecimento da função do produto secretado, gerando dados úteis para trabalhos de bioprospecção (Thadeo et al., 2009; Coutinho et al., 2010; Silva et al., 2012; Meira et al., 2014).

Neste contexto, este trabalho pretende responder os seguintes questionamentos:

- Nas folhas das espécies de *Casearia* os pontos e traços translúcidos podem ser correlacionados a cavidades e ductos, respectivamente? A presença, o tipo e a posição destas estruturas variam entre as espécies das diferentes seções?

- As glândulas dos ápices dos dentes marginais das espécies de *Casearia* correspondem a que tipo de estrutura secretora?

- Quais são os locais de síntese e/ou acúmulo de compostos secundários responsáveis pelas propriedades medicinais de *Casearia sylvestris*? Qual a natureza química da secreção e que função provavelmente desempenham?

Os dados ultraestruturais das estruturas secretoras de *C. sylvestris* podem fornecer informações relevantes para entender os mecanismos de produção e eliminação das secreções?

Com o objetivo de responder a esses questionamentos, o presente trabalho foi organizado em três capítulos, os quais foram redigidos na forma de artigos científicos,

como disposto nas normas de redação de teses da Universidade Federal de Viçosa, conforme detalhado abaixo.

Artigo I: Colleters in Casearia (Salicaceae): A new interpretation for the theoid teeth. Encontra-se publicado no periódico Botanical Journal of the Linnean Society. DOI: 10.1111/boj.12432

Artigo II: Como distinguir cavidades de ductos? Um estudo de caso em Casearia Jacq. (Salicaceae). Encontra-se nas normas do periódico Acta Botanica Brasilica.

Artigo III: Estruturas secretoras em Casearia sylvestris Sw. (Salicaceae): mecanismos de produção e eliminação da secreção. Encontra-se nas normas do periódico Annals of Botany.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absy ML, Scavone O. 1973. Sobre a morfologia e anatomia de *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha** 30: 641- 676.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. (The Angiosperm Phylogeny Group. Bremer B., Bremer K., Chase MW, Reveal JL, Soltes DE, Soltes PS, Stevens PF). **Botanical Journal of the Linnean Society** 141: 399- 436.
- Chase MW, Zmarzty S, Lledo´ MD, Wurdack KJ, Swensen SM, Fay MF. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. **Kew Bulletin** 57: 141-181.
- Coutinho IAC, Valente VMM, Meira RMSA. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany** 58: 224-232.
- Coutinho IAC, Meira RMSA, Francino DMT. 2013. Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): New evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. **Plant Systematics and Evolution** 299: 1709-1720.
- Curtis JD, Lersten NR. 1974. Morphology, seasonal variation, and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). **American Journal of Botany** 61: 835-845.
- Curtis JD, Lersten NR. 1978. Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. **American Journal of Botany** 65: 1003-1010.
- Curtis JD, Lersten NR. 1980. Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). **American Journal of Botany** 67: 1289-1296.
- Dalvi VC, Meira RMSA, Francino DMT, Silva LC, Azevedo AA. 2013. Anatomical characteristics as taxonomic tools for the species of *Curtia* and *Hockinia* (Saccifolieae-Gentianaceae Juss). **Plant Systematics and Evolution** 300: 99-112.
- Escalante-Pérez M, Jaborsky M, Lautner S, Fromm J, Müller T, Dittrich M, Kunert M, Boland W, Hedrich R, Ache P. 2012. Poplar extrafloral nectaries: Two types, two strategies of indirect defenses against herbivores. **Plant Physiology** 159: 1176-1191.
- Esteves I, Souza IR, Rodrigues M, Cardoso LGV, Santos LS, Sertié JAA, Perazzo FF, Lima LM, Schneedorf JM, Bastos JK, Carvalho JCT. 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* SW. **Journal of Ethnopharmacology** 101: 191-196.
- Evert, RF. 2006. **Esau's Plant anatomy**. Meristems, cells, and tissues of the plant body – their structure, function, and development. 3 ed. Wiley, New Jersey.

- Fahn A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London.
- Ferreira PMP, Costa-Lotufu LV, Moraes MO, Barros FWA, Martins AMA, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Santos AG, Pessoa C. 2011. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 83: 1373-1384.
- Lorenzi HE, Matos FJA. 2008. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa:
- Marquete R, Vaz ASF. 2007. O gênero *Casearia* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 58: 705-738.
- Marquete R. 2010. **O gênero *Casearia* Jacq. no Brasil**. Tese (Doutorado em Botânica-Diversidade Vegetal) Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Marquete R, Mansano VF. 2010. A New species of *Casearia* (Salicaceae) from Southeastern Brazil. **Novon** 20: 179-181.
- Marquete R, Mansano VF. 2012. Taxonomic Revision of the *Casearia ulmifolia* Complex (Salicaceae). **Novon** 22: 196-206.
- Marquete R, Mansano VF. 2013. A new species of *Casearia* (Salicaceae) from Brazil. **Journal of Systematics and Evolution** 51: 228-229.
- Meira RMSA, Francino DMT, Ascensão L. 2014. Oleoresin trichomes of *Chamaecrista dentata* (leguminosae): structure, function and secretory products. **International Journal of Plant Sciences** 175: 336-345.
- Pio Corrêa M. 1984. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v.3. Rio de Janeiro: Instituto de Desenvolvimento Florestal.
- Schnept E. 1974. **Gland cells**. In: Dynamic aspects of plant ultrastructure, (Robards A W (ed.), McGraw-Hill Book Co. Ltd., Maidenhead, p. 331-357.
- Sertié JAA, Carvalho JCT, Panizza S. 2000. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology** 38: 112-119.
- Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA. 2012. Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany** 60: 707- 717.
- Sleumer H. 1980. **Flacourtiaceae**. Monograph number 22. In: Flora Neotropica 22. The New York Botanical Garden, Nova York.
- Stevens PF. 2001. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/ research/ APweb> Data de Acesso: Maio, 2014

- Thadeo M , Cassino MF, Vitarelli NC, Azevedo AA, Araújo JM, Valente VMM, Meira RMSA. 2008. Anatomical and histochemical characterization of extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). **American Journal of Botany** 95: 1515-1522.
- Thadeo M, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 32: 329-338.
- Thadeo M, Azevedo AA., Meira RMSA. 2014. Foliar anatomy of neotropical Salicaceae: potentially useful characters for taxonomy. **Plant Systematics and Evolution** 300: 2073-2089.
- Torres RB, Yamamoto K. 1986. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacquin (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica** 9: 239-258
- Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuertes-Aguilar J, Meira RMSA. 2015. Foliar secretory structures in Crotonae (Euphorbiaceae): diversity, structure, and evolutionary significance. **American Journal of Botany** 102: 1-15.
- Wilkinson HP. 2007. Leaf teeth in certain Salicaceae and “Flacourtiaceae”. **Botanical Journal of the Linnean Society** 155: 241-256.

Artigo I: Colleters in Casearia (Salicaceae): a new interpretation for the theoid teeth

Publicado: Journal Botanical of the Linnean Society. DOI: 10.1111/boj.12432

Valéria Ferreira Fernandes¹; Marcela Thadeo²; Valdneá Casagrande Dalvi³;

Ronaldo Marquete^{4,5} & Renata Maria Strozi Alves Meira^{1*}

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36.570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP 87.020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, Rod. Sul Goiana Km 01, Zona Rural, CEP: 75.901-970, Caixa Postal 66, Rio Verde – Goiás, Brasil.

⁴Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Av. República do Chile 500, 7º andar, CEP: 20.031-170, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil e Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rua Pacheco Leão, 915, CEP: 22.460-030, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

⁵Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rua Pacheco Leão, 915, CEP: 22.460-030, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Short Running Heads: Theoid teeth of Casearia (Salicaceae)

* E-mail: rmeira@ufv.br ; Fax: (+55 31 3899 2584)

ABSTRACT

Salicaceae possess a variety of leaf teeth, many characterized as nectariferous salicoid or violoid teeth. One large genus, *Casearia* deviates from this generalization in having theoid teeth. Although taxonomic descriptions of *Casearia* have reported glands in the apex of teeth, there have been no descriptions of their anatomy or functional role. This work aims to describe the anatomy of the theoid teeth of 43 species of *Casearia*. Leaf samples from herbarium specimens were processed for light and scanning electron microscopy. Leaves of *C. sylvestris* were collected and fixed in the field for histochemical tests, which revealed only polysaccharides in secretory epidermal cells and outside of these cells. The glands have precocious development and are composed of a non-vascular central axis covered with a palisade-like secretory epidermis. During senescence, the cells of the palisade-like secretory epidermis and central axis appear to lose their typical form, with some cells walls disintegrating. In the mature leaf an abscission zone at the base of gland causes the gland's detachment. The placement, anatomical structure, precocious activity and polysaccharidic secretion (in *C. sylvestris*) allow the recognition of the glands associated with the marginal teeth of *Casearia* as colleters. Similar studies are needed for other genera in order to clarify how colleters have evolved in Salicaceae and how they are functionally and anatomically related to other teeth types in the family.

ADDITIONAL KEYWORDS: colleters – Flacourtiaceae – foliar anatomy – Salicaceae – salicoid teeth– secretory structures – theoid teeth.

INTRODUCTION

Casearia Jacq., with almost 180 species, is one of the largest genera of Salicaceae with approximately 75 of these species present in the tropical and subtropical areas of the Americas (Sleumer, 1980), which 21 species are endemic to Brazil (Marquete, 2010). The genus is organized into six sections: Crateria, Guidonia, Endoglossum, Gossypiospermum, Piparea, and Casearia. The section Casearia is subsequently organized into six informal groups: Ilicifoliae, Nitidae, Singulares, Arboreae, Aculeatae and Decandrae (Sleumer, 1980). Traditionally this genus has been included in the family Flacourtiaceae DC. , but based on molecular data it was transferred to a broadly circumscribed Salicaceae (Chase et al., 2002; APG III, 2009; APG IV, 2016) or a narrowly circumscribed Samydaceae (Wurdack & Davis, 2009; Xi et al., 2012).

In the broad taxonomic treatment, Salicaceae are characterized by the absence of cyanogenic glycosides (with the exception of *Banara* Aubl.) and the presence of salicin phenolic compounds (Chase et al., 2002), seeds often arillate, the presence or absence of nectariferous disks or glands in the ovary, and salicoid teeth on the margin of the leaves of most of the genera (Judd et al., 2007). A variety of leaf teeth are registered to Salicaceae, described as nectariferous salicoid or violoid tooth (Alford, 2005). Having salicoid teeth was the only morphological synapomorphy proposed for the Salicaceae but it is absent in *Casearia* (Judd et al., 2007), as well in closed relative genera like *Laetia* and *Ryania* that also occur in Brazil (Alford, 2005).

Salicoid teeth are characterized by the presence of a spherical callosity fused to the tooth apex, are non-deciduous and appear as a non-opaque dark seta (Hickey & Wolfe, 1975; Metcalfe & Chalk, 1979; Judd et al., 2007). Several vascular bundles

merge and branch toward salicoid tooth, forming excessive vascularization (Thadeo, Azevedo & Meira, 2014). On the other hand, violoid teeth present a medial vein running to the apex where it expands into an opaque glandular termination, without an deciduous apical seta (Hickey & Wolfe, 1975). *Casearia* deviates from this generalization for Salicaceae in having theoid teeth (Judd et al., 2007), in which the medial vein of the tooth runs to the apex, expands and congests with opaque material, such a way that the tooth apex is capped by an opaque deciduous seta (Hickey & Wolfe, 1975).

The presence of “glands” on the apex of leaf margin teeth in *Casearia* has been reported in some taxonomic papers (Sleumer, 1980; Marquete, 2010; Marquete & Mansano, 2012, 2013). These descriptions were based on fresh samples observed in the field and herbarium samples analyzed with a stereomicroscope, and so are limited to general morphology. The glands present on the leaf base and margin of species of other genus of Salicaceae have been anatomically and/or functionally described and characterized as: “like colleters” in *Dovyalis hebecarpa* (Gardner) Warb. (Wilkinson, 2007); extrafloral nectaries (EFNs) in *Populus grandidentata* Michx. (Curtis & Lersten, 1978), *Populus trichocarpa* Torr. & A.Gray ex Hook. (Escalante-Pérez et al., 2012) and *Prockia crucis* P. Browne ex. L. (Thadeo et al., 2008); resin glands in *Salix lucida* Muhl. (Curtis & Lersten, 1980) and *Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall (Curtis & Lersten, 1974). The theoid teeth of six species of *Casearia* were anatomically described as non-epithem hydathodes (Thadeo et al., 2014).

Hydathodes, EFNs and colleters are secretory structures that are present on leaf margins of various species (Curtis & Lersten, 1974; Curtis & Lersten, 1978; Fahn, 1979; Thadeo et al., 2008; Coutinho, Valente & Meira, 2010; Mercadante-Simões &

Paiva, 2013). The main parameters for distinguishing such structures are morphoanatomical description and functional role, besides the chemical nature of secreted compounds. Hydathodes secrete water exuded by epidermal pore (Elias & Gelband, 1977; Fahn, 1979). EFNs produce a sugar solution (nectar) exuded by epidermal pore or secretory epidermis, exhibit great morphoanatomical variation and are distributed widely on plants (Fahn, 1979; Nicolson & Thornburg, 2007). EFNs occurring on the rachis, petiole, adaxial face of leaf (Fahn, 1979), leaf margin (Thadeo et al., 2008; Rocha et al., 2009; Coutinho et al., 2010). Colleters produce a sticky secretion that functions as a lubricant, protecting meristems and developing organs against desiccation and attack by pathogens (Thomas, 1991; Mayer, Cardoso-Gustavson & Appezzato-da-Glória, 2011; Mayer, Carmello-Guerreiro & Mazzafera, 2013). Colleters occur on the adaxial surface of young reproductive and (or) vegetative organs found in several families of eudicots (Fahn, 1979; Thomas, 1991; Klein et al., 2004; Martins, 2012; Coelho et al., 2013; Dalvi et al., 2014; Lopes-Mattos et al., 2015) and only in Orchidaceae of monocots (Leitão & Cortelazzo, 2008; Mayer, et al., 2011). Recently, colleters were also reported at the leaf margins for some species (Paiva, 2012; Mercadante-Simões & Paiva, 2013; Vitarelli et al., 2015; Feio, Riina and Meira, 2016).

Therefore, anatomical studies and histochemical tests of *Casearia* are necessary in order to identify the type of gland that is associated with their teeth and to determine the chemical composition of their secretion, respectively. The aim of this work was to anatomically characterize the theoid teeth of *Casearia* by studying species of all six sections (sensu Sleumer, 1980).

MATERIAL AND METHODS

Samples of entire mature and/or young leaves (from first or second node) for 43 species of all six sections of *Casearia* (sensu Sleumer, 1980) were collected from herbarium material (List of material used). The samples were rehydrated (Smith & Smith, 1942), then dehydrated in an ethanol series and stored in 70% ethanol.

To describe the structure of the glands on the margin of leaf teeth, whole or fragmented leaves were cleared, stained with 50% alcoholic fuchsin according Vasco et al. (2014), and mounted in glycerin jelly (Johansen, 1940). Fragments of leaf with glands were selected from the leaf margin using a stereomicroscope (Stemi 2000-C®, ©Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), embedded in methacrylate resin (Historesin Leica, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and sectioned using an automatic rotary microtome with glass knives (Leica RM2265, Deerfield, IL, USA). Longitudinal and cross sections of 5 µm thick were stained with toluidine blue at pH 4.7 (O'Brien and McCully, 1981) and mounted on slides with resin (Permount, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Samples of stem apical meristem and leaves in different stages of development of *Casearia sylvestris* Sw. were collected in the national park “Flona de Paraopeba”, (Paraopeba, MG, Brazil), in order to describe secretion and to perform histochemical tests. These samples were fixed in FAA (formaldehyde, acetic acid, 50% ethanol, 1:1:18 by volume) for 48 h under a vacuum and stored in 70% ethanol (Johansen, 1940) prior to being embedded and sectioned as described above. The histochemical tests included xylidine Ponceau for total proteins (O'Brien & McCully, 1981) and PAS (Periodic acid Schiff's reagent) for total polysaccharides (McManus, 1948). Some samples were

sectioned on a table microtome (LPC model; Rolemberg and Bhering Trade and Import LTDA, Belo Horizonte, Brazil) and submitted to Sudan IV for detection of total lipids (Pearse, 1980).

Imaging was performed using an Olympus AX70TRF light microscope (Tokyo, Japan) equipped with a U-Photo System and an AxioCam HRc digital camera (Zeiss, Göttingen, Germany).

For micromorphological analysis, samples stored in 70% ethanol were dehydrated in an ethanol series and subjected to critical point drying using CO₂ (CPD 020; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). The samples were then fixed on stubs and sputter coated with gold (FDU 010; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Observations were performed using a Leo 1430 VP scanning electron microscope (Zeiss, Cambridge, England) at the Center for Microscopy and Microanalysis at Universidade Federal de Viçosa (UFV).

RESULTS

Of the 43 species examined, only *Casearia eichleriana* had leaves with entire margins (Fig. 1A, B). The remaining 42 species had leaves with marginal theoid teeth, as illustrated by *C. mestrensis* and *C. altiplanensis* (Fig. 1C, D). These theoid teeth may have two portions: a basal non-glandular portion and a glandular apical portion. The basal non-glandular portion may presents variable length (Fig. 1C–F), reaching until twice the length of the glandular portion, or even may be absent (Fig. 1G). Variations in the length of the non-glandular portion were notice among different specimens and among different leaf regions.

In the leaf primordia and young leaves (Fig. 1C), the glandular portion is present, while in mature leaves a darker region at the non-glandular portion shows the abscission zone of the senescent gland (Fig. 1D–F). Due to abscission of glandular portion, scars can be observed on the marginal tooth (Fig. 1H).

The glands of *C. sylvestris* differentiate precociously, as observed in the leaf primordium. This differentiation occurs prior to the differentiation of the foliar mesophyll. In this phase of development, the leaf primordium still has the leaf margins folded in a way that the ventral surface remains protected (Fig. 2A–D) and the dorsal surface maintain contact with the leaves of the following node. The fluid secretion produced by glands flows out lubricating the primordium and protecting against dehydration. As the leaves expand, the edges unroll and expose the leaf margins with the glands (Fig. 2E, F).

In the first stages of development, the differentiating glands exhibit a secretory epidermis surrounded the central axis of non-secretory cells. The secretory epidermis is covered with a thin cuticle and the cells have a conspicuous medially located nucleus, evident nucleolus and dense cytoplasm (Fig. 2G). The polysaccharide nature of the secretion that accumulates in the subcuticular space, as well as the extravasated secretion, was confirmed by the PAS test (Fig. 2H). Pores or a ruptured cuticle were not observed. The histochemical test for protein (xylidine Ponceau) was negative and the test for lipids (Sudan IV) was weakly positive (data not shown).

The glands of young and/or of fully expanded leaves are non-vascularized and have central axis cells with thin pectocellulosic walls and secretory palisade-like epidermal cells covered by a thin cuticle (Figs. 2 B, 3 A–C). In *C. rupestris*, druses were observed in the central axis cells (Fig. 3B). The marginal glands can have a short

peduncle (Fig. 3D), which corresponds to non-glandular portion, as well can be sessile (Fig. 3E, F).

In the mature leaves some of the glands exhibited secretion (Fig. 3D, E), whereas others were senescent (Fig. 3G, H) and/or absent due abscission (Fig. 1H). The secretory epidermal cells in the senescent glands had a hyaline cytoplasm and were deformed, some of them with broken walls (Fig. 3B). In the final phase of senescence, which may precede gland abscission, the epidermal and central axis cells were intensely stained green by toluidine blue (Fig. 3C), indicating the presence of phenolic compounds. In the intersection between the glandular and non-glandular portion of the teeth, a tissue of tabular cells corresponds to the abscission zone (Fig. 3C). In senescent glands the typical form described for the secretory phase is altered, with the surface becoming wrinkled and cells collapsing (Fig. 3G, H).

DISCUSSION

The glands associated with the marginal teeth of *Casearia* leaves are considered colleters due to their placement, anatomical characteristics, premature secretory activity, and polysaccharide nature detected in *C. sylvestris*. The colleters described in this work correspond to the previously described opaque deciduous seta of theoid teeth (Hickey & Wolfe, 1975), as also reported for *Casearia* (Judd et al., 2007). The absence of other previous records of colleters in *Casearia* can probably be explained by samples being limited to fully expanded leaves since these glands are senescent at this stage, and often fall off leaving just scars, which are difficult to interpret. The present study demonstrates the importance of investigating young leaves

and the relevance of combining analyses of the chemical nature of secretion with anatomical studies for the correct identification of these marginal glands.

The presence of colleters on leaf margins has been suggested for *Dovyalis hebecarpa*, also a species of Salicaceae, which were called “colleter-like-glands” (Wilkinson, 2007), because they resembled the “standard type colleter”. The necessity of studying young leaves in order to identify marginal glands, since these structures could necrose or abscise, was reinforced by this author (Wilkinson, 2007). The presence of colleters on the leaf margin has already been recorded for 21 species of *Croton*, *Astraea lobata* (L.) Klotzch and *Brasiliocroton mamoninha* P.E. Berry & Cordeiro (Euphorbiaceae, Vitarelli et al., 2015), *Croton echinocarpus* Müll. Arg. and *C. urucurana* Baill. (Euphorbiaceae, Feio et al., 2016) and in leaf-teeth for some species of *Prunus* L. (Rosaceae, Chin et al., 2013), *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae, Paiva, 2012) and *Tontelea micrantha* (Mart. ex Schult) A.C.Sm. (Celastraceae, Mercadante-Simões & Paiva, 2013).

The leaf teeth of six species of *Casearia* were described as non-epithem hydathodes (Thadeo et al., 2014). In the present study, we re-analyzed these same species and were able to verify that in the young and/or fully expanded leaves the marginal teeth possessed colleters and not hydathodes. Since these colleters are deciduous, previous authors probably observed only the main vein region of the tooth with vasculature exclusively comprised of xylem, thereby leading them to interpret the structure as a hydathode. However, a senescent colleter can be seen in an image in Thadeo et al. (2014: Fig. 1C), which was described as a theoid tooth seta.

Anatomical studies and chemical analyses of secretion are very important tools, especially in combination, for correctly identifying and characterizing marginal

glands, as the present study demonstrates. In Salicaceae, for example, there are both resin glands and nectaries in the marginal teeth of *P. grandidentada*, and the nectaries differ from the resin glands because they secrete nectar (Curtis & Lersten, 1978).

The colleters of *C. sylvestris* are active in the leaf primordium, and the polysaccharide secretion involves the meristematic region and the primordium. These results agree with the known functions of colleter secretion: to help lubricate the vegetative and reproductive meristems as well as the leaf primordium, and to reduce water loss to the environment thereby protecting the developing organs from dehydration (Thomas, 1991; Mayer et al., 2013).

The colleters of *Casearia* are the standard type according to the classification proposed by Lersten (1974). Such structures have an elongated axis covered by a one-layer palisade-like secretory epidermis. Standard type colleters have been described for other species of Malpighiales (Sheue, Chen & Yang, 2012; Vitarelli et al., 2015). Colleter type and position have been used as taxonomic characters (Thomas, 1991; Klein et al., 2004; Coutinho et al., 2010; Silva et al., 2012; Vitarelli et al., 2015). The present study is the first record of colleters in the Salicaceae, and their taxonomic potential deserves to be investigated further.

The colleters of all the studied species of *Casearia* are non-vascularized, indicating that this may be a feature common to the entire genus. Non-vascularized colleters are known from Myrtaceae (Silva et al., 2012), *Chamaecrista* (Fabaceae, Coutinho et al., 2015), and are found in *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae, Paiva & Machado, 2006) and *Macrocarpaea obtusifolia* (Griseb.) Gilg (Gentianaceae, Dalvi et al., 2014). Vascularized colleters are present in Rubiaceae (Miguel et al., 2006), and Apocynaceae (Martins, 2012). There is no functional correlation between the

presence of vascularization and secretory activity; however, the presence, or absence, of vascularization can be taxonomically useful (Coutinho et al., 2015).

The presence of calcium oxalate crystals, as seen in *Casearia rupestris* Eichler, has also been recorded from *Tontelea micranta* (Celastraceae, Mercadante-Simões & Paiva, 2013) and *Psychotria nuda* (Cham. & Schltld.) Wawra (Rubiaceae, Miguel, Moraes & Cunha, 2009). The function of these crystals remains unknown and is controversial; however, several hypothesis claim that these crystals are able to regulate calcium inside the plant, protect the plant against herbivores, and provide plant detoxification (Franceschi & Nakata, 2005).

The cuticle that covers the secretory epidermis of the colleter is smooth and thin, and there was no evidence of pores or other disruptions that are known mechanisms of exudation in colleters, as reported in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Vitarelli & Santos, 2009), *Croton glandulosus* L. (Machado et al., 2015), and species of *Chamaecrista* (Coutinho et al., 2015).

The morphological features of colleters of *Casearia* at senescence agree with those reported in the literature. The disorganization and collapse of the palisade-like epidermal cells in the central axis were also verified in *Bathysa gymnocarpa* K.Schum. and *B. stipulata* (Vell.) C. Presl. (Miguel et al., 2010), *Alseis pickelii* Pilg. & Schmale (Rubiaceae, Tullii et al., 2013) and *Macrocarpaea obtusifolia* (Dalvi et al., 2014). The formation of an abscission layer was noticed in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae, Paiva, 2012), *Tontelea micranta* (Mercadante-Simões & Paiva 2013), *Dovyalis hebecarpa* (Wilkinson, 2007), and *Macrocarpaea obtusifolia* (Dalvi et al., 2014). Premature activity in colleters is important for lubricating and protecting young or developing leaves, which then senesce or detach in mature leaves.

The presence of colleters in the order Malpighiales seems to be common since they were reported on the stipules adaxial face (Paiva & Machado, 2006; Sheue et al., 2012), and on the margin of leaf primordium and young leaves (Vitarelli et al., 2015) and the margin of leaves, on the base, margins and apex of stipules and in pistillate and staminate flowers (Feio et al., 2016). This present work demonstrates the presence of colleters in 42 species of *Casearia*, and thus represents the first record of these structures in Salicaceae. Our data show these structures to be quite common in the genus and a reinterpretation for the concept of theoid teeth according Hickey & Wolfe (1975) is presented. The following definition is proposed: theoid teeth occur on leaf margins, are variable in size, and are formed of a vascularized non-secretory portion (which can be absent) and by a secretory portion which constitutes a colleter. Investigations into the presence of colleters in other genera could address the phylogenetic or functional importance of these structures for Salicaceae.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEMIG (Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais), and Floresta-Escola SECTES/UNESCO/HidroEX/FAPEMIG) for financial support. We also thank CNPq for providing a research scholarship to R.M.S.A. Meira and CAPES for providing a PhD scholarship to V. F. Fernandes. We are grateful to the herbaria CEPEC, IAC, NY, RB, UEC and VIC, for kindly allowing the sampling of their voucher specimens. We thank the Microscopy and Microanalysis Center of the UFV

and Patricia Fonseca for her technical assistance. Comments by anonymous reviewers were very helpful.

REFERENCES

- Alford MH. 2005.** Systematic studies in Flacourtiaceae. Unpublished Ph.D. Dissertation. Cornell University, Ithaca.
- APG III. 2009.** An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105–121.
- APG IV. 2016.** An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 1-20.
- Chase MW, Zmarzty S, Lledó MD, Wurdack KJ, Swensen SM, Fay MF. 2002.** When in doubt, put it in Flacourtiaceae: A molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. *Kew Bulletin* **57**: 141–181.
- Chin S-W, Lutz S, Wen J, Potter D. 2013.** The bitter and the sweet: Inference of homology and evolution of leaf glands in *Prunus* (Rosaceae) through anatomy, micromorphology, and ancestral-character state reconstruction. *International Journal of Plant Sciences* **174**: 27–46.
- Coelho VPM, Leite JPV, Fietto LG, Ventrella MC. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): development, ultrastructure and chemical composition of the secretion. *Flora* **208**: 579–590.
- Coutinho IAC, Valente VMM, Meira RMSA. 2010.** Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). *Australian Journal of Botany* **58**: 224–232.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2015.** New Records of Colleters in *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae s.l.): Structural Diversity, Secretion, Functional Role, and Taxonomic Importance. *International Journal of Plant Sciences* **176**: 72–85.

Curtis JD, Lersten NR. 1974. Morphology, seasonal variation, and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **61**: 835–845.

Curtis JD, Lersten NR. 1978. Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **65**: 1003–1010.

Curtis JD, Lersten NR. 1980. Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **67**: 1289–1296.

Dalvi VC, Cardinelli LS, Meira RMSA, Azevedo AA. 2014. Foliar colleters in *Macrocarpaea obtusifolia* (Gentianaceae): anatomy, ontogeny, and secretion. *Botany* **92**: 59–67.

Elias TS, Gelband H. 1977. Morphology, anatomy, and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Botanical Gazette* **138**: 206–212.

Escalante-Pérez M, Jaborsky M, Lautner S, Fromm J, Müller T, Dittrich M, Kunert M, Boland W, Hedrich R, Ache P. 2012. Poplar Extrafloral Nectaries: Two Types, Two Strategies of Indirect Defenses against Herbivores. *Plant Physiology* **159**: 1176–1191.

Fahn A. 1979. Secretory tissues in plants. London: Academic Press.

Feio AC, Riina R, Meira RMSA. 2016. Secretory structures in leaves and flowers of two dragon's blood *Croton* (Euphorbiaceae): new evidence and interpretations. *International Journal of Plant Sciences* **177**: [Epub ahead of print].

Franceschi VR, Nakata PA. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annual Review of Plant Physiology* **56**: 41–71.

Hickey LJ, Wolfe JA. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: vegetative morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **62**: 538–589.

Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2007. Plant systematics: a phylogenetic approach vegetal. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc.

Klein DE, Gomes VM, Silva-Neto SJ, Cunha M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* **94**: 733–740.

Leitão CAE, Cortelazzo AL. 2008. Structural and histochemical characterization of the colleters of *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany* **56**: 161–165.

Lersten NR. 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.

Lopes-Mattos KLB, Otuki SAP, Azevedo AA, Pereira ZV, Meira RMSA. 2015. Colleters in 10 species belonging to three tribes of Rubiaceae: morphoanatomical diversity and potential as useful characters for taxonomy. *Botany* **93**: 1– 10.

Machado SR, Paleari LM, Paiva EAS, Rodrigues TM. 2015. Colleters on the inflorescence axis of *Croton glandulosus* (Euphorbiaceae): Structural and functional characterization. *International Journal of Plant Sciences* **176**: 86–93.

Marquete R. 2010. O gênero *Casearia* Jacq. no Brasil. Unpublished PhD. Thesis, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, Brasil.

Marquete R, Mansano VF. 2012. Taxonomic Revision of the *Casearia ulmifolia* Complex (Salicaceae). *Novon* **22**: 196–206.

Marquete R, Mansano VF. 2013. A new species of *Casearia* (Salicaceae) from Brazil. *Journal of Systematics and Evolution* **51**: 228–229.

Martins FM. 2012. Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Brazilian Journal Botany* **35**: 59–69.

Mayer JLS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-Da-Glória B. 2011. Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. *Flora* **206**: 185–190.

Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Mazzafera P. 2013. A functional role for the colleters of coffee flowers. *Annals of Botany* **5**: 1–13.

McManus JFA 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**: 99–108.

Mercadante-Simões MO, Paiva EAS. 2013. Leaf colleters in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural aspects. *Academie des Sciences. Comptes Rendus. Biologies* **336**: 400–406.

Metcalf CR, Chalk L. 1979. Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of the leaf and stem with a brief history of the subject. vol. 1, 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.

Miguel EC, Gomes VM, Oliveira MA, Cunha M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology* **8**: 715–722.

Miguel EC, Moraes DG, Cunha M. 2009. Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schldl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and cristals microanalysis. *Acta Botanica Brasilica* **23**: 1034–1039.

Miguel EC, Oliveira MA, Klein DE, Cunha M. 2010. Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **33**: 425–436.

Nicolson SW, Thornburg RW. 2007. Nectar chemistry. In: Nicolson SW, Nepi M, and Pacini E. eds. *Nectaries and Nectar*. Dordrecht: Springer, 215–264.

O'Brien TP, Mccully M E. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphi Pty.

Paiva EAS. 2012. Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure, secretion and evidences for young leaf protection. *The Journal of the Torrey Botanical Society* **139**: 1–8.

Paiva EAS, Machado SR. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* **66**: 301–308.

Pearse AGE. 1980. *Histochemistry: Theoretical and applied*. vol. 2, 4th ed. . Edinburgh: Churchill Livingstone.

Rocha DI, Campos SL, Valente VMM, Francino DMT, Meira RMSA. 2009. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). *Australian Journal of Botany* **57**: 619–626.

Sheue C-R, Chen Y-J, Yang YP. 2012. Stipules and colleters of the mangrove Rhizophoraceae: Morphology, structure and comparative significance. *Botanical Studies* **53**: 243–254.

Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA. 2012. Anatomical characterization of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **60**: 707–717.

Sleumer H. 1980. Flacourtiaceae. In: Rogerson CT ed. *Flora Neotropica*. Monograph 22. New York: The New York Botanical Garden, 1–499.

Smith FH, Smith EC. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* **29**: 464–471.

Thadeo M, Cassino MF, Vitarelli NC, Azevedo AA, Araújo JM, Valente VMM, Meira RMSA. 2008. Anatomical and histochemical characterization of extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **95**: 1515–1522.

Thadeo M, Azevedo AA, Meira RMSA. 2014. Foliar anatomy of neotropical Salicaceae: potentially useful characters for taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* **300**: 2073–2089.

Thomas V. 1991. Review Article. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* **68**: 287–305.

Tullii CF, Miguel EC, Lima NB, Fernandes KVS, Gomes VM, Cunha M. 2013. Characterization of stipular colleters of *Alseis pickelii*. *Botany* **91**: 403–413.

Vasco A, Thadeo M, Conover M, Daly DC. 2014. Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. *Applications in Plant Sciences* **9**: 1–4.

Vitarelli NC, Santos M. 2009. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* **23**: 923–928.

Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MB, Cordeiro I, Aguilar J-F, Meira RMSA. 2015. Foliar secretory structures in Crotonae (Euphorbiaceae): diversity, structure, and evolutionary significance. *American Journal of Botany* **102**: 1–15.

Wilkinson HP. 2007. Leaf teeth in certain Salicaceae and ‘Flacourtiaceae’. *Botanical Journal of the Linnean Society* **155**: 241–256.

Wurdack KJ, Davis CC. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* **96**: 1551–1570

Xi Z, Ruhfel BR, Schaefer H, Amorim AM, Sugumaran M, Wurdack KJ, Endressg PK, Matthews ML, Stevens PF, Mathews S, Davis CC. 2012. Phylogenomics and a posteriori data partitioning resolve the Cretaceous angiosperm radiation Malpighiales. *PNAS* **109**: 17519–17524

FIGURES

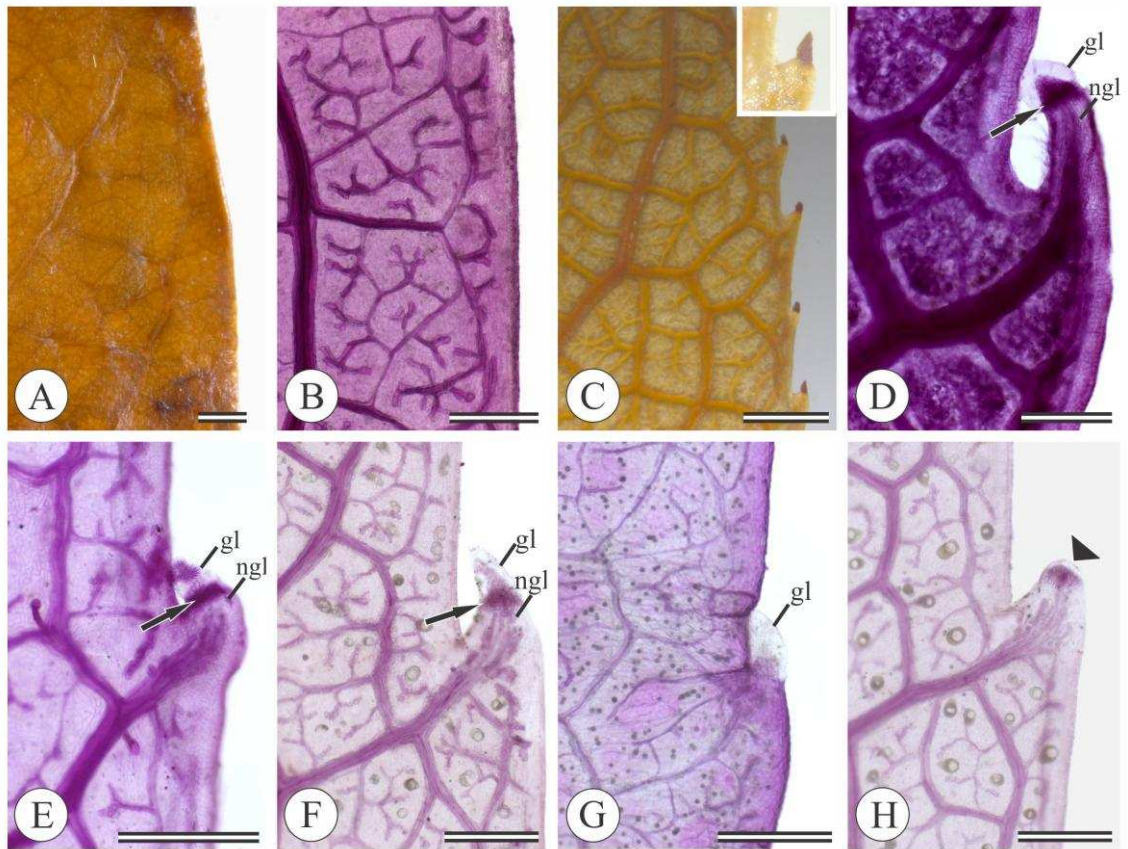


Figure 1. Leaf margins of species of *Casearia* viewed by stereomicroscope (A ,C) and under light microscopy of cleared samples (B , D-H). (A , B) Entire margin of the leaf of *C. eichleriana*. (C–G) Glands on the apex of a marginal tooth showing the glandular apical (gl) and non-glandular (ngl) portions. (C) Young leaves of *C. mestrensis*. Note the tooth glands. (D–G) Senescent glands of *C. altiplanensis* (D), *C. lasiophylla* (E), *C. tremula* (F), and *C. decandra* (G), darker region at the non-glandular portion shows the abscission zone (arrow) of the senescent gland. (H) Scars on the marginal tooth formed by the abscission of glands in *C. decandra*. Note the variation in the non-glandular portion (ngl). Bars= A, C: 0,1 cm; B, D-H: 300 μ m

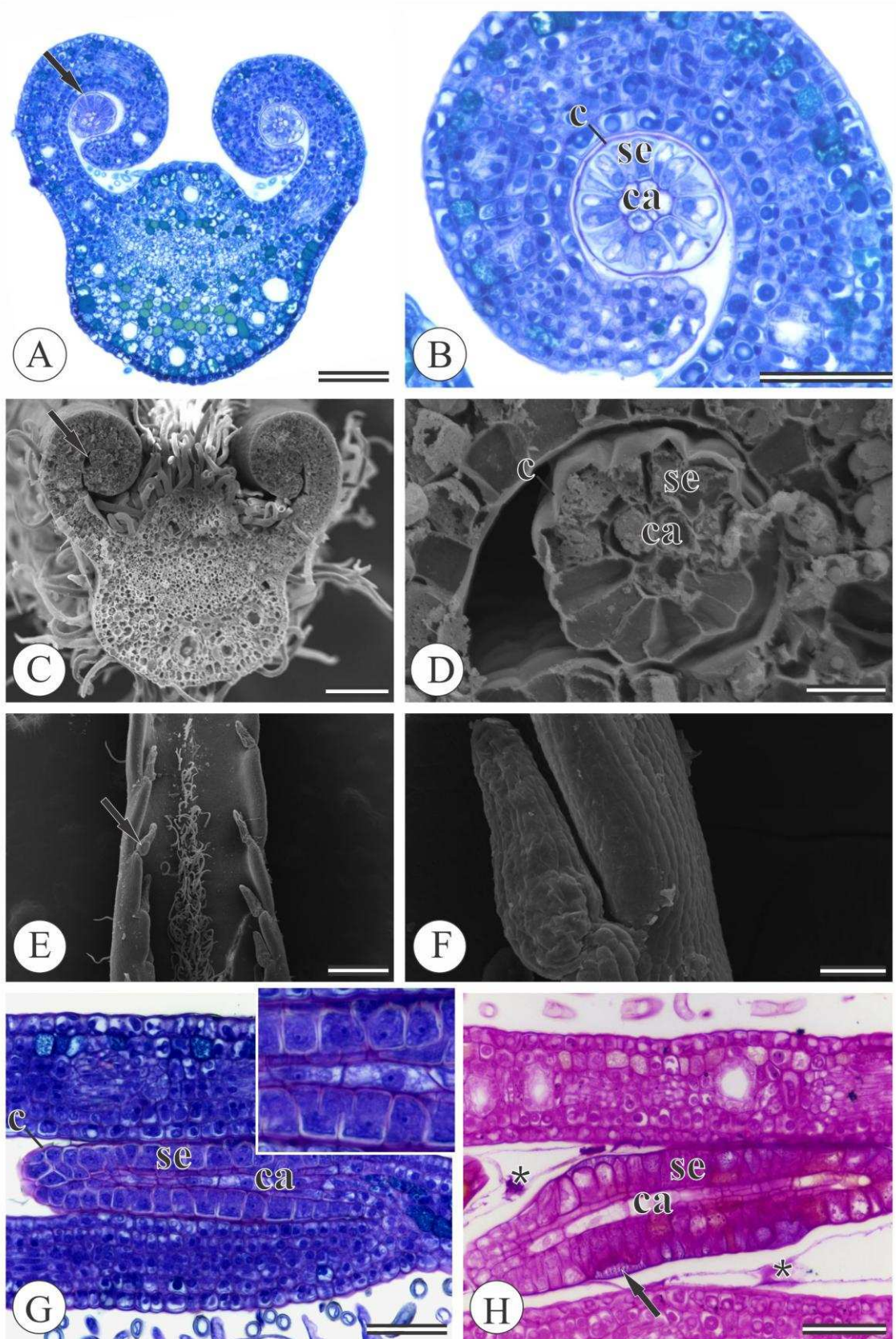


Figure 2. Leaf primordium of *C. sylvestris* showing glands under light microscopy (A, B, G and H) and scanning electron microscopy (C-F). Cross sections (A-D) and longitudinal sections (G, H). (A-D) Folded margins showing glands. Note the thin

pectocellulosic walls and thin cuticle covering secretory palisade-like epidermal cells. (E, F) As the leaves begin to expand, the edges unroll and expose the margin with glands along in the apex of teeth. (G) Central axis (ca) and secretory epidermal cells (se) of glands with conspicuous nuclei in a medial position. (H) Positive reaction to PAS in the secretory epidermis showing secretion in the subcuticular space (arrow) and outside the cell (asterisk). Bars= A, C: 100 μm ; B, F-H: 50 μm ; D: 10 μm ; E: 300 μm .

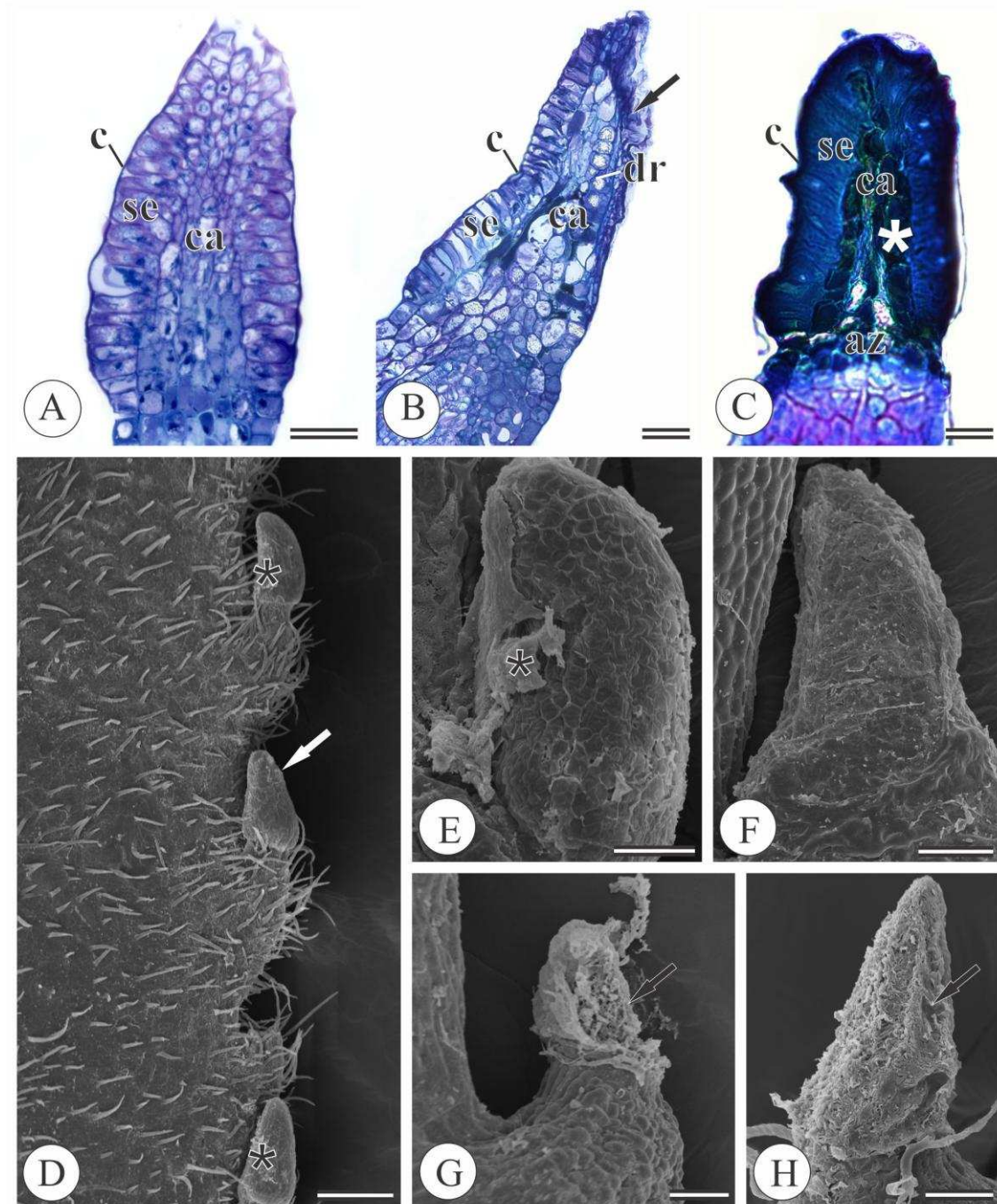


Figure 3. Marginal glands in species of *Casearia*. Light microscopy (A–C) and scanning electron microscopy (D–H) (A) Non-vascularized gland of *C. aculeata* showing central axis with thin pectocellulosic cell walls, and secretory palisade-like epidermis covered by a thin cuticle. (B) Gland in *C. rupestris* with druses (dr) in the central axis; note the collapse of a few of the secretory epidermal cells (black arrow). (C) Gland in *C. mestrensis* showing phenolic compounds in central axis (white asterisk) and abscission zone (az). (D) Short-stalked gland (white arrow) in *C. luetzelburgii*. (E, F) Sessile gland in *C. tremula* and *C. rupestris*, respectively. (G) Senescent gland with collapsed cells (black arrow) in *C. mestrensis*. (H) Gland surface that has become wrinkled (black arrow) in *C. grandiflora* se, secretory epidermis; ca, central axis; c, cuticle; dr, druses; az, abscission zone; black asterisk, secretion in glands. Bars= A, B: 50 μm ; C: 25 μm ; D: 200 μm ; E, G and H: 40 μm ; F: 60 μm .

APPENDIX: List of material used. Species of *Casearia* and voucher information.

Section: Taxon: Voucher (Herbarium code). The herbaria acronyms: CEPEC= Herbário do Centro de Pesquisa do Cacau; INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; NY = New York Botanical Garden; RB = Jardim Botânico do Rio de Janeiro; IAC= Instituto Agrônomo de Campinas; UEC = Herbário da Universidade Estadual de Campinas; VIC = Herbário da Universidade Federal de Viçosa. Collections fixed in FAA (formaldehyde, acetic acid and 50% ethanol) are indicated by asterisk (*).

Guidonia – *Casearia spinescens* (Sw.) Griseb.: Kuhlmann 6446 (RB), Stannard 826 and Arraís (NY), Britton 6875 (NY), Buntriy 6610 (NY), Curtiss 750 (NY), León 5056 (NY).

Endoglossum – *Casearia tremula* (Grisebach) Grisebach ex Wright: Howard 10581 (NY), Arnaldo-Broeders 3793 (NY), Buntriy 5103 (NY), Dugand 6324 (NY), Gentry and Cuadros 47607 (NY).

Gossypiospermum – *Casearia luetzelburgii* Sleumer: Farney 4160 and Gomes (IAC); *Casearia gossypiosperma* Briq.: Scardino 1015 et al. (RB), Silva and Barbosa 4865 (RB), Thomas et al. s.n (CEPEC), Duarte and Chiregatto 104 (IAC); *Casearia praecox* Griseb.: Lack, 5971 (NY), Stevens 22930 (NY), Burger and Gentry Jr. 9168 (NY).

Crateria – *Casearia obliqua* Spreng. : Carvalho s.n (CEPEC), Hoehne s.n (CEPEC), Carvalho s.n (RB), Marquete 4147 et al. (RB), Farney 4313 and Gomes (IAC); *Casearia selloana* Eichler: Paula 693 (RB), Macedo 865 and Souza (IAC); *Casearia sylvestris* Sw.: *Fernandes and Pereira s.n (VIC), * Fernandes and Pereira s.n (VIC), Lobão 272 et al. (RB), Bovini et al. 802 (RB).

Piparea – *Casearia commersoniana* Cambess. : Peixoto et al. 955 (RB), Bovini et al. 1844 (RB), Peixoto et al. 354 (RB), Lima et al. 2196 (CEPEC), Santos and Alves 220 (CEPEC), Marquete et al. 3404 (IAC); *Casearia javitensis* Kunth: Lopes 872 et al. (CEPEC), Carvalho et al. 1479 (CEPEC), Kollmann et al. 4079 (RB), Pereira 49 and Cardoso (RB), Silva et al. 8532 (IAC), Torres et al. 1927 (IAC), Bernacci et al 4611 (IAC); *Casearia spruceana* Benth. ex Eichler: Pires 420 (IAC), Amaral 718 et al.(INPA).

Casearia – *Casearia aculeata* Jacq.: França et al. 3560 (CEPEC), Pott et al. 8880 (RB), Heringer et al. 2305 (RB), Bernacci et al 790 (IAC), Bertoni s.n (IAC); *Casearia altiplanensis* Sleumer: Silva et al. 5247 (RB), Marquete and Mendonça 2848 (RB), Duarte et al. 185 (VIC); *Casearia arborea* (Rich.) Urb.: Mori and Funch 13372 (CEPEC), Thomas et al. s.n (CEPEC), Braga 1226 (RB), Lobão et al. 1309 (RB), Filardi et al. 814 (RB), Torres et al. 1937 (IAC); *Casearia bahiensis* Sleumer : Fiaschi

et al. 2325 (CEPEC), Mori et al. 12076 (CEPEC), Folli 3512 (RB), Folli 4360 (RB); *Casearia combaymensis* Tuslane: Granville and Hoeselc s.n (NY), Palacios 1405 (NY), Mello 3288 (INPA); *Casearia corymbosa* Kunth: Smith 122 (NY), Ortiz 436 (NY); *Casearia decandra* Jacq.: Pereira 1156 (CEPEC), Forzza et al. 4356 (CEPEC), Jardim et al. 2849 (CEPEC), Lobão 1658 et al. (RB), Marquete 3377 et al. (RB), Torres s.n (IAC); *Casearia duckeana* Sleumer: Albuquerque 67-46 (INPA); *Casearia eichleriana* Sleumer: Harley et al. 19200 (CEPEC), Jesus et al. 1311 (CEPEC), Zappi et al. 2091 (RB), Martinelli 5827 (RB) Carvalho et al. 1116 (IAC); *C. espiritosantensis* R. Marquete & Mansano: Siqueira 783 (RB); *Casearia fasciculata* (Ruiz & Pav.) Sleumer: Krukoff's 5148 (NY), Prance 30240 et al. (NY), Krukoff's 5174 (NY); *Casearia grandiflora* Cambess.: Thomas et al s.n, (CEPEC), Belém and Mendes 27 (CEPEC), Forzza 3782 and Mello-Silva (RB), Soavedra 417 et al. (RB), Bernacci 2248 (IAC), Árbocz 7203 (IAC), Marquete et al. 3166 (IAC); *Casearia guianensis* (Aubl.) Urb.: Croat 14978 (NY), Riedel s.n (NY), Kerbbride et al. 1684 (NY), Harris 10367 (NY), Howard 9705 (NY); *Casearia hirsurta* Sw. : Breteler 3675 (NY), Proctor 10183 (NY), Molina 3384 (NY) ; *Casearia lasiophylla* Eichler: Wesenberg 132 et al. (RB), Lindeman 5334 and Haas (RB), Echternacht 671 and Dornas (RB), Fernandes et al. 33439 (UEC), Alencar and Oliveira 1557 (IAC), Torres et al. 749 (IAC), Torres et al. 743 (IAC), Torres and Figueiredo 409 (IAC); *Casearia manausensis* Sleumer: Cid et al. 1879 (INPA), Mota 67 and Coêlho (INPA), Coelho 3201 (INPA), Monteiro 1330 et al. (INPA), Ferreira 1435 et al. (INPA); *Casearia mariquitensis* Kunth: Evans 2575 and Kalmar (RB), Pereira 7888 et al. (RB), Tozzi et al. s.n (UEC), Bertoni 281 (IAC); *Casearia melliodora* Eichler: Jardim et al. 1594 (CEPEC) Paixão et al. 197 (CEPEC), Macedo 12 (IAC), Macedo and Lima 470 (IAC); *Casearia mestrensis* Sleumer: Silva 158 (CEPEC), Sarmento 644 (RB), Valente 2328 et al. (VIC), Melo 3245 and Franco (IAC); *Casearia negrensis* Eichler: Duarte 6557 (RB), Amaral 100 et al. (INPA), Coelho 4121 (INPA), Amaral 750 et al. (INPA); *Casearia nigricans* Sleumer: Vieira 561 et al. (INPA); *Casearia nitida* L. Jacq.: Correll 43589 (NY) , Brittom 5677 et al. (NY); *Casearia oblongifolia* Cambess.: Cavalcante 04 (RB), Lima et al. 4568 (CEPEC), Siqueira 74 (RB), Marquete 1421 (IAC); *Casearia obovalis* Poepp. ex Griseb.: Cid and Nelson 2810 (RB); *Casearia paranaensis* Sleumer: Marchiori 501 et al.(UEC), Souza 111 (IAC), Zickel et al s.n (IAC), Rosi et al. 602 (IAC), Anunciação et al. 243 (IAC); *Casearia pauciflora* Cambess.: Braga 3923 et al. (RB), Nadruz 2341 et al. (RB), Braga et al. 1622 (IAC); *Casearia pitumba* Sleumer: Amaral 760 et al. (INPA); *Casearia resinifera* Spruce ex Eichler: Ducke s.n (RB), Ducke 1447 (NY); *Casearia rufescens* Cambess. : Pirani 5248 et al. (RB), Carvalho and Silva s.n (IAC), Valente 2327 et al. (VIC); *Casearia rupestris* Eichler: Pott 12235 et al. (RB), Marquete 3170 et al. (RB), Mota 2096 (VIC), Duarte and Silva 90 (VIC), Árbocz s.n (IAC); *Casearia sessiliflora* Cambess. : Cavalcanti 166 and Sá (RB), Cavalcanti 153 et al. (RB); *Casearia ulmifolia* Vahl ex Vent. : Alencar et al., 1163 (UEC) Hatschbach 61927 (CEPEC)

Artigo II: Como distinguir ductos de cavidades? Um estudo de caso em Casearia

Jacq. (Salicaceae)

Normas: Acta Botanica Brasilica

Valéria Ferreira Fernandes¹; Marcela Thadeo²; Valdneá Casagrande Dalvi³;

Ronaldo Marquete^{4,5} & Renata Maria Strozi Alves Meira^{1*}

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36.570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP 87.020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, Rod. Sul Goiana Km 01, Zona Rural, CEP: 75.901-970, Caixa Postal 66, Rio Verde – Goiás, Brasil.

⁴ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Av. República do Chile 500, 7º andar, CEP: 20.031-170, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rua Pacheco Leão, 915, CEP: 22.460-030, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

*Autor para correspondência: rmeira@ufv.br

RESUMO

Em *Casearia* pontos e traços translúcidos na lâmina foliar são caracteres taxonomicamente relevantes e foram descritos como cavidades e ductos, respectivamente. Tais estruturas são definidas de forma imprecisa, muitas vezes, dificultando a distinção entre elas. Adicionalmente, o padrão de distribuição e a orientação podem gerar interpretações equivocadas quanto a presença e o tipo de estrutura. O objetivo do presente trabalho foi identificar padrões de distribuição, bem como diferenciar as cavidades dos ductos em 45 espécies, abrangendo todas as seções de *Casearia* (sensu Sleumer). Amostras foliares foram processadas para obtenção de peças diafanizadas e cortes histológicos. Cavidades e ductos estão ausentes em quatro espécies e nas demais as cavidades são predominantes. Para a maioria das espécies a correlação entre cavidades e ductos com pontos e traços translúcidos foi confirmada. Discordâncias quanto a presença destas estruturas em descrições de algumas espécies foram esclarecidas. As variações na distribuição de cavidades e ductos são relevantes para a taxonomia do grupo. A diafanização, juntamente com as secções transversais e paradérmicas, é essencial para assegurar o reconhecimento de ductos e cavidades em *Casearia*, garantindo interpretações seguras em um elevado número de espécies fundamentais para estudos taxonômicos e filogenéticos futuros.

Palavras-chave: Flacourtiaceae, anatomia foliar, Salicaceae, estruturas secretoras.

INTRODUÇÃO

Estruturas secretoras são amplamente distribuídas em diversas plantas vasculares (Metcalf & Chalk 1950; Fahn 1979; Evert 2006) e possuem grande variação morfológica, funcional e na natureza química do secretado (Schnepp 1974; Lüttge & Pitman 1976; Fahn 1979). Segundo Evert (2006), as estruturas secretoras podem ser classificadas de acordo com a posição como externas, aquelas distribuídas na superfície da planta (tricoma, coléteres, nectários e hidatódios) e internas, estruturas secretoras localizadas no interior do corpo da planta (laticíferos, células individualizadas, ductos e cavidades). Os compostos produzidos por tais estruturas podem conferir valor adaptativo as plantas, estando relacionados com diversas interações ecológicas, e também apresentam valor econômico (Fahn 1988; Fahn 1979; Fahn 2002; Evert 2006; Miguel et al. 2006; Cheng et al. 2007).

Ductos e cavidades são estruturas constituídas por epitélio secretor, que delimita um espaço (lúmen) onde a secreção produzida é armazenada (Cutter 1978; Fahn 1979; Evert 2006). Os termos “bolsas” e “canais” também são utilizados para designar as cavidades e os ductos, respectivamente (Lersten & Curtis 1989; Evert 2006). A distinção entre ductos e cavidades é baseada na dimensão do lúmen, esta classificação pode gerar dúvidas, conforme verificado nos conceitos propostos por diferentes pesquisadores. De acordo com Esau (1965) as cavidades são definidas como espaços arredondados e os ductos como alongados “parecidos com canais”. Para Fahn (1979), nas cavidades o epitélio secretor delimita um lúmen que pode ser mais ou menos esférico, já nos ductos o lúmen é alongado. De acordo com Cutter (1978), as cavidades podem ser mais ou menos isodiamétricas, já os ductos são consideravelmente

alongados em um único plano. Segundo Evert (2006), cavidades são espaços secretores curtos e ductos são espaços secretores longos.

O problema dos conceitos apresentados é a falta de um parâmetro de medida para se estimar o quão longo precisa ser o lúmen para que a estrutura seja caracterizada como ducto. Esse fato levou a utilização de denominações alternativas, tais como: cavidade alongada em *Porophyllum lanceolatum* (Monteiro et al. 1995), “oil reservoir” em *Solidago canadenses* (Lersten & Curtis 1989); “tubular cavities” em *Eupatorium rugosum* (Lersten & Curtis 1986) e cavidade tubular em *Casearia decandra* (Thadeo et al. 2009).

A dificuldade em diferenciar ductos e cavidades, em alguns casos, pode limitar a utilização deste caráter nas abordagens taxonômicas. Entretanto, estas estruturas destacam-se como importantes caracteres taxonômicos em muitas famílias (Solereeder 1908; Metcalfe & Chalk 1950) e são encontradas em diversos órgãos, tais como folhas, caules, raízes e flores (Lersten & Curtis 1989; Ciccarelli et al. 2001; Sant'Anna-Santos et al. 2006; Ciccarelli et al. 2008). Cavidades são comuns em espécies de Rutaceae (Turner et al. 1998; Bennici & Tani 2004; Muntoreanu et al. 2011), Myrtaceae (Fontenelle et al. 1994; Cardoso et al. 2009) e Hypericaceae (Curtis & Lersten 1990; Ciccarelli et al. 2001). Já os ductos secretores ocorrem frequentemente em espécies de Anacardiaceae (Joel & Fahn 1980; Machado & Carmello-Guerreiro 2001; Lacchia & Carmello Guerreiro 2009) e Asteraceae (Sacchetti et al. 1997). Tanto cavidades quanto ductos foram descritos em espécies de Asteraceae (Anderson & Creech 1975; Castro et al. 1997), Leguminosae (Lersten & Curtis 1994; Teixeira et al. 2000; Milani et al. 2012) e Salicaceae (Thadeo et al. 2009; 2014).

Muitos taxonomistas, fazendo o uso de observações em estereomicroscópios, ressaltam a presença de pontos e/ou traços translúcidos ao longo das lâminas foliares (Torres & Yamamoto 1986; Tozzi 1989; Marquete & Vaz 2007; Marquete 2010; Marquete & Mansano 2013), os quais geralmente correspondem às cavidades e ductos. Pelo fato destas estruturas estarem localizadas internamente no corpo da planta estudos anatômicos são fundamentais tanto para identificação quanto para diferenciação das mesmas (Teixeira et al. 2000; Thadeo et al. 2009; 2014). A visão tridimensional para averiguar a dimensão do lúmen pode ser obtida por cortes paradérmicos, longitudinais e transversais ou por cortes seriados, o que significa um moroso e árduo trabalho laboratorial. Adicionalmente, estes procedimentos podem ser dificultados quando a folha tem grandes dimensões e/ou as estruturas variam em relação à distribuição e orientação, em um padrão aleatório ou concentrado de ocorrência (Lersten & Beaman 1998). Nestes casos podem ocorrer interpretações equivocadas quanto à presença e ao tipo de estrutura. Asteraceae e Salicaceae são exemplos de famílias que possuem ductos e cavidades no mesmo órgão e com distribuição coincidente ou distinta (Anderson & Creech 1975; Thadeo et al. 2009; 2014). Nestes casos, a diafanização é uma técnica de fácil execução, que permite observar a extensão do lúmen além de verificar padrões de distribuição e quando associada com observações de secções transversais e paradérmicas fornece uma interpretação segura.

Nas descrições taxonômicas de *Casearia* é comum a citação de pontos e traços translúcidos distribuídos no limbo foliar das espécies do gênero (Sleumer 1980; Torres & Yamamoto 1986; Marquete & Vaz 2007; Marquete 2010; Marquete & Mansano 2013), os quais foram descritos como cavidades e ductos, respectivamente, em apenas seis das 180 espécies (Thadeo et al. 2009; 2014). Esse gênero representa um bom modelo de estudo para rever o conceito de ductos e cavidades, bem como avaliar quais

as metodologias adequadas para proceder a interpretações seguras em um elevado número de espécies. Com isso pretende-se responder as seguintes perguntas:

Ductos, cavidades ou ambos são comuns às espécies de *Casearia*? Existe um padrão de distribuição dessas estruturas na lâmina foliar de *Casearia*? A diafanização é suficiente para distinguir ductos de cavidades ou é necessária a observação de cortes anatômicos? Para responder tais questionamentos, objetivou-se com este trabalho proceder a descrição anatômica dos pontos e traços translúcidos das espécies de *Casearia* e também verificar como a diafanização pode facilitar esta descrição.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras foliares de 45 espécies de *Casearia*, compreendendo representantes de todas as seções (sensu Sleumer), foram coletadas de diferentes herbários e em campo (Material Suplementar). As amostras herborizadas foram rehidratadas (Smith & Smith 1942) e estocadas em álcool 70%. Ramos contendo folhas expandidas foram coletados de três indivíduos adultos de *C. sylvestris* na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (ETEAMP), localizada no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil e fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético, etanol 50%, 1:1:18 por volume) por 48 h sob vácuo e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940). O material testemunho está depositado no Herbário VIC (Universidade Federal de Viçosa-UFV) sob os números VIC 44866 (Fernandes e Faria s.n) e VIC 44867 (Fernandes e Faria s.n).

Para identificar a ocorrência de cavidades e ductos ao longo do limbo foliar, folhas inteiras ou fragmentos foliares foram submetidos ao processo de diafanização, segundo Vasco et al. (2014) com modificações. Os materiais armazenados em álcool

70% foram imersos em uma solução de hidróxido de sódio 5% em estufa 50-55° até clareamento total (o tempo foi variável, dependendo da consistência da folha). Posteriormente foram lavados em água destilada (3x, 10 min cada), e transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio 10% (o tempo foi variável de 1-20 min). Os mesmos foram lavados novamente em água destilada (3x, 10 min cada), desidratados em série etanólica 10%, 30% e 50% (10 min cada) e corados com fúcsina etanólica 50 % por aproximadamente 3 - 6 horas (o tempo foi variável, de acordo com a consistência das folhas). Finalmente o material foi lavado em álcool 50 % (2x, 10 min cada) e montado em gelatina glicerinada (Johansen 1940).

Fragmentos da lâmina foliar compreendendo a região mediana, região entre margem e nervura mediana, e da margem foram desidratados em série etanólica e incluídos em metacrilato (Historesin; Leica Instruments, Heidelberg, Germany). Cortes transversais e paradérmicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica RM2265, Deerfield, IL, USA), com utilização de navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4.7 (O'Brien & McCully 1981), e as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética. (Permount, Fisher Scientific, NJ, USA). A análise e documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF; Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipado com sistema U-Photo e câmera digital (AxioCam HRc; Zeiss, Göttingen, Germany).

A presença de cavidades e ductos foi comparada com os dados contidos nas descrições taxonômicas sobre a ocorrência de pontos e traços translúcidos nas lâminas foliares das espécies (Sleumer 1980; Marquete 2010). Neste trabalho foram denominadas cavidades as estruturas que apresentam lúmen mais ou menos esférico e

ductos, aquelas cujo comprimento do lúmen é no mínimo três vezes maior que a largura.

RESULTADOS

Foram analisadas 45 espécies de seis seções de *Casearia* (sensu Sleumer) e destas, 41 apresentaram cavidades e ductos ao longo do limbo foliar (Quadro 1). Tais estruturas estão ausentes apenas em *C. commersoniana*, *C. javitensis* e *C. spruceana* (Seção *Piparea*) e *C. eichleriana* (Seção *Casearia*; Grupo *Arboreae*) (Fig. 1A – D).

As cavidades e ductos podem ocorrer esparsamente (Fig. 1E–H) ou densamente (Fig. 2A, B), entretanto, variações entre indivíduos de uma mesma espécie foram observadas (Fig. 2C, D). Em *C. bahiensis* tais estruturas estão concentradas na margem foliar (Fig. 2E). Adicionalmente, foi visualmente evidente uma maior quantidade de cavidades em relação aos ductos em todas as espécies analisadas (Figs. 1E– H e 2 A–D). Uma diferença interessante ocorreu em *C. negrensis* e *C. nigricans* (Fig. 2F, G), onde os ductos são mais numerosos em comparação com as outras espécies analisadas, embora ainda apresentem maior quantidade de cavidades. Cavidades e ductos também foram observados na nervura mediana, conforme pode ser observado em *C. lasiophylla* (Fig. 2 H).

As secções paradérmicas (Fig. 3 A–F) e transversais (Fig. 4 A–H) permitiram visualizar o epitélio uniestratificado delimitando o lúmen, confirmando que as estruturas visualizadas na diafanização eram cavidades e ductos. Tais cortes também possibilitaram verificar diferenças no comprimento do lúmen, além de confirmarem que estas estruturas internas nunca se estendiam de uma face a outra da folha e desta

forma o lúmen nunca era alongado no sentido perpendicular à superfície da lâmina foliar (Fig. 4C–H).

Cavidades e ductos ocorreram de forma concentrada na nervura mediana apenas em *C. aquifolia* e *C. crassinervis* (Fig. 4A-B) e raramente no mesofilo (Fig. 4C). Tais estruturas não foram visualizadas nas diafanizações devido ao maior calibre e intensidade da coloração nas nervuras e também devido à consistência da folha. Neste caso, os cortes foram essenciais para identificar estas estruturas, que possuem lúmen estreito e epitélio com 5-8 células (Fig. 4 A–C).

Quanto a orientação, foram observados diversos padrões de distribuição, com cavidades e ductos podendo estar paralela, perpendicular ou obliquamente orientados em relação a nervura mediana (Fig. 5), enquanto no mesofilo estas estruturas estão distribuídas aleatoriamente, nunca apresentando o eixo alongado se estendendo de uma face a outra da epiderme (Fig. 4C–H). Em relação ao aspecto da secreção produzida, foi observada secreção acumulada como gotas imersas em uma secreção granulosa (Fig. 2A-B) ou secreção homogênea e fortemente corada (Fig. 2E-G).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a importância da diafanização para um levantamento preliminar das estruturas secretoras, uma vez que permitiu identificar e estabelecer correspondência entre os pontos e traços translúcidos com cavidades e ductos, respectivamente. Esses resultados ampliam a base de dados sobre a ocorrência e distribuição de tais estruturas na lâmina foliar de *Casearia*, conforme registrado para seis espécies de *Casearia* (Thadeo et al. 2009; 2014).

A presença, o tipo de estrutura secretora, bem como posição que ocupam são características relevantes em abordagens taxonômicas e filogenéticas (Fahn 1979; Castro et al. 1997; Teixeira et al. 2000; Thadeo et al. 2014) e evolutivas (Vitarelli et al. 2015). Os pontos e traços translúcidos são considerados diagnósticos e importantes para identificar *Casearia* (Torres & Yamamoto 1986; Marquete 2010), sendo esse caráter até o presente utilizado de forma limitada (Thadeo et al. 2014) pela ausência de uma caracterização compreendendo um número maior de espécies.

Ductos e cavidades foram facilmente visualizados nas diafanização de *C. grandiflora* e nos cortes anatômicos de *C. aquifolia* e *C. crassinervis*, embora nas descrições taxonômicas dessas espécies os pontos e traços translúcidos tenham sido considerados obscuros, inconspícuos ou até mesmo ausentes (Sleumer 1980; Marquete 2010), evidenciando a necessidade de uma análise microscópica para descrições seguras. Por outro lado, em *C. commersoniana*, *C. javitensis*, *C. spruceana* e *C. eichleriana*, análises anatômicas, tanto de amostras diafanizadas quanto das seções histológicas, não evidenciaram a ocorrência de cavidades e ductos. Estes resultados permitem afirmar com segurança que tais estruturas estão ausentes nestas espécies, contrapondo as descrições taxonômicas onde as estruturas são consideradas inconspícuas, não visualizadas ou obscuras (Sleumer 1980; Marquete 2010). Cabe ressaltar que os dados do presente trabalho são relevantes e promissores, em especial quanto a ausência de ductos e cavidades somente nos representantes da seção *Piparea* e em *C. eichleriana*.

Algumas divergências entre autores a respeito das descrições de pontos e traços translúcidos foram esclarecidas no presente trabalho. Em *C. bahiensis*, Sleumer (1980) relatou a ocorrência de “dense pellucido-punctata et-lineata”, enquanto Marquete (2010) registrou que os pontos e traços translúcidos não eram visíveis. Nas amostras

analisadas no presente trabalho as cavidades e ductos estão densamente distribuídos pelo limbo foliar, com uma maior concentração na margem, detalhando informações sobre a distribuição destas estruturas para a espécie, além de confirmar as observações de Sleumer (1980). De forma semelhante, os traços e pontuações foram citados como não visíveis em *C. rupestris* por Marquete (2010). Já Sleumer (1980) descreve para a espécie “*laxly pellucid-punctate and lineat*”, o que está de acordo com os dados anatômicos obtidos no presente trabalho onde estas estruturas ocorreram esparsamente na lâmina foliar. Embora em *C. grandiflora* os pontos e traços translúcidos tenham sido citados como obscuros tanto por Sleumer (1980) quanto por Marquete (2010), nas amostras analisadas no presente estudo as cavidades e ductos estão densamente distribuídas ao longo do limbo foliar. Ressaltamos, portanto a relevância do estudo anatômico para confirmar a presença e o tipo de estrutura secretora, principalmente quando estas são internas.

Nas informações contidas na descrição de *C. combaymensis* a ocorrência de pontos e traços translúcidos foi considerada rara em alguns exemplares (Marquete, 2010), sendo localizadas no “center of each areola” (Sleumer 1980). Tais informações foram confirmadas nas análises anatômicas realizadas no presente estudo.

Quando taxonomistas descrevem uma espécie baseando-se apenas em observações ao estereomicroscópio, a caracterização das estruturas internas pode ser limitada. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o estudo anatômico foi imprescindível para descrever e caracterizar com precisão as estruturas secretoras em *Casearia*. De forma semelhante, para *Lonchocarpus* (Leguminosae), também foi ressaltado que observações exclusivamente macromorfológicas podem ocasionar interpretações equivocadas quanto as estruturas secretoras internas (Teixeira et al. 2000). Os autores verificaram que nem sempre os “glandular dots pellucid”

citados nas descrições taxonômicas de 23 espécies correspondiam às cavidades secretoras. Algumas vezes tais estruturas estavam ausentes e os “dots” correspondiam a espaços intercelulares amplos sem o epitélio secretor, os quais foram denominados “false secretory cavities”.

No presente trabalho, as descrições foram baseadas em diafanizações foliares e secções paradérmicas e transversais. Desse modo, foi possível ter certeza do tipo de estrutura, uma vez que foi avaliada a dimensão do lúmen, permitindo distinguir com segurança ductos como estruturas alongadas em um único plano cujo comprimento do lúmen é pelo menos três vezes mais longo que a largura, e cavidades como estruturas com lúmen mais ou menos esférico. Essa forma de classificação está em parte de acordo com Cutter (1978), que considera as cavidades como estruturas mais ou menos isodiamétricas, já os ductos são consideravelmente alongados em um único plano. No entanto, nesta classificação não existe um parâmetro claro de quão longo deve ser o lúmen para a estrutura ser considerada um ducto. Fica evidente que a dimensão do lúmen é crucial para distinguir ductos de cavidades, especialmente para os grupos que apresentam esses dois tipos de estruturas.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a necessidade de avaliações detalhadas que utilizem mais de um plano de observação para descrever ductos e cavidades, pois descrições baseadas apenas em um único plano podem incorrer em equívocos. Por exemplo, em *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) as estruturas secretoras internas dos órgãos vegetativos e reprodutivos foram denominadas como glândulas translúcidas, cavidades esféricas ou oblongas e canais secretores de três diferentes tipos, diferindo em formato, ontogênese e localização (Cicarelli et al. 2001). Neste trabalho não foram documentados planos de observações que possibilitassem a

distinção entre glândulas translúcidas e canais, já que estes últimos deveriam apresentar lúmen alongado.

Nas espécies de *Casearia*, cavidades e ductos apresentaram distribuição e orientação heterogênea no limbo foliar, e a utilização de apenas secções transversais e longitudinais poderia ocasionar interpretações equivocadas. Note que, em secção não seriadas, os ductos dispostos perpendicularmente a nervura principal (Fig. 5) poderiam ser interpretados como cavidades em secções longitudinais das folhas, bem como aqueles que estão dispostos paralelamente a nervura mediana poderiam ser interpretados como cavidades em secções transversais. Como em todas as secções observadas não foram visualizadas estruturas alongadas no sentido perpendicular da folha, as observações baseadas nas diafanizações asseguram a confiabilidade dos dados para o reconhecimento e distinção de cavidades e ductos.

A presença de cavidades e ductos é um caráter comum em *Casearia*, uma vez que 41 das 45 espécies estudadas, incluindo representantes de todas as secções, apresentaram essas estruturas. Esses resultados reforçam que a presença, o tipo e a posição dessas estruturas na lâmina foliar é uma das características taxonomicamente importante para *Casearia*, conforme já havia sido proposto (Thadeo et al. 2014). Cavidades foram relatadas, por Metcalfe & Chalk (1950), para os representantes de “*Flacourtiaceae*”, os quais foram transferidos para *Salicaceae* no sistema de classificação atual (Stevens 2001, Chase et al. 2002, Judd et al. 2009). Do ponto de vista de aplicação taxonômica, os dados obtidos permitirão que as abordagens futuras incluam não somente a presença, mas também a posição de ductos e cavidades, em estudos combinando dados morfológicos e moleculares, contribuindo para o entendimento da evolução dessas estruturas dentro do grupo.

REFERÊNCIA

- Anderson LC, Creech JB. 1975. Comparative leaf anatomy of *Solidago* and related Asteraceae. *American Journal of Botany* 62: 486-493.
- 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.
- Castro MM, Leitão-Filho HF, Monteiro WR. 1997. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 20: 163-174.
- Cardoso CMV, Proença SL, Sajo MG. 2009. Foliar anatomy of the subfamily Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 57: 148-161.
- Chase MW, Zmarzty S, Lledo MD, Wurdack KJ, Swensen SM, Fay MF. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. *Kew Bulletin* 57: 141-181.
- Cheng A-X, Lou Y-G, Mao Y-B, Lu S, Wang L-J, Chen, X-Y. 2007. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:179-186.
- Ciccarelli D, Andreucci AD, Pagni AM. 2001. Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and Histochemical Studies During the Course of Ontogenesis. *Annals of Botany* 88: 637-644.
- Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM. 2008. The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae): Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora* 203: 85–93
- Cutter EG. 1978. *Plant Anatomy. Part I. Cells and tissues*. London, Edward Arnold (Publishers) Ltda.
- Curtis JD, Lersten NR. 1990. Internal secretory in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. belearicum* L. *New Phytologist* 144:571-580.

- Evert RF. 2006. *Esau's plant anatomy; Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body; Their Structure, Function, and Development*. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.
- Esau K. 1965. *Plant Anatomy*. New York, John Wiley & Sons.
- Fahn A. 1979. *Secretory Tissues in Plants*. London, Academic Press.
- Fahn A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *The New Phytologist* 108: 229-257.
- Fahn A. 2002. Functions and location of secretory tissues in plants and their possible evolutionary trends. *Israel Journal of Plant Sciences* 50:s59–s64.
- Fontenelle JB, Costa CG, Machado RD. 1994. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 115:111-133.
- Joel DM, Fahn A. 1980. Ultrastructure of resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). II. Resin secretion in the primary stem ducts. *Annals of Botany* 46: 779-783.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw Hill.
- Lacchia APS, Carmello-Guerreiro SM. 2009. Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Botanica Brasilica* 23: 376-388.
- Lersten NR, Beaman JM. 1998. First report of oil cavities in Scrophulariaceae and reinvestigation of air spaces in leaves of *Leucophyllum frutescens*. *American Journal of Botany* 85: 1646–1649.
- Lersten NR, Curtis JD. 1986. Tubular cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 73:1016 -1021.
- Lersten NR, Curtis JD. 1989. Foliar oil reservoir anatomy and distribution in *Solidago Canadensis* (Asteraceae, tribe Astereae). *Nordic Journal of Botany* 9: 281-287.

- Lersten NR, Curtis JD. 1994. Leaf anatomy in *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) with emphasis on secretory structures. *Plant Systematics and Evolution* 192:231-255.
- Lüttge U, Pitman MG. 1976. Elimination process by glands. 5.1. General introduction. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. N. S. vol.2. Transport in plants II. Part. B. Lüttge U, Pitman MG eds. Tissues and Organs. Berlin, Springer-Verlag. p. 244-269.
- Machado SR, Carmello-Guerreiro SM. 2001. Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 15: 189-195.
- Marquete R. 2010. O gênero *Casearia* Jacq. no Brasil. Tese, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Marquete R, Vaz ASF. 2007. O gênero *Casearia* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguesia* 58: 705-738.
- Marquete R, Mansano VF. 2013. A new species of *Casearia* (Salicaceae) from Brazil. *Journal of Systematics and Evolution* 51: 228-229.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950. Vol. I. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford, Clarendon Press.
- Miguel EC, Gomes VM, Oliveira MA, Cunha M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology* 8:715- 722.
- Milani JM, Rocha JF, Teixeira SP. 2012. Oleoresin glands in copaiba (*Copaifera trapezifolia* Hayne: Leguminosae), a Brazilian rainforest tree. *Trees* 26: 769-775.
- Monteiro WR, Castro MM, Fahn A, Caldeira W.1995. Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). *Nordic Journal Botany* 15: 69-76
- Muntoreanu TG, Cruz RS, Melo-de-Pina GF. 2011. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. *Plant Systematics and Evolution* 296: 87-99.

O'Brien TP, McCully ME. 1981. The study of plant structure principles and selected 21 methods. Melbourne, TermarcaphiPty. Ltda.

Sacchetti G, Romagnoli C, Ballero M, Tosi B, Poli, F. 1997: Internal secretory structures and preliminary phytochemical investigation on flavonoid and coumarin content in *Santolina insularis* (Asteraceae). *Phyton* 37: 219-228.

Sant'Anna-Santos BF, Thadeo M, Meira RMSA, Ascensão L. 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore* 30: 481- 489.

Schnept, E. 1974. Gland cells. In: *Dynamic aspects of plant ultrastructure*, (A. W. Robards, ed.), McGraw-Hill Book Co. Ltd., Maidenhead, p. 331-357.

Sleumer, H. 1980. Flacourtiaceae. Monograph number 22. In: *Flora Neotropica* 22. Nova York, The New York Botanical Garden.

Smith FH, Smith EC. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* 29: 464- 471.

Solereeder H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany*. Oxford, Clarendon Press.

Stevens PF. 2001. *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Disponível em: [http://www.mobot.org/MOBOT/research/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb) APweb Data de Acesso: Maio, 2014.

Teixeira SP, Castro MM, Tozzi AMGA. 2000. Secretory cavities and pellucid dots in leaflets of *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Plant Systematics and Evolution* 221: 61- 68.

Thadeo M, Meira RMSA, Azevedo AA, Araújo JM. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 32: 329-338.

- Thadeo M, Azevedo AA, Meira RMSA. 2014. Foliar anatomy of neotropical Salicaceae: potentially useful characters for taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* 300: 2073-2089.
- Torres RB, Yamamoto K. 1986. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacquin (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 239-258
- Tozzi AMGA. 1989. Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Turner GW, Berry AM, Gifford EM .1998. Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and a re-evaluation of lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Science* 159: 75-88.
- Vasco A, Thadeo M, Conover M, Daly DC. 2014. Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. *Applications in Plant Sciences* 9: 1- 4.
- Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuertes-Aguilar J, Meira RMSA.2015. Foliar secretory structures in *Crotoneae* (Euphorbiaceae): diversity, structure, and evolutionary significance. *American Journal of Botany* 102: 1-15.

QUADRO 1. Ocorrência de cavidades e ductos na lâmina foliar das espécies de *Casearia* Jacq.

Cavidades/Ductos	Ausentes	Presentes		
		NUMEROSOS E ALEATORIAMENTE DISTRIBUÍDOS NO LIMBO FOLIAR	NUMEROSOS E CONCENTRADOS NA MARGEM FOLIAR	ESTRUTURAS DE TAMANHO REDUZIDO, CONCENTRADAS NA NERVURA MEDIANA E RARAMENTE PRESENTES NO MESOFILO
ESPÉCIE				
<i>C. aculeata</i>		x		
<i>C. altiplanensis</i>		x		
<i>C. aquifolia</i>				x
<i>C. arborea</i>		x		
<i>C. bahiensis</i>		x	x	
<i>C. bartlettii</i>		x		
<i>C. commersoniana</i>	x			
<i>C. combaymensis</i>		x		
<i>C. corymbosa</i>		x		
<i>C. cotticensis</i>		x		
<i>C. crassinervis</i>				x
<i>C. decandra</i>		x		
<i>C. duckeana</i>		x		
<i>C. eichleriana</i>	x			
<i>C. espirotosantensis</i>		x		
<i>C. fasciculata</i>		x		
<i>C. gossypiosperma</i>		x		
<i>C. grandiflora</i>		x		
<i>C. guianensis</i>		x		
<i>C. hirsuta</i>		x		
<i>C. javitensis</i>	x			
<i>C. lasiophylla</i>		x		

<i>C. luetzelburgii</i>		x		
<i>C. manausensis</i>		x		
<i>C. mariquitensis</i>		x		
<i>C. melliodora</i>		x		
<i>C. negrensis</i>		x		
<i>C. nigricans</i>		x		
<i>C. nitida</i>		x		
<i>C. obliqua</i>		x		
<i>C. oblongifolia</i>		x		
<i>C. obovalis</i>		x		
<i>C. paranaensis</i>		x		
<i>C. pauciflora</i>		x		
<i>C. pitumba</i>		x		
<i>C. praecox</i>		x		
<i>C. resinifera</i>		x		
<i>C. rufescens</i>		x		
<i>C. rupestris</i>		x		
<i>C. sessiliflora</i>		x		
<i>C. spinescens</i>		x		
<i>C. spruceana</i>	x			
<i>C. selloana</i>		x		
<i>C. tremula</i>		x		
<i>C. sylvestris</i>		x		

FIGURAS

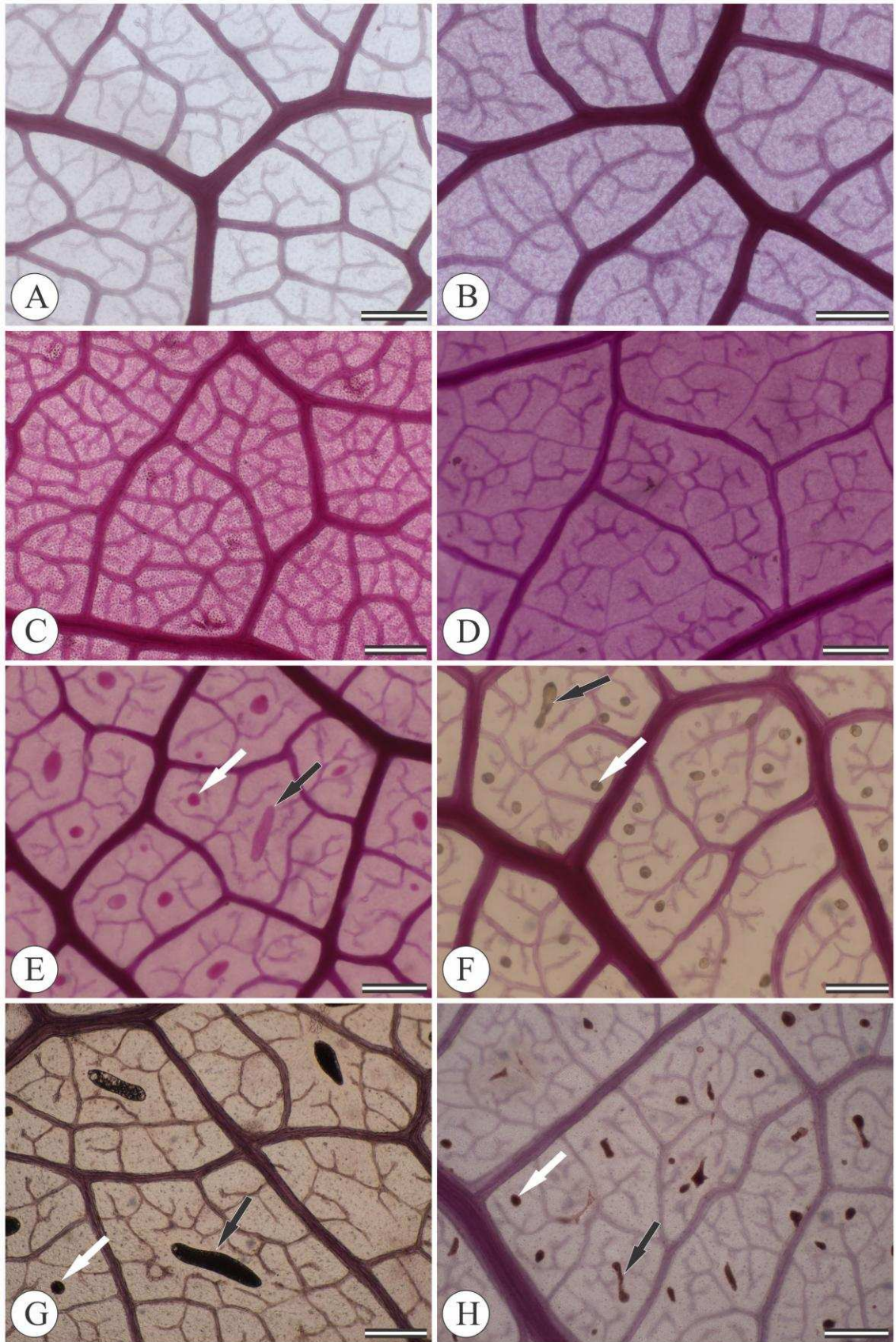


Figura 1. Presença e distribuição de ductos e cavidades na lâmina foliar de espécies de *Casearia* (Material diafanizado) . A-D. Cavidades e ductos ausentes em *C. commersoniana* (A), *C. javitensis* (B), *C. spruceana* (C) e *C. eichleriana* (D). E-H. Cavidades (seta branca) e ductos (seta preta) esparsamente distribuídos na lâmina foliar de *C. combaymensis* (E), *C. rufencens* (F), *C. rupestris* (G) e *C. aculeata* (H). Barras= 300 μ m. 169x253, 74 (300 x 300 DPI)

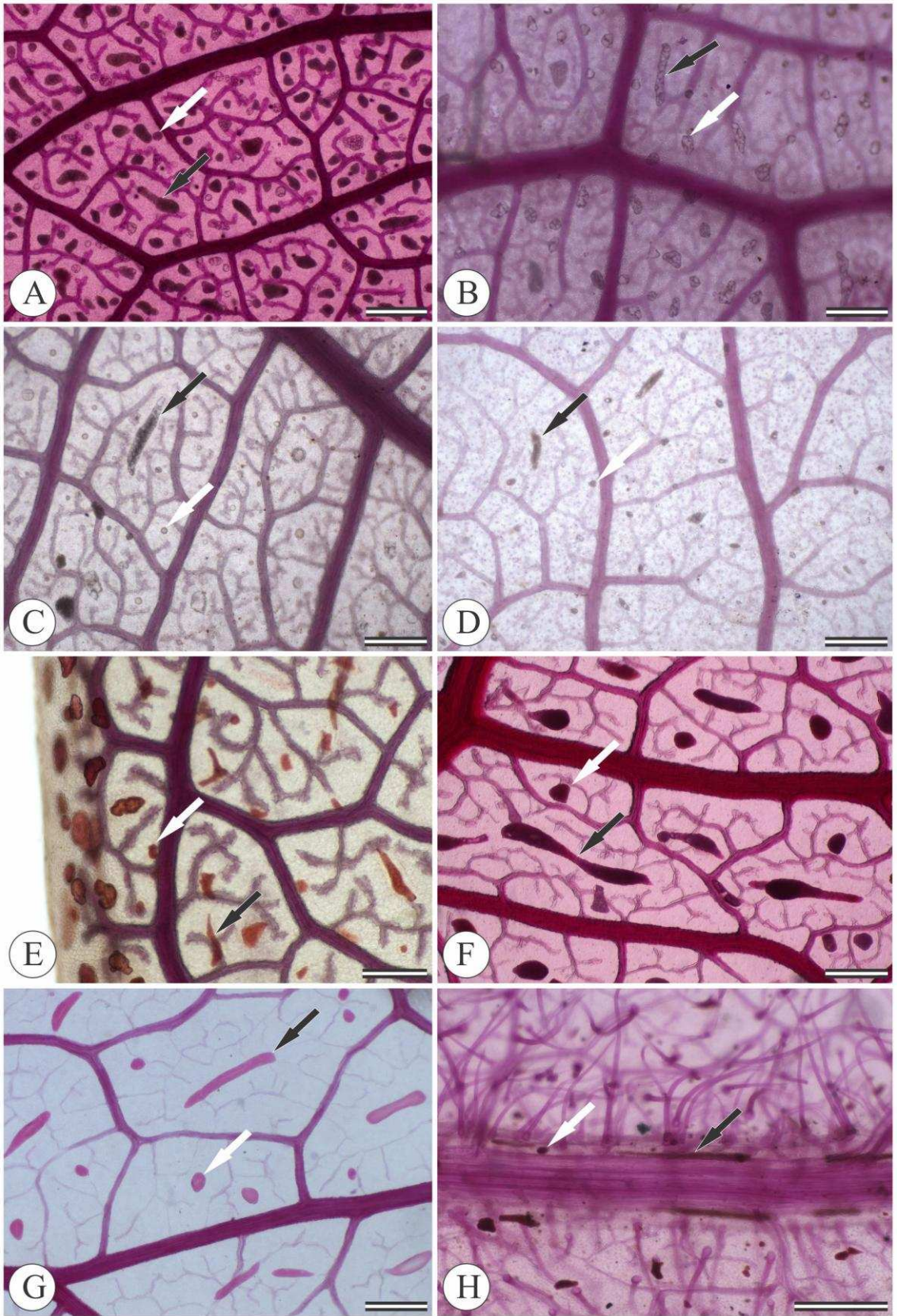


Figura 2. Presença e distribuição de cavidades (seta branca) e ductos (seta preta) na lâmina foliar das espécies de *Casearia* (material diafanizado). A, B. Cavidades e ductos densamente distribuídos na lâmina foliar em *C. manausensis* (A) e *C. grandiflora* (B); C, D. Cavidades e ductos distribuídos densamente e esparsamente, respectivamente, na lâmina foliar de *C. arborea*; E. Cavidades e ductos concentrados na margem foliar em *C. bahiensis*; F, G. Cavidades e ductos numerosos em *C. negrensis* (F) e *C. nigricans* (G); H. Cavidades e ductos distribuídos na nervura na mediana de *C. lasiophylla*.

Barras= 300 μ m. 169x248,66 (300 x 300 DPI)

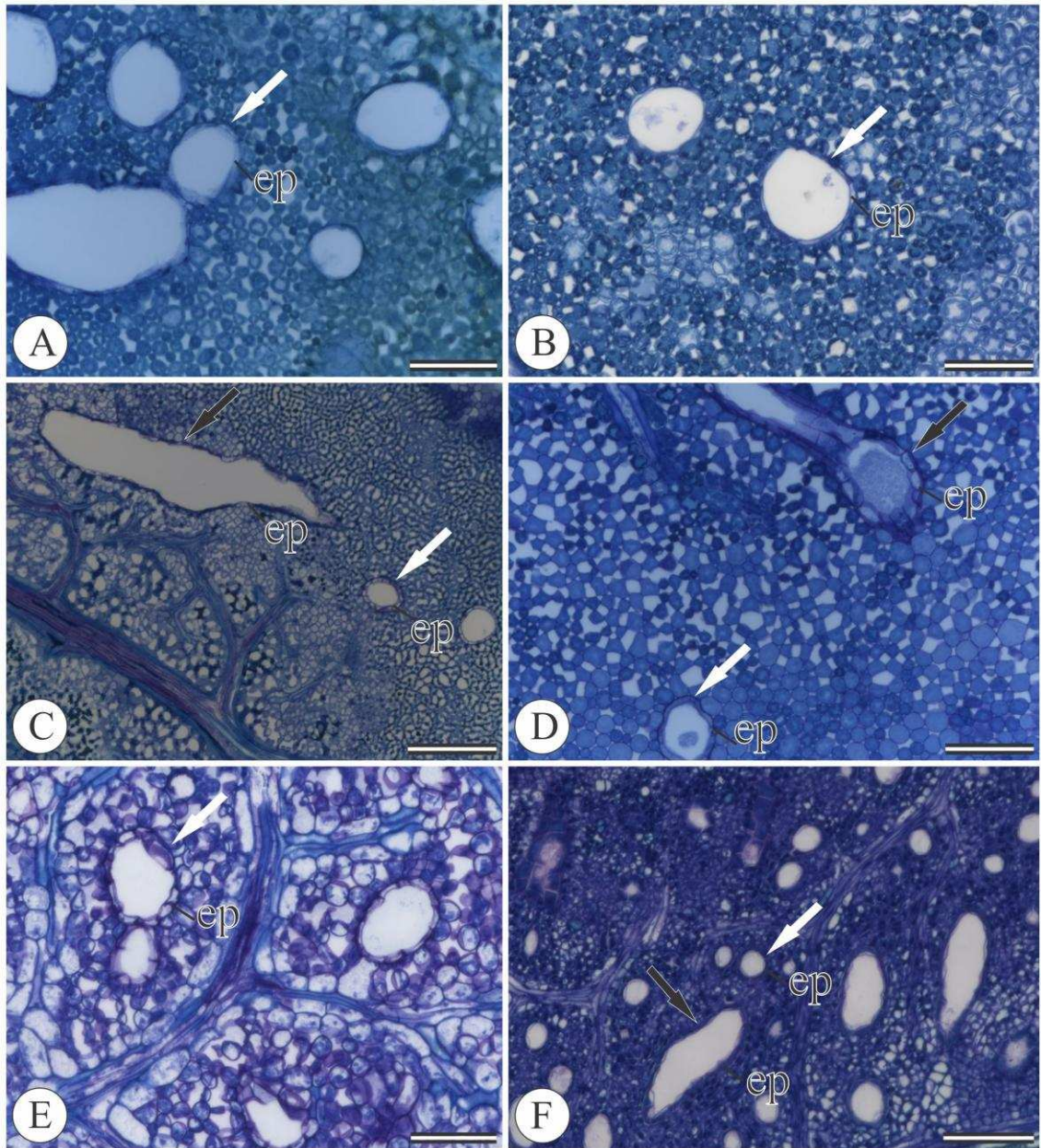


Figura 3. Cavidades (seta branca) e ductos (seta preta) na lâmina foliar em espécies de *Casearia* visualizados em cortes paradérmicos. A-F. Note o epitélio unisseriado (ep) nas cavidades e ductos de *C. altiplanensis* (A), *C. bahiensis* (B), *C. grandiflora* (C), *C. rufencens* (D), *C. sessiflora* (E) e *C. sylvestris* (F). Barra= 150 μ m. 170x188, 04 (300 x 300 DPI)

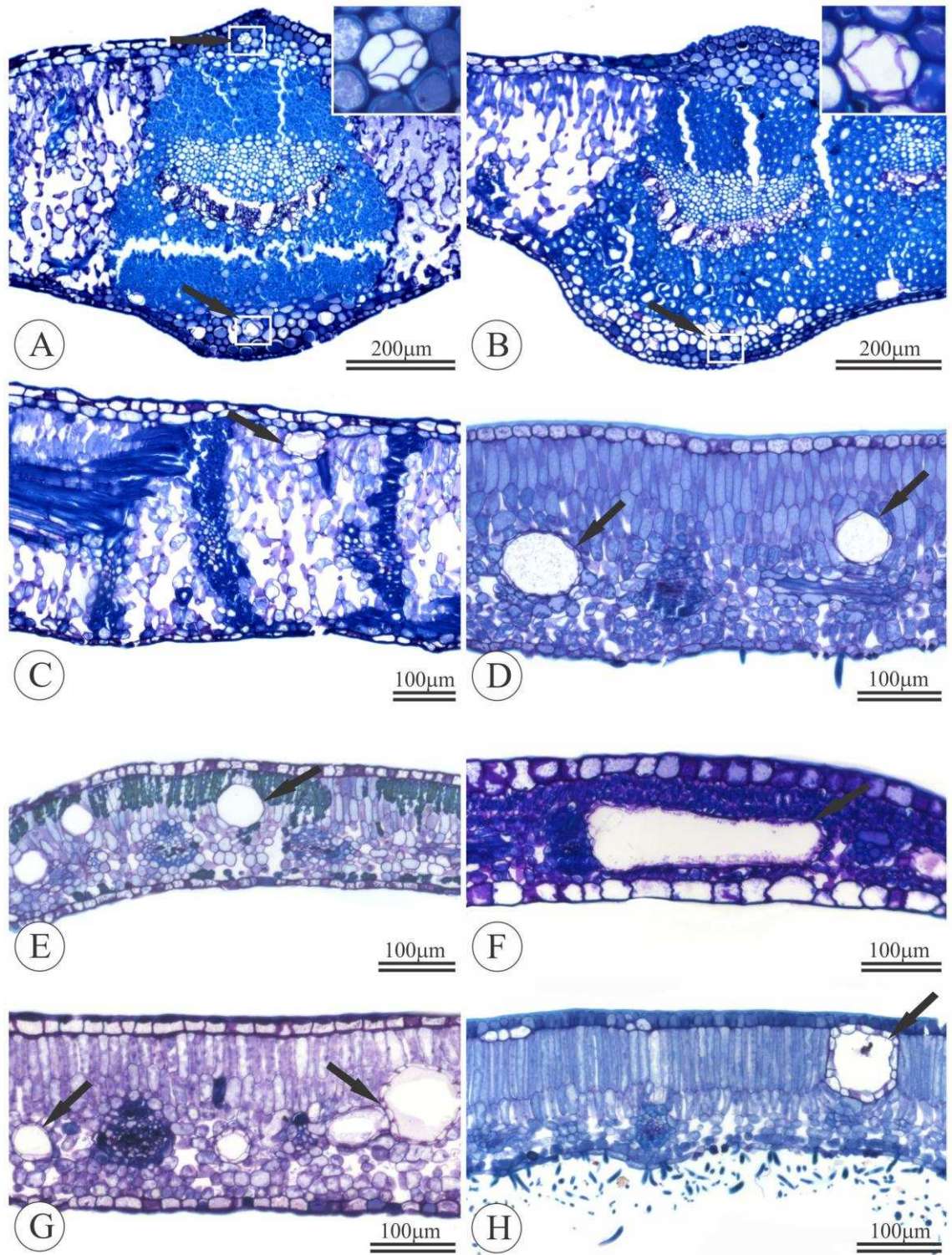


Figura 4. Distribuição das cavidades e ductos (setas) na nervura mediana (A, B) e mesofilo (C-H) das espécies de *Casearia*, evidenciadas em secções transversais da folha. A, B. lúmen reduzido em *C. aquifolia* e *C. crassinervis*, respectivamente. Note o epitélio com apenas cinco células nos detalhes; C. localização subepidérmica das cavidade/ducto em *C. crassinervis*; D, E. Cavidade/ducto no parênquima paliçádico e na interface do paliçádico com o lacunoso em *C. rufescens* e *C. mariquitensis*, respectivamente; F. Ducto na interface do paliçádico com o lacunoso em *C. sessiflora*; G. Cavidade/ ducto na interface do paliçádico com o lacunoso e no paliçádico em *C. spinescens*, note as cavidades lado a lado; H. Localização subepidérmica da cavidade/ducto em *C. grandiflora*. 170x226,48 (300 x 300 DPI)

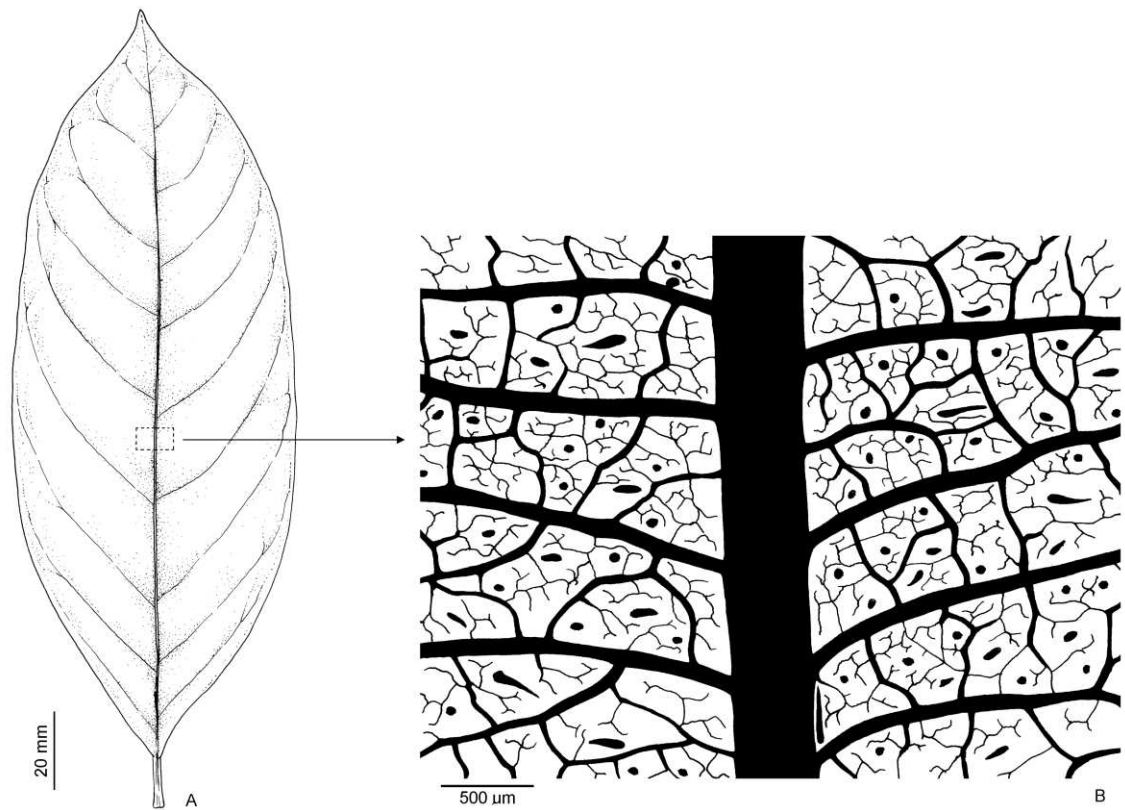


Figura 5. Distribuição e orientação das cavidades e ductos na lâmina foliar de *C. negrensis*, ilustradas em diafanização. A. Folha inteira. B. Detalhe da região mediana.

Material suplementar 1- Lista das espécies de *Casearia* utilizadas no estudo anatômico com informações do número de coletor (es) e herbário.

Seção: Táxon: Número de coletor (es) e herbário. Siglas dos herbários: CEPEC= Herbário do Centro de Pesquisa do Cacau; INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; NY = New York Botanical Garden; RB = Jardim Botânico do Rio de Janeiro; IAC= Instituto Agrônomo de Campinas; UEC = Herbário da Universidade Estadual de Campinas; VIC = Herbário da Universidade Federal de Viçosa. Materiais fixados em FAA₅₀ estão indicados por asterisco.

Guidonia – *Casearia spinescens* (Sw.) Griseb.: Kuhlmann 6446 (RB), Stannard 826 and Arraís (NY), Britton 6875 (NY), Buntriya 6610 (NY), Curtiss 750 (NY), León 5056 (NY).

Endoglossum – *Casearia tremula* (Grisebach) Grisebach ex Wright: Howard 10581 (NY), Arnoldo-Broeders 3793 (NY), Buntriya 5103 (NY), Dugand 6324 (NY), Gentry and Cuadros 47607 (NY).

Gossypiospermum – *Casearia luetzelburgii* Sleumer: Farney 4160 and Gomes (IAC); *Casearia gossypiosperma* Briq.: Scardino 1015 et al. (RB), Silva and Barbosa 4865 (RB), Thomas et al. s.n (CEPEC), Duarte and Chiregatto 104 (IAC); *Casearia praecox* Griseb.: Lack, 5971 (NY), Stevens 22930 (NY), Burger and Gentry Jr. 9168 (NY).

Crateria – *Casearia obliqua* Spreng. : Carvalho s.n (CEPEC), Hoehne s.n (CEPEC), Carvalho s.n (RB), Marquete 4147 et al. (RB), Farney 4313 and Gomes (IAC); *Casearia seloana* Eichler: Paula 693 (RB), Macedo 865 and Souza (IAC); *Casearia sylvestris* Sw.: *Fernandes and Faria s.n (VIC), * Fernandes and Faria s.n (VIC), Lobão 272 et al. (RB), Bovini et al. 802 (RB).

Piparea – *Casearia commersoniana* Cambess. : Peixoto et al. 955 (RB), Bovini et al. 1844 (RB), Peixoto et al. 354 (RB), Lima et al. 2196 (CEPEC), Santos and Alves 220 (CEPEC), Marquete et al. 3404 (IAC); *Casearia javitensis* Kunth: Lopes 872 et al. (CEPEC), Carvalho et al. 1479 (CEPEC), Kollmann et al. 4079 (RB), Pereira 49 and Cardoso (RB), Silva et al. 8532 (IAC), Torres et al. 1927 (IAC), Bernacci et al 4611 (IAC); *Casearia spruceana* Benth. ex Eichler: Pires 420 (IAC), Amaral 718 et al.(INPA).

Casearia – *Casearia aculeata* Jacq.: França et al. 3560 (CEPEC), Pott et al. 8880 (RB), Heringer et al. 2305 (RB), Bernacci et al. 790 (IAC), Bertoni s.n (IAC); *Casearia altiplanensis* Sleumer: Silva et al. 5247 (RB), Marquete and Mendonça 2848 (RB), Duarte et al. 185 (VIC); *Casearia arborea* (Rich.) Urb.: Mori and Funch 13372 (CEPEC), Thomas et al. s.n (CEPEC), Braga 1226 (RB), Lobão et al. 1309 (RB), Filardi et al. 814 (RB), Torres et al. 1937 (IAC); *Casearia bahiensis* Sleumer : Fiaschi et al. 2325 (CEPEC), Mori et al. 12076 (CEPEC), Folli 3512 (RB), Folli 4360 (RB); *Casearia combaymensis* Tuslane: Granville and Hoeselc s.n (NY), Palacios 1405 (NY), Mello 3288 (INPA); *Casearia corymbosa* Kunth: Smith 122 (NY), Ortiz 436 (NY); *Casearia decandra* Jacq.: Pereira 1156 (CEPEC), Forzza et al. 4356 (CEPEC), Jardim et al. 2849 (CEPEC), Lobão 1658 et al. (RB), Marquete 3377 et al. (RB), Torres s.n (IAC); *Casearia duckeana* Sleumer: Albuquerque 67-46 (INPA); *Casearia eichleriana* Sleumer: Harley et al. 19200 (CEPEC), Jesus et al. 1311 (CEPEC), Zappi et al. 2091 (RB), Martinelli 5827 (RB) Carvalho et al. 1116 (IAC); *C. espiritosantensis* R. Marquete & Mansano: Siqueira 783 (RB); *Casearia fasciculata* (Ruiz & Pav.) Sleumer: Krukoff's 5148 (NY), Prance 30240 et al. (NY), Krukoff's 5174 (NY); *Casearia grandiflora* Cambess.: Thomas et al s.n, (CEPEC), Belém and Mendes 27 (CEPEC), Forzza 3782 and Mello-Silva (RB), Soavedra 417 et al. (RB), Bernacci 2248 (IAC), Árbocz 7203 (IAC), Marquete et al. 3166 (IAC); *Casearia guianensis* (Aubl.) Urb.: Croat 14978 (NY), Riedel s.n (NY), Kerbbride et al. 1684 (NY), Harris 10367 (NY), Howard 9705 (NY); *Casearia hirsurta* Sw. : Breteler 3675 (NY), Proctor 10183 (NY), Molina 3384 (NY) ; *Casearia lasiophylla* Eichler: Wesenberg 132 et al. (RB), Lindeman 5334 and Haas (RB), Echternacht 671 and Dornas (RB), Fernandes et al. 33439 (UEC), Alencar and Oliveira 1557 (IAC), Torres et al. 749 (IAC), Torres et al. 743 (IAC), Torres and Figueiredo 409 (IAC); *Casearia manausensis* Sleumer: Cid et al. 1879 (INPA), Mota 67 and Coêlho (INPA), Coelho 3201 (INPA), Monteiro 1330 et al. (INPA), Ferreira 1435 et al. (INPA); *Casearia marikitensis* Kunth: Evans 2575 and Kalmar (RB), Pereira 7888 et al. (RB), Tozzi et al. s.n (UEC), Bertoni 281 (IAC); *Casearia melliodora* Eichler: Jardim et al. 1594 (CEPEC) Paixão et al. 197 (CEPEC), Macedo 12 (IAC), Macedo and Lima 470 (IAC); *Casearia mestrensis* Sleumer: Silva 158 (CEPEC), Sarmento 644 (RB), Valente 2328 et al. (VIC), Melo 3245 and Franco (IAC); *Casearia negrensis* Eichler: Duarte 6557 (RB), Amaral 100 et al. (INPA), Coelho 4121 (INPA), Amaral 750 et al. (INPA); *Casearia nigricans* Sleumer: Vieira 561 et al. (INPA); *Casearia nitida* L. Jacq.: Correll 43589 (NY) , Brittom 5677 et al. (NY); *Casearia oblongifolia* Cambess.: Cavalcante 04 (RB), Lima et al. 4568 (CEPEC), Siqueira 74 (RB), Marquete 1421 (IAC); *Casearia obovalis* Poepp. ex Griseb.: Cid and Nelson 2810 (RB); *Casearia paranaensis* Sleumer: Marchiori 501 et al.(UEC), Souza 111 (IAC), Zickel et al s.n (IAC), Rosi et al. 602 (IAC), Anunciação et al. 243 (IAC); *Casearia pauciflora* Cambess.: Braga 3923 et al. (RB), Nadruz 2341 et al. (RB), Braga et al. 1622 (IAC); *Casearia pitumba* Sleumer: Amaral 760 et al. (INPA); *Casearia resinifera* Spruce ex Eichler: Ducke s.n (RB), Ducke 1447 (NY); *Casearia rufescens* Cambess. : Pirani 5248 et al. (RB), Carvalho and Silva s.n (IAC), Valente 2327 et al. (VIC); *Casearia rupestris*

Eichler: Pott 12235 et al. (RB), Marquete 3170 et al. (RB), Mota 2096 (VIC), Duarte and Silva 90 (VIC), Árbocz s.n (IAC); *Casearia sessiliflora* Cambess. : Cavalcanti 166 and Sá (RB), Cavalcanti 153 et al. (RB); *Casearia ulmifolia* Vahl ex Vent. : Alencar et al., 1163 (UEC) Hatschbach 61927 (CEPEC)

**Artigo III: Estruturas secretoras em *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae):
mecanismos de produção e eliminação da secreção**

Normas: Annals of Botany

**Valéria Ferreira Fernandes¹, Marcela Thadeo², Valdneá Casagrande Dalvi³,
Renata Maria Strozi Alves Meira^{1*}**

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36.570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP 87.020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, Rod. Sul Goiana Km 01, Zona Rural, CEP: 75.901-970, Caixa Postal 66, Rio Verde – Goiás, Brasil.

*Autor para correspondência: rmeira@ufv.br

RESUMO

Fundamentação teórica e objetivos: *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) é amplamente utilizada na medicina tradicional e possui diversos tipos de estruturas secretoras. Entretanto, não existem informações sobre os locais e mecanismos envolvidos no processo secretor. Neste estudo objetivou-se caracterizar a natureza química das secreções produzidas pelas estruturas secretoras, identificar os compartimentos e os mecanismos de secreção (incluindo a síntese, armazenamento e a liberação) e elucidar o processo de formação das cavidades/ductos de *C. sylvestris*.

Metodologia: Amostras de ápices vegetativos, incluindo folhas em diferentes estádios de desenvolvimento, coletadas em campo, foram processadas e analisadas em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Principais resultados: Idioblastos, cavidades, ductos e coléteres desenvolvem-se precocemente e apresentam distribuição variada. Os idioblastos fenólicos ocorrem dispersos pela nervura mediana e mesófilo; cavidades/ductos secretam óleo-resina e estão distribuídos densamente por toda lâmina foliar e os coléteres do tipo padrão, cujos testes histoquímicos detectaram polissacarídeos e proteínas na secreção, estão localizados nos ápices dos dentes marginais. Foram identificados os compartimentos subcelulares envolvidos no processo secretor das quatro estruturas e as características ultraestruturais foram coerentes com os resultados histoquímicos. No epitélio secretor das cavidades/ductos, foram observados plastídios e retículo endoplasmático, organelas frequentemente relacionadas com a produção de óleo-resina. Nos coléteres, dictiosomos e retículo endoplasmático rugoso, foram visualizados nas células da epiderme secretora, dados coerentes com as reações positivas para polissacarídeos e proteínas.

Conclusões: O estudo elucidou as etapas do processo secretor dos quatro tipos de estruturas da lâmina foliar de *C. sylvestris*. As características ultraestruturais são compatíveis com a natureza química dos produtos secretados e os mecanismos de produção e eliminação da secreção foram elucidados.

Palavras - chave: cavidades, coléteres, ductos e idioblastos secretores.

INTRODUÇÃO

Em Salicaceae foram descritos ductos, cavidades (Thadeo et al., 2009, 2014), glândulas de óleo (Absy e Scavone, 1973), glândulas resinosas e nectários (Curtis e Lersten, 1974, 1978, 1980; Wilkinson, 2007; Thadeo et al., 2008; Escalante-Pérez et al., 2012). Os termos pontos e traços translúcidos e glândulas nos dentes marginais (Sleumer, 1980; Torres e Yamamoto, 1986; Marquete e Vaz, 2007; Marquete, 2010; Marquete e Mansano, 2012, 2013) são utilizados nas descrições de *Casearia* Jacq., um dos maiores gêneros de Salicaceae (Judd et al., 2009). Os pontos e traços foram caracterizados como cavidades e ductos, respectivamente (Thadeo et al., 2009, 2014), enquanto as glândulas dos dentes marginais como coléteres do tipo padrão, devido à atividade precoce, natureza polissacarídica da secreção, estrutura anatômica e localização (Fernandes et al., 2016). Neste trabalho a estrutura e a função das setas opacas decíduas dos dentes teóides em 42 espécies de *Casearia* foram elucidadas, entretanto, os aspectos ultraestruturais envolvidos no processo secretor não foram abordados. A caracterização anatômica, simultaneamente com análises histoquímicas e ultraestruturais, possibilita reconhecer os sítios de síntese e/ou acúmulo e a natureza química dos compostos produzidos pelas estruturas secretoras (Ascensão e Pais, 1998; Machado et al., 2006; Canaveze e Machado, 2015; Possobom et al., 2015). Esta abordagem integrada permite uma melhor compreensão do papel funcional das estruturas secretoras, além de evidenciar as transformações subcelulares ocorridas desde a fase pré-secretora até a senescência da estrutura.

Casearia sylvestris Sw. é uma das espécies medicinais popularmente conhecidas como “guaçatonga” (Pio Corrêa, 1984). Esta espécie é largamente utilizada na medicina tradicional (Lorenzi e Matos, 2008; Ferreira et al., 2011) tendo sido

sugerido que as propriedades medicinais se devem aos terpenóides e compostos fenólicos das folhas (Sértie et al., 2000; Esteves et al., 2005). No entanto, os sítios de síntese bem como os compartimentos celulares envolvidos com a produção e eliminação destes compostos secundários não foram esclarecidos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a natureza química da secreção dos idioblastos, cavidades/ductos e coléteres de *C. sylvestris*, identificar os compartimentos e os mecanismos de secreção destas estruturas (incluindo a síntese, o armazenamento e a liberação) e elucidar o processo de formação das cavidades/ductos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e microscopia de luz

Ápices vegetativos, incluindo folhas de diferentes estádios do desenvolvimento, de *Casearia sylvestris* Sw., foram coletados de três indivíduos adultos na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (ETEAMP), localizada no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O material testemunho está depositado no Herbário VIC (Universidade Federal de Viçosa-UFV) sob os números VIC 44866 (Fernandes e Faria s.n) e VIC 44867 (Fernandes e Faria s.n). Para o estudo anatômico, amostras da porção mediana da lâmina foliar foram fixadas em FAA (solução de formaldeído 47%, ácido acético, etanol 50%, 1:1:18 por volume) por 48 h sob vácuo e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em metacrilato (Historesin; Leica Instruments, Heidelberg, Germany). Cortes transversais e paradérmicos com 5 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço

automático (Leica RM2265, Deerfield, IL, USA), com utilização de navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4.7 (O'Brien e McCully 1964), e as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética (Permount, Fisher Scientific, New Jersey, USA). Para verificar a distribuição de cavidades e ductos na lâmina foliar, folhas inteiras ou fragmentos foliares foram diafanizados, corados com fucsina etanólica 50% de acordo com Vasco et al. (2014) e montadas em gelatina glicerinada (Johansen, 1940). A análise e documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF; Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipado com sistema U-Photo e câmera digital (AxioCam HRc; Zeiss, Göttingen, Germany).

Para a realização dos testes histoquímicos, amostras fixadas em FAA foram incluídas em metacrilado (Historesin Leica; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) para identificação de polissacarídeos. Amostras foram fixadas em sulfato ferroso em formalina (Johansen, 1940) e incluídas em parafina histológica para identificação de compostos fenólicos gerais.

Para detecção de terpenoides e proteínas amostras frescas foram seccionadas transversalmente utilizando-se micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil). As principais classes de metabólitos presentes foram investigadas usando os testes histoquímicos sumarizados na tabela 1. Os respectivos controles foram processados simultaneamente aos testes histoquímicos, utilizando-se procedimento padrão. Amostras não submetidas aos reagentes (branco) foram também observadas.

Tabela 1- Metodologias utilizadas para a detecção das principais classes de metabólitos nas secções das folhas de *Casearia sylvestris*.

	GRUPO DE METABÓLITO	TESTE APLICADO	REFERÊNCIAS
LIPÍDIOS	Lipídios totais	Sudan Red	(Pearse, 1980)
TERPENÓIDES	Óleos essenciais e Óleo-resinas	Reagente de Nadi	(David e Carde, 1964)
COMPOSTOS FENÓLICOS	Compostos fenólicos gerais	Sulfato ferroso em formalina	(Johansen, 1940)
PROTEÍNAS		Xilidine Ponceau	(O'Brien e McCully, 1981)
POLISSACARÍDEOS	Polissacarídeos totais	PAS	(McManus, 1948)

Microscopia eletrônica de varredura

Folhas de diferentes estádios do desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 2.5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.2 por 24 horas, lavadas no mesmo tampão (3x, 10 min cada) e posteriormente desidratadas em série etanólica e levadas à secagem ao ponto crítico (CPD 020; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) com CO₂. As amostras foram montadas em “stubs”, utilizando-se fita dupla face e recobertas com uma camada de ouro, utilizando-se metalizador (FDU 010; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As análises e a captura de imagens foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura com câmara digital acoplada (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, UK) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Microscopia eletrônica de transmissão

Folhas de diferentes estádios do desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (10-12 horas), pós-

fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, desidratadas em série etanólica crescente e incluídas em resina Spurr. Secções de 60-70 nm obtidas em ultramicrotomo (modelo UCT, Leica Microsystems Inc., Deerfield), foram contrastadas com acetato de uranila 5% em solução aquosa e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A análise e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (modelo Zeiss EM 109), em 50 kV, com câmera digital acoplada do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

RESULTADOS

Quatro tipos de estruturas secretoras foram observados na lâmina foliar de *C. sylvestris*: idioblastos (Fig. 1), cavidades/ductos (Figs. 2- 6) e coléteres (Figs. 7-10).

Distribuição e produto secretado pelos idioblastos

Idioblastos fenólicos ocorrem na nervura mediana, associados ao xilema e floema ou dispersos pelo parênquima cortical (Fig. 1A), e no mesofilo (Fig. 1B). Conforme o acúmulo de secreção no vacúolo, o citoplasma e núcleo são deslocados para a periferia da célula (Fig. 1C) e o vacúolo pode ocupar um grande volume da célula com o aumento da secreção (Fig. 1D).

Origem, natureza química do secretado e processo secretor das cavidades/ductos

As cavidades apresentam o lúmen predominantemente arredondado, podendo exibir formas elípticas, enquanto os ductos apresentam lúmen alongado com o comprimento no mínimo três vezes maior que a largura (Fig 2A-B). Ambas estruturas são delimitadas por epitélio uniestratificado (Fig. 2B) e apresentam desenvolvimento

assincrônico, sendo evidenciadas estruturas em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 2C-D). Nas folhas expandidas, cavidades e ductos estão densamente distribuídos pelo limbo foliar (Fig. 2A-B), de forma aleatória no mesofilo (Fig. 2E) e nervura mediana, tanto entre o xilema e o floema quanto no parênquima cortical (Fig. 2F).

As cavidades e ductos apresentam as mesmas etapas de desenvolvimento ontogenético. Originam-se por divisão periclinal de uma célula do meristema fundamental (Fig. 3A) que posteriormente sofrem divisão anticlinal, resultando em quatro células (Fig. 3B). Divisões subsequentes formam aglomerados de 6 a 10 células (Fig. 3C). A dissolução da lamela média promove o afastamento das células (Fig. 3D) originando o lúmen, enquanto as sucessivas divisões das células epiteliais promovem o aumento da estrutura (Fig. 3E- F).

Nas amostras frescas (Fig. 4A) e nos cortes das amostras fixadas a secreção é translúcida (Fig. 4B). As secções de amostras frescas reagiram ao Nadi, detectando gotas de óleo-resina no lúmen (Fig. 4C- D) e no epitélio secretor (Fig. 4E).

Posteriormente ao afastamento das células (Fig. 3D), observa-se a lise de algumas células epiteliais que apresentam degradação da parede (Fig. 5A) desestruturação do protoplasto e a presença de vacúolo lítico (Fig. 5B).

As células do epitélio secretor apresentam núcleo volumoso com nucléolo evidente e citoplasma denso (Fig. 5A, C) com abundância de mitocôndrias, vacúolos que se coalescem, retículo endoplasmático liso (Fig. 5D-E) e plastídios envolvidos por retículo endoplasmático (Fig. 5F). Plasmodesmos foram observados conectando as células adjacentes do epitélio secretor (Fig. 6A).

A secreção produzida nas células epiteliais é acumulada nos vacúolos, os quais se coalescem (Fig. 5D). A secreção apresenta constituição heterogênea (Fig. 5E). No início do processo de eliminação, foram notadas evidências da fusão do tonoplasto com

a membrana plasmática (Fig. 6C), liberando a secreção para o espaço periplasmático por exocitose (Fig. 6B-D). O aumento da secreção neste espaço leva à retração do protoplasto (Fig. 6C) gerando uma pressão que faz com que a secreção atravesse a parede celular (Fig. 6D-E). A secreção granular é observada no lúmen (Figs. 5C, 6C) antes das gotas lipídicas que aparecem posteriormente misturadas com o material granular (Fig. 6E). Na região que fica voltada para o lúmen foi observada uma alteração na estrutura da parede (Fig. 6E-F), esse desarranjo pode estar relacionado com a liberação da secreção de natureza hidrofóbica para o lúmen.

Elucidação do processo secretor dos coléteres marginais

Os coléteres do tipo padrão dos ápices dos dentes marginais (Fig. 7A-B) ficam expostos quando as margens dos primórdios (Fig. 1C-D) se desenrolam (Fig. 7B). Nas folhas expandidas a atividade secretora cessa e os coléteres tornam-se senescentes, apresentando coloração acastanhada ou marrom (Fig. 7C). Neste estágio, as células da epiderme secretora estão colapsadas e esverdeadas pelo acúmulo de fenólicos (Fig. 7D), os quais também são visualizados no eixo central (Fig. 7D) e na zona de abscisão (Fig. 7E). Nas folhas expandidas, grande parte dos coléteres cai deixando cicatrizes nos dentes marginais (Fig. 7C).

É possível observar na amostra fresca (não submetida a reagente - “branco”) a coloração natural do coléter (Fig. 8A). O teste histoquímico com Sudan IV corou fortemente a cutícula, confirmando a presença de lipídios (Fig. 8B). Proteínas e polissacarídeos foram detectados no citoplasma das células da epiderme em paliçada e na secreção extravasada, utilizando-se o teste com xilidine Ponceau (Fig. 8C) e PAS (Fig. 8D), respectivamente. A reação ao Nadi foi negativa, não sendo detectados óleos-

resinas nos coléteres (Fig. 4C).

As células epidérmicas secretoras apresentaram na fase secretora núcleo volumoso com nucléolo evidente, citoplasma denso (Fig. 9A) com mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, plastídios, dictiossomos e vacúolos diminutos (Fig. 9B-C). Os dictiossomos apresentam 4-6 cisternas (Fig. 9B-C) geralmente localizados nas proximidades do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 9C) e os plastídios contém grãos de amido (Fig. 9B) e depósitos de material eletrodense (Fig. 9D). Plasmodesmos ocorrem entre as células da epiderme secretora (Fig. 9D) e entre essas e as do eixo central (Fig. 9E). As células do eixo central possuem núcleo lobado e o citoplasma é menos denso, se comparado com o citoplasma das células da epiderme secretora, e predominam retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, dictiossomos e pequenos vacúolos (Fig. 9F).

A secreção é armazenada primeiramente no espaço periplasmático (Fig. 10 A-C) e posteriormente no espaço intercelular, o qual é formado pela dissolução da lamela média (Figs. 9A e 10 E). À medida que o volume de secreção aumenta, é possível observar os espaços repletos de secreção (Figs. 9A e 10E). Vesículas secretoras derivadas dos dictiossomos (Fig. 10D) se fundem à membrana plasmática eliminando a secreção por exocitose (Fig. 10E-F). Concomitantemente, diminutas gotas de secreção lipídica foram observadas no espaço periplasmático (Fig. 10 A-C) e na cutícula (Fig. 10B, F). A eliminação da secreção para o meio externo ocorre pela permeabilidade da cutícula que é delgada (Fig. 10B, F) não tendo sido observados poros, distendimento ou rompimento da mesma.

Os eventos subcelulares que marcam a fase de senescência do coléter são: colapso e degradação do citoplasma e acúmulo de compostos fenólicos nas células da epiderme secretora e do eixo central (Fig. 10F).

DISCUSSÃO

Idioblastos da lâmina foliar de *C. sylvestris*: secreção e importância

Os idioblastos da lâmina foliar de *C. sylvestris* produzem compostos fenólicos, que podem atuar na defesa química contra herbívoros e/ou patógenos (Fahn, 1990; Evert, 2006), conforme sugerido para espécies de Myrsine (Luna et al., 2014). Estudos fitoquímicos relatam a presença de compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* (Espinosa et al., 2015). Neste trabalho foi possível identificar que os idioblastos são os sítios de síntese e/ou acúmulo destes compostos de interesse medicinal.

Cavidades/ductos como sítios de síntese e/ou armazenamento de óleo-resina: elucidação do processo secretor

As características do epitélio secretor das cavidades e ductos de *C. sylvestris* também foram observadas nas cavidades e ductos de *C. decandra* (Thadeo et al., 2009). Quanto à origem, as cavidades/ductos de *C. sylvestris* se assemelham as cavidades de *Dahlstedtia pentaphylla* e *D. pinnata*, Leguminosae (Teixeira e Rocha, 2009) e *Clusia fluminensis* e *C. lanceolata*, Clusiaceae (Sá-Haiad et al., 2015).

As cavidades e ductos de *C. sylvestris* formam-se por um processo esquizolisígeno, resultado divergente dos obtidos por Absy e Scavone (1973) para esta espécie. Estes autores relataram que a formação das glândulas de óleo, as quais correspondem às cavidades e ductos descritos neste trabalho, ocorre por um processo esquizógeno. Embora a lisigenia seja questionada como um processo de formação de cavidades e ductos (Turner et al., 1998; Turner, 1999), o presente trabalho demonstra

que para *C. sylvestris* a degradação da parede celular, desestruturação do citoplasma e a ocorrência de vacúolos líticos nas fases iniciais de desenvolvimento caracterizam o processo de lisigenia. A degradação da parede celular, a lise do protoplasto das células centrais, condensação da cromatina, integridade de organelas e vesiculação da membrana plasmática foram observadas durante a formação das cavidades de *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva e Machado, 2006a). Dessa forma, fica evidente a importância dos estudos ultraestruturais para comprovar a ocorrência de lisigenia, conforme enfatizado na literatura (Paiva e Machado, 2006a).

A secreção é produzida nas células epiteliais, sendo liberada para o lúmen, onde é armazenada. As características das células epiteliais das cavidades/ductos de *C. sylvestris* tais como núcleos volumosos com nucléolos evidentes, citoplasma denso com muitas mitocôndrias e retículo endoplasmático desenvolvido, são comuns na fase ativa de estruturas secretoras, como registrado para cavidades ou ductos de *Asteraceae* (Monteiro et al, 1995), *Anacardiaceae* (Lacchia e Guerreiro, 2009) e *Leguminosae* (Milani et al., 2012). A alta atividade metabólica da fase secretora é confirmada pela quantidade de mitocôndrias presentes no citoplasma das células epiteliais de *C. sylvestris*, fato enfatizado na literatura (Lüttge, 1971; Fahn, 1979; Ascensão e Pais, 1998; Teixeira e Rocha, 2009).

A secreção das cavidades e ductos de *C. sylvestris* é heterogênea, constituindo-se de uma mistura de óleo-resina, conforme detectada pelos testes histoquímicos. Resultado semelhante foi registrado para *C. decandra* (Thadeo et al., 2009) que, assim como *C. sylvestris*, é uma espécie medicinal denominada popularmente como “guaçatonga” (Pio Corrêa, 1984). Os nossos resultados demonstram que cavidades/ductos são as estruturas responsáveis pela síntese e acúmulo dos óleos essenciais extraídos das folhas de *C. sylvestris* (Absy e Scavone, 1973; Esteves et al.,

2005). Adicionalmente foi possível detectar que a secreção é complexa e contém compostos resinosos. Óleo-resinas são compostos relacionados com a defesa química de plantas, atuando nas interações planta-planta, planta-animal e planta-ambiente (Fahn,1979) e também largamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Croteau et al., 2000).

A secreção granular, provavelmente hidrofílica, visualizada em microscopia eletrônica de transmissão no vacúolo das células secretoras e lúmen das cavidades e ductos de *C. sylvestris*, pode corresponder a uma pequena fração polissacarídica, não mucilaginosa, detectada histoquimicamente onde os resultados foram positivos para polissacarídeos gerais e negativos para mucilagem/pectinas. A detecção histoquímica de proteínas no citoplasma das células do epitélio secretor, pode também estar correlacionada com essa secreção granular.

A presença de retículo endoplasmático liso e de plastídios nas células epiteliais das cavidades/ductos de *C. sylvestris* está de acordo com os resultados obtidos na análise histoquímica. Estas organelas são encontradas no citoplasma de células secretoras que produzem secreção de natureza lipídica (Ascensão e Pais 1988; Huang et al., 2008; Teixeira e Rocha, 2009) e desempenham papel importante na produção de óleo-resina, participando do processo de biossíntese e transporte (Ascensão e Pais, 1988).

A presença de retículo endoplasmático periplastídial, como o que ocorre nas células do epitélio secretor de *C. sylvestris*, também foi relatada em células secretoras de resina em *Copaifera langsdorffii* (Rodrigues et al., 2011) e em duas espécies de *Clusia* (Sá-Haiad et al., 2015), e os mesmos têm sido relacionados com o transporte de resina e seus precursores (Benayoun e Fahn, 1979). É comum a associação do plastídio com o retículo endoplasmático em células que secretam material de natureza lipídica

(Schnept, 1974).

A secreção produzida nas células epiteliais é armazenada nos vacúolos, sendo liberada para o espaço periplasmático, através da fusão do tonoplasto com a membrana plasmática por exocitose, caracterizando o mecanismo como granulócrico. Este mesmo mecanismo foi relatado em *Pterodon pubescens* (Rodrigues e Machado, 2012) e *Clusia fluminensis* e *C. lanceolata* (Sá-Haiad et al., 2015). Paiva (2016) enfatiza que os mecanismos granulócrico e écrino não explicam quase nada, em relação aos eventos envolvidos com a eliminação da secreção pelas células vegetais, especialmente devido à presença da parede celular. Dessa forma, o autor propõe que ocorre um ciclo secretor nos diversos tipos de estruturas secretoras. Nesta hipótese, a ação mecânica do protoplasto, sob a forma de ciclos sucessivos de contração e expansão, permite que o material acumulado no espaço periplasmático atravesse a parede celular. Os nossos resultados evidenciam eventos subcelulares que corroboram as hipóteses apresentadas pelo autor, como a pressão exercida pelo protoplasto retraído, que permite que a secreção atravesse a parede celular. No entanto, sugerimos que a desorganização da parede na região voltada para o lúmen, provavelmente ocasionada pela ação enzimática, em parte explique a passagem da secreção de natureza hidrofóbica. Para o material de natureza hidrofílica a parede pectocelulósica não representaria uma barreira química à passagem da secreção.

Correlação entre processo secretor e função desempenhada pelos coléteres

Os coléteres de *C. sylvestris* são do tipo padrão, segundo a classificação proposta por Lersten (1974). Coléteres do tipo padrão parecem ser comuns na ordem Malpighiales, pois já foram descritos para Caryocaraceae (Paiva e Machado, 2006b),

Euphorbiaeaceae (Vitarelli et al., 2015) e Rhizophoraceae (Sheue et al., 2012). Embora coléteres do tipo padrão sejam comuns em *Casearia*, tendo sido descritos em 42 espécies (Fernandes et al., 2016), não existem informações sobre as etapas envolvidas com a produção e eliminação da secreção, as quais foram elucidadas no presente trabalho.

Coléteres são frequentemente relatados na superfície adaxial de órgãos reprodutivos e vegetativos (Thomas, 1991; Klein et al., 2004; Coelho et al., 2013; Mayer et al., 2013; Dalvi et al., 2014; Lopes-Mattos et al., 2015), enquanto nas margens da lâmina foliar a sua ocorrência foi recentemente registrada (Paiva, 2012; Mercadante-Simões e Paiva, 2013; Vitarelli et al., 2015). A secreção produzida por essas estruturas é principalmente composta de mucilagem (Fahn, 1979; Thomas, 1991; Silva et al., 2012) ou uma mistura de mucilagem e resina (Mangalan et al., 1990; Barreiro e Machado, 2007), bem como lipídios (Apezzato-da-Glória e Estelita, 2000; Paiva, 2009; Mayer et al., 2011). No caso de *C. sylvestris*, a reação positiva ao PAS está de acordo com a ocorrência de numerosos dictiosomos em associação com o retículo endoplasmático, organelas responsáveis pela síntese e empacotamento de mucilagem (Fahn, 1979). A cooperação entre estas duas organelas é comumente interpretada como um sistema de síntese e transporte de secreção em coléteres (Paiva e Machado, 2006b). Por outro lado, a reação negativa ao NADI contrasta com os dados ultraestruturais que evidenciaram gotas de secreção (fração lipídica), talvez em quantidade insuficiente para serem detectadas pelo teste histoquímico.

Os coléteres de *C. sylvestris* encontram-se ativos nos primórdios foliares e tornam-se senescentes com a expansão foliar. A atividade precoce permite que a secreção mucilaginosa lubrifique e proteja as folhas em desenvolvimento contra a desidratação, dada à natureza higroscópica da mucilagem. Este resultado corrobora a

função atribuída a secreção produzida pelos coléteres, de proteção contra a dessecação aos órgãos em desenvolvimento, auxiliando na lubrificação e redução da perda de água para o ambiente (Thomas,1991; Paiva, 2009; Mayer et al., 2013; Mercadante-Simões e Paiva, 2013).

Proteínas foram evidenciadas no citoplasma das células secretoras da epiderme e na secreção extravasada pelos coléteres de *C. sylvestris*. O desenvolvimento de retículo endoplasmático granular, especialmente na região próxima a membrana plasmática, permite reconhecer essa organela como o sítio de síntese dessas proteínas que são exocitadas. Esses resultados demonstram que a secreção produzida pelos coléteres de *C. sylvestris* é complexa, pois além das mucilagens são produzidas proteínas e lipídios, o que já foi relatado em outros trabalhos (Klein et al., 2004; Miguel et al., 2006; Paiva, 2009).

As proteínas presentes na secreção dos coléteres de *Bathysa nicholsonii* inibiram o crescimento de esporos de fungos, confirmando o papel de defesa contra patógenos da secreção (Miguel et al., 2006). Tal papel é comumente relatado aos coléteres (Klein et al., 2004), e parece ocorrer também em *C. sylvestris*, entretanto, são necessários estudos complementares para confirmar tal hipótese.

A secreção produzida é eliminada e primeiramente armazenada no espaço periplasmático, o que está de acordo com relatos na literatura (Coelho et al., 2013; Canaveze e Machado, 2015). Com a dissolução da lamela média formam-se espaços entre as células da epiderme secretora onde a secreção permanece acumulada, evento também relatado em outros trabalhos (Paiva, 2009; Mercadante-Simões e Paiva, 2013; Machado et al., 2015). A pressão provocada pelo material no espaço periplasmático, pode facilitar a passagem da secreção através da parede celular conforme modelo proposto por Paiva (2016).

A presença de vesículas que se originam dos dictiossomos, a fusão das mesmas com a membrana plasmática e a liberação do conteúdo no espaço periplasmático por exocitose é uma característica típica de secreção granulócrica (Evert, 2006). Este mecanismo de secreção também foi relatado no coléter de *Alibertia sessilis* (Machado et al., 2012) e *Caryocar brasiliense* (Paiva e Machado, 2006b), considerado comum no processo secretor dessas estruturas. Presença de plasmodesmos entre as células da epiderme secretora e entre essas e as do eixo central comprova a cooperação metabólica entre tais células por meio de transporte simplasto, sugerindo que o eixo central também participe do processo secretor, como enfatizado para os coléteres de *A. sessilis* (Machado et al., 2012). Plasmodesmos também foram observados entre as células epidérmicas do coléter de *Simira rubra* (Klein et al., 2004) e entre as células da epiderme secretora e o eixo central em *C. brasiliense* (Paiva e Machado, 2006b).

Alterações durante a fase de senescência dos coleteres

A fase senescente dos coléteres de *C. sylvestris* ocorre quando as folhas estão totalmente expandidas e pôde ser detectada pela coloração amarronzada ou acastanhada destas estruturas. Observações semelhantes foram registradas em diversos trabalhos (Thomas, 1991; Miguel et al., 2010; Tullii et al., 2013; Dalvi et al., 2014; Simões-Mercadante e Paiva, 2013; Lopes-Mattos et al., 2015). A coloração escurecida tem sido atribuída ao acúmulo de compostos fenólicos nas células dos coléteres (Souza, 2014). Alguns estudos atribuem a senescência dos coléteres ao processo de morte celular programada (Miguel et al., 2010; Tullii et al., 2013). Além das alterações nas células secretoras, nota-se a formação de uma zona de abscisão na base do coléter, que culmina com a eliminação de toda a estrutura, evento descrito em outros trabalhos (Miguel et al.,

2010; Paiva, 2012; Simões-Mercadante e Paiva 2013; Tullii et al., 2013; Dalvi et al., 2014).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram identificar os sítios de síntese e acúmulo dos compostos produzidos pelos idioblastos, ductos e cavidades, os quais podem estar correlacionados com a importância medicinal da espécie. Já a secreção produzida pelos coléteres protege os primórdios foliares contra a dessecação e ataque de patógenos. As mudanças subcelulares envolvidas com a produção e eliminação da secreção destas estruturas secretoras foram elucidadas. Os compartimentos envolvidos com a produção dos compostos secretados foram identificados e as características ultraestruturais são compatíveis com a natureza química da secreção.

REFERÊNCIAS

- Absy ML, Scavone O. 1973.** Sobre a morfologia e anatomia de *Casearia sylvestris* Swartz. *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha* **30**:641-676.
- Appezato-da-Glória B, Estelita MEM. 2000.** Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **23**: 113-120.
- Ascensão L, Pais MS. 1988.** Ultrastructure and histochemistry of secretory ducts in *Artemisia campestris* ssp. *maritima* (Compositae). *Nordic Journal Botany* **8**: 283-292.
- Ascensão L, Pais MS. 1998.** The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* **81**: 263-271.
- Barreiro DP, Machado SR. 2007.** Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 387-399.
- Benayoun J, Fahn A. 1979.** Intracellular transport and elimination of resin from epithelial duct-cells of *Pinus halepensis*. *Annals of Botany* **43**: 179-181.
- Canaveze Y, Machado SR. 2015.** Leaf colleters in *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis and cellular secretion. *Botany* **93**: 287-296
- Coelho VM, Leite JPV, Fietto LG, Ventrella MC. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): development, ultrastructure and chemical composition of the secretion. *Flora* **208**:579-590.
- Croteau R, Kutchan, TM, Lewis NG. 2000.** Natural products (Secondary metabolites). In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318.
- Curtis JD, Lersten NR. 1974.** Morphology, seasonal variation, and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **61**: 835-845.

- Curtis JD, Lersten NR. 1978.** Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **65**: 1003-1010.
- Curtis JD, Lersten RN. 1980.** Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **67**:1289-1296.
- Dalvi VC, Cardinelli LS, Meira RMSA, Azevedo AA. 2014.** Foliar collectors in *Macrocarpaea obtusifolia* (Gentianaceae): anatomy, ontogeny and secretion. *Botany* **92**: 59-67.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences Paris D* **258**: 1338-1340.
- Escalante-Pérez M, Jaborsky M, Lautner S, Fromm J, Müller T, Dittrich M, Kunert M, Boland W, Hedrich R, Ache P. 2012.** Poplar Extrafloral Nectaries: Two Types, Two Strategies of Indirect Defenses against Herbivores. *Plant Physiology* **159**: 1176-1191.
- Espinosa J, Medeiros LF, Souza A, Güntzel ARC, Rücker B, Casali EA, Ethur EM, Wink MR, Torres ILS. 2015.** Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **17**: 305-315.
- Esteves I, Souza IR, Rodrigues M, Cardoso LGV, Santos LS, Sertié JAA, Perazzo FF, Lima LM, Schneedorf JM, Bastos JK, Carvalho JCT. 2005.** Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* SW. *Journal of Ethnopharmacology* **101**: 191-196.
- Evert RF. 2006.** *Esau's Plant Anatomy*, 3rd edn. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc.
- Fahn A. 1979.** *Secretory Tissues in Plants*, 1st edn. London: Academic Press Inc.
- Fernandes VF, Thadeo M, Dalvi VC, Meira RMSA. 2016.** Collecters in *Casearia* (Salicaceae): a new interpretation for the theoid teeth. *Botanical Journal Linnean Society* v. online, p. ahead of print.
- Ferreira PMP, Costa-Lotufu LV, Moraes MO, Barros FWA, Martins AMA, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Santos AG, Pessoa C. 2011.** Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais da*

Academia Brasileira de Ciências **83**: 1373-1384.

Huang S-S, Kirchoff B-K, Liao, J-P. 2008. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): histochemistry, ultrastructure, and secretion. *Journal of the Torrey Botanical Society* **135**: 155-167.

Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw- Hill.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. *Sistemática vegetal. Um enfoque filogenético*, 3rd edn. Brasil, Porto Alegre: Artmed.

Klein DE, Gomes VM, Silva-Neto SJ, Cunha M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* **94**: 733-740.

Lacchia APS, Guerreiro SMC. 2009. Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Botanica Brasilica* **23**: 376-388.

Lersten NR. 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.

Lopes-Mattos KLB, Otuki SAP, Azevedo AA, Meira RMSA. 2015. Colleters in 10 species belonging to three tribes of Rubiaceae: morphoanatomical diversity and potential as useful characters for taxonomy. *Botany* **93**: 425-434.

Lorenzi HE, Matos FJA. 2008. *Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas*, 2nd. edn. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Luna BN, Defaveri ACAE, Sato A, Bizzo HR, Freitas MDEF, Barros CF. 2014. Leaf secretory tissues in *Myrsine coriacea* and *Myrsine venosa* (Primulaceae): ontogeny, morphology, and chemical composition of essential oils. *Botany* **92**: 757-766.

Lüttge U. 1971. Structure and function of plant glands. *Annual Review of Plant Physiology* **22**: 23-44.

Machado SR, Gregório EA, Guimarães E. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* **97**: 357-369.

Machado SR, Barreiro DP, Rocha JF, Rodrigues TM. 2012. Dendroid colleters on

vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora* **207**: 868-877.

Machado SR, Paleari LM, Paiva EAS, Rodrigues TM. 2015. Colleters on the Inflorescence Axis of *Croton glandulosus* (Euphorbiaceae): Structural and Functional Characterization. *International Journal of Plant Sciences* **176**: 86-93, 2015

Mangalan S, Kurien KP, John P, Nair GM. 1990. Development, structure and cytochemistry of resin secreting colleters of *Gardenia gummifera* (Rubiaceae). *Annals of Botany* **66**: 123-132.

Marquete R, Vaz ASF. 2007. O gênero *Casearia* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguesia* **58**: 705-738.

Marquete R. 2010. O gênero *Casearia* Jacq. no Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Marquete R, Mansano VF. 2012. Taxonomic Revision of the *Casearia ulmifolia* Complex (Salicaceae). *Novon* **22**:196-206.

Marquete R, Mansano VF. 2013. A new species of *Casearia* (Salicaceae) from Brazil. *Journal of Systematics and Evolution* **51**: 228-229.

Mayer JLS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-da-Glória B. 2011. Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. *Flora* **206**: 185-190.

Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Mazzafera P. 2013. A functional role for the colleters of coffee flowers. *Annals of botany* **5**: 1-13.

McManus JFA. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**: 99-108.

Mercadante-Simões MO, Paiva EAS. 2013. Leaf colleters in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural aspects. *Academie des Sciences. Comptes Rendus Biologies* **336**: 400-406.

Miguel EC, Gomes VM, Oliveira MA, Cunha M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology* **8**:715- 722.

Miguel EC, Klein DE, Oliveira MA, Cunha M. 2010. Ultrastructure of secretory and

senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **33**: 425- 436.

Milani JF, Rocha JF, Pádua ST. 2012. Oleoresin glands in copaíba (*Copaifera trapezifolia* Hayne: Leguminosae), a Brazilian rainforest tree. *Trees* **26**: 769- 775.

Monteiro WR, Castro MM, Fahn A, Caldeira W. 1995. Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). *Nordic Journal Botany* **15**: 69-76.

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

O'Brien TP, McCully ME. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd.

Paiva EAS, Machado SR. 2006a. Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae- Caesalpinioideae) leaves. *Nordic Journal of Botany* **24**: 423-431.

Paiva EAS, Machado SR. 2006b. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* **66**: 301-308.

Paiva EAS. 2009. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Comptes Rendus Biologies* **332**: 1078-1084.

Paiva EAS. 2012. Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure, secretion and evidences for young leaf protection. *The Journal of the Torrey Botanical Society* **139**: 1- 8.

Paiva EAS. 2016. How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of Botany* **117**: 533-540.

Pearse AGE. 1980. Histochemistry theoretical and applied. vol. 2, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingston.

Pio Corrêa M. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v.3. Rio de Janeiro: Instituto de Desenvolvimento Florestal.

- Possobom CCF, Guimarães E, Machado SR. 2015.** Structure and secretion mechanisms of floral glands in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae), a neotropical species. *Flora* **211**: 26-39.
- Reynolds ES. 1963.** The use of lead citrate at high pH as an electron- opaque staining in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.
- Rodrigues TM, Teixeira SP, Machado SR. 2011.** The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora* **206**: 585-594.
- Rodrigues TM, Machado SR. 2012.** Oil glands in *Pterodon pubescens* (Leguminosae-Papilionoideae): distribution, structure and secretion mechanisms. *International Journal of Plant Sciences* **173**: 984-992.
- Sá-Haiad B, Silva CP, Paula RCV, Rocha JF, Machado SR. 2015.** Androecia in two *Clusia* species: development, structure and resin secretion. *Plant Biology* **17**: 816-824.
- Schnept E. 1974.** Gland cells. In: *Dynamic aspects of plant ultrastructure*, (Robards AW. ed.), McGraw-Hill Book Co. Ltd., Maidenhead, p. 331-357.
- Sertié JAA, Carvalho JCT, Panizza S. 2000.** Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology* **38**: 112–119.
- Sheue C-R, Chen Y-J, Yang Y-P. 2012.** Stipules and colleters of the mangrove *Rhizophoraceae*: morphology, structure and comparative significance. *Botanical Studies* **53**:243-254
- Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA. 2012.** Anatomical characterization of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **60**: 707-717.
- Sleumer H. 1980.** Flacourtiaceae. Monograph number 22. In: **Flora Neotropica** 22. New York: The New York Botanical Garden.
- Souza LM. 2014.** Estruturas secretoras em espécies de leguminosas da subtribo Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae). Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Thadeo M, Cassino MF, Vitarelli NC, Azevedo AA, Araújo JM, Valente VMM, Meira RMSA. 2008.** Anatomical and histochemical characterization of

extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **95**: 1515-1522.

Thadeo M, Meira RMSA, Azevedo AA, Araujo JM. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **32**: 329-338.

Thadeo M, Azevedo AA, Meira RMSA. 2014. Foliar anatomy of neotropical Salicaceae: potentially useful characters for taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* **300**: 2073-2089.

Teixeira SP, Rocha JF. 2009. Oil glands in Neotropical genus *Dahlstedtia* Malme (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Revista Brasileira de Botânica* **32**: 57-64

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

Torres RB, Yamamoto K. 1986. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacquin (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* **9**: 239-258

Tullii CF, Miguel EC, Lima NB, Fernandes KVS, Gomes VM, Cunha M. 2013. Characterization of stipular colleters of *Alseis pickelii*. *Botany* **91**: 403-413.

Turner GW, Berry AM, Gifford EM. 1998. Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. F. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Sciences* **159**: 75-88.

Turner GW. 1999. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. *The Botanical Review* **65**: 76-88.

Vasco A, Thadeo M, Conover M, Daly DC. 2014. Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. *Applications in Plant Sciences* **9**: 1- 4.

Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MB, Cordeiro I, Aguilar JF, Meira RMSA. 2015. Foliar secretory structures in Crotoneae (Euphorbiaceae): diversity, structure, and evolutionary significance. *American Journal of Botany* **102**: 833- 847.

Wilkinson HP. 2007. Leaf teeth in certain 'Flacourtiaceae'. *Botanical Journal of the*

Linnean Society **155**: 241-256.

FIGURAS

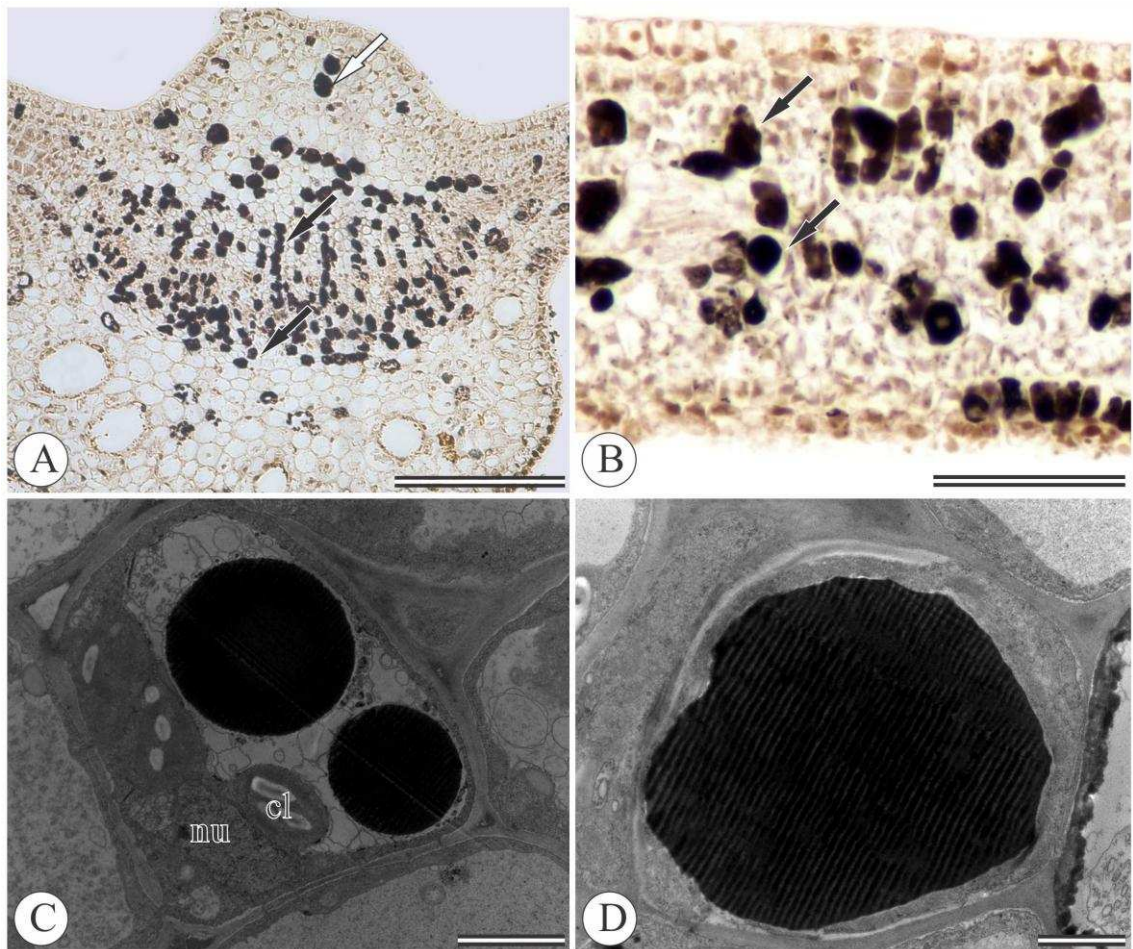


Figura 1. Idioblastos fenólicos de *Casearia sylvestris* visualizados na nervura mediana (A, D) e no mesofilo (B, C). A e B. Secções transversais em microscopia de luz; C e D. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. A. Idioblastos associados ao xilema e floema (seta preta) e dispersos pelo parênquima cortical (seta branca) evidenciados pelo sulfato ferroso em formalina; B. Idioblastos no mesofilo (seta preta); C. Compostos fenólicos no vacúolo das células do parênquima clorofiliano. Note que o acúmulo da secreção desloca o citoplasma e núcleo para a periferia da célula; D. Vacúolo ocupando um grande volume da célula com o aumento da secreção. cl, cloroplastos; nu, núcleo. Barras = A: 100 μm ; B: 50 μm ; C: 2 μm ; D: 1 μm .

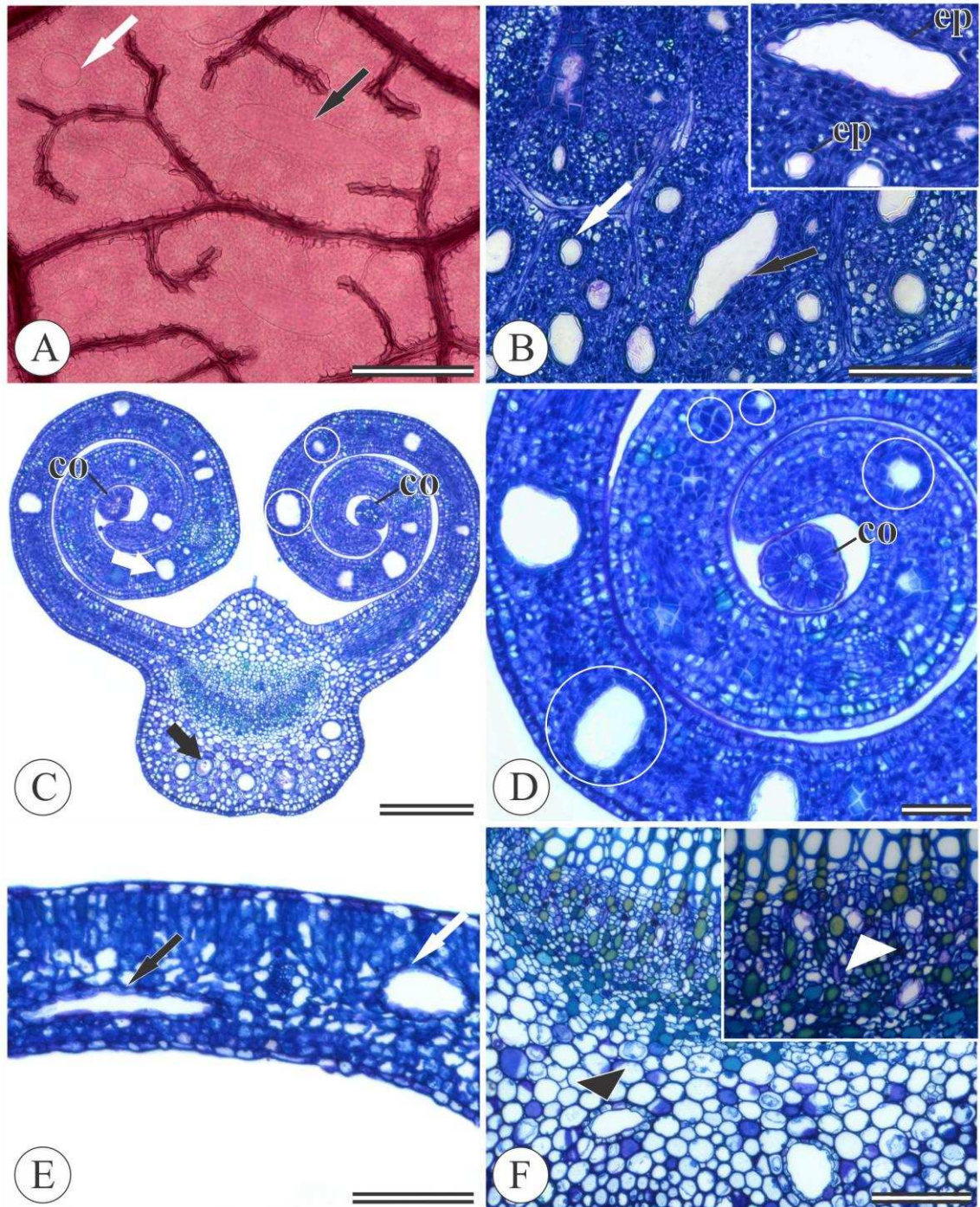


Figura 2. Estrutura foliar de *C. sylvestris*, enfatizando cavidades e ductos. **A:** Diafanização, **B:** Secção paradérmica, **C-F:** Secções transversais. **A, B.** Cavidades (seta branca) e ductos (seta preta) distribuídos densamente ao longo do limbo foliar; **C.** Primórdio foliar com margens enroladas como um espiral, note os coléteres e a distribuição e o desenvolvimento assincrônico de cavidades/ductos no mesofilo (seta branca) e na nervura mediana (seta preta); **D.** Detalhe do primórdio foliar, evidenciando o desenvolvimento precoce e assincrônico das cavidades/ductos; **E.** Cavidades (seta branca) e ductos (seta preta) no mesofilo; **F.** Detalhe da nervura mediana em folha expandida, evidenciando cavidades/ductos no parênquima cortical (cabeça de seta preta) e entre o xilema e floema (cabeça de seta branca). co, coléter; ep, epitélio. Barras = A, C: 200 μ m; B, E, F: 100 μ m; D: 50 μ m.

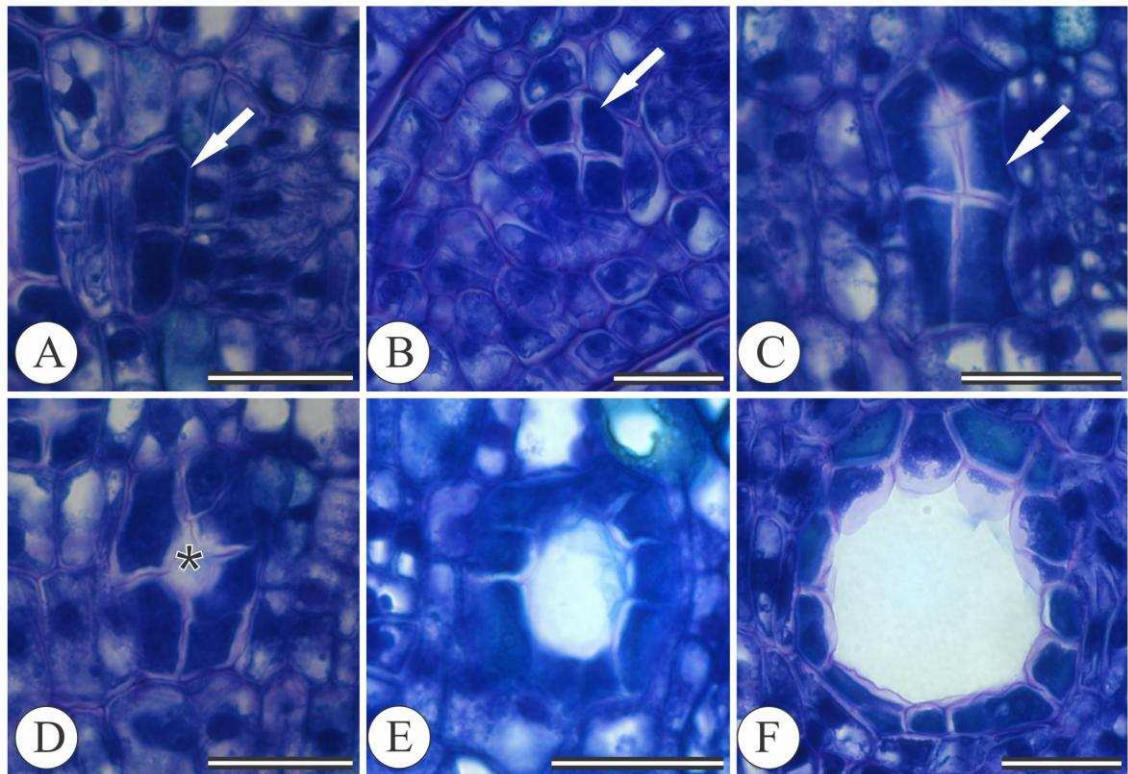


Figura 3. Ontogenia das cavidades/ ductos de *Casearia sylvestris*, visualizadas em secções transversais de primórdios foliares. **A.** Divisão periclinal de uma célula do meristema fundamental, resultando em duas células; **B.** As células sofrem divisão anticlinal resultando em quatro células; **C.** Divisões subsequentes formam aglomerados de 6 a 10 células; **D.** A dissolução da lamela média promove o afastamento das células do epitélio, originando o lúmen (*); **E, F:** Sucessivas divisões das células epiteliais promovem o aumento da estrutura. Barras: 20 μm .

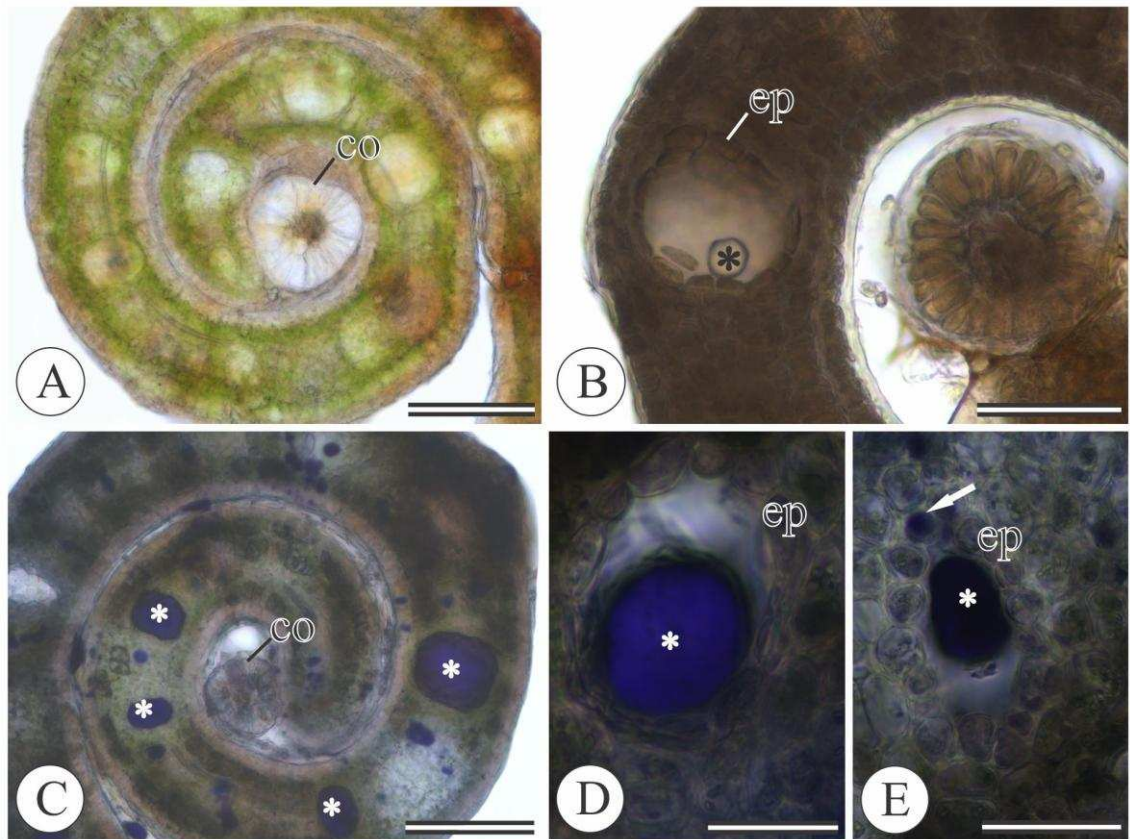


Figura 4. Aspecto da secreção e detecção de óleo-resina em estruturas secretoras foliares de *Casearia sylvestris*. Secções transversais do primórdio foliar não submetidas a reagentes (A, B) e submetidas ao reagente de Nadi (C-E). **A.** Amostra fresca evidenciando a coloração natural do coléter; **B.** Amostra fixada evidenciando o aspecto translúcido da secreção no lúmen (asterisco preto); **C-E-** Reação positiva ao Nadi, evidenciando óleo-resina no lúmen (asterisco branco) e no epitélio (seta branca) das cavidades/ductos. co, coléter; ep, epitélio. Barras = A, C: 100 μm ; B: 50 μm ; D, E: 30 μm .

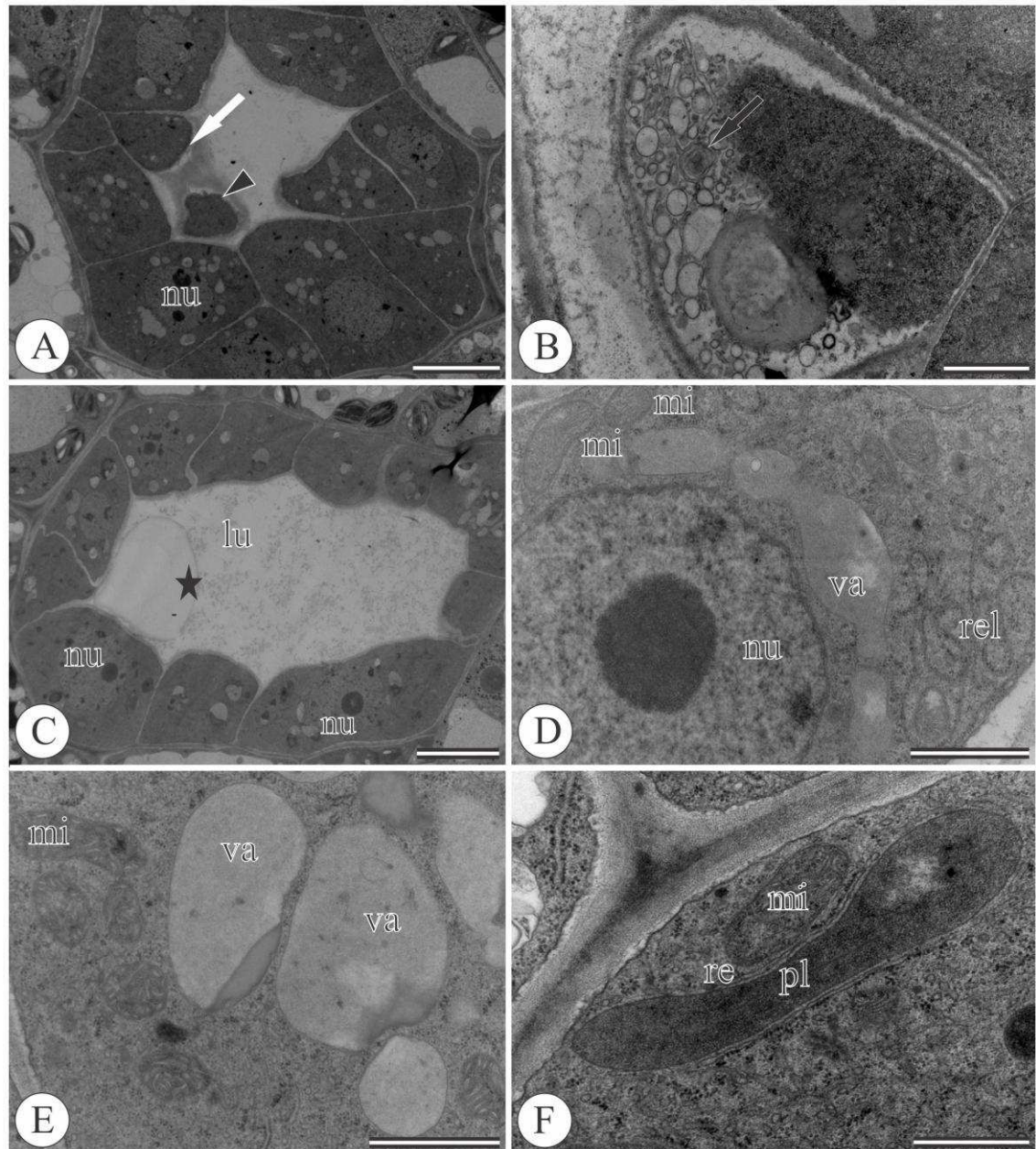


Figura 5. Ultraestrutura das cavidades/ductos na lâmina foliar de *Casearia sylvestris*. **A, B.** Formação do lúmen por lisigenia. **A.** Note a degradação da parede celular (seta branca) e a desestruturação de uma célula localizada no lúmen (cabeça de seta preta); **B.** Detalhe de uma célula do epitélio secretor evidenciando a desestruturação do protoplasto e vacúolo líticos (seta preta); **C.** Cavidade/ducto completamente formado com secreção granular (estrela) no lúmen; **D.** Célula epitelial evidenciando mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e vacúolos que se coalescem; **E.** Vacúolos e mitocôndrias; **F.** Retículo endoplasmático periplastidial e mitocôndrias. lu, lúmen; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pl, plastídio; re, retículo endoplasmático; rel, retículo endoplasmático liso; va, vacúolos. Barras= A, C: 5 μ m; B, D, E: 1 μ m; F: 500 nm.

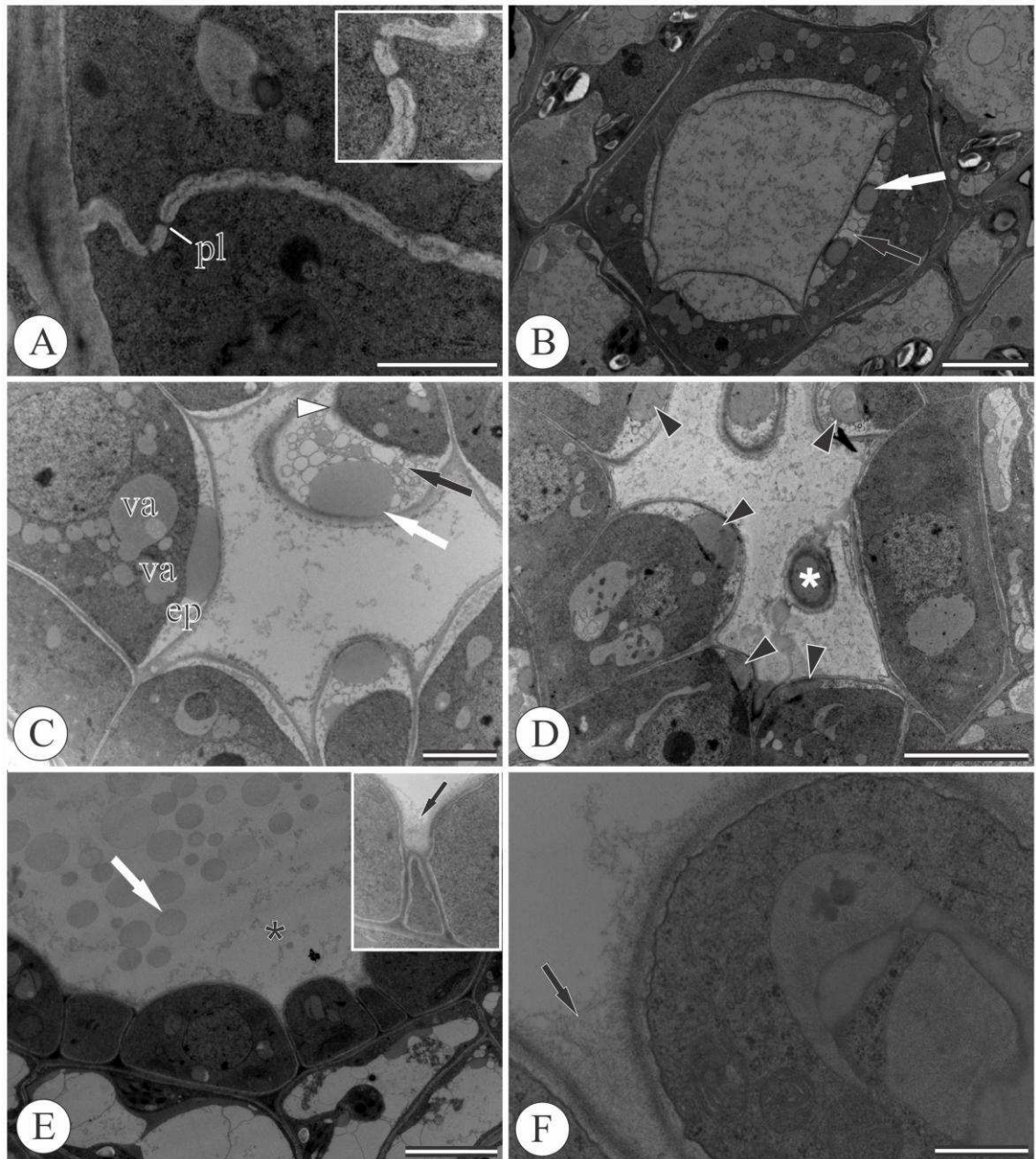


Figura 6. Ultraestrutura das cavidades/ductos da lâmina foliar de *C. sylvestris*. **A.** Plasmodesmos entre as células do epitélio secretor; **B.** Acúmulo de secreção no espaço periplasmático de natureza heterogênea (setas branca e preta); **C.** Vacúolos com secreção, sugerindo que o material seja liberado para o espaço periplasmático, devido à fusão do tonoplasto com a membrana plasmática. O aumento da secreção neste espaço leva à retração do protoplasto (cabeça de seta branca) gerando uma pressão que faz com que a secreção (setas branca e preta) atravesse a parede celular. **D.** A pressão provocada pelo acúmulo de secreção no espaço periplasmático (cabeça de seta preta), faz com que a secreção seja liberada no lúmen (asterisco branco); **E.** Gotas de secreção (seta branca) e secreção de aspecto granular (asterisco preto) no lúmen. Note o desarranjo na estrutura da parede celular (seta preta); **F.** Detalhe de uma célula epitelial, evidenciando o desarranjo da parede celular (seta preta). ep, espaço periplasmático; pl, plasmodesmos; va, vacuolos. Barras = A, C, F: 1 µm; B, D, E: 5 µm.

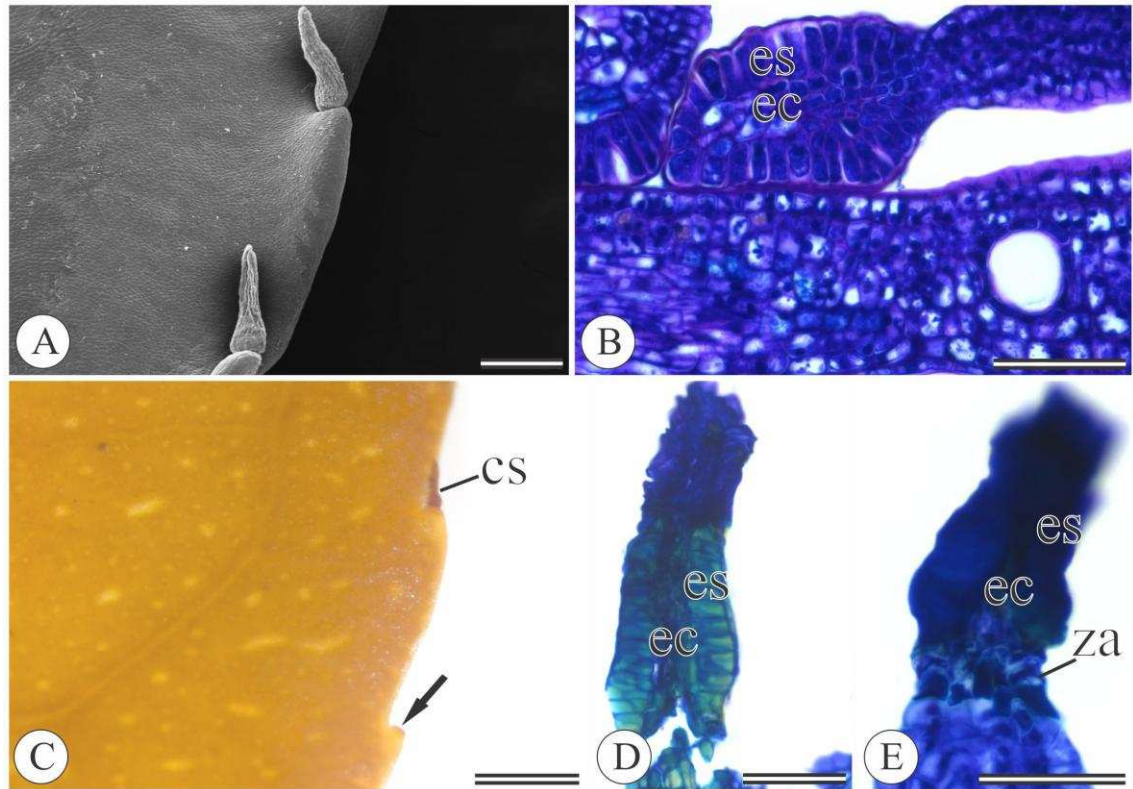


Figura 7. Coléteres de *Casearia sylvestris* em diferentes estádios do desenvolvimento. **A.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura; **B, D e E:** Imagens de microscopia de luz; **C.** Imagem de estereomicroscópio. **A.** Coléteres nos ápices dos dentes marginais; **B.** Cóléter do tipo padrão, evidenciando a epiderme secretora (es) e eixo central (ec); **C.** Coléter senescente na folha expandida. Note a cicatriz onde ocorreu abscisão (seta preta); **D.** Coléter em fase senescente com acúmulo de compostos fenólicos nas células da epiderme secretora e do eixo central; **E.** Cóléter senescente com compostos fenólicos na zona de abscisão. cs, coléter senescente; ec, eixo central; es, epiderme secretora; za, zona de abscisão. Barras = A: 200 μ m; B, D, E: 50 μ m; C: 5mm.

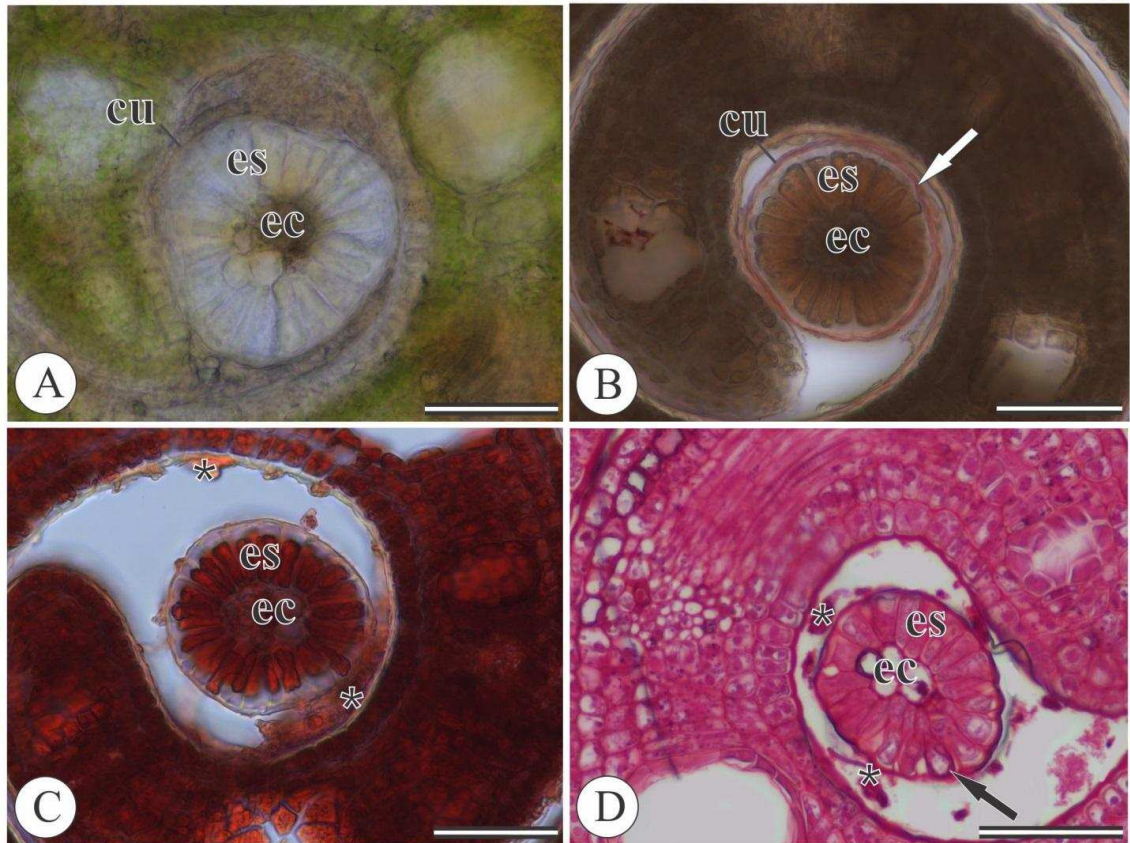


Figura 8. Testes histoquímicos nos coléteres de *Casearia sylvestris* **A.** Amostra fresca (não submetida a reagente - branco) note a coloração natural do coléter; **B.** Material submetido ao Sudan IV evidenciando a reação positiva na cutícula (seta branca); **C.** Proteínas detectadas no citoplasma das células da epiderme secretora e na secreção extravasada (*), evidenciadas pelo teste xilidine ponceau; **D.** Natureza polissacarídica da secreção acumulada nas células da epiderme secretora (seta preta) e na secreção extravasada (*) detectada pelo PAS. cu, cutícula; ec, eixo central; es, epiderme secretora. Barras: 50 μ m.

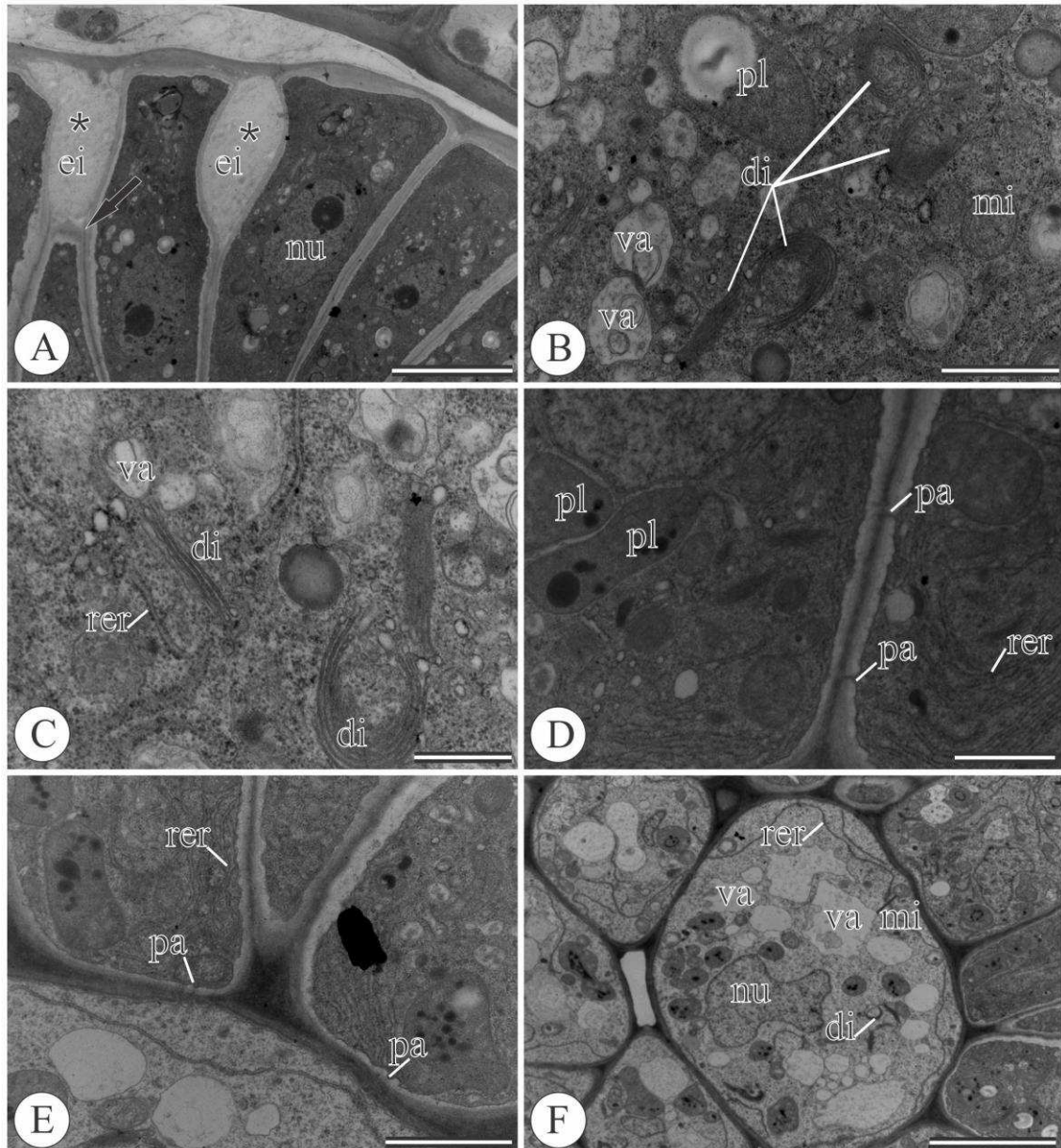


Figura 9. Ultraestrutura dos coléteres durante a fase secretora. **A.** Células epidérmicas secretoras com núcleo conspícuo e citoplasma denso. Note o acúmulo de secreção (*) no espaço intercelular e a dissolução da lamela média (seta preta); **B.** Detalhe da célula da epiderme secretora com mitocôndrias, plastídios com grãos de amido, dictiossomos e vacúolos diminutos; **C.** Dictiossomos localizados nas proximidades do retículo endoplasmático rugoso; **D.** Plasmodesmos conectando as células da epiderme secretora; **E.** Plasmodesmos conectam as células da epiderme secretora e as células do eixo central; **F.** Células do eixo central com núcleo lobado e citoplasma pouco denso. Observe a diferença de densidade entre o citoplasma das células da epiderme secretora e do eixo central. di, dictiossomos; ei, espaço intercelular; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pl, plastídio; pa, plasmodesmo; va, vacúolo; rer, retículo endoplasmático rugoso. Barras = A, F: 5 μ m; C: 500 nm; B, D, E: 1 μ m.

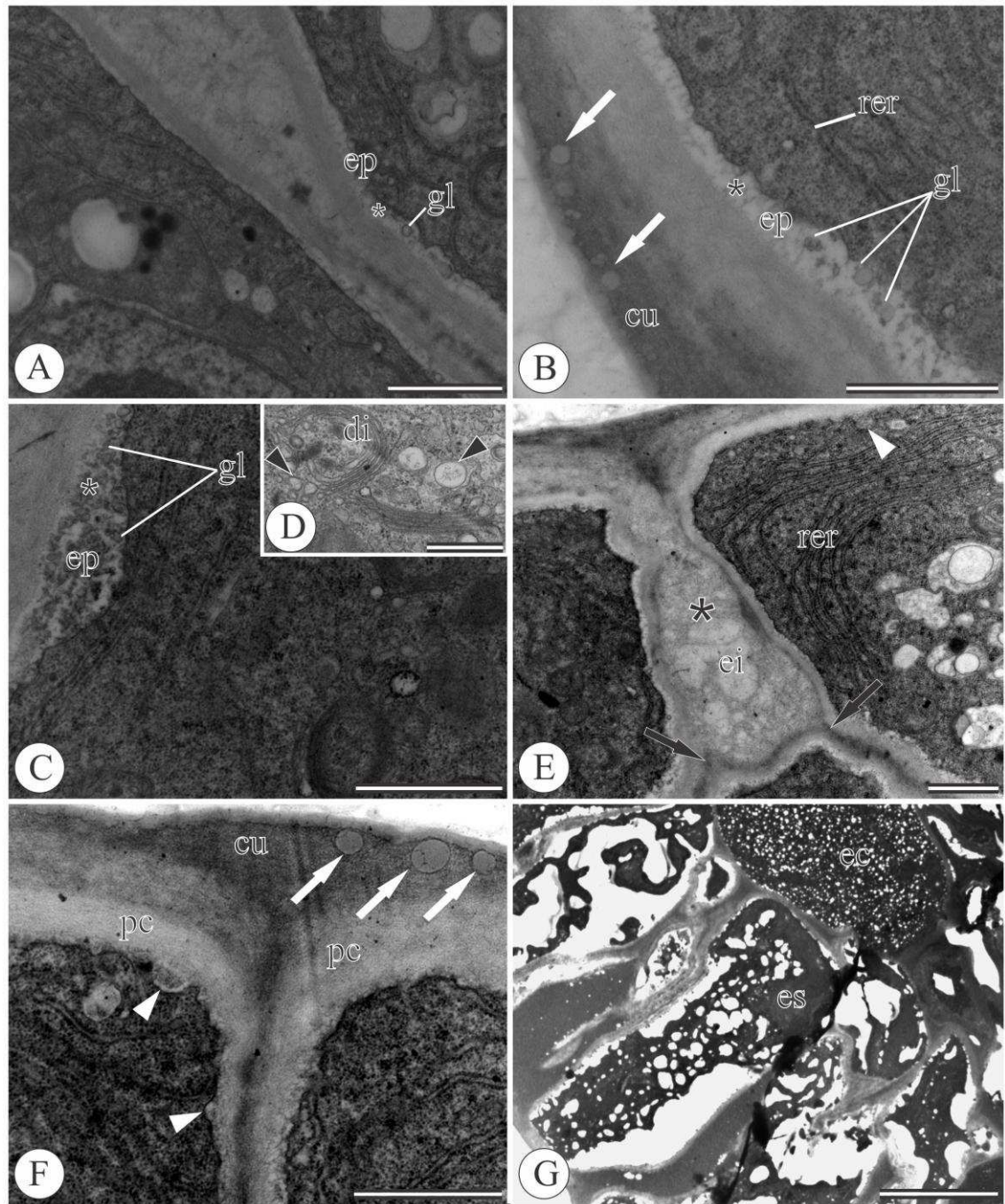


Figura 10. Ultraestrutura dos coléteres nas fases secretora e senescente. **A-C** Acúmulo de secreção de aspecto hidrofílico (*) e gotas lipídicas (gl) no espaço periplasmático; Note a presença de gotículas lipídicas na cutícula em **B** (seta branca); **D.** Detalhe das células da epiderme secretora, evidenciando dictiossomos com vesículas (cabeça de seta preta); **E.** Detalhe de uma célula da epiderme secretora, evidenciando o acúmulo de secreção (*) no espaço intercelular, o qual foi formado devido à dissolução da lamela média (seta preta) e vesículas fundidas a membrana plasmática (cabeça de seta branca); **F.** Epiderme secretora com diminutas gotas lipídicas na cutícula (seta branca). Vesículas secretoras fundidas a membrana plasmática (cabeça de seta branca). Note a cutícula intacta; **G.** Coléter senescente evidenciando a degradação do citoplasma e

acúmulo de compostos fenólicos. cu, cutícula; di, dictiossomo; ec, eixo central; ep, espaço periplasmático; es, epiderme secretora; gl, gotas lipídicas; mi, mitocôndria; nu, núcleo; pc, parede celular; rer, retículo endoplástico rugoso. Barras = A: 5 μm ; B, C, E: 1 μm ; D: 500 nm; F: 5 μm .

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho confirmou-se a diversidade de estruturas secretoras nas espécies de *Casearia*, ampliando a base de dados acerca destas estruturas no gênero. A correlação entre os pontos e traços translúcidos foi estabelecida com cavidades e ductos, respectivamente. Padrões de distribuição dos ductos/cavidades foram reconhecidos, entretanto não houve uma relação com a organização das espécies em táxons infra-específicos.

A localização, a estrutura anatômica, a atividade precoce e a natureza polissacarídica da secreção permitem concluir que as glândulas associadas aos dentes marginais das folhas de *Casearia* são coléteres do tipo padrão. Este é o primeiro estudo que caracteriza as setas opacas decíduas dos dentes teóides de *Casearia* e elucida sua função. Este dado além de inédito é promissor e deve ser considerado nos estudos taxonômicos e filogenéticos em *Salicaceae*. Destaca-se ainda a importância da análise de órgãos jovens para descrição e caracterização dos coléteres, pois são estruturas efêmeras.

Em *C. sylvestris* os idioblastos foram identificados como os sítios de síntese e/ou acúmulo dos compostos fenólicos, enquanto as cavidades/ductos são responsáveis pela síntese e armazenamento de óleo-resina.

Os dados ultraestruturais permitiram compreender o papel das organelas na síntese dos produtos secretados, possibilitando, dessa forma, correlacionar à ultraestrutura com a natureza química dos produtos secretados. Adicionalmente, foi possível compreender os mecanismos de síntese e eliminação dos produtos secretados.