

LUCIMARA AMÉLIA DE SOUZA

**ESTRUTURAS SECRETORAS NOS ÓRGÃOS  
VEGETATIVOS AÉREOS DE *Paullinia rubiginosa*  
Cambess. (SAPINDACEAE)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2010

LUCIMARA AMÉLIA DE SOUZA

**ESTRUTURAS SECRETORAS NOS ÓRGÃOS  
VEGETATIVOS AÉREOS DE *Paullinia rubiginosa*  
Cambess. (SAPINDACEAE)**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010

---

Prof<sup>ª</sup>. Aristéa Alves Azevedo  
(Coorientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Luzimar Campos da Silva  
(Coorientadora)

---

Prof. Fabiano Machado Martins

---

Prof. João Marcos de Araújo

---

Prof<sup>ª</sup>. Renata Maria Strozi Alves Meira  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pela oportunidade da realização deste curso.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização do curso de Mestrado.

Aos meus pais, por todo apoio e amor. Muito obrigada por tornar possível a realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs Gláucia e Larissa, pelo amor e carinho.

À Ludmila pelo companheirismo, cuidado e compreensão.

À minha orientadora Renata Maria Strozi Alves Meira, pela orientação desde a graduação, pela atenção, amizade e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

As minhas co-orientadoras prof<sup>a</sup> Aristéa Alves Azevedo e prof<sup>a</sup> Luzimar Campos da Silva, pela amizade, pelas sugestões e críticas no decorrer do trabalho.

Ao prof. Fabiano Machado Martins, pelo auxílio na análise e interpretação dos testes histoquímicos.

À Banca examinadora, pelas sugestões.

À Dona Edite pela ajuda no laboratório.

Ao Ângelo por ser sempre tão prestativo.

Ao Celso do Horto Botânico pela ajuda com o cultivo dos espécimes.

Ao Gilmar pela ajuda no campo.

Ao meu amigo de turma Vinícius pelos momentos passados juntos no laboratório e fora dele.

Aos colegas de laboratório.

Aos amigos que fiz em Viçosa, especialmente ao PEP.

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

## **BIOGRAFIA**

LUCIMARA AMÉLIA DE SOUZA, filha de Edson Severino de Souza e Maria Lúcia do Carmo Souza, nasceu no dia 11 de fevereiro de 1983, em São Paulo-SP. Em agosto de 2007, graduou-se Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Botânica na Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6

### Capítulo I

#### Ontogênese e histoquímica dos laticíferos e idioblastos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)

Resumo.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	10
Área de estudo e coleta das amostras.....	10
Ontogênese e histoquímica.....	11
Resultados.....	12
Laticíferos.....	12
Idioblastos.....	14
Discussão.....	24
Laticíferos.....	24
Idioblastos.....	26
Referências Bibliográficas.....	27

### Capítulo II

#### Ontogênese e histoquímica dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)

Resumo.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Coleta do material vegetal.....	34
Ontogênese e histoquímica.....	34
Resultados.....	36
Discussão.....	44
Referências Bibliográficas.....	46

### Capítulo III

#### Anatomia das glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)

Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e métodos.....	52
Coleta do material vegetal.....	52
Caracterização anatômica e histoquímica.....	52
Micromorfologia.....	54
Resultados.....	54
Discussão.....	61
Referências Bibliográficas.....	64
Conclusões Gerais.....	68

## RESUMO

SOUZA, Lucimara Amélia de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Estruturas secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)**. Orientadora: Renata Maria Strozi Alves Meira. Co-Orientadoras: Aristéa Alves Azevedo e Luzimar Campos da Silva.

*Paullinia* pertence à família Sapindaceae e é constituído por lianas. *P. rubiginosa* ocorre em vários países da América do Sul, apresenta folhas compostas, com cinco folíolos oblongos de ápice acuminado e margem denteada. Na descrição da espécie, foi mencionada a ocorrência de tricomas secretores e a produção de secreção semelhante a látex. Em observações realizadas em campo, foi visualizada uma pequena quantidade de secreção exsudando nos dentes da margem dos folíolos jovens, sugerindo uma natureza secretora para estas estruturas. O presente trabalho tem por objetivo investigar a ocorrência de estruturas secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *P. rubiginosa*, descrevendo-as e identificando as principais classes de metabólitos produzidos por estas estruturas. Os laticíferos de *P. rubiginosa* são do tipo articulado e são originados da atividade do meristema fundamental e/ou do procâmbio. A atividade secretora dos laticíferos é precoce, entretanto as células laticíferas mantêm capacidade de divisão celular mesmo em fase de diferenciação, em consequência destas divisões, o laticífero se alonga pelo aumento no número de células. Os laticíferos possuem paredes primárias e pectocelulósicas e a secreção produzida é complexa e tem caráter lipofílico, tendo sido evidenciado lipídios neutros, óleo essencial, esteróides, borracha, além de alcalóides. Idioblastos taníferos ocorrem em todos os órgãos aéreos analisados. Os tricomas secretores se desenvolvem muito cedo e em folíolos jovens e primórdios foliolares, os tricomas se encontram totalmente diferenciados e em atividade secretora. Ontogeneticamente os tricomas iniciam seu desenvolvimento formando uma fileira unisseriada de células, e posteriormente tornam-se bisseriados, graças a divisões anticlinais ou assimétricas em algumas células desta série. A secreção produzida é exclusivamente polissacarídica e aliada a atividade precoce indica que os tricomas apresentam função de coléteres. As glândulas presentes na margem dos folíolos se desenvolvem muito precocemente, mantendo a aparência secretora inclusive em folhas maduras. São vascularizadas por xilema e floema, que é envolvido por uma bainha de células com compostos fenólicos e por laticíferos. A porção secretora da estrutura reagiu positivamente ao teste para polissacarídeos e foi evidenciada a presença de glicose na secreção eliminada. Estas estruturas correspondem, portanto, a nectários extraflorais (NEFs). A presença de NEFs e a confirmação da ocorrência de laticíferos em *P. rubiginosa* são resultados promissores para os estudos de taxonomia e filogenia que devem ser considerados nas análises em nível genérico, de família e até da ordem Sapindales.

## ABSTRACT

SOUZA, Lucimara Amélia de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Secretory structures in the aerial vegetative organs of *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae).** Adviser: Renata Maria Strozi Alves Meira. Co-advisers: Aristéa Alves Azevedo and Luzimar Campos da Silva.

*Paullinia* belongs to the Sapindaceae family and is composed of lianas. *P. rubiginosa* occurs in several countries in South America, has compound leaves with five oblong leaflets acuminate at apex and dentate margins. The occurrence of secretory trichomes and the production of a latex-like secretion have been mentioned in the description of the species. In field observations we detected a small amount of secretion exuding in the teeth of the margin of young leaflets, suggesting a secretory nature for these structures. Thus, this study aims to investigate the occurrence of secretory structures in the aerial vegetative organs of *P. rubiginosa*, describe them and identify the major metabolite classes produced by these structures. The laticifers of *P. rubiginosa* are articulated and originate from the activity of the ground meristem and/or procambium. The secretory activity of laticifers is precocious, yet laticiferous cells retain their cellular division ability even during their differentiation phase. As a consequence of such divisions, the laticifer elongates through an increase in the number of cells. Laticifers have primary and pectocellulosic walls, and the secretion produced is complex, with a lipophilic character; additionally, the presence of neutral lipids, essential oil, steroids, rubber, and alkaloids has been observed. Tanniniferous idioblasts occur in all aerial organs examined. Secretory trichomes develop early and are fully differentiated and actively exuding in young leaflets and leaf primordia. Ontogenetically, trichomes initiate their development by forming a row of uniseriate cells that subsequently become biseriate, through anticlinal or asymmetric divisions in some cells of this series. The secretion produced is solely polysaccharidic and that, coupled with their precocious activity, indicate the trichomes act as colleters. Glands present on the margins of leaflets develop very precociously, retaining their secretory aspect even in mature leaves. Glands are vascularized by xylem and phloem, and the latter is enveloped by a cellular sheath with phenolic and laticiferous compounds. The secretory portion of the structure reacted positively to polysaccharides, and the presence of glucose in the released secretion was established. Therefore, these structures correspond to extrafloral nectaries (EFNs). The presence of EFNs and the occurrence of laticifers in *P. rubiginosa* are promising results that have to be taken into account in future studies on taxonomy and phylogeny at the genus and family levels, and even at the order Sapindales.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Sapindaceae está incluída na ordem Sapindales (Cronquist, 1988; Judd *et al.*, 2008), juntamente com as famílias: Anacardiaceae R. Brown, Burseraceae Kunth, Meliaceae Jussieu, Rutaceae Jussieu e Simaroubaceae Candolle (Judd *et al.*, 2008). Em estudos filogenéticos utilizando dados morfológicos e moleculares, a família Sapindaceae tem se mostrado monofilética (Judd *et al.*, 2008; Harrington *et al.*, 2005). Sapindaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 140 gêneros e 1.600 espécies; no Brasil, ocorrem 24 gêneros e aproximadamente 400 espécies. São geralmente árvores ou lianas, com gavinhas originadas da modificação de parte da inflorescência (Souza & Lorenzi, 2008).

O gênero *Paullinia* L., pertence à tribo Paullinieae, que é constituída pelos gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Lophostigma*, *Serjania* e *Urvillea* (Acevedo–Rodríguez, 1993). *Paullinia* é um dos maiores gêneros de Sapindaceae, com aproximadamente 200 espécies, nativas de regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo representando um componente importante nas florestas tropicais úmidas e perenifólias (Somner, 2001).

Em território brasileiro, ocorre cerca de 80 espécies de *Paullinia*, cujo centro de diversidade é a região amazônica, sendo um gênero bem representado na floresta Atlântica e pouco freqüente no cerrado (Somner, 2001). As espécies deste gênero são popularmente denominadas de “cupana”, “guaraná”, “cipó-timbó”, “timbó” ou “tinguis”. Muitas das espécies contêm alcalóides, saponinas e outros metabólitos secundários que conferem às plantas efeitos ictiotóxicos (Acevedo–Rodríguez, 1990). O gênero é conhecido por suas propriedades medicinais e pelo uso potencial de suas espécies como, por exemplo, *Paullinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, o guaraná, que apresenta sementes ricas em cafeína e é utilizado no tratamento contra dor de cabeça, como diurético, no combate a arteriosclerose, cólicas, desordens intestinais, malária, dentre outras. Outras espécies são usadas no tratamento de tumores, reumatismo, dor de estômago, bronquites etc. (Beck, 1990).

Morfologicamente as espécies de *Paullinia* são arbustos ou lianas com gavinhas, apresentando folhas compostas e alternas, com estípulas, flores brancas e pequenas, frutos vermelhos do tipo cápsula septífraga, sementes com sarcotestas brancas, e presença de uma secreção branca semelhante látex. (Somner, 2001). *Paullinia* é vegetativamente muito semelhante aos outros gêneros da tribo Paullinieae, sendo diferenciado principalmente pela morfologia do fruto. Na filogenia da família Sapindaceae realizada por Harrington *et al.*, (2005), *Paullinia* figura como grupo irmão de *Serjania*, e muito próximo ao gênero *Cardiospermum*.

São relatados diferentes tipos de estruturas secretoras para as Sapindaceae: idioblastos mucilaginosos, tricomas secretores, canais secretores presentes nos raios de *Deinbollia grandiflora*, *Dolodendron bipinnatum* e *Diplokeleba* (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950). Também foi assinalada, em folhas de algumas espécies, a presença células organizadas em fileiras unisseriadas de comprimento variável as quais secretam saponina (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950). Nos espécimes vivos essa secreção é leitosa e nos materiais de herbário pode ser clara ou turva, variando de castanho amarelado ao castanho escuro (negro). Nos gêneros *Stockia* e *Erythrophysa* foram observadas células cujo conteúdo apresentou resultado positivo para tanino (Solereeder 1908; Metcalfe & Chalk, 1950).

Nos representantes da tribo Paullinieae diversos tipos de estruturas secretoras têm sido mencionados. Laticíferos associados aos feixes vasculares foram citados para os folíolos de *Serjania dumicola* (Acevedo–Rodríguez, 1993), e para as folhas e frutos de *Paullinia* (Radlkofer, 1892–1900), a presença de látex em *Paullinia* também foi mencionada por Milanez (1959), Areia *et al.* (1971), Croat (1976). Idioblastos taníferos e canais secretores são muito comuns no córtex dos caules de muitas espécies de *Serjania* (Acevedo–Rodríguez, 1993). Entretanto, estes estudos são baseados apenas em observações morfológicas, não havendo uma caracterização anatômica.

Algumas espécies de *Paullinia* apresentam glândulas nas margens dos folíolos que exsudam uma substância doce (Somner, 2001), em *Serjania* estas glândulas também estão presentes e a secreção é frequentemente coletada por formigas (Acevedo–Rodríguez, 1993). Nestas espécies essas glândulas têm sido denominadas de nectários, igualmente sem uma caracterização anatômica para respaldar esta inferência.

Tricomas secretores multicelulares foram descritos em *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Areia, 1966; Areia *et al.*, 1973), *Paullinia carpopodea* (Ferraz & Costa 1985), *Paullinia barbadosensis*, *P. coriacea*, *P. fuscensis*, *P. micrantha*, *P. plumieri*, *P. racemosa*, *P. revoluta*, *P. rufences*, *P. thalictrifolia*, *P. uloptera*, *P. vespertilio* (Somner, 2001), em *Serjania* (Acevedo–Rodríguez, 1993). Entretanto, não foram encontradas referências quanto à ontogenia e histoquímica destes tricomas.

Estruturas secretoras são responsáveis pela produção de um grande número de substâncias que desempenham diferentes funções nas plantas como defesa contra a herbivoria, atração de polinizadores e participação, em alguns casos, na interação das plantas com outras plantas. Outras substâncias têm estimulado o interesse comercial e medicinal (Fahn, 1979). Desta forma, a caracterização das estruturas secretoras, bem como a compreensão da biologia das secreções vegetais tem recebido atenção dos pesquisadores de diferentes áreas.

*Paullinia rubiginosa* ocorre em vários países da América do Sul e no Brasil principalmente na mata atlântica tendo sido registrada para os estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (Radlkofer, 1892–1900). Apresenta folhas compostas, com cinco folíolos oblongos de ápice acuminado e margem denteada (fig. 1). Na descrição da espécie foi mencionada a ocorrência de tricomas secretores e a produção de látex (Radlkofer, 1892–1900). Tais observações foram feitas com base em análise da morfologia externa, não tendo sido encontradas referências quanto à caracterização dos tricomas secretores nem das estruturas secretoras de látex.

O látex é uma emulsão contendo várias partículas em suspensão, como óleos, resinas, ceras e borracha, dispersas num líquido que pode conter mucilagem, carboidratos, ácidos orgânicos íons minerais e enzimas proteolíticas (Fahn, 1979). Esta secreção pode bloquear ferimentos, tendo papel relevante na defesa contra microrganismos, e reduzir a herbivoria. O látex é produzido por laticíferos, que correspondem a células ou conjunto de células conectadas, em alguns casos podem formar sistemas que permeiam vários tecidos do corpo da planta (Evert, 2006). Os laticíferos podem ser classificados em não articulados ou articulados. Os não articulados são formados por células isoladas que têm crescimento indeterminado, podem se ramificar ou não. Os laticíferos articulados consistem de fileiras de células, ramificados ou não, e geralmente mantêm suas paredes terminais íntegras (Evert, 2006). As características morfológicas dos laticíferos e químicas do látex podem ser utilizadas como caráter taxonômico devido à provável origem polifilética dos laticíferos articulados e não articulados (Mahlberg, 1993).

Tricomas secretores ou glandulares são apêndices epidérmicos que podem apresentar as mais variadas formas e número variado de células e, além disso, secretam substâncias da natureza química diversa e complexa. A função dos tricomas secretores está relacionada com o caráter químico da substância secretada, e eles podem proporcionar defesa e proteção para as plantas, além de atuar na atração de polinizadores ou eliminar secreção salina em plantas halófitas (Evert, 2006), dentre outras funções.

Em observações realizadas em campo, foi visualizada uma pequena quantidade de secreção exsudando da margem dos folíolos jovens de *Paullinia rubiginosa*, o que sugere uma natureza secretora para os dentes da margem. Aparentemente, estes dentes correspondem ao que foi denominado, na descrição taxonômica da espécie, como um prolongamento das nervuras laterais que ultrapassa a margem dos folíolos (Radlkofer, 1892–1900). A natureza secretora destes dentes e sua descrição anatômica não foram relatadas na literatura.

Dentes foliares que apresentam atividade secretora foram observados em diversas famílias botânicas e caracterizados como estruturas distintas, conforme o produto secretado.

Em alguns casos eles correspondem a nectários, que são estruturas secretoras de néctar e por ocorrerem em órgãos vegetativos são classificados como extraflorais (Fahn, 1979). Em outros casos, hidatódios foram relatados na margem das folhas, estes diferem dos nectários principalmente por secretarem água na forma líquida (gutação) e por serem vascularizados exclusivamente por xilema, enquanto os nectários por xilema e floema (Fahn, 1979, Evert *et al.* 2006). Estruturas secretoras de resina também podem ter esta mesma distribuição topográfica, como no caso dos dentes salicídeos em diferentes espécies de *Populus* (Salicaceae) que secretam resina e néctar (Curtis & Lersten, 1974, 1978, 1980).

Nectários extraflorais foram descritos para *Guarea macrophylla* (Morellato & Oliveira, 1994) pertencente à família Meliaceae que compõe a ordem Sapindales. Como já foi relatada a presença de nectários extraflorais em *Paullinia* e *Serjania*, a confirmação da presença de nectários nos dentes dos folíolos de *Paulina rubiginosa* pode significar uma proximidade filogenética entre as famílias Meliaceae e Sapindaceae. No entanto, são necessários estudos anatômicos com outras espécies de *Paullinia* e outros gêneros de Sapindaceae para confirmação desta hipótese. Os componentes principais do néctar são sacarose, glicose e frutose nas mais variadas concentrações, entretanto, diversas outras substâncias e íons podem estar presentes (Fahn, 1979; Baker & Baker, 1983). Os nectários extraflorais são comumente visitados por insetos que conferem proteção à planta contra o ataque de herbívoros (Janzen, 1966; Oliveira, 1997).

O presente trabalho tem por objetivo geral investigar a ocorrência de estruturas secretoras nos órgãos vegetativos aéreos de *Paullinia rubiginosa*, descrevendo-as e identificando as principais classes de metabólitos secretados por estas estruturas. O trabalho será apresentado em três capítulos, capítulo I, Ontogênese e histoquímica dos laticíferos e idioblastos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae), o qual foi redigido conforme as normas da revista *Annals of Botany*; capítulo II, Ontogênese e histoquímica dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae), conforme as normas do periódico *Botany*, e o capítulo III, Anatomia das glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae), de acordo com a revista *American Journal of Botany*.

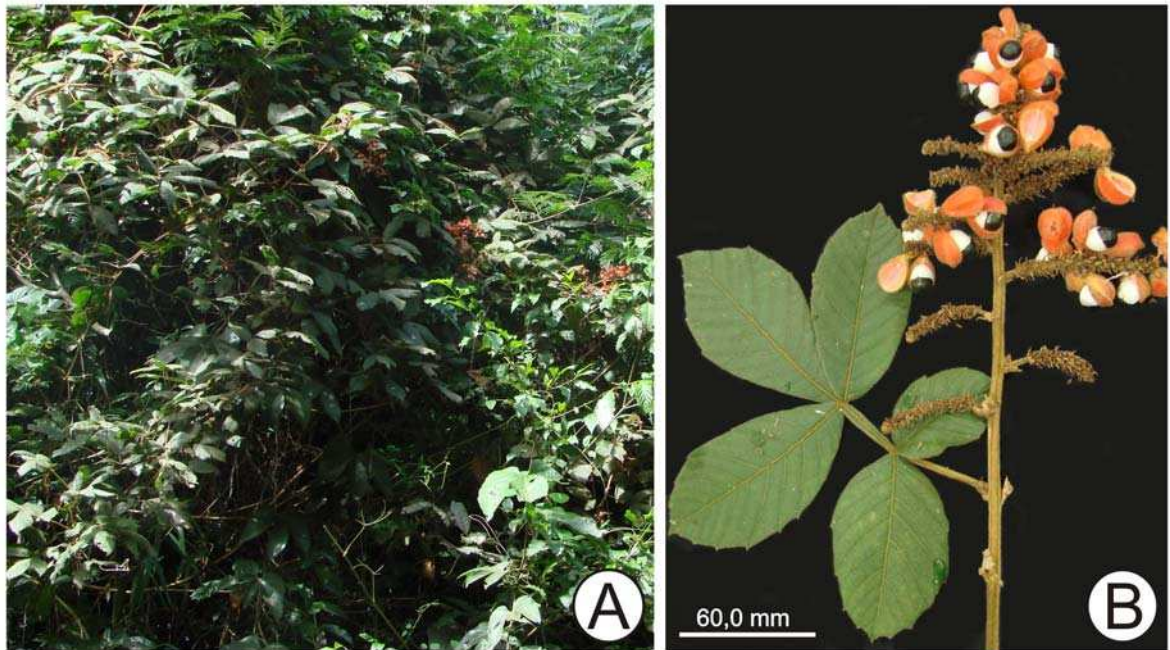


Fig. 1. *Paullinia rubiginosa* (Sapindaceae). (A) Vista geral no campo: hábito trepador. (B) Detalhe do ramo com uma folha e frutos maduros e sementes negras com sarcostesta branca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO–RODRÍGUEZ, P. 1990. The occurrence of Piscides and Stupefactants in the Plant Kingdom. *Advances in Economic Botany* 8: 1-23.
- ACEVEDO–RODRÍGUEZ, P. 1993. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part I: a revision of *Serjania* sect. *Platycoccus*. *Memoires of The New York Botanical Garden* 67: 1-93.
- AREIA, C.A. 1966 Anatomia da folha do guaraná: *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae). *Rodriguésia* 25: 297-312.
- AREIA, C.A. 1971. Alguns aspectos da parede celular em estrutura fina: *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Duke (Sapindaceae). *Rodriguésia* 26: 103-112.
- AREIA, C.A., MARQUETE, O., GUIMARÃES, D.J. & MAGALHÃES, H.G. 1973. Anatomia da folha jovem do guaraná *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae). *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 19: 154-170.
- BAKER, H.G. & BAKER, I. 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: BENTLEY, B. & ELIAS, T. (Eds.). *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- BECK, H.T. 1990. A survey of the useful species of *Paullinia* L. (Sapindaceae). *Advances in Economic Botany* 8: 41-56.
- CROAT, T.B. 1976. Flora of Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 419-540.
- CRONQUIST, A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, New York.
- CURTIS, J.D., LERSTEN, N.R. 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, J.D., LERSTEN, N.R. 1978. Heterophylly in *Populus grandidentata* (Salicaceae) with emphasis on resin glands and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* 65: 1003-1010.
- CURTIS, J.D., LERSTEN, N.R. 1980. Morphology and anatomy of resin glands in *Salix lucida* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 67: 1289-1296.
- DEMARCO, D., KINOSHITA, L.S & CASTRO, M.M. 2006. Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 133-144.
- EVERT, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy - Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- FAHN, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc., London.
- FERRAZ, C.L.A. & COSTA, C.G. 1985. *Paullinia carpopodea* Camb. (Sapindaceae): anatomia foliar. *Rodriguésia* 37: 79-90.

- HARRINGTON, M.G., EDWARDS, K.J., JOHNSON, S.A., CHASE, M.W. & GADEK, P.A. 2005. Phylogenetic Inference in Sapindaceae sensu lato Using Plastid *matK* and *rbcL* DNA Sequences. *Systematic Botany* 30: 366-382.
- JANZEN, D.H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* 20: 249-275.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2008. *Plant systematics, a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- LOPES, K.L.B., THADEO, M., AZEVEDO, A.A., SOARES, A.A. & MEIRA, R.M.S.A. 2009. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). *Botany* 87: 202–209.
- MAHLBERG, P.G. 1993. Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* 59: 1-23.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. V.I. Clarendon Press, Oxford.
- MILANEZ, F.R. 1959. Anatomia do fruto do Guaraná. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 16: 57-100.
- MORELLATO, P.C. & OLIVEIRA, P.S. 1994. Extrafloral nectaries in the tropical tree *Guaremacrophylla* (Meliaceae). *Canadian Journal of Botany* 72: 157-160.
- OLIVEIRA, P.S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology* 11: 323-330.
- PIO CORRÊA, M. & PENNA, L. 1975. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
- RADLKOFER, L. 1892-1900. Sapindaceae. In: MARTIUS, V. (ed.). *Flora Brasiliensis*. Volumen XIII. Pars III.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic anatomy of dicotyledons*. Vol. 1. Clarendon Press, Oxford.
- SOMNER, G.V. 2001. *Paullinia L. (Sapindaceae): Morfologia, taxonomia e revisão de Paullinia sect. Phygoptilon*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2008. *Botânica Sistemática*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

## CAPÍTULO I

### Ontogênese e histoquímica dos laticíferos e idioblastos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)

#### RESUMO

As descrições do gênero *Paullinia* citam a presença de uma secreção semelhante ao látex, no entanto, não foi encontrado nenhum trabalho anatômico das estruturas responsáveis por esta secreção. A presença de idioblastos contendo tanino é relatada para a família Sapindaceae em gêneros não tropicais, e no gênero *Serjania*. O presente trabalho tem por objetivos descrever o desenvolvimento dos laticíferos e idioblastos, bem como elucidar a natureza química da secreção produzida. Os laticíferos se localizam no córtex e por entre as células do floema do caule; nas folhas estão presentes no mesofilo, no córtex e floema da nervura mediana, da raque e do pecíolo. São do tipo articulado e originados da atividade do meristema fundamental e/ou do procâmbio. Os laticíferos possuem paredes pectocelulósicas, cuja espessura não difere das células adjacentes. A secreção dos laticíferos é constituída por emulsão complexa de substâncias de caráter lipofílico, contendo lipídios neutros, óleo essencial, esteróides, borracha, além de alcalóides. Os idioblastos se localizam na epiderme, córtex e floema do caule e da raque e pecíolo das folhas, secretam exclusivamente compostos fenólicos, em especial taninos, que se depositam uniformemente no vacúolo ou se condensam em gotas na periferia do vacúolo. A presença de laticíferos e idioblastos taníferos em *P. rubiginosa* pode conferir valor adaptativo devido à proteção contra herbívoros e patógenos, pela presença de compostos com atividade biológica como alcalóides, terpenos, esteróis e tanino. Este se constitui no primeiro trabalho que caracteriza os laticíferos e descreve histoquimicamente a natureza do látex em uma espécie de Sapindaceae.

## INTRODUÇÃO

*Paullinia* L., juntamente com *Serjania*, é um dos maiores gêneros da família Sapindaceae, apresentando aproximadamente 200 espécies (Somner, 2001), pertence à tribo Paullinieae, juntamente com os gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Serjania*, *Lophostigma* e *Urvillea* (Acevedo–Rodríguez, 1993).

Uma característica universalmente citada nas descrições do gênero *Paullinia* é a presença de uma secreção semelhante ao látex em folhas e frutos (Radlkofer, 1892–1900). A presença de látex em *Paullinia* também foi observada por Milanez (1959) e Areia (1971) em estudos anatômicos do fruto do guaraná, e Croat (1976) em estudos taxonômicos de espécies da flora do Panamá. Na tribo Paullinieae laticíferos associados aos feixes vasculares foram registrados para os folíolos de *Serjania dumicola*, e idioblastos taníferos foram observados no córtex dos caules de muitas espécies de *Serjania* (Acevedo–Rodríguez, 1993). Apesar das descrições sobre o gênero *Paullinia* citarem a presença de látex, não foram encontradas referências sobre anatomia dos laticíferos.

Laticíferos são células ou conjunto de células conectadas que secretam látex, podendo ocorrer em vários tecidos do corpo da planta (Evert, 2006). O látex é o próprio protoplasto do laticífero o qual possui pequenas partículas em suspensão como óleos, resinas, ceras e borracha, dispersas num líquido que pode conter mucilagem, carboidratos, ácidos orgânicos, íons minerais e enzimas proteolíticas (Fahn, 1979). Com base na sua origem, os laticíferos são classificados em articulados e não articulados (Evert, 2006). Os laticíferos não articulados desenvolvem-se a partir de uma única célula que sofre considerável alongamento e pode se ramificar durante o desenvolvimento do tecido. Os articulados consistem de uma série de células, ramificadas ou não, que são geralmente alongadas. Neste tipo de laticíferos as paredes terminais podem se tornar porosas ou sofrerem lise completa (Fahn, 1979). Quando ocorre a dissolução completa das paredes, o sistema de laticíferos resultante é muito semelhante ao tipo não articulado (Metcalf, 1967). Alguns laticíferos articulados formam anastomoses laterais com série de células semelhantes, constituindo uma estrutura reticular denominada de laticíferos articulados anastomosados; os laticíferos em que não ocorre anastomose são denominados laticíferos articulados não anastomosados (Evert, 2006). A provável origem polifilética dos laticíferos articulados e não articulados confere uma potencial aplicação de suas características morfológicas como caráter taxonômico (Mahlberg, 1993).

O látex apresenta papel importante na defesa química das plantas contra herbívoros e microorganismos e/ou resistência a doenças, podendo bloquear ferimentos (Dussourd, 1999; Konno *et al.*, 2004), aumentando o sucesso adaptativo da espécie; pode ser encontrado em ervas, incluindo suculentas e plantas aquáticas, bem como em árvores, arbustos e lianas

(Metcalf, 1967). Alguns constituintes do látex têm considerável importância econômica, como por exemplo, os alcalóides presentes no ópio, a borracha natural, dentre outros produtos (Pickard, 2008).

Idioblastos são células que diferem das demais por apresentar forma, tamanho ou conteúdo distinto das outras células do tecido. Os idioblastos podem secretar uma infinidade de compostos como óleo, resina, mucilagem, tanino. Dentre os compostos fenólicos produzidos por plantas, os taninos são aparentemente a classe mais estudada devido ao seu significado biológico (Salatino *et al.*, 1993). Os taninos são polifenóis, encontrados em grande número de plantas, hidrossolúveis e solúveis em solventes polares capazes de precipitar proteínas (Hartish & Kolodziej, 1997). A precipitação de proteínas é base de algumas de suas propriedades biológicas tais como substâncias alelopáticas (Khan & Hungar, 1986), de proteção contra patógenos (Hagerman & Bluter, 1989) e redução da herbivoria por conferir adstringência a muitos frutos e plantas em geral (Swain, 1979).

O presente trabalho tem por objetivos identificar o sítio de secreção da substância semelhante ao látex e caracterizar os idioblastos secretores de *Paullinia rubiginosa*, desde os estádios iniciais do desenvolvimento até a fase secretora, além de elucidar a natureza química da secreção produzida pelos idioblastos e laticíferos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo e coleta das amostras

*Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae) ocorre em regiões de mata atlântica, sendo representativa na região de Viçosa. Caminhadas aleatórias foram realizadas pelas trilhas da Mata da Biologia, situada no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e localizados treze indivíduos que cresciam em hábito trepador, em populações naturais, dos quais foram retiradas as amostras para o estudo estrutural. A Mata da Biologia é um fragmento de Floresta Estacional Semidecídua Montana (Velooso *et al.*, 1991) e encontra-se a uma altitude de 650 m, nas coordenadas 20°45'S e 42°51'W, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

Para o estudo estrutural, ontogenético e histoquímico, amostras foram coletadas do ápice caulinar, folhas jovens do primeiro nó, contados a partir do ápice, folhas jovens do segundo e terceiro nós, folhas adultas do quarto e quinto nós e caule jovem, na região do entre-nó logo abaixo do ápice vegetativo. Ramos férteis foram coletados para a produção de exsiccatas que foram depositadas no Herbário VIC, do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa sob os números 32.629 e 32.630.

## Ontogênese e histoquímica

Para a análise ontogenética, ápices caulinares, folíolos do primeiro nó inteiros, a região mediana de folíolos do segundo e terceiro nós e a região mediana de folíolos adultos do quarto e quinto nós foram fixados em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio de Sorenson 0,1 M pH 7,2 (Gabriel, 1982), desidratados em série etílica e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Instruments). Cortes paradérmicos, transversais e longitudinais seriados, de 4 e 5 µm de espessura, foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo com avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Os cortes foram corados com azul de toluidina em pH 4,4 (O'Brien e McCully, 1981) e as lâminas, montadas com resina sintética (Permount-Fisher).

Amostras do segundo e terceiro nós foram utilizadas para os testes histoquímicos. Secções longitudinais foram obtidas da região mediana do folíolo, raque e pecíolo em micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil) ou a mão livre e as lâminas montadas em gelatina glicerizada. As principais classes de metabólitos investigadas estão descritas na tabela 1. Secções controle foram realizadas simultaneamente, de acordo com as recomendações dos respectivos autores. Os testes foram realizados no mesmo dia da coleta, com as amostras frescas.

Para detecção de compostos fenólicos, amostras da região mediana do folíolo do terceiro e quarto nós e do caule foram fixadas em SFF (solução de sulfato ferroso, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Johansen, 1940). O material foi submetido à vácuo em dessecador durante o processo de fixação, e depois de desidratado em série etílica, foi armazenado em etanol 70%. Amostras foram incluídas em parafina histológica com DMSO (Histosec/Merck) utilizando-se série butílica para a desidratação (Johansen, 1940). Cortes transversais e longitudinais foram obtidos (com 7 e 10 µm de espessura) com o auxílio de micrótomo rotativo (820 Spencer, American Optical Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permount- Fisher). O controle foi realizado com solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v, High, 1948). As amostras foram submetidas a essa solução por um período de 48 horas em temperatura ambiente, logo em seguida fixadas em SFF e submetidas ao mesmo tratamento das demais peças.

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo e recurso para epifluorescência. A lâmpada de vapor de mercúrio utilizada foi a HBO 50W e o filtro para luz ultra-violeta.

Tabela 1- Relação dos testes histoquímicos realizados para identificação dos principais metabólitos secretados pelos laticíferos e idioblastos das folhas de *Paullinia rubiginosa* (Sapindaceae)

Grupos de Metabólitos		Reagente
Lipídios	Lipídios totais	Negro de Sudão B (Pearse, 1980) Vermelho Neutro* (Kirk, 1970)
	Lipídios ácidos e neutros	Sulfato Azul do Nilo (Cain, 1947)
	Ácidos graxos	Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico (Ganter & Jollés, 1969)
Terpenóides	Óleos essenciais e oleoresinas	Reagente de Nadi (David & Carde, 1964)
	Esteróides	Tricloreto de Antimônio (Hardman & Sofowora, 1972; Mace <i>et al.</i> , 1974)
	Lactonas sesquiterpênicas	Ácido Sulfúrico (Geissman & Griffin, 1971)
	Terpenóides com grupo carbonila	2,4-Dinitrofenilhidrazina (Ganter & Jollés, 1969)
	Borracha	Óleo Vermelho (Jayabalan & Shah, 1986) Cloreto de Dansila (Jayabalan & Shah, 1986)
Compostos fenólicos	Compostos fenólicos totais	Dicromato de Potássio (Gabe, 1968) Cloreto de ferro III (Johansen, 1940)
	Taninos	Vanilina Clorídrica (Mace & Howell, 1974)
	Ligninas	Floroglucinol (Johansen, 1940)
	Flavonóides	Cloreto de Alumínio* (Charrière-Ladreix, 1976)
	Agliconas flavonólicas	Reagente de Wilson* (Charrière-Ladreix, 1976)
Composto nitrogenado	Alcalóides	Reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981)
		Reagente de Dittmar (Furr & Mahlberg, 1981)
Polissacarídeos	Polissacarídeos neutros	PAS (McManus, 1948)
	Amido	Lugol (Jensen, 1962)
	Pectinas	Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940)
	Calose	Azul de Anilina (Smith & McCully, 1978)
	Mucopolissacarídeos ácidos	Azul de Alcião (Pearse, 1980)
	Mucilagens	Ácido Tânico/Cloreto de Ferro III (Pizzolato, 1977)
Proteínas	Proteínas totais	Pounceau de Xilidina (XP) (O'Brien & McCully, 1981)

\* Indução de Fluorescência

## RESULTADOS

### Laticíferos

Os laticíferos de *Paullinia rubiginosa* estão presentes nos órgãos vegetativos analisados. Nas folhas, foram visualizados no mesofilo (fig. 1A e 1B), no córtex e na medula da nervura mediana do folíolo e no córtex, medula e por entre as células do floema (fig. 1C e 1D) do pecíolo. No caule, ocorrem no córtex, por entre as células do floema e na medula.

Os laticíferos se diferenciam precocemente (fig. 2). Laticíferos diferenciados contendo secreção são visualizados nos primórdios foliolares, onde os demais tecidos encontram-se indiferenciados (fig. 2A). Seu desenvolvimento inicia com células originadas do meristema fundamental ou procâmbio, que podem ser reconhecidas por serem um pouco maiores que as células circunvizinhas (fig. 2B), possuem núcleo relativamente grande com cromatina descondensada e nucléolo evidente, citoplasma denso, poucos e pequenos vacúolos. Os vacúolos se expandem gradativamente (fig. 2D), e se fundem (figs. 2E e 2F). Com a expansão dos vacúolos, o citoplasma assume posição parietal (figs. 2E, 2F, 2G) e o núcleo permanece no pólo equatorial da célula (fig. 2G).

Durante o desenvolvimento do laticífero, verifica-se um alongamento acompanhando o eixo longitudinal da planta (figs. 2A, 2G e 3A). Neste estágio, o laticífero, embora se encontre em desenvolvimento, ainda exibe capacidade de divisão (figs. 3B, 3C e 3D). A ocorrência de divisões anticlinais culmina com a formação de fileiras de células laticíferas longitudinalmente arranjadas (fig. 2A). Desta forma, os laticíferos são originados de células meristemáticas e a divisão anticlinal das células laticíferas em desenvolvimento, aumenta o comprimento do laticífero pelo aumento no número de células.

Os laticíferos de *Paullinia rubiginosa* são articulados e mantêm as paredes terminais na fase final do desenvolvimento, não ocorrendo nenhum tipo de dissolução mesmo quando diferenciado (figs. 2A e 2G, 3A e 3C). Não foi verificada anastomose, tampouco ramificações nos laticíferos, os quais são constituídos de fileiras unisseriadas de células (fig. 2A). Suas paredes apresentam aproximadamente a mesma espessura das células parenquimáticas adjacentes, e são de natureza pectocelulósica, sem deposição de calose, suberina ou lignina, conforme verificado pelos resultados dos testes histoquímicos aplicados (tabela 2).

Em todos os estádios de desenvolvimento, os laticíferos são estruturalmente diferenciados das células vizinhas por sua forma alongada e diâmetro maior (figs. 1, 2 e 3).

Durante as coletas em campo foi possível verificar o extravasamento de uma secreção de coloração branca, consistência viscosa e que coagula quando em contato com o ar. Essa secreção corresponde ao látex.

Na caracterização histoquímica dos laticíferos (tabela 2), verificou-se reação negativa para polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, e reação positiva para compostos lipofílicos e alcalóides. Os dois testes para lipídios totais aplicados foram positivos: Negro de Sudão B (não documentado) e a coloração esverdeada fluorescente do Vermelho Neutro (fig. 4D). A coloração rosa resultante da reação ao Sulfato Azul do Nilo demonstra que os lipídios são ácidos (figs. 4B e 4C). O Reagente de Nadi (figs. 4E e 4F) evidenciou óleo essencial enquanto os reagentes: Óleo Vermelho (figs. 4G e 4H) e Cloreto de Dansila (fig. 4I)

demonstraram a presença de partículas de borracha sob luz branca e UV, respectivamente, as partículas apresentaram coloração vermelha no teste com Óleo Vermelho e fluorescência branca no teste com Cloreto de Dansila. Esteróides foram evidenciados pela coloração alaranjada no teste com Tricloreto de Antimônio (Fig. 4J). Os dois testes para verificar a presença de alcalóides foram positivos sendo visualizados pela coloração castanho-escura resultante dos Reagentes de Wagner (fig. 4K) e Dittmar (fig. 4L).

### Idioblastos

Os idioblastos de *Paullinia rubiginosa* estão presentes nos órgãos analisados. Foram visualizados na epiderme, no parênquima cortical e no floema do caule e da folha (lâmina foliolar, raque e pecíolo) (fig. 5). Os idioblastos associados ao floema são menores que os originados do meristema fundamental (fig. 5B-C). A secreção ocupa todo o vacúolo de forma uniforme ou apresenta-se em forma de gotas aglomeradas na periferia do vacúolo (fig. 5D).

Os idioblastos se diferenciam precocemente, semelhante ao descrito para os laticíferos. Estas estruturas secretoras podem ser visualizadas lado a lado, e ambas encontram-se em fase secretora já no ápice caulinar (fig. 6A). Os idioblastos têm origem de células da protoderme, do meristema fundamental e do procâmbio, sendo que as células que originarão os idioblastos são menores que as células-mãe dos laticíferos. Durante o desenvolvimento dos idioblastos, os vacúolos se expandem e se fundem, comprimindo o núcleo e o citoplasma na periferia da célula (figs. 6C, 6D e 6E). A secreção produzida pelo idioblasto se acumula no interior dos vacúolos e pode facilmente ser identificada pela coloração verde em cortes submetidos ao azul de toluidina (fig. 6).

Os idioblastos apresentam paredes primárias, sem deposição de compostos lipídicos ou lignina, e tamanho semelhante ao das células circunvizinhas, sendo possível o seu reconhecimento graças à presença da secreção (figs. 5 e 6). O desenvolvimento dos idioblastos é assincrônico, uma vez que foram visualizados idioblastos totalmente diferenciados nas proximidades de outros em fase inicial de desenvolvimento (fig. 6M). Os idioblastos, da mesma forma que os laticíferos, exibem capacidade de divisão celular mesmo em fase de diferenciação (figs. 6H, 6I), apresentam um rápido desenvolvimento, exibindo atividade secretora (figs. 6J e 6L) logo após a divisão.

Na análise dos testes histoquímicos (tabela 2), verificou-se reação positiva somente para compostos fenólicos através dos testes com o reagente dicromato de potássio (figs. 7A e 7B) e cloreto de ferro III (não documentado). Por intermédio do teste com Vanilina Clorídrica, cuja reação foi positiva, identificando várias gotas vermelho-claras no interior dos idioblastos, obteve-se a confirmação de se tratam de idioblastos taníferos (fig. 7C).

Tabela 2- Caracterização histoquímica dos laticíferos e idioblastos presentes na folhas de *Paullinia rubiginosa* (Sapindaceae)

<b>Grupo de compostos</b>	<b>Teste</b>	<b>Laticíferos</b>	<b>Idioblastos</b>
Lípidios	Negro de Sudão B	+	-
	Vermelho Neutro	+	Fig. 4D -
	Sulfato Azul do Nilo	+	Figs. 4B e 4C -
	Acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico	-	-
Terpenóides	Reagente de Nadi	+	Figs. 4E e 4F -
	Tricloreto de Antimônio	+	Fig. 4J -
	Ácido Sufúrico	-	-
	2,4-Dinitrofenilhidrazina	-	-
	Óleo Vermelho	+	Figs. 4G e 4H -
	Cloreto de Dansila	+	Fig. 4I -
Compostos Fenólicos	Dicromato de potássio	-	+ Figs. 7A e 7B
	Cloreto de Ferro III	-	+ -
	Vanilina clorídrica	-	+ Fig. 7C
	Floroglucinol	-	-
	Cloreto de Alumínio	-	-
	Reagente de Wilson	-	-
Alcalóides	Reagente de Wagner	+	Fig. 4K -
	Reagente de Dittmar	+	Fig. 4L -
Polissacarídios	PAS	-	-
	Lugol	-	-
	Vermelho de Rutênio	-	-
	Azul de Anilina	-	-
	Azul de Alcião	-	-
	Ácido Tânico/Cloreto de Ferro III	-	-
Proteínas Totais	Ponceau de Xilidina	-	-

(+) reação positiva; (-) reação negativa

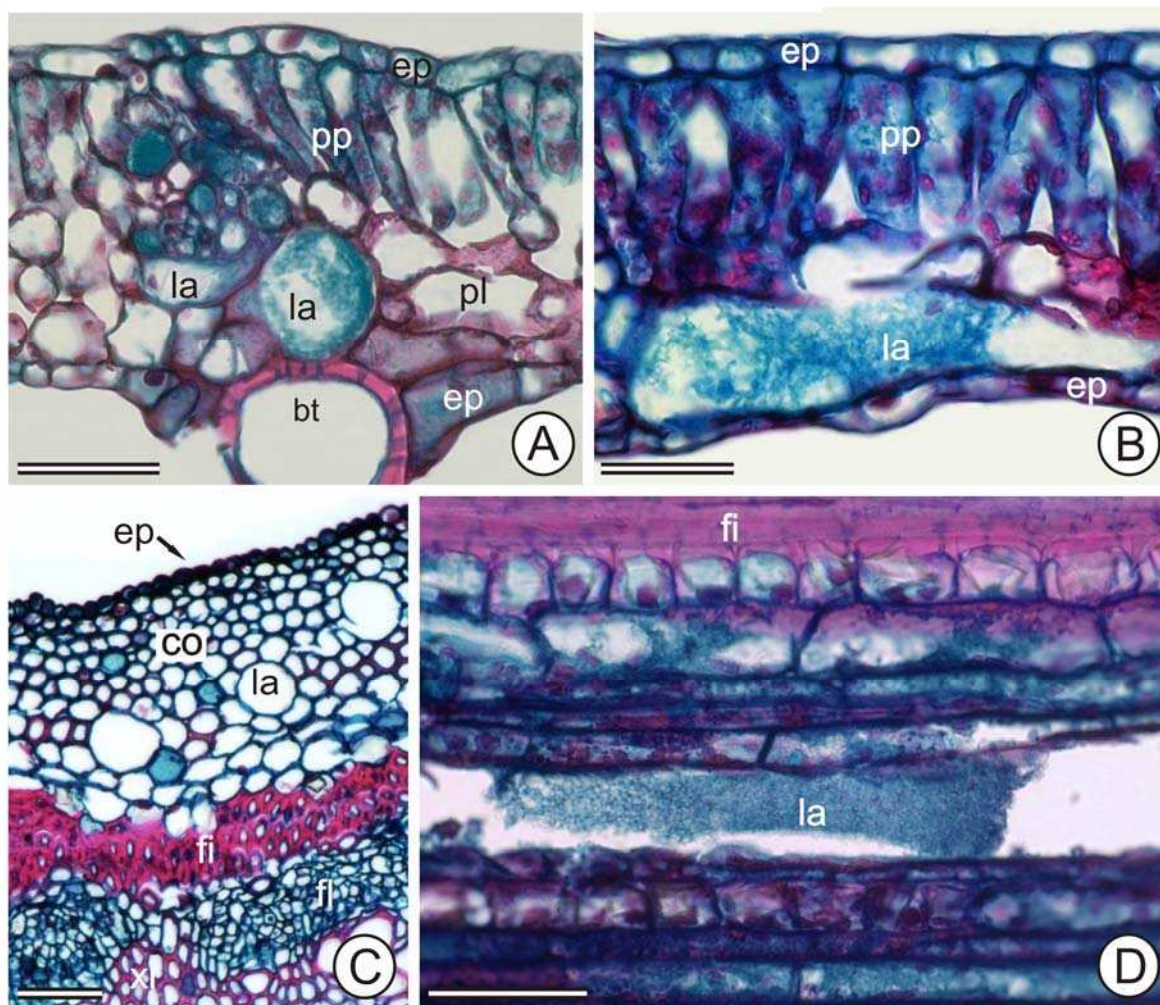
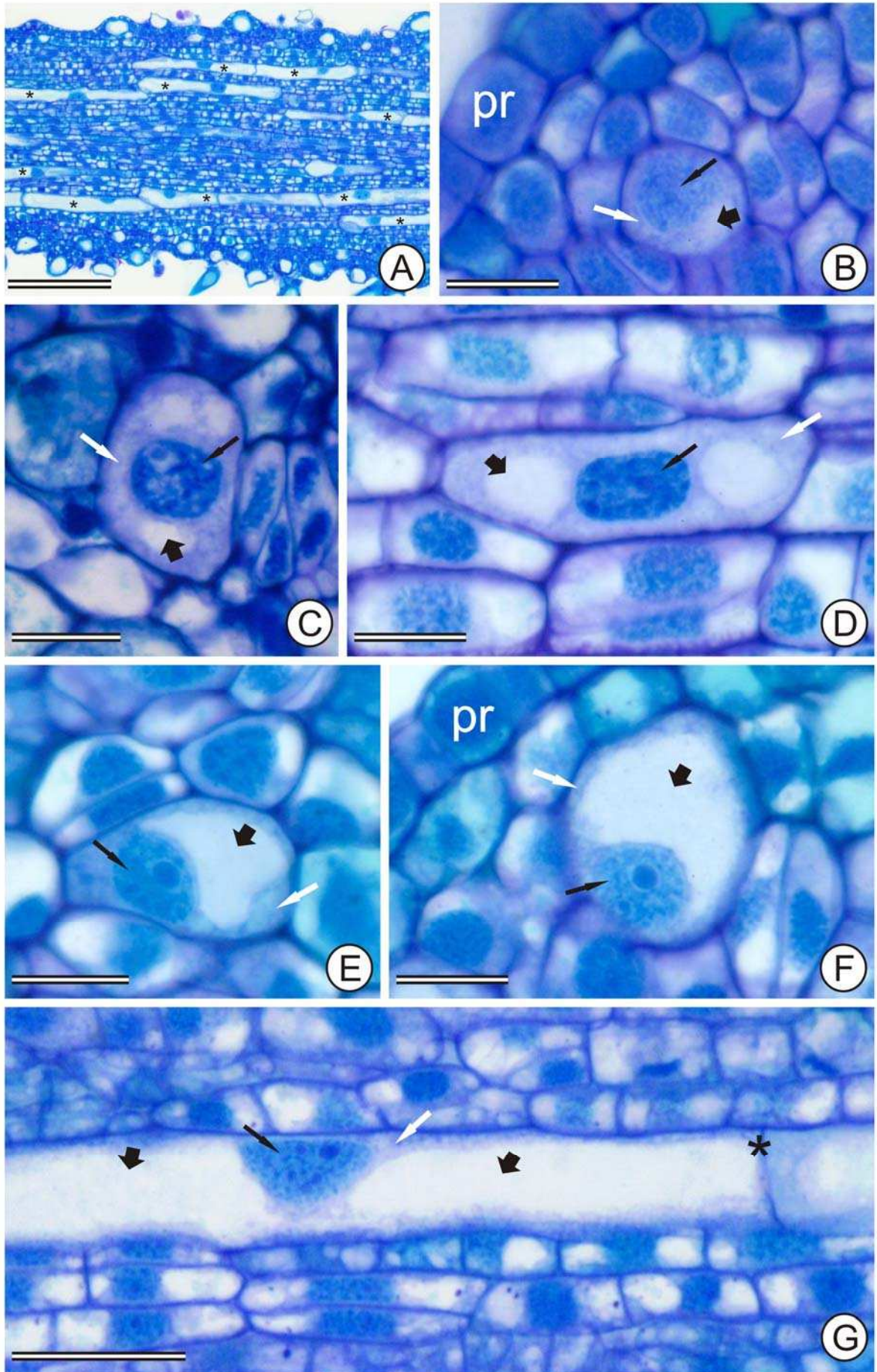


Fig. 1. Laticíferos em folhas adultas de *Paullinia rubiginosa*. (A e C) Cortes transversais. (B e D) Cortes longitudinais. (A e B) Laticíferos associados ao floema e no mesófilo do folíolo. (C e D) Laticíferos no córtex do pecíolo e associados ao floema, respectivamente. Abreviaturas: bt- base de um tricoma tector, co- córtex, ep- epiderme, fl- floema, fi- fibras, la- laticífero, pl- parênquima lacunoso, pp- parênquima paliçádico, xi- xilema. Barras B= 25 μm, A, C e D= 50 μm.

Fig. 2. Ontogenia dos laticíferos de *Paullinia rubiginosa*. (A e G) Vista geral e detalhe dos laticíferos em folíolos jovens, respectivamente (corte paradérmico). (B-F) Corte longitudinal do ápice caulinar evidenciando o desenvolvimento do laticífero no primórdio foliolar. (B) Célula-mãe de laticífero. (C-D) Aumento do volume dos vacúolos. (D-F) Expansão do vacúolo comprimindo o citoplasma pra a periferia da célula. (G) Detalhe do laticífero. Abreviaturas: pr- protoderme, setas largas- vacúolo, setas pretas- núcleo, setas brancas- citoplasma, asterisco- parede terminal do laticífero. Barras A= 150  $\mu\text{m}$ , B-G= 50  $\mu\text{m}$ .



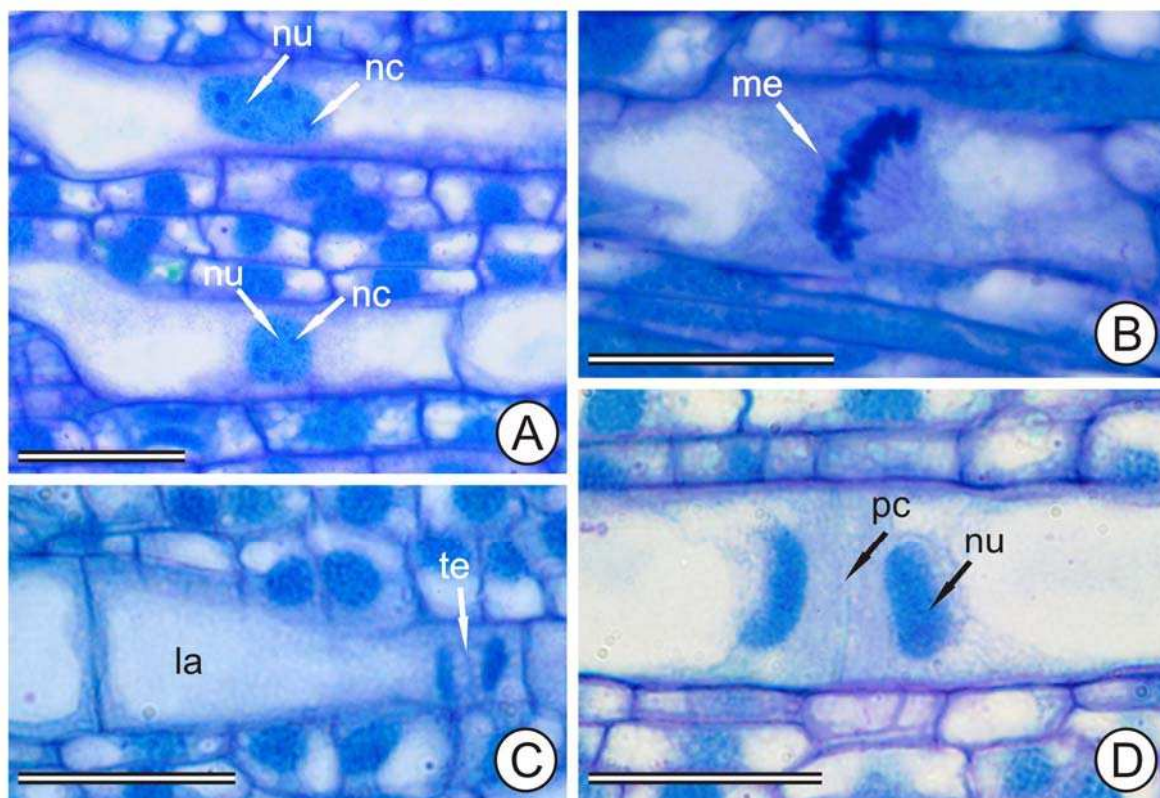


Fig. 3. Laticíferos de *Paullinia rubiginosa* no folíolo jovem (cortes paradérmicos). (A) Laticífero com núcleo volumoso e vários nucléolos. (B-D) Células laticíferas em divisão celular. (D) Detalhe da placa celular. Abreviaturas: la- laticífero, me- metáfase, nc- nucléolo, nu, núcleo, pc- placa celular, te- telófase. Barras 30  $\mu$ m.

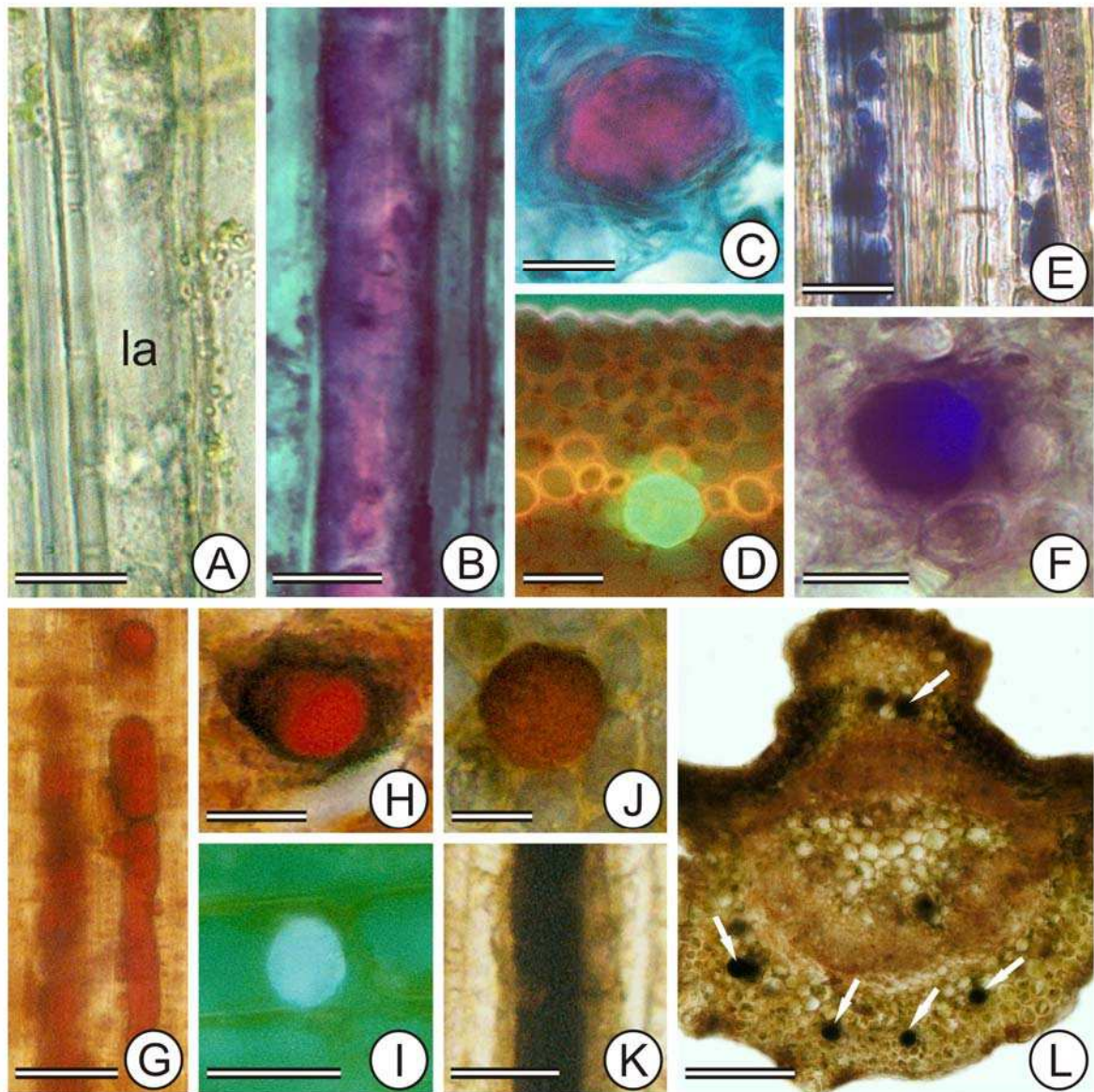


Fig. 4. Testes histoquímicos dos laticíferos em folhas de *Paullinia rubiginosa*. (A, B, E, G, I e K) Cortes longitudinais. (C, D, F, H, J e L) Cortes transversais. (A) Laticífero não submetido a reagente - branco. (B) Teste com Vermelho Neutro evidenciando lipídios gerais sob luz UV. (C-D) Reação com o Sulfato Azul do Nilo ilustrando as gotas de lipídios ácidos. (E-F) Teste com o Reagente de Nadi demonstrando a presença de óleo essencial. (G-H) Teste com o reagente Oil Red mostrando as partículas de borracha. (I) Reação com o Cloreto de Dansila evidenciando partícula de borracha sob luz UV. (J) Reação com Tricloreto de Antimônio detectando esteróides. (K-L) Reação positiva para alcalóides no teste com Reagente de Wagner e Dittmar (setas brancas), respectivamente. Barras A, B, E, G= 10  $\mu\text{m}$ ; D= 30  $\mu\text{m}$ ; F e H- K= 15  $\mu\text{m}$ ; L= 60  $\mu\text{m}$ .

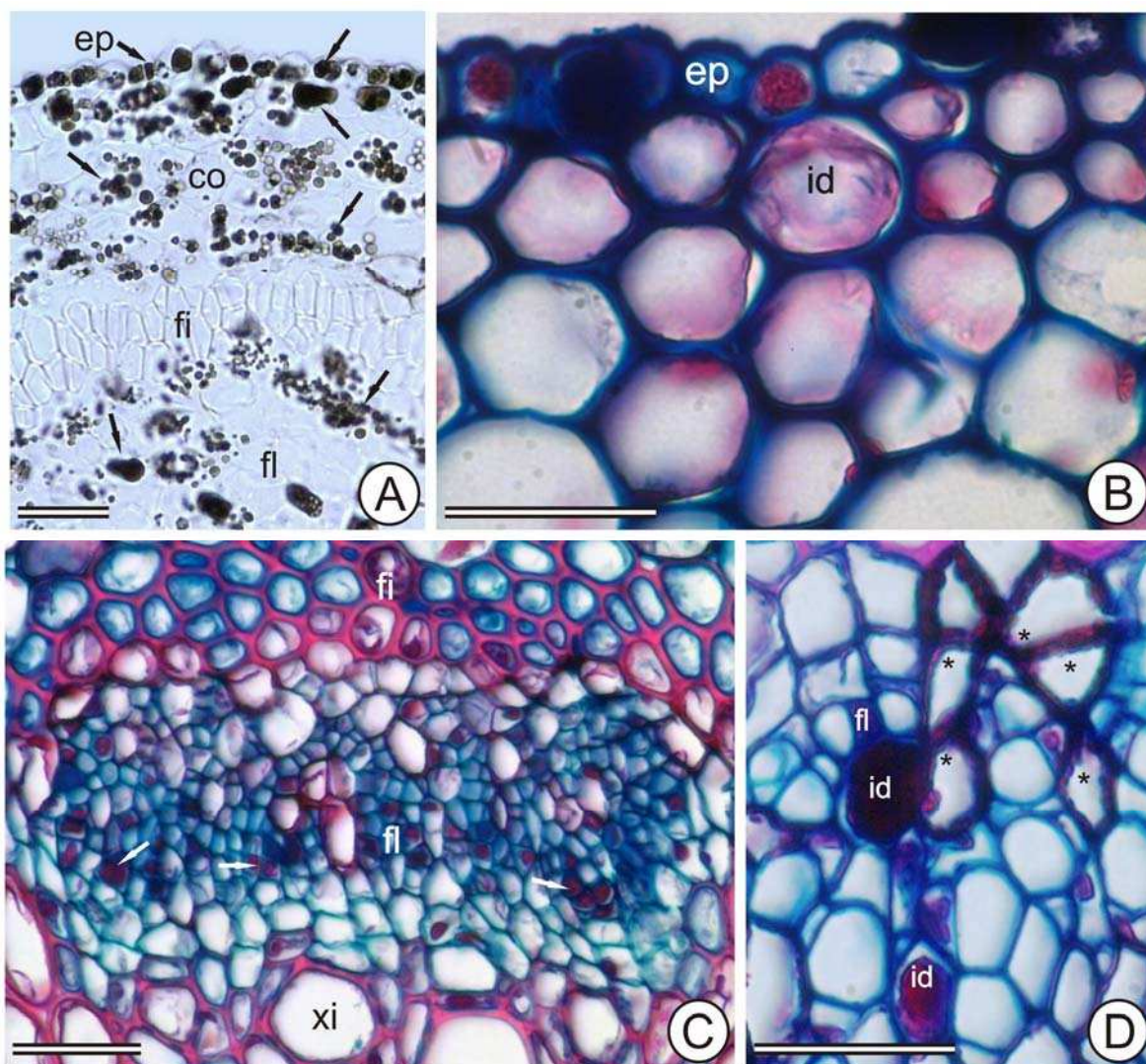


Fig. 5. Idioblastos taníferos no caule e folha adultos de *Paullinia rubiginosa* (cortes transversais). (A) Idioblastos no caule fixado com SFF e evidenciado pelo conteúdo negro. (B) Idioblastos na epiderme e córtex do pecíolo. (C) Idioblastos associados ao floema do pecíolo. (D) Idioblastos associados ao floema do pecíolo mostrando secreção uniforme e secreção em forma de gotas aglomeradas na periferia do vacúolo. Abreviaturas: co- córtex, ep- epiderme, fl- floema, fi- fibras, xi- xilema, asterisco- idioblastos do floema com secreção acumulada na periferia da célula, seta preta- idioblastos. Barras 30  $\mu$ m.

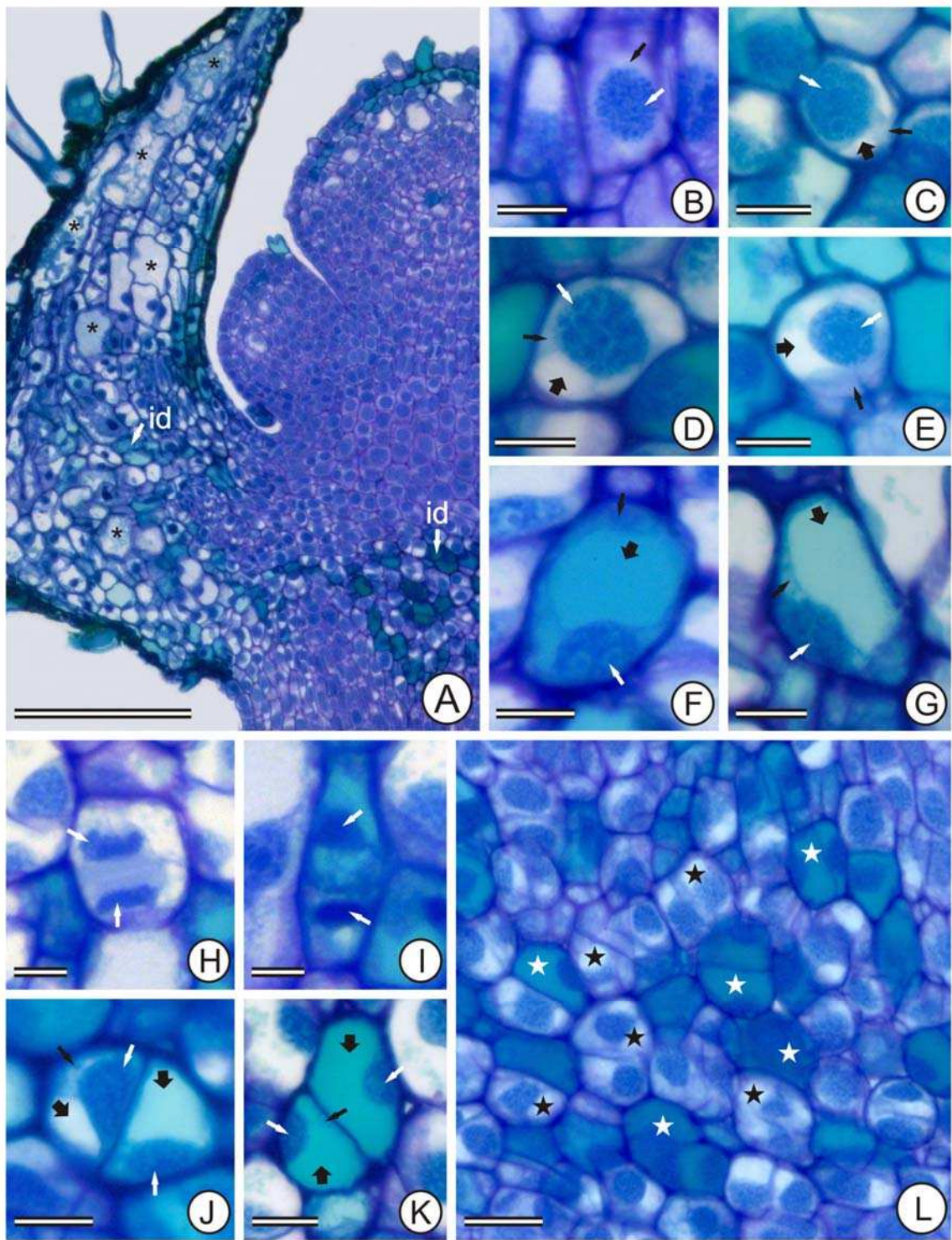


Fig. 6. Ontogenia dos idioblastos de *Paullinia rubiginosa* no ápice caulinar (corte longitudinal). (A) Ápice caulinar com vista geral dos idioblastos (id) e laticíferos (\*). (B-G) Desenvolvimento do idioblasto. (B) Célula-mãe de idioblasto. (C-E) Expansão dos vacúolos. (F-G) Citoplasma parietal, presença de secreção no vacúolo. (H-L) Idioblastos em divisão celular. (M) Vista geral da do desenvolvimento assincrônico dos idioblastos. Setas largas- vacúolo, setas pretas- citoplasma, setas brancas- núcleo, estrelas brancas- idioblastos maduros, estrelas pretas- idioblastos em desenvolvimento. Barras A= 150  $\mu\text{m}$ ; B-K= 10  $\mu\text{m}$ , L= 20  $\mu\text{m}$ .

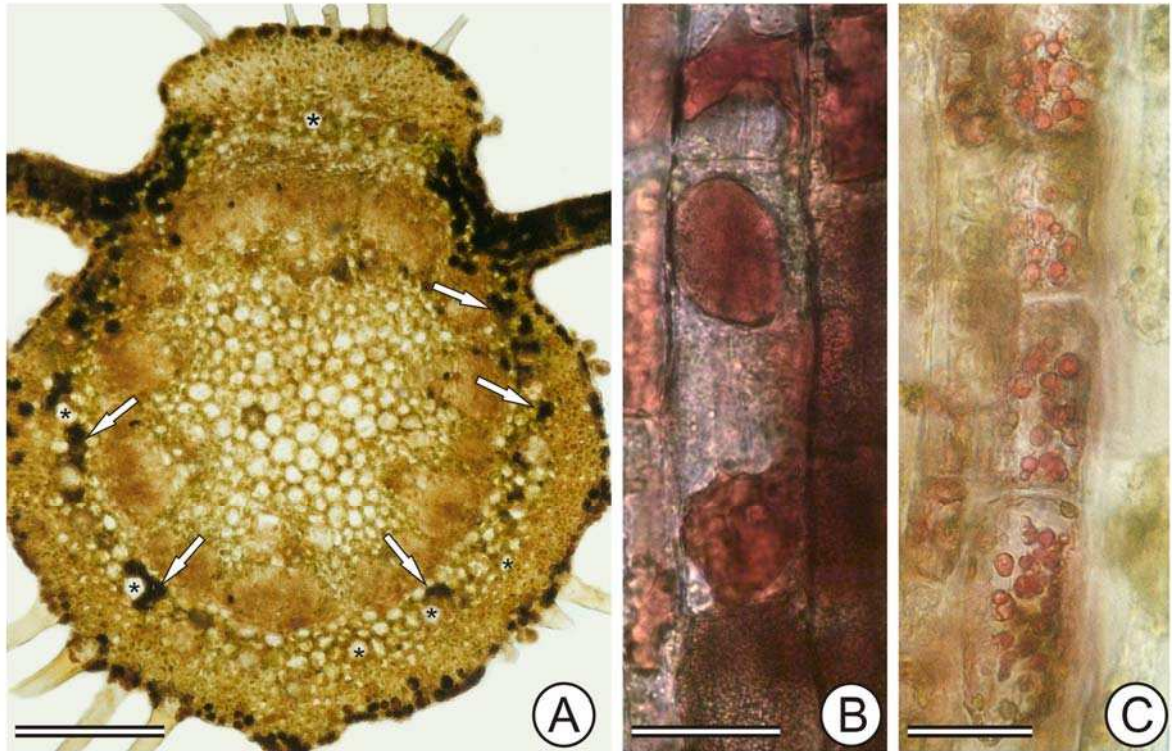


Fig. 7. Nervura mediana do folíolo de *Paullinia rubiginosa* (Sapindaceae). Testes histoquímicos. (A) Corte transversal. (B-C) Cortes longitudinais. (A-B) Compostos fenólicos evidenciados pelo teste com o reagente Dicromato de Potássio. (C) Detecção de tanino mediante reação com Vanilina Clorídrica. Asterísco- laticíferos, setas- idioblastos. Barras A=100  $\mu\text{m}$ ; B= 30  $\mu\text{m}$ ; C= 15  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

### Laticíferos

Nas descrições taxonômicas, o gênero *Paullinia* é citado como lactescente, pela observação da liberação de um exsudado de cor branca em cortes de folhas, caules e frutos frescos (Radlkofer, 1892-1900). Trabalhos de anatomia têm enfatizado a presença de laticíferos em diversas espécies de *Paullinia*, tais como, a presença de látex em folíolos e frutos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) (Areia, 1971; Milanez, 1959). Somner (2001) relata a presença de látex em *Paullinia racemosa*, *P. revoluta* e *P. weinmanniaefolia*. A presença de laticíferos também foi citada em *Serjania dumicola* (Acevedo-Rodríguez, 1993), cujo gênero é estreitamente relacionado à *Paullinia*. Estes trabalhos, entretanto, se limitam em citar a presença desta estrutura, sem, contudo, esclarecer a sua estrutura anatômica e a caracterização do tipo de laticífero, como foi feito para *Paullinia rubiginosa* neste trabalho. Estes resultados indicam a necessidade de estudos complementares em outros representantes da tribo Paullinieae para se averiguar a importância deste parâmetro para análises taxonômicas e filogenéticas.

Os laticíferos de *Paullinia rubiginosa* são do tipo articulado e como não foram encontradas descrições do tipo de laticífero para outros representantes do gênero, tampouco para a família, não é possível avaliar o significado filogenético da presença de laticíferos articulados. A provável origem polifilética dos laticíferos articulados e não articulados confere uma potencial aplicação de suas características morfológicas como caráter taxonômico (Mahlberg, 1993), sendo necessária a verificação da presença de laticíferos e sua classificação morfológica, em outras espécies de Sapindaceae, em especial na tribo Paullinieae. Este tipo de laticífero foi citado para representantes de muitas famílias não relacionadas com as Sapindaceae, como Asteraceae, Campanulaceae, Caricaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae (em poucas espécies), Nymphaeaceae, Papaveraceae, Sapotaceae (Metcalf & Chalk, 1983). Cabe ressaltar que nesta mesma obra, onde foi apresentada uma listagem das famílias que possuem espécies lactescentes, não há menção a família Sapindaceae.

Não há dúvidas quanto à classificação dos laticíferos de *Paullinia rubiginosa*, pois não há dissolução das paredes terminais no laticífero adulto, permanecendo as fileiras unisseriadas e articuladas, como ocorre em algumas espécies de Apocynaceae (Demarco *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2009).

A formação precoce dos laticíferos em *Paullinia rubiginosa*, no meristema apical (procâmbio e meristema fundamental), e o contínuo acréscimo de células no sistema laticífero em formação, através de divisões das células laticíferas unicamente no plano anticlinal, já

foram relatados na literatura para a família Apocynaceae (Murugan & Inamdar 1987; Demarco *et al.* 2006; Lopes *et al.*, 2009).

Conforme exposto por Fahn (1979), as paredes dos laticíferos podem ser tão finas quanto às paredes das células parenquimáticas ou mais espessas, sendo muito hidratadas e contendo uma grande proporção de substâncias pécticas e hemiceluloses. As paredes dos laticíferos de *Paullinia rubiginosa* são delgadas, pectocelulósicas, sem deposição de calose ou lignina, sua espessura não difere das demais células adjacentes, e a composição não variou ao longo do seu desenvolvimento.

O látex produzido pelos laticíferos de *Paullinia rubiginosa* apresenta composição química complexa e diversa. Dentre os constituintes identificados pelos testes histoquímicos, destacam-se os alcalóides e a borracha, que são comuns no látex produzidos por espécies vegetais taxonomicamente não relacionadas como em *Papaver somniferum* (Papaveraceae) cujo látex é rico em alcalóides opiáceos (Kutchan *et al.*, 1985) e *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) cujo látex é rico em borracha (Kush, 1994).

A verificação de esteróides em *Paullinia rubiginosa* indica que os laticíferos correspondem ao sítio de secreção ou acúmulo destes compostos. Este resultado é interessante, uma vez que a presença de esteróides no gênero *Paullinia* já foi registrada para extratos foliares de *P. elegans*, correspondendo a uma mistura dos esteróides stigmasterol, sitosterol, canferol, calicopteretina glicosilada, quiroinositol (Guimarães, 2006). O esteróide saponina, que apresenta propriedade antifúngica e antimicrobiana (Agarwal & Rastogi, 1974), também já foi citado para a família Sapindaceae no gênero *Serjania* (Hegnauer, 1963). Nas famílias Rutaceae, Meliaceae e Simaroubaceae, que compõe a ordem Sapindales, algumas espécies são de interesse econômico, pois produzem o esteróide limonóide. Em Meliaceae foi extraído o limonóide azadiracina, que tem efeito inseticida e dissuasivo alimentar para insetos (Harbone, 1989; Stone, 1992).

Os óleos essenciais, também identificados como constituinte do látex de *Paullinia rubiginosa*, podem estar relacionados com a defesa contra patógenos (Siqui *et al.*, 2000), por exibirem propriedades antifúngicas e antibacterianas (Bhavanani & Ballou, 1992).

O látex pode ter papel relevante na defesa química contra microrganismos, e redução da herbivoria (Dussourd, 1999). Vários dos constituintes do látex de *Paullinia rubiginosa* apresentam atividade biológica. Segundo Farrell *et al.* (1991), linhagens de plantas lactescentes apresentam maior diversidade nos mais variados habitats, pela presença de laticíferos conferir maior valor adaptativo às plantas.

Os resultados obtidos sobre os constituintes do látex de *Paullinia rubiginosa*, são promissores para estudos adicionais que avaliem o potencial econômico dos produtos

biologicamente ativos componentes do látex desta espécie. Alguns trabalhos têm sido realizados com a atividade biológica de produtos extraídos de espécies da família Sapindaceae (Guimarães *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008) no entanto, estes trabalhos são conduzidos a partir de extratos brutos de órgãos vegetativos, a maioria deles de *Magonia pubescens* e *Sapindus saponaria*, sem a identificação da classe química de cada substância, tampouco o sítio de produção destes compostos.

### Idioblastos

Idioblastos taníferos foram registrados em muitas famílias como Crassulaceae, Ericaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Rosaceae, Vitaceae e ocorrem em plantas de diversos ambientes (Evert, 2006). Para Sapindaceae, Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1950) relataram idioblastos taníferos em *Stockia* e *Erythrophysa*, gêneros exóticos, e Acevedo-Rodríguez (1993) cita sua presença em *Serjania*. Em *Paullinia*, este é o primeiro registro sobre a ocorrência de idioblastos taníferos.

Os idioblastos são formados a partir de células iniciais protodérmicas, do meristema fundamental, procâmbio e também a partir de idioblastos em diferenciação, constituindo outra forma de produção de idioblastos. A diferenciação precoce é comum em estruturas secretoras (Fahn, 1979), foi relatada também para outros tipos de idioblastos, tais como em *Laurus nobilis* (Maron & Fahn 1979), *Persea americana* (Platt-Aloia, 1983), *Magnolia grandiflora* (Postek & Tucker, 1983), *Liriodendron tulipifera* (Mariani *et al.* 1989) e *Annona muricata* (Bakker & Gerritsen, 1990), cujos idioblastos não seguem os estádios ontogênicos dos órgãos onde ocorrem. O desenvolvimento precoce e a localização em vários órgãos talvez reflitam o papel que os idioblastos taníferos desempenham na defesa das plantas.

A diferença no aspecto da secreção que ocupa todo o vacúolo de forma uniforme ou apresenta-se em forma de gotas aglomeradas na periferia do mesmo, pode ser um indício da presença de diferentes classes de taninos compondo a secreção, já que diferentes classes de taninos são capazes de se complexar com proteínas, polissacarídeos e outras macromoléculas (Burns, 1971; Evert, 2006). O fato da secreção dos idioblastos ter apresentado resultado positivo apenas para compostos fenólicos, comprova que o idioblasto não apresenta secreção mista, o que é bastante comum de ocorrer, como observado para *Spondias dulcis*, em que a secreção dos idioblastos é composta por tanino e ácidos graxos (Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006).

Taninos podem ter diversos efeitos sobre os sistemas biológicos por serem potenciais quelantes de íons metálicos, agentes precipitantes de proteína e antioxidantes. Por

apresentarem variadas funções biológicas, torna-se difícil estabelecer a exata função desempenhada pelos idioblastos taníferos. Aparentemente, a função principal de taninos é a proteção, a adstringência atua como um repelente para os herbívoros e um impedimento para a invasão de patógenos, imobilizando enzimas extracelulares (Von Teichman & Van Wyk, 1994; Evert, 2006). Os taninos são tóxicos para certos fungos (Rawlins, 1933) e vírus, em particular contra os vírus *Coxsackie B2* e *Herpes simplex* (Corthout *et al.*, 1991). Taninos isolados de *Magonia pubescens* (Sapindaceae) apresentam atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (Silva *et al.*, 2004). Em virtude da grande variedade de funções apresentadas pelos taninos, são necessários estudos ecológicos futuros para uma melhor interpretação do papel destas estruturas secretoras na espécie *P. rubiginosa*.

A ocorrência de laticíferos e sua classificação morfológica devem ser investigadas na família Sapindaceae, para se averiguar a importância deste caráter para as abordagens taxonômicas na família. A natureza complexa e quimicamente diversa da secreção dos laticíferos pode representar uma vantagem adaptativa à espécie por conter substâncias que apresentam atividade biológica como óleo essencial, alcalóides, esteróides, além dos taninos em idioblastos taníferos, que podem conferir proteção contra herbívoros e patógenos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo-Rodríguez P. 1993.** Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part I: a revision of *Serjania* sect. *Platyococcus*. *Memoires of The New York Botanical Garden* **67**: 1-93.
- Areia CA. 1971.** Alguns aspectos da parede celular em estrutura fina: *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Duke (Sapindaceae). *Rodriguésia* **26**: 103-112.
- Agarwal SK, Rastogi RP. 1974.** Triterpenoid saponins and their genins. *Phytochemistry* **13**: 2623-2645.
- Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. 2003.** Alterações morfológicas observadas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens*. *Entomologia y Vectores* **10**: 47-60.
- Bakker ME, Gerritsen AF, Van Der Schaaf PJ. 1991.** Development of oil and mucilage cells in *Cinnamomum burmanni*. An ultrastructural study. *Acta Botanica Neerlandica* **40**: 339-356.
- Bhavanani SM, Ballow CH. 1992.** New agents for Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 528-534.
- Burns TE. 1971.** Methods for estimation of tannin in grain sorghum. *Agronomy Journal* **63**: 511-512.

- Cain AJ. 1947.** The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **88**: 383-392.
- Charrière-ladreix Y. 1976.** Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* **129**: 167-174.
- Corthout J. 1991.** Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry* **30**: 1129-1130.
- Croat TB. 1976.** Flora of Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **63**: 419-540.
- David R, Carde, JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Série D* **258**: 1338-1340.
- Demarco D, Kinoshita LS, Castro MM. 2006.** Laticíferos articulados anastomosados - novos registros para Apocynaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 133-144.
- Dussourd DE. 1999.** Behavioral sabotage of plant defense: Do vein cuts and trenches reduce insect exposure to exudate? *Journal of Insect Behavior* **12**: 501–515.
- Evert RF. 2006.** *Esau's Plant Anatomy - Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc., London.
- Farrell BD, Dussourd, DE, Mitter C. 1991.** Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* **138**: 881-900.
- Fernandes FF, Leles RN, Silva IG, Freitas EPS. 2007.** Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) against *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **59**: 145-149.
- Fernandes FF, Walmirton BD, Freitas EPS. 2008.** Toxicity of extract of *Magonia pubescens* (Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae). *Neotropical Entomology* **37**: 205-208.
- Furr M, Mahlberg PG. 1981.** Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **44**: 153-159.
- Gabe M. 1968.** *Techniques histologiques*. Masson & Cie, Paris.
- Gabriel BL. 1982.** *Biological Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold Company Inc, England.
- Ganter P, Jollés G. 1969.** *Histochimie normale et pathologique*. Gauthier – Villars, Paris.
- Geissman TA, Griffin TS. 1971.** Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry* **10**: 2475-2485.
- Guimarães RN. 2006.** *Estudo químico e de atividade biológica de Paullinia elegans (Sapindaceae)*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

- Guimarães VP, Silva IG, Silva HHG, Rocha C. 2001.** Atividade larvicida do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St. Hil. sobre *Aedes albopictus* (Skuse,1894) (Diptera, Culicidae). *Revista de Patologia Tropical* **34**: 159-165.
- Hagerman AE, Bluter LG. 1989.** Choosing appropriate method for determining tannin in plant extracts. *Journal of Chemical Ecology* **15**: 1795- 1810.
- Harbone JB. 1989.** Recent advances in the chemical ecology. *Natural Product Reports* **7**: 85-107.
- Hardman R, Sofowora EA. 1972.** Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technology* **47**: 205-208.
- Hartish C, Kolodziej H. 1997.** Galloylhamamelosides and proanthocyanidins from *Hamamelis virginiana*. *Phytochemistry* **42**: 99-105.
- Hegnauer, R. 1963.** *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhauser, Switzerland.
- Jayabalan M, Shah JJ. 1986.** Histochemical techniques to localize rubber in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *Stain Technology* **61**: 303- 308.
- Jensen WAA. 1962.** *Botanical histochemistry, principles and practice*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Khan MA, Hungar IA. 1986.** Inhibition of germination in *Atriplex triangularis* seed by application of phenols and reversal of inhibition by growth regulators. *Botanical Gazette* **147**: 148-152.
- Kirk Jr PW. 1970.** Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**: 1-4.
- Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. 2004.** Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal* **37**: 370–378.
- Kutchan TM, Ayabe S, Coscia CJ. 1985.** Cyto differentiation and *Papaver* alkaloid accumulation. In: Phillipson JD, Roberts MF, Zenk MH, eds. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer, Berlin.
- Kush A. 1994.** Isoprenoid biosynthesis: the *Hevea* factory. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 761-767.
- Lopes KLB, Thadeo, M, Azevedo AA, Soares AA, Meira RMSA. 2009.** Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). *Botany* **87**: 202–209.
- Mace ME, Bell AA, Stipanovic RD. 1974.** Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* **64**: 1297-1302.
- Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* **64**: 1297-1302.
- Mahlberg PG. 1993.** Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* **59**:1-23.

- Mariani P, Cappelletti EM, Campoccia D, Baldan B. 1989.** Oil cell ultrastructure and development in *Liriodendron tulipifera* L. *Botanical Gazette* **150**: 391-396.
- Maron R, Fahn A. 1979.** Ultrastructure and development of oil cells in *Laurus nobilis* L. leaves. *Botanical Journal of the Linnean Society* **78**: 31-40.
- McManus JFA. 1948.** Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**: 99-108.
- Metcalf CR. 1967.** Distribution of latex in the plant Kingdom. *Economic Botanic* **21**:115-127.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf CR, Chalk L. 1983.** *Anatomy of the dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction*. Clarendon Press, Oxford.
- Milanez, FR. 1959.** Anatomia do fruto do Guaraná. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* **16**: 57-100.
- Murugan V, Inamdar JA. 1987.** Studies in the laticifers of *Vallaris solanaceae* (Roth) O. Ktze. *Phytomorphology* **87**:209-14.
- O'Brien TP, McCully ME. 1981.** *The Study of Plant Structure Principles and selected methods*. Termarcaphi Pty. Ltda., Melbourne.
- Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Platt-Aloia KA, Oross JW, Thomson WW. 1983.** Ultrastructural study of the development of oil cells in the mesocarp of avocado fruit. *Botanical Gazette* **144**: 49-55.
- Pickard WF. 2008.** Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. *New Phytologist* **177**: 877-888.
- Pizzolato TD. 1977.** Staining of Tilia mucilages with Mayer's tannic acid-ferric chloride. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **104**: 277-279.
- Postek MT, Tucker SC. 1983.** Ontogeny and ultrastructure of secretory oil cells in *Magnoli grandiflora* L. *Botanical Gazette* **144**: 501-512.
- Radlkofer, L. 1892-1900.** *Sapindaceae*. In: MARTIUS, V. (ed.). *Flora Brasiliensis*. Volumen XIII. Pars III.
- Rawlins TE. 1933.** *Phytopathological and botanical research methods*. John Wiley, New York.
- Salatino A, Kraus JE, Salatino MLF. 1993.** Contents of tannins and their histological localization in young and adults parts of *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). *Annals of Botany* **72**: 409-414.
- 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.

**Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Rodrigues Filho E, Elias CN. 2004.** Atividade larvívica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **37**: 396-399.

**Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E. 2003.** Efeito larvívica e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em criadouros artificiais. *Revista de Patologia Tropical* **32**: 73-86.

**Siqui AC, Sampaio ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos MFS 2000.** Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* **16**: 38-43.

**Smith MM, McCully. 1978.** A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. *Protoplasma* **95**: 229-259.

**Solereder H. 1908.** *Systematic anatomy of dicotyledons*. Vol. 1. Clarendon Press, Oxford.

**Somner, GV. 2001.** *Paullinia L. (Sapindaceae): Morfología, taxonomia e revisão de Paullinia sect. Phygoptilon*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

**Stone R. 1992.** A biopesticidal tree begins to blossom. *Science* **255**: 1070-1071.

**Swain T. 1979.** Tannins and lignins. In: Rosenthal GA, Janzen DH, eds. *Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, London.

**Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA. 1991.** *Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.

**Von Teichman I, Van Wyk AE. 1994.** The generic position of *Protorhus namaquensis* Sprague (Anacardiaceae): evidence from fruit structure. *Annals of Botany* **73**: 175-184.

## CAPÍTULO II

### Ontogênese e histoquímica dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)

#### RESUMO

A presença de tricomas secretores é relatada na literatura para espécies de Sapindaceae. Na descrição taxonômica de *Paullinia rubiginosa* (Sapindaceae) foi citada a presença de tricomas secretores com base em observações de morfologia externa, não foram encontrados trabalhos anatômicos que descrevessem os tricomas. O presente trabalho tem por objetivos a caracterização anatômica e histoquímica dos tricomas dos folíolos de *P. rubiginosa*. Os tricomas secretores de *P. rubiginosa* se desenvolvem cedo, em folíolos jovens e nos primórdios foliolares, os tricomas já se encontram totalmente diferenciados e em fase secretora. As principais etapas do desenvolvimento do tricoma secretor são: aumento de volume da célula protodérmica, e posterior divisão periclinal; formação de uma fileira unisseriada de seis células, provenientes exclusivamente de divisões periclinais da célula apical; formação da cabeça secretora bisseriada, por divisões anticlinais e/ou oblíquas. O tricoma apresentou resultado positivo para polissacarídeos no teste do PAS e pectinas no teste com Vermelho de Rutênio, e negativo para todas as outras classes de compostos testados. Levando-se em consideração a localização e a secreção exclusivamente mucilagínosa, o tricoma pode exercer função semelhante à de coléteres, representando uma importante estratégia adaptativa, que garante proteção e lubrificação aos primórdios foliolares em desenvolvimento.

## INTRODUÇÃO

A família Sapindaceae está incluída na ordem Sapindales (Cronquist, 1988; Judd *et al.*, 2008), juntamente com as famílias: Anacardiaceae, Burseraceae, Meliaceae, Rutaceae e Simaroubaceae (Judd *et al.*, 2008). *Paullinia*, com cerca de 200 espécies, e *Serjania*, são os gêneros mais representativos de Sapindaceae (Souza & Lorenzi, 2008).

As estruturas secretoras variam quanto a sua morfologia, posição, tipo de substâncias secretadas e função (Fahn 1979). Dependendo do tipo de substância secretada, as estruturas secretoras podem apresentar diversas funções, como defesa contra a herbivoria, atração de polinizadores e participação, em alguns casos, na interação das plantas com outras plantas e das plantas com o ambiente (Fahn 1979). Estruturas secretoras diversas foram relatadas para família Sapindaceae: idioblastos mucilaginosos, canais secretores (Solereeder 1908; Metcalfe e Chalk 1950), tricomas secretores (Solereeder 1908; Metcalfe e Chalk 1950; Acevedo-Rodríguez 1993; Albiero *et al.* 2001) e coléteres (Solereeder 1908). Para o gênero *Paullinia*, foi citada a presença de tricomas secretores em várias espécies (Areia 1966; Areia *et al.* 1973; Ferraz *et al.* 1985; Somner 2001), inclusive *Paullinia rubiginosa* (Radlkofer, 1892–1900). Em nenhum destes estudos foi realizada a ontogenia e histoquímica dos tricomas.

Tricomas secretores ou glandulares são apêndices epidérmicos e se destacam pela ampla diversidade de tipos quanto ao tamanho, à forma, ao número de células, à localização. A natureza química do exsudado produzido também é variável, desde mucilagem, enzimas digestivas em plantas carnívoras, compostos lipofílicos diversos ou ainda soluções salinas em espécies halófitas, sendo este aspecto diretamente relacionado com a provável função desempenhada pela estrutura (Fahn 1979).

Os tricomas podem secretar compostos de importância econômica como os óleos essenciais característicos da família Lamiaceae, que são utilizados na indústria farmacêutica, perfumaria e cosméticos (Ascensão *et al.* 1999). Podem, ainda, ter relevante valor para a taxonomia e, dependendo do grupo taxonômico, podem exibir valor diagnóstico ou unificador, por serem distintivos ou conservativos, respectivamente (Solereeder 1908; Metcalfe e Chalk 1950; Fahn 1979).

Apesar de muitos trabalhos indicarem a presença de tricomas secretores, poucos fazem referência à composição da secreção (Metcalfe e Chalk 1950). Isso demonstra a necessidade da realização de estudos histoquímicos para analisar as principais classes químicas dos metabólitos que compõem o exsudado, uma vez que a identificação das estruturas secretoras está baseada também no tipo de substância predominante no secretado (Fahn 1979). Além disso, a análise ontogenética pode fornecer dados para esclarecer as etapas envolvidas na biologia da secreção (Silva e Machado 1999, Monteiro *et al.* 2001; Ciccarelli *et al.* 2001; Moura *et al.* 2005), de

modo a auxiliar na identificação da função desempenhada pelos tricomas nas espécies estudadas.

O presente trabalho tem por objetivos descrever as etapas do desenvolvimento dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa*, além de elucidar a natureza química da secreção produzida e inferir sua provável função.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do material vegetal

Ápice caulinar, folhas jovens do primeiro nó, contados a partir do ápice, folhas jovens nos segundo e terceiro nós, folhas adultas nos quarto e quinto nós, de treze indivíduos adultos e de três indivíduos jovens de *Paullinia rubiginosa* foram coletados em populações naturais da Mata da Biologia, localizada no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Ramos férteis foram coletados para a produção de exsiccatas que foram depositadas no Herbário VIC, do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa sob os números 32.629 e 32.630.

### Ontogênese e histoquímica

Folíolos jovens do primeiro nó de *Paullinia rubiginosa* foram analisados sob estereomicroscópio (modelo ZZX7 acoplado com câmera E330, Olympus Optical, Tóquio, Japão) e foram obtidas imagens digitais dos tricomas secretores.

Para a análise ontogenética fragmentos de primórdios foliolares, folíolos do primeiro nó, folíolos terceiro nó e folíolos adultos do quarto nó foram fixados em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio de Sorenson 0,1 M pH 7,2 (Gabriel 1982), desidratados em série etílica e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Instruments). Cortes transversais e longitudinais seriados, de 4 e 5  $\mu\text{m}$  de espessura, foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo com avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Estados Unidos). Os cortes foram corados com azul de toluidina em pH 4,4 (O'Brien e McCully, 1981) ou azul de toluidina e lugol (Feder e O'Brien, 1968) e as lâminas montadas com resina sintética (Permount-Fisher).

Amostras de folíolos adultos foram diafanizadas para a visualização dos tricomas secretores. Fragmentos do folíolo foram lavados com água destilada e colocados em hidróxido de sódio 10% por duas horas, lavados novamente em água destilada, permanecendo em hipoclorito de sódio comercial a 20%, por 72 horas. Após a clarificação, os fragmentos foram lavados em água destilada, desidratados em série etílica até etanol 100%, e corados com

safranina xilólica, por aproximadamente 24 horas (Handro 1964). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permount- Fisher).

Fragmentos de folíolos jovens do segundo nó foram fixados em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%; 5:5:90; v/v), por 48 horas (Johansen 1940) para a realização dos testes PAS (McManus 1948) e vermelho de rutênio (Johansen 1940) visando a detecção de polissacarídeos, e em FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Clark 1973) para o teste com Negro de Sudão B para detecção de lipídios totais. Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois desidratado em série etílica e armazenado em etanol 70%. As amostras foram incluídas em parafina histológica (Histosec/Merck) utilizando-se série butílica para a desidratação (Johansen 1940) e cortadas longitudinalmente (com 7 e 10  $\mu\text{m}$  de espessura), pois em análise prévia verificou-se ser este o plano que possibilita melhor observação dos tricomas, utilizando micrótomo rotativo (820 Spencer, American Optical Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com gelatina glicerinada.

Testes histoquímicos também foram realizados com amostras frescas de folíolos jovens do segundo nó e folíolos adultos. Destes folíolos foram obtidas secções longitudinais em micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg e bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil) ou a mão livre e as lâminas foram montadas com gelatina glicerinada. Os testes histoquímicos e as principais classes de metabólitos investigados estão descritos na tabela 1. Secções controle serão realizadas simultaneamente, de acordo com as recomendações dos respectivos autores.

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo.

Tabela 1- Relação dos testes histoquímicos realizados para a identificação do material secretado pelos tricomas de *Paullinia rubiginosa*

Grupos de Metabólitos		Reagente
Lipídios	Lipídios totais	Negro de Sudão B (Pearse 1980) Vermelho Neutro* (Kirk 1970)
	Lipídios ácidos e neutros	Sulfato Azul do Nilo (Cain 1947)
Terpenóides	Óleos essenciais e oleoresinas	Reagente de Nadi (David e Carde 1964)
	Esteróides	Tricloreto de Antimônio (Hardman e Sofowora 1972; Mace et al. 1974)
	Lactonas sesquiterpênicas	Ácido Sulfúrico (Geissman e Griffin 1971)
	Terpenóides com grupo carbonila	2,4-Dinitrofenilhidrazina (Ganter e Jollés 1969)
Compostos fenólicos	Compostos fenólicos totais	Dicromato de Potássio (Gabe 1968) Cloreto de ferro III (Johansen 1940)
	Taninos	Vanilina Clorídrica (Mace e Howell 1974)
	Ligninas	Floroglucinol (Johansen 1940)
	Flavonóides	Cloreto de Alumínio* (Charrière-Ladreix 1976)
	Agliconas flavonólicas	Reagente de Wilson* (Charrière-Ladreix 1976)
Alcalóides		Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg 1981) Reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg 1981)
	Polissacarídeos	Polissacarídeos neutros
Amido		Lugol (Jensen 1962)
Pectinas		Vermelho de Rutênio (Johansen 1940)
Mucopolissacarídeos ácidos		Azul de Alcião (Pearse 1980)
Mucilagens		Ácido Tânico/Cloreto de Ferro III (Pizzolato 1977)
Proteínas	Proteínas totais	Pounceau de Xilidina (XP) (O'Brien e McCully 1981)

\* Indução de Fluorescência

## RESULTADOS

Os tricomas secretores ocorrem no primórdio foliolar e na epiderme das duas faces dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* (fig.1), a secreção tem aspecto viscoso e é incolor. Distribuem-se de maneira mais ou menos uniforme por todo o limbo do folíolo, havendo uma ligeira concentração na região das nervuras laterais (figs. 2C). Apresentam uma célula basal, uma ou duas células no pescoço, de aspecto hialino, e uma cabeça secretora multicelular (figs. 2A e 2B).

Os tricomas são encontrados diferenciados no primórdio foliolar, onde os tecidos não estão diferenciados. Seu desenvolvimento se dá com um aumento no volume e projeção da célula protodérmica (fig. 3A). Após este aumento de volume a célula protodérmica inicial se divide periclinalmente (fig. 3B), originando a célula basal e uma distal (fig. 3C). A célula distal divide formando uma série de três células (figs. 3D e 3E): a célula basal, a do pescoço, e a apical (fig. 3F). A célula apical continua se dividindo periclinalmente, formando uma série

de quatro, cinco (figs. 3G e 3H) e finalmente seis células (fig. 3I). A quarta célula, contada da base para o ápice, divide-se (fig. 3J), no plano anticlinal, ou oblíquo; com esta divisão, o tricoma se curva (fig. 3K) e começa a distinção da cabeça secretora. A quinta célula também se divide (figs. 3L, 3M, 3N), e posteriormente a terceira. Nem sempre a terceira célula se divide, em alguns tricomas foi visualizada esta célula fazendo parte do pescoço juntamente com a célula dois. A última célula a se dividir assimetricamente é a seis. Muitos tricomas iniciam a fase secretora antes da divisão da célula seis. As células basal e do pescoço tornam-se muito vacuolizadas (figs. 3I, 3J, 3K), e nas células da cabeça secretora pequenos vacúolos vão se fundindo. Por divisões anticlinais ou assimétricas, a cabeça do tricoma torna-se bisseriada (figs. 2B, 3P e 3Q). Nas folhas jovens, os tricomas apresentam desenvolvimento assincrônico, enquanto alguns estão no estágio inicial do desenvolvimento, outros estão completamente desenvolvidos e secretando.

A secreção se acumula no espaço subcuticular, havendo distensão da cutícula principalmente na parte inferior da cabeça secretora, e após a eliminação se acumula no espaço que se forma pela curvatura da cabeça do tricoma (fig.4B). Não foi observado rompimento da cutícula.

Na caracterização histoquímica dos tricomas (tabela 2), verificou-se reação negativa para compostos lipofílicos, fenólicos e alcalóides, e positiva apenas para os compostos de natureza polissacarídica. Através do teste PAS observou-se o resultado positivo para polissacarídeos neutros (fig. 4B) com Vermelho de Rutênio para pectinas (Fig. 4C). A reação positiva ao PAS foi observada tanto na secreção contida nas células secretoras do tricoma quanto naquela acumulada no exterior (fig. 4B). Apesar da natureza polissacarídica e da consistência viscosa da secreção, o teste aplicado para detecção de mucilagem demonstrou resultado negativo. O teste com Negro de Sudão B apresentou resultado positivo apenas para a parede dos tricomas (não documentado), identificando a cutícula delgada. A parede do tricoma não apresenta deposição de lignina, conforme resultado negativo ao teste com floroglucinol.

Os tricomas são ativos em folhas jovens e embora não sejam caducos nas folhas maduras, as células da cabeça secretora são mais vacuolizadas, e não foi observada secreção. Todos os testes histoquímicos realizados com folhas adultas apresentaram resultados negativos, exceto o teste com Negro de Sudão B apresentou resultado positivo apenas para a parede dos tricomas, assim como nos tricomas nos folíolos jovens.

Tabela 2- Caracterização histoquímica dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa*

<b>Grupo de compostos</b>	<b>Teste</b>	<b>Tricoma secretor</b>	
Lípidios	Negro de Sudão B	+ (parede)	
	Vermelho Neutro	-	
	Sulfato Azul do Nilo	-	
Terpenóides	Reagente de Nadi	-	
	Tricloreto de Antimônio	-	
	Ácido Sufúrico	-	
	2,4-Dinitrofenilhidrazina	-	
Compostos Fenólicos	Dicromato de potássio	-	
	Cloreto de Ferro III	-	
	Vanilina clorídrica	-	
	Floroglucinol	-	
	Cloreto de Alumínio	-	
	Reagente de Wilson	-	
Alcalóides	Reagente de Wagner	-	
	Reagente de Dittmar	-	
Polissacarídios	PAS	+	Fig. 4B
	Lugol	-	
	Vermelho de Rutênio	+	Fig. 4C
	Azul de Alcião	-	
	Ácido Tânico/Cloreto de Ferro III	-	
Proteínas Totais	Ponceau de Xilidina	-	

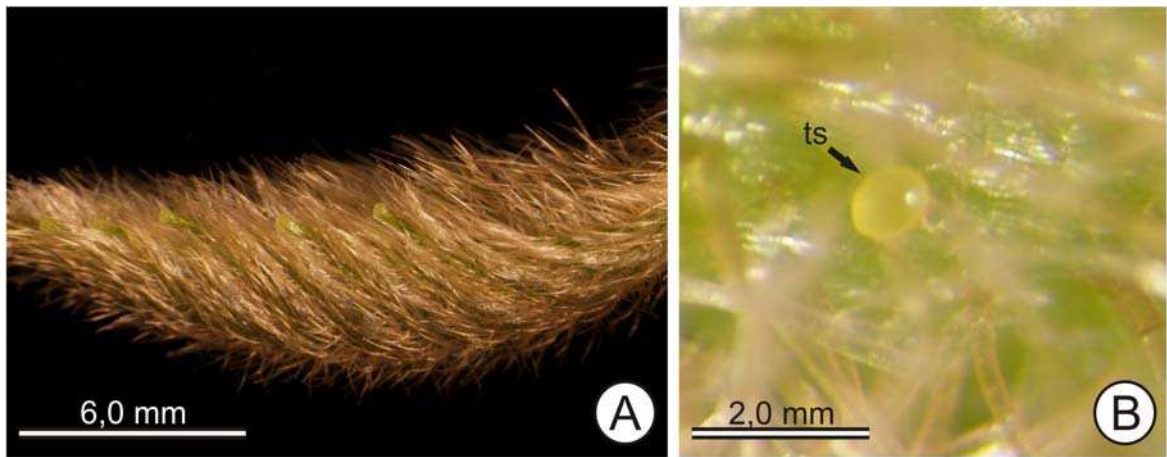


Fig.1. Foliolo jovem de *Paullinia rubiginosa* (estereomicroscópio). (A) Vista geral do folíolo. (B) Detalhe do tricoma secretor. Abreviatura: ts- tricoma secretor.

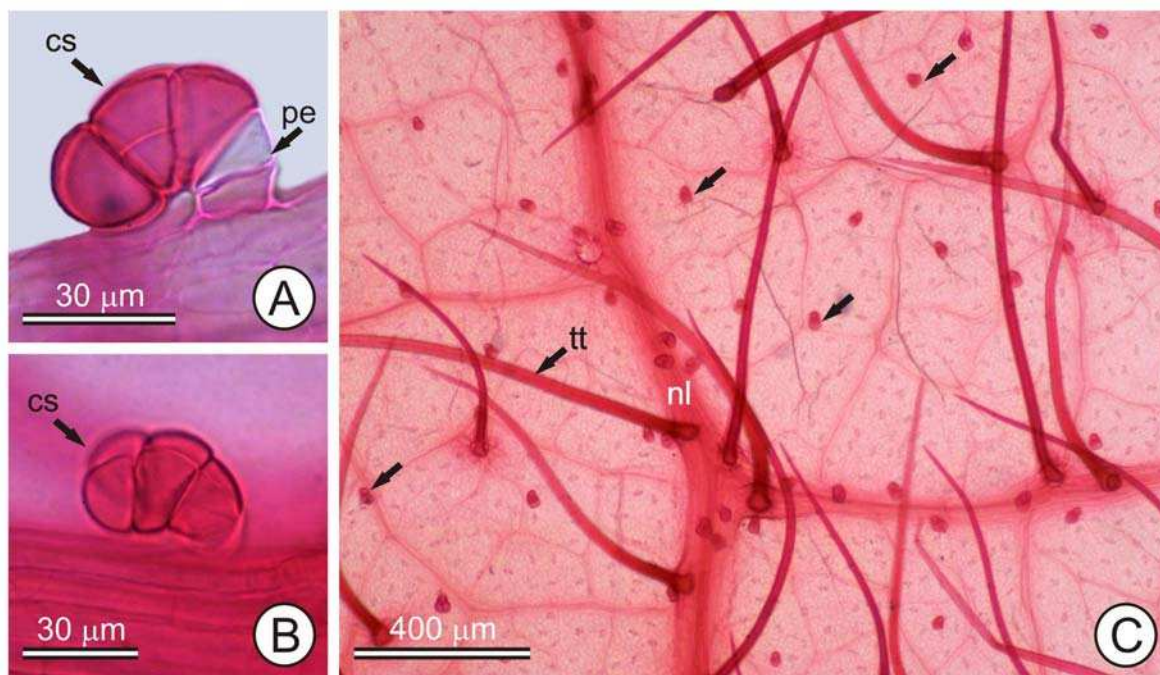
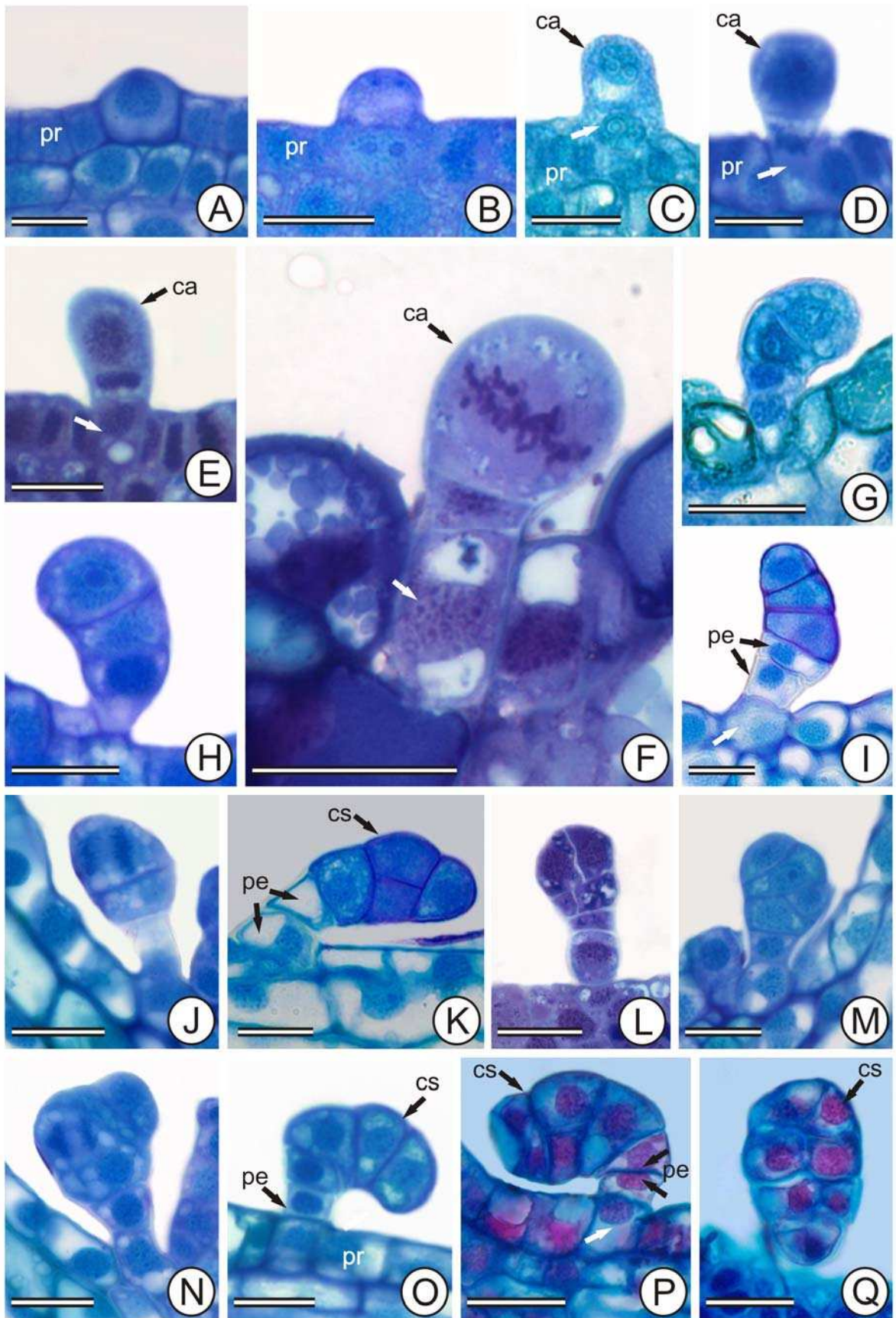


Fig. 2. Tricomas secretores de folíolos adultos de *Paullinia rubiginosa* (diafanização). (A) Cabeça secretora e pescoço. (B) Cabeça multicelular biseriada. (C) Distribuição na lâmina do folíolo (seta). Abreviaturas: cs- cabeça secretora, nl- nervura lateral, pe- pescoço, tt- tricoma tector.

Fig. 3. Ontogenia dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* (corte longitudinal). (A) Projeção da célula protodérmica. (B e C) Tricoma com duas células. (D e E) Tricoma com três células. (F) Célula apical em metáfase no tricoma com três células. (G) Tricoma formado por uma série de quatro células. (H) Tricoma com cinco células. (I) Tricoma com seis células. (J - N) Divisões celulares anticlinais ou assimétricas que promovem a curvatura do tricoma e delimitação da cabeça secretora. (O) Tricoma com a delimitação da cabeça secretora. (P e Q) Tricoma maduro com a cabeça secretora bisseriada. Abreviaturas: ca- célula apical, cs- cabeça secretora, pe- pescoço, pr- protoderme, seta branca- célula basal. Barras 30  $\mu\text{m}$ .



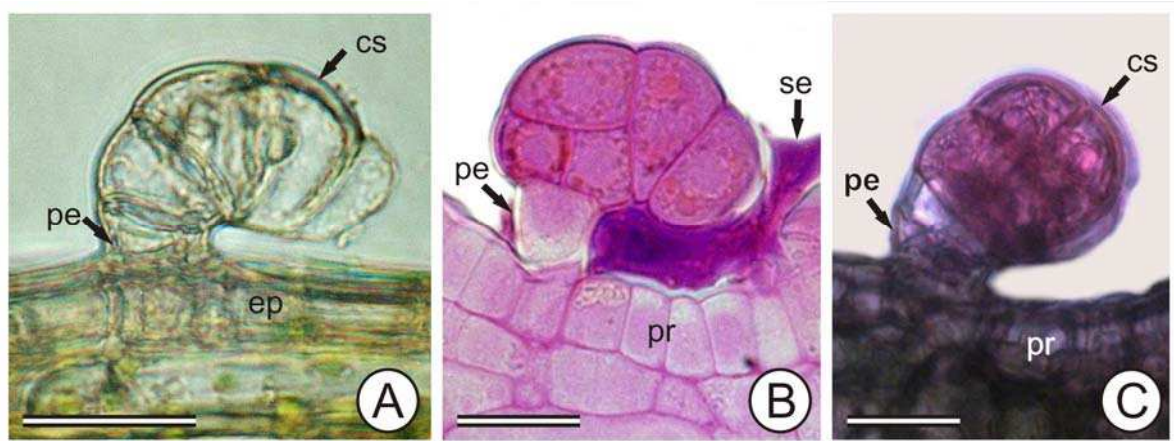


Fig. 4. Testes histoquímicos dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* em folíolos jovens. (A) Branco. (B) Teste para polissacarídeos (PAS) mostrando a reação positiva na cabeça do tricoma e secreção exsudada. (C) Reação positiva ao Vermelho de rutênio evidenciando a presença de pectina na cabeça secretora. Abreviaturas: cs- cabeça secretora, ep- epiderme, pe- pescoço, pr- protoderme, se- secreção. Barras A- 30  $\mu\text{m}$ , B e C- 15  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

Os tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* são semelhantes aos descritos para outras espécies de *Paullinia* (Areia 1966; Areia et al. 1973; Ferraz et al. 1985).

O desenvolvimento precoce dos tricomas secretores de *Paullinia rubiginosa* é um processo comum dentre as estruturas secretoras (Fahn, 1979). Em diversas espécies a precocidade no desenvolvimento de tricomas é enfatizada, como em *Piper regnellii* (Silva e Machado 1999), *Stevia rebaudiana* (Monteiro et al. 2001), *Humulus lupulus* (Sugiyama et al. 2006).

Na ontogenia dos tricomas de *Paullinia rubiginosa*, a célula protodérmica inicial torna-se conspícua, devido à maior densidade do citoplasma e o volume relativamente grande do núcleo, como registrado para a grande maioria dos tricomas secretores (Bosabalidis e Tsekos 1984; Karousou et al. 1992; Silva e Machado 1999; Sugiyama et al. 2006). O desenvolvimento dos tricomas de *P. rubiginosa* é acrópeto, conforme proposto por Uphof (1962), pois é sempre a célula apical que se divide para dar origem às outras células do tricoma. O mesmo tipo de desenvolvimento foi relatado para o tricoma secretor de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) (Monteiro et al. 2001), família não relacionada a Sapindaceae.

Segundo Uphof (1962), o desenvolvimento de tricomas multicelulares unisseriados inicia-se sempre com divisão periclinal da célula protodérmica, e tricomas bi ou multisseriados com divisão anticlinal ou oblíqua. Muitos dos tricomas secretores relatados na literatura, por serem multisseriados, iniciam seu desenvolvimento com divisão anticlinal da célula protodérmica inicial (Ascensão e Pais 1987; Fahn e Shimony 1996; Favi et al. 2008). No caso de *Paullinia rubiginosa*, apesar do tricoma ser bisseriado, no início do desenvolvimento este é caracteristicamente unisseriado, uma vez que as células da protoderme sofrem divisão exclusivamente no plano periclinal até a etapa de seis células, quando divisões anticlinais marcam o início da diferenciação da cabeça secretora. Desenvolvimento semelhante foi relatado em *Calceolaria adscendens* onde a primeira divisão é periclinal, seguida de divisões anticlinais que culminam na formação da cabeça secretora com duas células (Sacchetti et al. 1999).

Apesar de *Paullinia rubiginosa* possuir uma grande quantidade de tricomas tectores, as células-mãe de tricomas tectores são facilmente distinguidas das dos secretores, pois a primeira apresenta um vacúolo no ápice da célula (não documentado), que se torna muito grande.

A secreção do tricoma de *Paullinia rubiginosa* tem consistência viscosa e natureza polissacarídica e péctica/mucilaginosa, atestada pelos resultados positivos ao PAS e ao vermelho de rutênio. Entretanto, o teste recomendado para evidenciar mucilagens (ácido

tânico/cloreto de ferro III) foi negativo, o que pode ser interpretado como uma limitação do teste, que tem pouca especificidade para as mucilagens vegetais, as quais são pobres em proteínas (Pizzolato e Lillie 1973).

Em folíolos jovens de *Paullinia rubiginosa*, a secreção mucilagínosa secretada pelos tricomas recobre a superfície das folhas em desenvolvimento. De acordo com Fahn (1979), é comum a ocorrência de tricomas secretores de mucilagem em folhas e estípulas em desenvolvimento.

As mucilagens podem atuar na proteção contra a dessecação de estruturas foliares em desenvolvimento e na lubrificação entre superfícies de contato das folhas jovens enroladas (Meyberg 1988). Estas funções podem ser atribuídas à secreção presente na superfície das folhas jovens de *P. rubiginosa*, sendo assim, pode-se inferir que os tricomas apresentam função de coléter, uma vez que esta secreção só está presente no ápice caulinar e em folíolos muito jovens, no folíolo maduro não foi identificada secreção.

O uso do termo coléter tem variado de acordo com o critério utilizado para definir estas estruturas secretoras, como localização, morfologia e natureza química da secreção. O nome coléter vem sendo atribuído às estruturas secretoras formadas por emergências, constituídas por células epidérmicas, parenquimáticas, e vascularizadas, em Apocynaceae (Thomas et al. 1989), Rhizophoraceae (Lersten e Curtis 1974), Rubiaceae (Klein et al. 2004). No entanto, a denominação coléter também foi utilizada para tricomas secretores ocorrentes em brácteas, bractéolas e sépalas de *Cryosplenium alternifolium* (Saxifragaceae) por Decraene et al. 1998. O termo coléter foi criado por Hanstein (1868), que definiu o funcionalmente, uma vez que morfológicamente os coléteres podem corresponder a várias estruturas, como tricomas ou emergências, encontradas na superfície adaxial de folhas jovens, brácteas, sépalas, em diversas famílias de dicotiledôneas, que secretam mucilagens (Uphof 1962; Fahn 1979; Wilkinson 1979).

Solereder (1908) cita a presença de coléteres em alguns gêneros de Sapindaceae como *Sapindus*, *Hornea*, *Deinbollia*, *Lepisanthus* e *Otophora*, ocorrentes nas folhas, mas não faz menção sobre a sua morfologia ou distribuição. Na ordem Sapindales a presença de coléteres também foi apontada para Simaroubaceae (Solereder 1908). Em espécies de Anacardiaceae, família incluída na ordem Sapindales, os tricomas com secreção mucilagínosa, semelhante aos observados em *Paullinia rubiginosa*, foram denominados coléteres (Lacchia 2009). Desta forma, é interessante ampliar o conhecimento sobre a presença de coléteres em outros representantes da família Sapindaceae para se esclarecer se esta característica é comum na na ordem Sapindales.

Tricomas secretores de mucilagem têm sido denominados coléteres em *Cryosplenium alternifolium* (Saxifragaceae) (Decraene et al. 1998), *Gentiana* (Gentianaceae) (Renobales et al. 2001), *Hibiscus tiliaceus* e *Hibiscus pernambucensis* (Malvaceae) (Rocha et al. 2002), *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae) (Leitão e Cortelazzo 2008), *Anacardium humile*, *Spondia dulcis*, *Tapirira guianensis* e *Lithraea molleoides* (Anacardiaceae) (Lacchia 2009).

A ocorrência de tricomas com secreção mucilagínosa em *Paullinia rubiginosa* pode ser considerada uma estratégia adaptativa de importância pela proteção às folhas jovens que a secreção confere. A presença deste tipo de tricomas secretores pode constituir um caráter de valor taxonômico, no entanto são necessários mais estudos no gênero para que este caráter possa ser considerado uma ferramenta para auxiliar na filogenia do gênero.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo–Rodríguez P. 1993. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part I: a revision of *Serjania* sect. *Platycoccus*. Memoires of The New York Botanical Garden **67**: 1-93.
- Albiero, A.L.M., Bacchi E.M. e Mourão, K.S.M. 2001. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). Acta Scientiarum **23**: 549-560.
- Areia, C.A. 1966 Anatomia da folha do guaraná: *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae). Rodriguésia **25**: 297-312.
- Areia, C.A., Marquete, O., Guimarães, D.J. e Magalhães, H.G. 1973. Anatomia da folha jovem do guaraná *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro **19**: 154-170.
- Ascensão, L., Mota, L. e Castro, M.M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. Annals of Botany **84**: 437-447.
- Ascensão, L. e Pais, M.S.S. 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. Botanical Gazette **148**: 221-227.
- Bosabalidis, A.M. e Tsekos, I. 1984. Glandular hair formation in *Origanum species*. Annals of Botany **53**: 559-563.
- Cain, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. Quarterly Journal of Microscopical Science **88**: 383-392.
- Charrière-Ladreix, Y. 1976. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. Planta **129**: 167-174.
- Cicarelli, D., Andreucci, A.C. e Pagni, A.M. 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.
- Clark, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, New York.
- David, R. e Carde, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. Comptes Rendus de L' Academie des Sciences Série D **258**: 1338-1340.
- Decraene, L.P.R., Roels, P., Smets, E.F. e Backlund, A. 1998. The floral development and floral anatomy of *Chrysosplenium alternifolium*, an unusual member of the Saxifragaceae. Journal of Plant Research **111**: 573-580.
- Fahn, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.
- Fahn, A. e Shimony, C. 1996. Glandular Trichomes of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) Species: structure, development and decreted materials. Annals of Botany **77**: 25-34.
- Favi, F., Cantrell, C.L., Mebrahtu, T. e Kraemer, M.E. 2008. Leaf peltate glandular trichomes of *Vernonia galamensis* ssp. *galamensis* var. *ethiopica* gilbert: development, ultrastructure, and chemical composition. International Journal of Plant Sciences **169**: 605-614.
- Feder N. e O'Brien T.P. 1968. Plant microthecnique: some principles and new methods. American Journal of Botany **55**: 123-142.
- Ferraz, C.L.A. e Costa, C.G. 1985. *Paullinia carpopodea* Camb. (Sapindaceae): anatomia foliar. Rodriguésia **37**: 79-90.
- Furr, M. e Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products **44**: 153-159.
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie, Paris.
- Gabriel, B.L. 1982. Biological Electron Microscopy. Van Nostrand Reinhold Company Inc, England.
- Ganter, P. e Jollés, G. 1969. Histochimie normale et pathologique. Gauthier – Villars, Paris.
- Geissman, T.A. e Griffin, T.S. 1971. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. Phytochemistry **10**: 2475-2485.
- Hanstein, J. 1868. Ueber die Organe der Harz und Schleimbsonderung in den Laubknospen. Botanische Zeitung **43**: 697-713.
- Handro, W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciências **36**: 479-499.
- Hardman, R. e Sofowora, E.A. 1972. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. Stain Technology **47**: 205-208.
- Jensen, W.A.A. 1962. Botanical histochemistry, principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco.
- Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. e Donoghue, M.J. 2008. Plant systematics, a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland.

- Karousou, R., Bosabadilis, A.M. e Kokkini, S. 1992. *Sideritis syriaca* spp. *syriaca*: glandular trichome structure and development in relation to systematics. *Nordic Journal of Botany* **12**: 31-37.
- Klein D.E, Gomes V.M, Silva-Neto S.J, Cunha M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* **94**:733–740.
- Kirk Jr, P.W. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**: 1-4.
- Lacchia, A.P.S., Carmello Guerreiro, S.M., Castro, M.M. e Ascensão, L. 2009. Estruturas Secretoras em Anacardiaceae. 60º Congresso Nacional de Botânica, 32ª Reunião Nordestina, 29ª ERBOT- Encontro regional de Botânicos- MG, BA, ES. Feira de Santana, Bahia.
- Leitão, C.A.E e Cortelazzo, A.L. 2008. Structural and histochemical characteridation of the colleters of *Rodriguezia venust* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany* **56**: 161-165.
- Lersten, N.R. e Curtis, J.D. 1974. Colleter anatomy in red mangrove, *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae). *Canadian Journal of Botany* **52**: 2277-2278.
- Mace, M.E., Bell, A.A. e Stipanovic, R. D. 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* **64**: 1297-1302.
- Mace, M. E. e Howell, C. R. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* **64**: 1297-1302.
- McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**: 99-108.
- Metcalf, C.R. e Chalk, L. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- Meyberg, M. 1988. Cytochemistry and ultrastructure of the mucilage secreting trichomes of *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae). *Annals of Botany* **62**: 537-548.
- Monteiro, W.R., Castro, M.M., Mazzoni-Viveiros, S.C. e Mahlberg, P.G. 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.)Bert. – Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica* **24**: 349-357.
- Moura, M.Z.D., Isaias, R.M.S. e Soares, G.L.G. 2005. Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **148**: 427-431.
- O'Brien, T.P. e McCully, M.E. 1981. *The Study of Plant Structure Principles and selected methods*. Termarcarphi Pty. Ltda., Melbourne.
- Pearse, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology*. Churchill Livingston, Edinburgh.
- Pizzolato, T.D. 1977. Staining of Tilia mucilages with Mayer's tannic acid-ferric chloride. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **104**: 277-279.
- Pizzolato, T.D. e Lillie, R.D. 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **21**: 56-64.

- Radlkofer, L. 1892-1900. Sapindaceae. *In*: Martius, V. (ed.), Flora Brasiliensis. Volumen XIII. Pars III.
- Renobales, G., Diego, E., Urcelay, B. e López-Quintana, A. 2001. Secretary hairs in *Gentiana* and allied genera (Gentianaceae, subtribe Gentianinae) from the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* **136**: 119-129.
- Rocha, J.F., Neves, L.J. e Pace, L.B. 2002. Estruturas secretoras em folhas de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda. *Revista da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* **22**: 43-55.
- Sacchetti, C.R., Nicoletti, M., Di Fabio, A., Bruni, A. e Poli, F. 1999. Glandular Trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure. *Annals of Botany* **83**: 87-92.
- Silva, E.M.J. e Machado, S.R. 1999. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **22**: 117-124.
- Solereder, H. 1908. Systematic anatomy of dicotyledons. Vol. 1. Clarendon Press, Oxford.
- Somner, G.V. 2001. *Paullinia* L. (Sapindaceae): Morfologia, taxonomia e revisão de *Paullinia* sect. *Phygoptilon*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Souza, V.C. e Lorenzi, H. 2008. Botânica Sistemática. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Sugiyama, R., Oda, H. e Kurosaki, F. 2006. Two distinct phases of glandular trichome development in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Biotechnology* **23**: 493-496.
- Thomas, V., Dave, Y. e Menon, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* **8**: 493-496.
- Ufhof, J.C.T. 1962. Plant hairs. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). *In*: Metcalfe, C.R. e Chalk, L. (eds.), *Anatomy of the dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.

## CAPÍTULO III

### Anatomia das glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* Cambess. (Sapindaceae)

#### RESUMO

*Paullinia rubiginosa* (Sapindaceae) ocorre em vários países da América do Sul, apresenta folhas compostas, com cinco folíolos oblongos de ápice acuminado e margem denteada. Em observações realizadas em campo, foi visualizada uma pequena quantidade de secreção exsudando nos dentes da margem dos folíolos jovens de *P. rubiginosa*, o que sugere uma natureza secretora para tais estruturas. Nas descrições taxonômicas baseadas em morfologia externa foi mencionada a presença de nectários extraflorais nas margens das folhas denteadas de algumas espécies dos gêneros *Paullinia* e *Serjania*, entretanto sem confirmação estrutural. Como existem relatos de estruturas que já foram confundidas com nectários extraflorais por apresentarem posição e morfologia semelhantes, este trabalho teve por objetivos a caracterização anatômica e histoquímica das glândulas presentes nas margens dos folíolos de *P. rubiginosa*. Amostras de folíolos jovens foram coletadas e fixadas segundo metodologia usual, para a confecção de lâminas histológicas e para observação ao microscópio eletrônico de varredura. Foram realizados testes histoquímicos em amostras frescas e fixadas, além de verificação de presença de glicose na secreção produzida pelos dentes dos folíolos. As glândulas apresentam desenvolvimento precoce; em folíolos jovens a estrutura está totalmente formada e secretando. São estruturas vascularizadas por xilema e floema, que são envolvidos por uma bainha de células com compostos fenólicos e laticíferos. A glândula apresentou resultado positivo para polissacarídeos no teste PAS, e a secreção para glicose, mantendo a aparência secretora mesmo em folíolos maduros. Desta forma, tais estruturas correspondem à nectários extraflorais. Trata-se da primeira caracterização anatômica de nectário extrafloral na família Sapindaceae. Como os nectários extraflorais podem representar marcadores morfológicos importantes em análises filogenéticas, é de suma importância a verificação da presença de nectários extraflorais em outras espécies de Sapindaceae, em especial na tribo Paullinieae, onde estão incluídos os dois maiores gêneros da família (*Paullinia* e *Serjania*).

## INTRODUÇÃO

Sapindaceae é uma família de distribuição cosmopolita, integrante da ordem Sapindales (Cronquist, 1988; Judd *et al.*, 2008), que inclui Anacardiaceae, Burseraceae, Meliaceae, Rutaceae e Simaroubaceae (Judd *et al.*, 2008). *Paullinia* pertence à tribo Paullinieae, constituída pelos gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Lophostigma*, *Serjania* e *Urvillea* (Acevedo–Rodríguez, 1993), é juntamente com *Serjania*, um dos maiores gêneros de Sapindaceae, com aproximadamente 200 espécies (Somner, 2001). Segundo a análise filogenética molecular realizada com a família Sapindaceae, a tribo Paullinieae é monofilética, *Paullinia* sendo considerado grupo irmão de *Serjania*. Estes dois gêneros são muito semelhantes morfológicamente e distinguidos pelo tipo de fruto (Acevedo–Rodríguez, 1993).

*Paullinia rubiginosa* tem ocorrência registrada em vários países da América do Sul, incluindo o Brasil. Morfológicamente se caracteriza por apresentar folhas compostas, com cinco folíolos oblongos de ápice acuminado e margem denteada (Radlkofer, 1892–1900). Em observações realizadas em campo, foi visualizada uma pequena quantidade de secreção incolor exsudando dos dentes da margem dos folíolos jovens, sugerindo uma natureza secretora para estas estruturas. Radlkofer (1892–1900), na descrição taxonômica da espécie na *Flora Brasiliensis*, mencionou que estas estruturas marginais dos folíolos de *P. rubiginosa* são prolongamentos das nervuras laterais que ultrapassam a margem dos folíolos. Estas descrições foram baseadas na análise da morfologia externa de exsicatas, depois de prensados e secos, os dentes não mantêm a aparência de estrutura secretora.

A presença de secreção incolor exsudando dos dentes dos folíolos de *Paullinia rubiginosa*, pode indicar que estas estruturas correspondam a hidatódios, glândulas secretoras de resina ou nectários extraflorais. Estes três tipos de estruturas secretoras podem ser confundidas por apresentarem morfologia e topografia semelhantes, somente a morfologia externa é insuficiente para sua caracterização. Em *Passiflora fetida* var. *fetida* e *P. fetida* var. *hastata*, estruturas morfológicamente e topograficamente semelhantes a nectários foram reconhecidas como glândulas produtoras de resina, uma vez que elas secretam substâncias lipofílicas (Durkee *et al.*, 1984). Hidatódios são estruturas encontradas nas margens de folhas e secretam por processo ativo um líquido de composição variável, desde água pura à soluções diluídas de solutos orgânicos e inorgânicos na forma de íons (Fahn, 1979; Evert, 2006). Glândulas de resina são estruturas que secretam uma mistura de terpenos de alto e baixo peso molecular. Os nectários extraflorais correspondem a estruturas secretoras de néctar (fluido aquoso composto por sacarose, glicose e frutose nas mais variadas concentrações, podendo

conter, ainda, diversas outras substâncias e íons), presentes em órgãos vegetativos (Fahn, 1979; Nepi, 2007).

Na ordem Sapindales NEFs são raros em Meliaceae e comuns em Simaroubaceae (Elias, 1983). Na família Sapindaceae os NEFs foram citados para as margens dos folíolos de *Paullinia* (Somner, 2001) e *Serjania* (Acevedo–Rodríguez, 1993) com base em observações de morfologia externa. Para a família Meliaceae, nectários extraflorais foram anatomicamente descritos para três espécies de *Swietenia* (Lersten & Rugenstein, 1982); em *Carapa* (Elias, 1983); *Cipadessa* (Lersten & Pohl, 1985); *Cedrela* e *Trichilia* (Schupp & Feener, 1991); *Guarea macrophylla* (Morellato & Oliveira, 1994) e *Cedrela fissilis* (Paiva *et al.*, 2007).

O presente trabalho tem por objetivos descrever a anatomia das glândulas presentes nas margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* e caracterizar histoquimicamente o exsudato destas estruturas secretoras.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do material vegetal

Folhas jovens do primeiro nó, contados a partir do ápice, folhas jovens em final de expansão nos segundo e terceiro nós, folhas adultas nos quarto e quinto nós, de cinco indivíduos e três indivíduos jovens de *Paullinia rubiginosa* foram coletados em populações naturais da Mata da Biologia, localizada no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Ramos férteis foram coletados para a produção de exsiccatas que foram depositadas no Herbário VIC, do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa sob os números 32.629 e 32.630.

### Caracterização anatômica e histoquímica

Folíolos jovens do primeiro nó de *Paullinia rubiginosa* foram analisados sob estereomicroscópio (modelo ZZX7 acoplado com câmera E330, Olympus Optical, Tóquio, Japão) e foram obtidas imagens digitais das glândulas em fase secretora.

Os três indivíduos jovens foram retirados com raízes do campo e transferidos para vasos com capacidade de 1,5 litros, com solo proveniente da área de coleta. Os vasos foram mantidos por duas semanas em casa de vegetação no Horto Botânico da UFV, sendo regados diariamente. Posteriormente foram transportados para o laboratório de anatomia vegetal e mantidos sob câmara úmida, constituída de uma cúpula de vidro, colocada sobre os vasos. Para manter a umidade, os vasos foram colocados sobre uma placa de petri grande com água; o sistema foi vedado com massa de modelar (fig. 2A). O experimento ficou montado por uma semana, na qual foi realizadas coleta da secreção, com microcapilar, e colocada sobre a

superfície indicadora de fita de identificação de glicose (teste em tira para determinação qualitativa de glicose na urina, Alamar tecno científica LTDA, São Paulo, Brasil).

Amostras da margem dos folíolos em final de expansão e adultos foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%; 5:5:90; v/v), por 48 horas (Johansen, 1940) e em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (Gabriel, 1982) para caracterização estrutural das glândulas das margens dos folíolos; em FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Clark, 1973) para posterior teste histoquímico de detecção de compostos lipídicos e em SFF (solução de sulfato ferroso, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Johansen, 1940) para detecção de compostos fenólicos. Todo o material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação e depois desidratado em série etílica e armazenado em etanol 70%. As amostras fixadas em FAA, FNT e SFF foram incluídas em parafina histológica (Histosec/Merck) utilizando-se série butílica para a desidratação (Johansen, 1940). Após o emblocamento, as amostras foram cortadas transversal e longitudinalmente (com 7-10 µm de espessura) com o uso de um micrótomo rotativo (820 Spencer, American Optical Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). Já as fixadas em glutaraldeído, foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments) e cortes transversais e longitudinais, de 5 µm de espessura, foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Estados Unidos) e navalhas de vidro.

Parte dos cortes obtidos das amostras fixadas com FAA foi corada com safranina alcoólica e azul de astra (Johansen, 1940), por 1 hora e por 20 minutos, respectivamente; e parte foi utilizada para a realização do teste histoquímico para polissacarídeos neutros PAS (McManus, 1948). O material fixado em glutaraldeído foi corado com azul de toluidina em pH 4,4 (O'Brien & McCully, 1981); enquanto os fixados com SFF foram analisados sem coloração posterior e os fixados com FNT foram submetidos aos testes com: Negro de Sudão B (Pearse, 1980), para a identificação de lipídios gerais; reagente de Nadi (David & Carde, 1964) para óleos essenciais e óleoresinas; e Sulfato Azul do Nilo (Cain, 1947) evidencia a presença de lipídios ácidos e neutros. As lâminas dos testes histoquímicos foram montadas com gelatina glicerinada e as demais com resina sintética (Permound- Fisher). O controle dos testes para substâncias lipofílicas foi realizado com solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v, High 1948). As amostras foram submetidas a essa solução por um período de 48 horas em temperatura ambiente, logo em seguida fixadas em SFF ou em FNT e submetidas aos mesmos tratamentos das demais peças. O controle para o teste do PAS segue as recomendações metodológicas, com supressão do tratamento com ácido periódico (McManus, 1948).

Amostras de folhas adultas foram diafanizadas para a visualização das glândulas da margem do folíolo. Fragmentos do folíolo foram lavados com água destilada e colocados em hidróxido de sódio 10% por duas horas, lavados novamente em água destilada, permanecendo em hipoclorito de sódio comercial a 20%, por 72 horas. Após a clarificação, os fragmentos foram lavados em água destilada, desidratados em série etílica até etanol 100%, corados com safranina xilólica, por aproximadamente 24 horas (Handro, 1964). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permout- Fisher).

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo.

### Micromorfologia

Fragmentos da margem de folíolos em três fases de desenvolvimento (folíolo jovem do primeiro nó, folíolo jovem do terceiro nó, folíolo adulto do quinto nó), de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foram analisados ao microscópio eletrônico de varredura, após desidratação em série etílica até etanol 100% e secagem ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec), utilizando dióxido de carbono líquido e montagem em porta-espécimes, recobertos com uma camada de ouro pelo processo de pulverização catódica (Sputter Coater, FDU 010, Bal-Tec) (Bozzola & Russel, 1991). A documentação fotográfica foi obtida utilizando-se microscópio eletrônico de varredura (LEO, 1430 VP) localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

## **RESULTADOS**

Os folíolos de *Paullinia rubiginosa* apresentam aproximadamente de 9 a 12 dentes localizados na margem do terço apical do folíolo totalmente expandido (figs. 1A, 1B); a ocorrência de dentes no terço basal é rara.

Ao estereomicroscópio, foi visualizada uma pequena quantidade de secreção exsudando dos dentes (fig. 1D) em folíolos muito jovens, próximos ao ápice meristemático. As glândulas têm coloração verde-clara (fig. 1), apresentam atividade secretora tanto em muitos folíolos jovens, quanto em folhas maduras. Em material herborizado os dentes secam, perdendo a aparência de estrutura secretora.

Nas plantas que foram mantidas em câmara úmida (fig. 2A) foi possível verificar acúmulo de secreção nos dentes de folíolos em final de expansão (fig. 2B). A secreção contém glicose, como indicado pela coloração na fita detectora de glicose (fig. 2C). A quantidade de secreção produzida foi muito pequena de modo que não foi possível a realização de testes químicos detalhados para a presença de glicose, frutose e sacarose.

As glândulas se desenvolvem muito precocemente e em folíolos muito jovens já se apresentam totalmente desenvolvidas e em fase secretora (Figs. 1C e D). São estruturas complexas e vascularizadas por xilema e floema em proporções equivalentes (figs. 3A e 3E). O dente corresponde a um prolongamento da nervura lateral de maior porte do folíolo em junção com nervuras de menor porte que se projeta para fora da margem do folíolo, conferindo ao nectário a posição supramarginal (fig. 3B). Este prolongamento da nervura é envolvido por uma bainha de idioblastos que contém compostos fenólicos (fig. 3C); nesta região, é comum a observação de laticíferos (fig. 3A). A bainha é incompleta, sendo interrompida na porção terminal do dente, próximo ao ápice da glândula (figs. 3A, 3C e 3E). Numerosos idioblastos cristalíferos contendo drusas estão presentes ao longo das glândulas (fig. 3D).

O ápice da estrutura glandular é constituído por células pequenas, de paredes finas e pectocelulósicas e cutícula delgada (fig. 3E). As células periféricas, constituindo de 1 a 5 camadas, apresentam citoplasma denso e núcleo volumoso. Já as mais internas que mantêm contato com o sistema vascular diferem por serem vacuolizadas (figs. 3A e 3E).

Espaços intercelulares são comuns na região periférica do ápice da glândula e nestes espaços foi possível observar o acúmulo de secreção que também foi evidenciada na superfície externa da glândula (fig. 3E).

A secreção apresentou resultado negativo para substâncias lipofílicas. Para substâncias hidrofílicas, a secreção apresentou resultado positivo para polissacarídeos neutros no teste do PAS, que se acumulam nos espaços intercelulares e subcuticulares (fig. 4).

Na análise das micrografias eletrônicas de varredura observou-se que em folíolos próximos do ápice meristemático, as glândulas apresentam as células epidérmicas do ápice secretor em formação (figs. 5A e B). Em folíolos ainda não expandidos, a epiderme se diferencia e nota-se a proliferação de hifas fúngicas (figs. 5C e D). Nos folíolos expandidos, não foram encontrados fungos, e abaulamentos na epiderme do ápice secretor são evidentes (fig. 5E). Estômatos estão presentes ao longo da epiderme glândula, mas não ocorrem no ápice; a cutícula da epiderme é fina e não apresentou distensão.

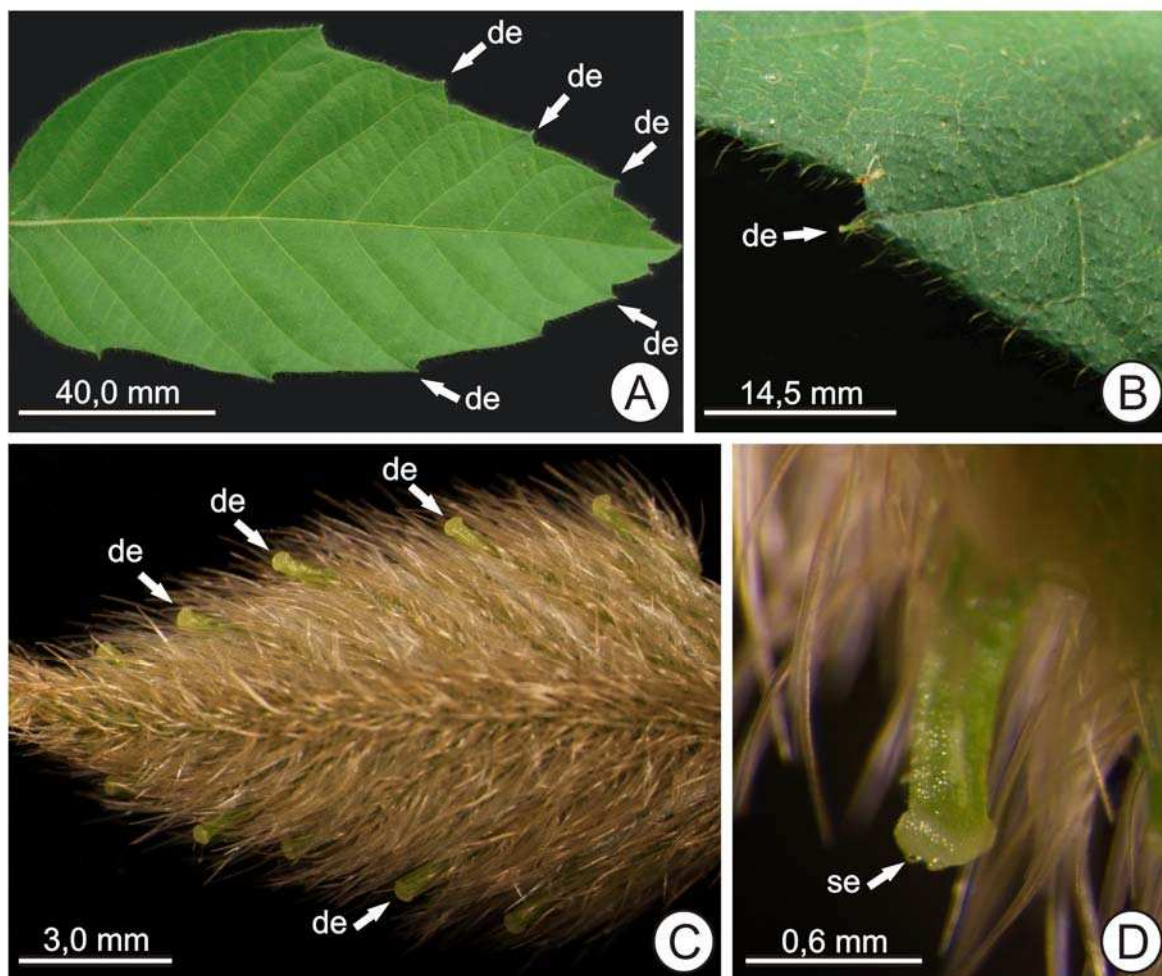


Fig. 1. Glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa*. (A e B) Folíolos adultos. (C e D) Folíolos jovens. (A) Vista geral mostrando a distribuição dos dentes. (B) Detalhe do dente. (C) Distribuição das glândulas no folíolo próximo ao ápice caulinar. (D) Detalhe da secreção exsudada pela glândula. Abreviaturas: de- dente, se- secreção.

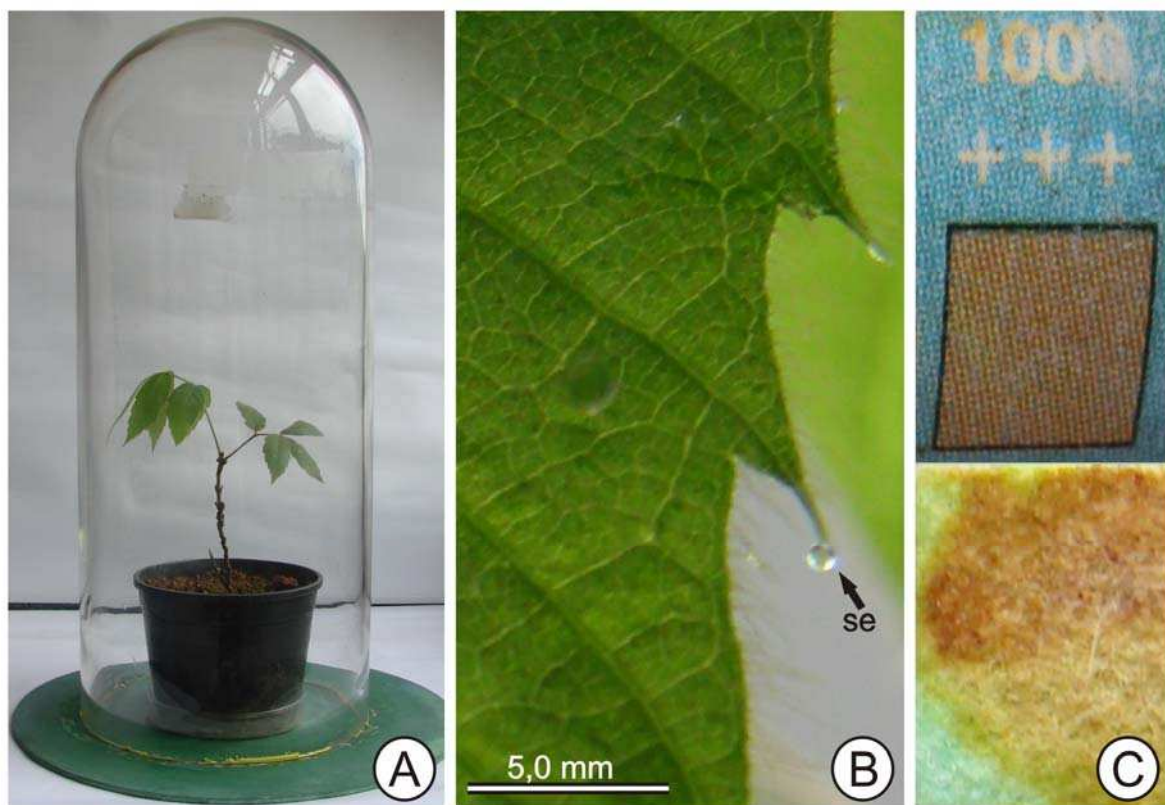


Fig. 2. Experimento realizado em câmara úmida com indivíduo jovem de *Paullinia rubiginosa*. (A) Câmara úmida. (B) Glândulas das margens dos folíolos exsudando secreção. (C) Resultado positivo para glicose em fita de identificação. Abreviaturas: se- secreção.

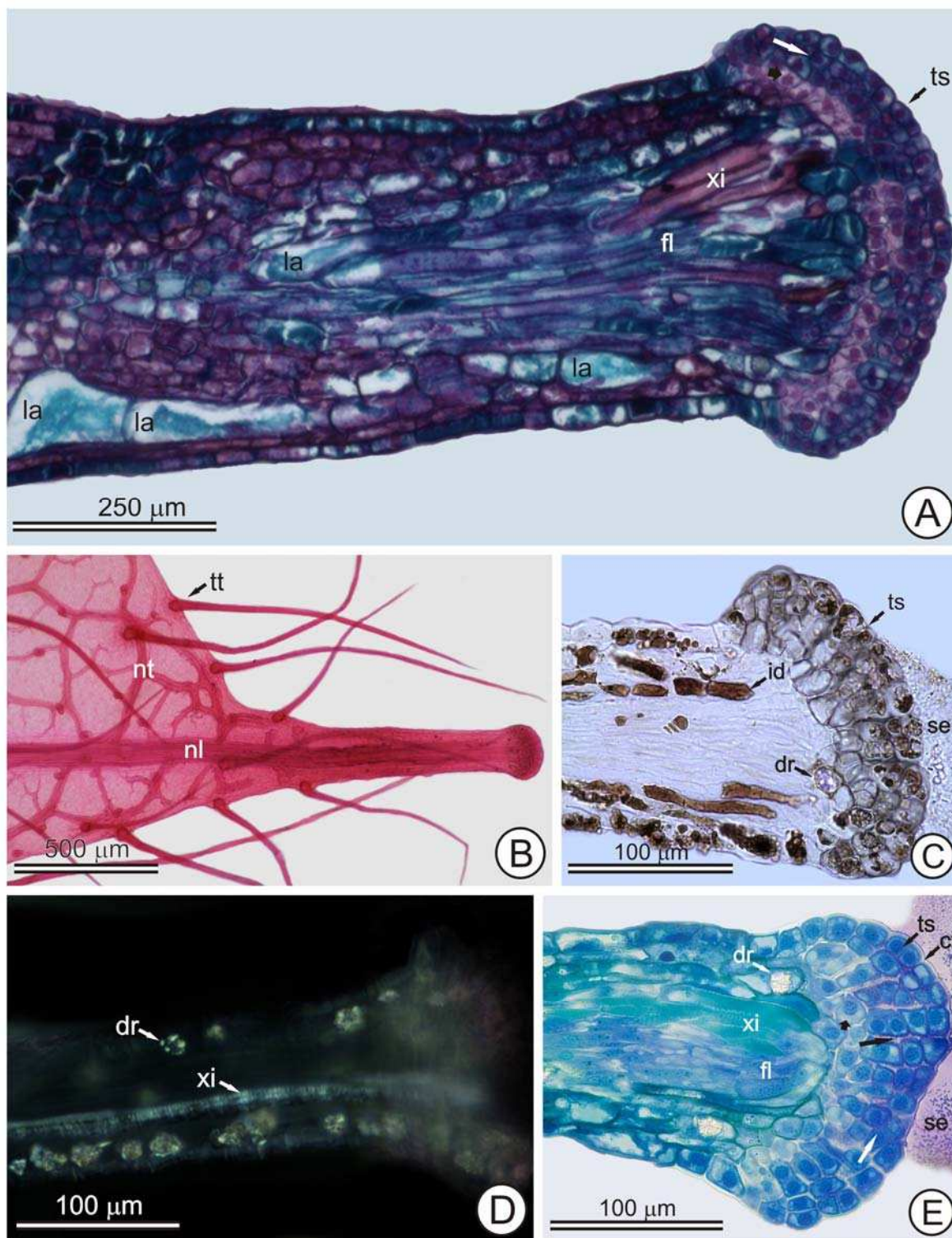


Fig. 3. Glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa*. (A, C e E) Cortes longitudinais. (B e D) Diafanização. (A) Vista geral da glândula. (B) Nervura lateral se estendendo ao longo do corpo da glândula. (C) Ápice da glândula com idioblastos taníferos evidenciado pelo sulfato ferroso em formalina. (D) Cristais de oxalato de cálcio (luz polarizada) (E) Ápice da glândula e secreção. Abreviaturas: ct- cutícula, dr- drusa, fl- floema, id- idioblasto tanífero, la- laticífero, nl- nervura lateral, nt- nervura terciária, se- secreção, ts- tecido secretor, tt- tricoma tector, xi- xilema. Seta branca- camada de células com citoplasma mais denso, seta larga- células mais vacuolizadas, seta preta- secreção no espaço intercelular.

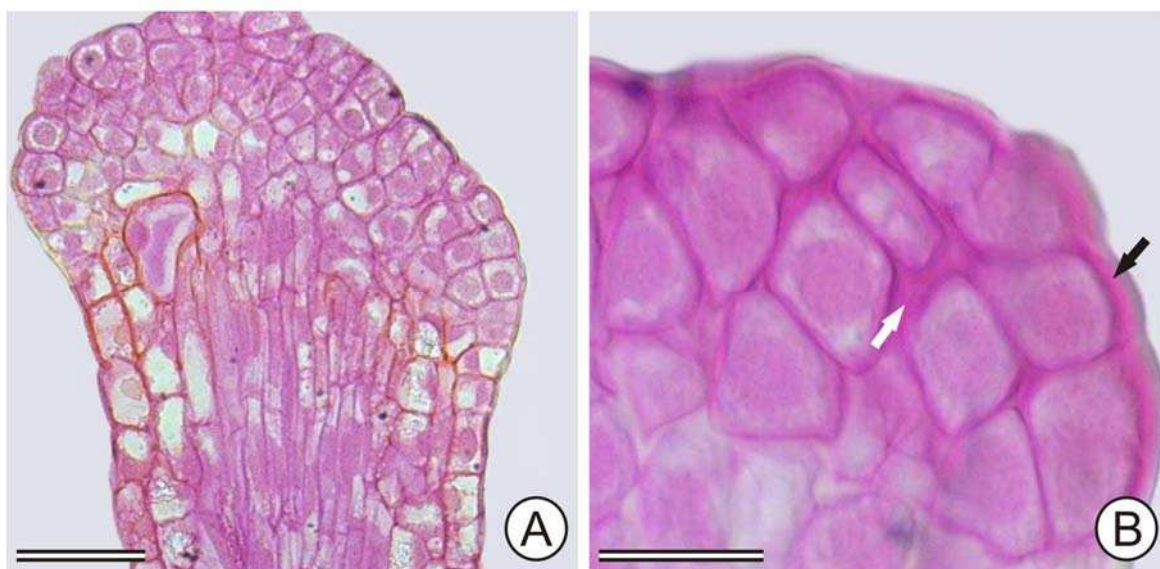


Fig. 4. Teste histoquímico PAS das glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa*. (A) Vista geral do resultado positivo para polissacarídeos. (B) Detalhe da secreção acumulada no espaço intercelular (seta branca) e subcuticular (seta preta). Barras A- 30  $\mu\text{m}$ , B- 15  $\mu\text{m}$ .

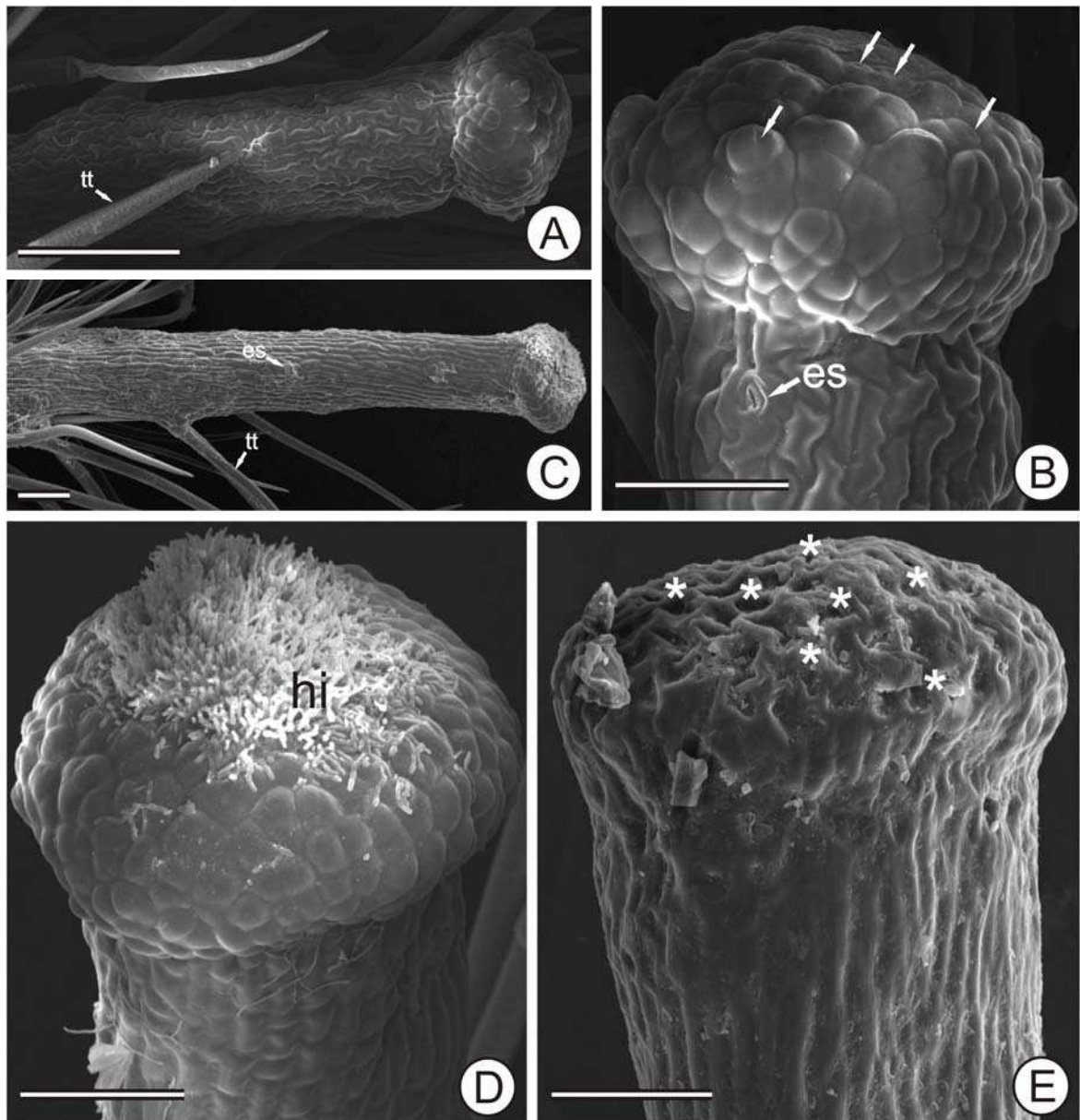


Fig. 5. Estrutura glandular das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* (micrografia eletrônica de varredura). (A e B) Epiderme do ápice da glândula em diferenciação (setas brancas). (C e D) Presença de hifas de fungos sobre o ápice da estrutura secretora. (E) abaulamento na cutícula por onde possivelmente a secreção é eliminada (asterisco). Abreviaturas: es- estômato, hi- hifas de fungos, tt- tricoma tector. Barras A, C- 150  $\mu\text{m}$ , B, D e E- 75  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

O resultado positivo da secreção das glândulas das margens dos folíolos de *Paullinia rubiginosa* para polissacarídeos, no teste PAS, bem como a presença de glicose demonstrada pela coloração na fita detectora, permite concluir que se trata de nectário extrafloral (NEF), pois a glicose é um dos principais componentes do néctar. A presença de açúcares na secreção exclui a possibilidade das glândulas serem hidatódios e os resultados negativos para compostos lipídicos excluem a possibilidade de corresponderem a glândulas de secretarem resina.

Os NEFs de *Paullinia rubiginosa* iniciam sua atividade em folhas muito jovens, próximas ao ápice meristemático e mesmo em folhas mostrando sinais de senescência os NEFs mantêm aparência secretora. O mesmo não foi observado para *Paullinia coriacea* e *Paullinia weinmanniaefolia*, onde as glândulas, denominadas de nectaríferas, secam permanecendo uma mancha castanha ou avermelhada na região (Somner, 2001). No entanto a longa duração da fase secretora observada nos NEFs de *P. rubiginosa* também foi relatada para as espécies de Meliaceae *Guarea macrophylla* (Morellato & Oliveira, 1994) e *Cedrela fissilis* (Paiva *et al.*, 2007).

A presença de NEF em *Paullinia* pode ser negligenciada pelos mesmos exibirem morfologia semelhante a hidatódios (Somner, 2001), ou devido às descrições taxonômicas serem baseadas em material herborizado, onde os nectários extraflorais secam e podem ser confundidos com prolongamento das nervuras laterais.

Os nectários extraflorais de *Paullinia rubiginosa* ocupam posição supramarginal em relação ao folíolo. Segundo Somner (2001), esta é uma localização comum no gênero, ocorrendo também NEFs abaixo da margem dos folíolos ou na margem, e quando os folíolos têm margem inteira, os nectários extraflorais se localizam no ápice. Essa informação deve ser averiguada, pois hidatódios são estruturas muito comuns em ápices de lâminas foliares, a caracterização destas estruturas baseada somente em dados morfológicos pode levar ao erro, por se tratarem de estruturas que podem ser morfológicamente semelhantes. Além disso, existem relatos de estruturas intermediárias entre hidatódio e NEF, como em *Impatiens scabrida* e *I. balfourii* (Elias & Gelband, 1977).

A presença de nectários extraflorais vem sendo utilizada como marcador morfológico de proximidade filogenética em algumas famílias. Em Leguminosae um clado do gênero *Senna* foi caracterizado pela presença de NEFs (Marazzi *et al.*, 2006) em recente trabalho a presença de NEFs é considerada como sinapomorfia de *Chamaecrista* (De Souza Conceição *et al.*, 2009). No gênero *Paullinia* os NEFs são caracteres taxonomicamente úteis ao nível de espécie e podem ser utilizados para a identificação de material estéril (Somner, 2001).

Algumas espécies do gênero *Serjania*, apresentam NEFs com localização e morfologia semelhantes aos de *Paullinia rubiginosa*, este pode ser mais um caráter que corrobora com a proximidade filogenética de *Paullinia* e *Serjania*, membros da tribo Paullinieae, descritos como grupo irmão na análise filogenética baseada em sequências DNA de cloroplasto (Harrington *et al.*, 2005). No entanto, não existem trabalhos de caracterização anatômica dos NEFs na família Sapindaceae.

Na ordem Sapindales, dados moleculares apontam para um relacionamento mais estreito entre a família Meliaceae e Simaroubaceae, e não com Sapindaceae (Savolainen *et al.*, 2000). Nectários extraflorais são comuns em Simaroubaceae e tem sua ocorrência registrada em várias espécies de Meliaceae (Elias, 1983). A ocorrência de NEFs em *Paullinia rubiginosa*, assim como em outras espécies do gênero e em *Serjania*, pode significar uma maior proximidade da família Sapindaceae com as famílias Simaroubaceae e Meliaceae, em que a ocorrência de NEFs é reconhecida. No entanto são necessários mais estudos de prospecção e anatomia destas estruturas secretoras, para averiguar se realmente elas podem ser utilizadas como marcadores filogenéticos na ordem Sapindales, como foi utilizado com o gênero *Senna* e *Chamaecrista* (Leguminosae).

Embora *Paullinia rubiginosa* possua nectários extraflorais como a família Meliaceae (Morellato & Oliveira 1994, Paiva *et al.* 2007), estes são anatomicamente distintos. Os NEFs de *Paullinia rubiginosa* são alongados e vascularizados, enquanto os de Meliaceae não são alongados, tampouco apresentam vascularização. Tal fato sugere a origem independente desta estrutura nas duas famílias ao longo do tempo. Para Meliaceae, Muellner *et al.* (2003) defendeu que a presença de NEFs é uma condição basal, por estes estarem presentes nos dois maiores clados, Melioideae e Cedreloideae, e terem morfologia e distribuição semelhantes. Em Sapindaceae os nectários de *Serjania* e *Paullinia* são semelhantes, mas ainda é precoce fazer qualquer afirmação sobre a ancestralidade destas glândulas.

As espécies de *Serjania* que apresentam NEFs são frequentemente visitadas por formigas agressivas, e suas folhas jovens não apresentam danos, evidenciando uma relação mutualística com as formigas (Acevedo–Rodríguez, 1993). Embora não tenha sido observada a presença de formigas em *Paullinia rubiginosa*, da mesma forma que em *Serjania*, suas folhas não se mostraram predadas, o que pode indicar que o mesmo tipo de associação mutualística esteja ocorrendo, como tem sido citada para muitas espécies que possuem nectários extraflorais (Bentley, 1977; Beattie, 1985; Koptur, 1992; Heil & McKey, 2003; Kobayashi *et al.*, 2008).

Os NEFs de *Paullinia rubiginosa* apresentam uma bainha aberta de células com compostos fenólicos ao redor dos tecidos vasculares, resultados semelhantes foram relatados

para *Prockia crucis* (Salicaceae) (Thadeo *et al.*, 2008). Segundo Elias (1983) compostos fenólicos são freqüentemente encontrados em nectários, mesmo em famílias distantemente relacionadas. Estes compostos podem ter papel de defesa nas plantas (Koptur, 1992), proteger as células contra radiação ultravioleta excessiva, podem ainda manter os protoplastos das células íntegros sob estresse hídrico (Taiz e Zeiger, 2004).

A presença de cristais de oxalato de cálcio nos nectários, assim como ocorre em *Paullinia rubiginosa*, foi relatada por Metcalfe & Chalk (1979), como sendo freqüente em diversos grupos taxonômicos. Relatos semelhantes foram feitos por Schnell *et al.* (1963); Baker *et al.* (1978); Boughton (1981); Durkee (1982); Elias (1983), Leitão *et al.* (2005), Francino *et al.* (2006), Thadeo *et al.* (2008), Rocha *et al.* (2009). Tem sido demonstrado que o  $\text{Ca}^{2+}$  inibe a ATPase da membrana plasmática (Leonard & Hodges, 1980). Como o transporte de sacarose em plantas, um dos principais componentes do néctar, envolve ATPase (Giaquinta, 1979), os cristais de oxalato de cálcio podem imobilizar o cálcio nas regiões do nectário onde o transporte de sacarose é ativo (Veza *et al.*, 2006).

As características das células do tecido secretor, como núcleo volumoso, citoplasma denso, pouco vacuolizado, são relatadas para diversos tipos nectários e são indicativas de alta atividade metabólica (Fahn, 1979; Durkee, 1983; Stpiczynska *et al.*, 2005).

As células mais internas, em contato com o tecido vascular, podem ser interpretadas como participantes no transporte a curta distância de materiais do tecido vascular para o secretor, atuando na transferência do pré-néctar para o tecido secretor. Na porção secretora, ocorre a transformação do pré-néctar em néctar, de acordo com o que foi relatado por Nepi (2007). Segundo Nepi (2007), o parênquima nectarífero pode participar do mecanismo de transformação do pré-néctar em néctar. No caso de *P. rubiginosa* embora não tenha sido possível verificar a origem ontogenética da camada interna à secretora, é possível que esta tenha a função de restringir o transporte apoplástico impedindo o refluxo da secreção do tecido secretor.

Segundo Fahn (2000), a origem do néctar secretado por nectários é o floema, seja diretamente da fotossíntese do parênquima nectarífero, de outras partes clorofiladas da planta, ou ainda de grãos de amido armazenado no parênquima nectarífero. No caso de *Paulinia rubiginosa*, os carboidratos devem ser provenientes dos fotoassimilados de outras partes da planta transportados pelo floema até o nectário, uma vez que não foram evidenciadas substâncias de reserva nem cloroplastos no tecido secretor. Situação semelhante foi descrita para os nectários florais de *Hedera helix* (Veza *et al.*, 2006).

Em geral, o néctar pode ser acumulado em espaços intercelulares e subcuticulares e ser exsudado do nectário através de tricomas, estômatos modificados, rupturas na cutícula,

regiões mais permeáveis na cutícula ou poros na mesma (Fahn, 1979). A ausência de estômatos no pólo secretor, característica usual em NEFs (Metcalf & Chalk, 1979), o acúmulo do néctar em espaços intercelulares e subcuticulares, e a presença de abaulamentos semelhantes a poros na cutícula das células do ápice dos NEFs de *Paullinia rubiginosa*, sugerem que a secreção é eliminada por intermédio de poros na cutícula das células secretoras dos nectários extraflorais. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

Este trabalho é o primeiro a descrever anatomicamente e confirmar a presença de NEFs na família Sapindaceae, no entanto existem trabalhos relatando a presença de NEFs em outras espécies de *Paullinia* e em *Serjania*, e também em outras famílias que compõem a ordem Sapindales. Os nectários extraflorais de *Paullinia rubiginosa* apresentam morfologia e topografia semelhante aos das outras espécies do gênero e de *Serjania*, mas diferentes dos descritos para espécies de Meliaceae. A presença de NEFs, sua morfologia e localização na planta, e mesmo sua cor podem ser caracteres utilizados para a separação de táxons de plantas (Metcalf & Chalk, 1979). Nectários extraflorais podem representar marcadores morfológicos importantes em análises filogenéticas, dessa forma, são necessários mais estudos de prospecção e anatômicos de nectários extraflorais em Sapindaceae, principalmente na tribo Paullinieae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. 1993. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). Part I: a revision of *Serjania* sect. *Platycoccus*. *Memoires of The New York Botanical Garden* 67: 1-93.
- BAKER, D.A., HALL, J.L. & THORPE, J.R. 1978. A study of the extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. *New Phytologist* 81: 129-137.
- BEATTIE, A.J. 1985. *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- BENTLEY, B.L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8: 407-427.
- BOUGHTON, V.H. 1981. Extrafloral nectaries of some phyllodineous *Acacias*. *Australian Journal of Botany* 29: 653-664.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSEL, L.D. 1991. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones and Bartlett Publishers, New York.
- CAIN, A.J. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 88: 383-392.
- CLARK, G. 1973. *Staining procedures*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

- CRONQUIST, A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, New York.
- DAVID, R. & CARDE, J.P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L' Academie des Sciencis Série D* 258: 1338-1340.
- DE SOUZA CONCEIÇÃO, A., QUEIROZ, L.P., LEWIS, G.P., ANDRADE, M.J.G., ALMEIDA, P.R.M., SCHNADELBACH, A.S. & VAN DEN BERG, C. 2009. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. *Taxon* 58: 1168-1180.
- DURKEE, L.T. 1982. The floral and extrafloral nectaries of Passiflora. II–The extrafloral nectary. *American Journal of Botany* 69: 1420-1428.
- DURKEE, L.T. 1983. *The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries*. In: BENTLEY, B. & ELIAS, T. (eds.). *The Biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- DURKEE, L.T, BAIRD, C.H. & COHEN, P. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* 71: 596-602.
- ELIAS, T.S.1983. *Extrafloral nectaries: their structure and distribution*. In: BENTLEY, B.; ELIAS, T.S. (Eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.
- ELIAS, T.S. & GELBAND, H. 1977. Morphology, anatomy, and relationship of extrafloral nectaries and hydathodes in two species of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Botanical Gazette* 138: 206-212.
- EVERT, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy - Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- FAHN, A.1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc., London.
- FAHN, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*. 31: 37-75.
- GABRIEL, B.L. 1982. *Biological Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold Company Inc, England.
- GIAQUINTA, R.T .1979. Phloem loading of sucrose: involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiology* 63:744–748.
- HANDRO, W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 36: 479-499.
- HARRINGTON, M.G., EDWARDS, K. J., JOHNSON, S.A., CHASE, M.W. & GADEK, P.A. 2005. Phylogenetic Inference in Sapindaceae sensu lato Using Plastid *matK* and *rbcL* DNA Sequences. *Systematic Botany* 30: 366-382.
- HEIL, M. & McKEY, D. 2003. Protective ant–plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 425-553.
- HIGH, O.B. 1984. *Lipid histochemistry*. Oxford University Press, New York.

- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2008. *Plant systematics, a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- KOBAYASHI, S., ASAI, T., FUJIMOTO, Y. & KOHSHIMA, S. 2008. Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: morphology, distribution, chemical constituents and changes during shoot and development. *Annals of Botany* 101: 1035-1047.
- KOPTUR, S. 1992. *Extrafloral nectar-mediated interactions between insects and plants*. In: BERNAYS, E. (Ed.), *Insect-Plant Interactions*. CRC Press, Boca Raton.
- LEITÃO, C.A.E., MEIRA, R.M.S.A., AZEVEDO, A.A., ARAÚJO, J.M., SILVA, K.L.F. & COLLEVATTI, R.G. 2005. Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany* 83: 279-286.
- LEONARD, R.T., & HODGES, T.K. 1980. *The plasma membrane*. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. (eds.). *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York.
- LERSTEN, N.R. & POHL, R.W. 1985. Extrafloral nectaries in *Cipadessa* (Meliaceae). *Annals of Botany* 56: 363- 366.
- LERSTEN, N.R. & RUGENSTEIN, S.R. 1982. Foliar nectaries in Mahogany (*Swietenia Jacq.*). *Annals of Botany* 49: 397-401.
- MARAZZI, B., ENDRESS, P.K., QUEIROZ, L.P. & CONTI, E. 2006. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectarines. *American Journal of Botany* 93: 288-303.
- McMANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. Vol. 1, Oxford University Press, New York.
- MORELLATO, P.C. & OLIVEIRA, P.S. 1994. Extrafloral nectaries in the tropical tree *Guaremacrophylla* (Meliaceae). *Canadian Journal of Botany* 72: 157- 160.
- MUELLNER, A.N.; SAMUEL, R.; JOHNSON, S.A.; CHEEK, M.; PENNINGTON, T.D. & CHASE, M.W. 2003. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 471–480.
- NEPI, M. 2007. *Nectary structure and ultrastructure*. In: NICOLSON, S.W.; NEPI, M. & PACINI, E. (eds.). *Nectaries and nectar*. Springer, Netherlands.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. *The Study of Plant Structure Principles and selected methods*. Termarcarphi Pty. Ltda., Melbourne.
- PAIVA, E.A.S.; BUONO, R.A. & DELGADO, M.N. 2007. Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Flora* 202: 455-461.
- PEARSE, A.G.E. 1980. *Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.

RADLKOFER, L. 1892–1900. Sapindaceae. In: MARTIUS, V. (ed.). *Flora Brasiliensis*. Volumen XIII. Pars III.

ROCHA, D.I.; SILVA, L.C.; VALENTE, V.M.M, FRANCINO, D.M.T. & MEIRA, R.M.S.A. 2009. Morphoanatomy and development of leaf secretory structures in *Passiflora amethystina* Mikan (Passifloraceae). *Australian Journal of Botany* 57: 619-626.

SAVOLAINEN, V.; CHASE, M.W.; HOOT, S.B.; MORTON, C.M.; SOLTIS, D.E.; BAYER, C.; FAY, M.F.; BRUIJN, A.Y.; DE SULLIVAN, S. & QIU, Y. L. 2000. Phylogenetics of Flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. *Systematic Biology* 49: 306–362.

SCHNELL, R.; CUSSET, G. & QUENUM, M. 1963. Contribution a l'étude des glandes extra-florales chez quelques groupes de plantes tropicales. *Revue Générale de Botanique* 70 (828): 269-341.

SCHUPP, E.W. & FEENER, D.H. 1991. *Phylogeny, life form, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest*. In: HUXLEY, C.R. & CUTLER, D.F. (eds.). Ant-plant interactions. Oxford Science, Oxford.

SOMNER, G.V. 2001. *Paullinia L. (Sapindaceae): Morfologia, taxonomia e revisão de Paullinia sect. Phygoptilon*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

STPICZYNSKA, M.; DAVIES, K.L. & GREGG, A. 2005. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricate* (lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 749-756.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Metabólitos secundários e defesa vegetal*. In: TAIZ, L. & ZEIGER, E. (eds.). Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre.

NEPI, M. 2007. *Nectary structure and ultrastructure*. In: NICOLSON, S.W.; NEPI, M. & PACINI, E. (eds.). Nectaries and nectar. Springer, Netherlands.

THADEO, M.; CASSINO, M.F.; VITARELLI, N.; AZEVEDO, A.A.; ARAÚJO, J.M.; VALENTE, V.M.M. & MEIRA, R.M.S.A. 2008. Anatomical and histochemical characterization of Extrafloral nectaries of *Prockia crucis* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 95: 1515-1522.

VEZZA, M.; NEPI, M.; GUARNIERI, M.; ARTESE, D.; RASCIO, N. & PACINI, E. 2006. Ivy (*Hedera helix* L.) Flower nectar and nectary ecophysiology. *International Journal of Plant Sciences* 167: 519-527.

## CONCLUSÕES FINAIS

O gênero *Paullinia* é um dos mais representativos da família Sapindaceae, juntamente com *Serjania*, mas apesar disso existem poucos os trabalhos anatômicos de estruturas secretoras destes gêneros. Os resultados obtidos com este trabalho são bastante promissores, e abrem espaço para futuros trabalhos com estruturas secretoras em Sapindaceae principalmente com gêneros da tribo Paullinieae.

A presença de laticíferos e sua classificação morfológica podem representar marcadores morfológicos de proximidade filogenética, e estão presentes em *Paullinia* e *Serjania*. No entanto, para avaliar o valor destas estruturas secretoras como marcadores filogenéticos na tribo Paullinieae, novos trabalhos devem ser conduzidos com espécies dos gêneros que compõem esta tribo.

A natureza complexa e quimicamente diversa da secreção dos laticíferos pode representar uma vantagem adaptativa à espécie por conter substâncias que apresentam atividade biológica como óleo essencial, alcalóides, esteróides, além dos taninos em idioblastos taníferos, que podem conferir proteção contra herbívoros e patógenos.

A ocorrência de tricomas apresentando função de coléter em *Paullinia rubiginosa* constitui-se num dado inédito para o gênero, uma vez que não foram realizados trabalhos com a caracterização do secretados dos tricomas presentes em outras espécies do gênero. A presença destas estruturas secretoras pode ser considerada uma estratégia adaptativa de importância pela proteção às folhas jovens que a secreção confere.

Este trabalho é o primeiro a descrever anatomicamente NEF para a família Sapindaceae. Os nectários extraflorais de *Paullinia rubiginosa* apresentam morfologia e topografia semelhantes aos descritos para *Serjania*, mas diferentes dos relatados para espécies de Meliaceae, família que compõe a ordem Sapindales juntamente com Sapindaceae. Dessa forma, são necessários mais estudos para verificar a presença de NEF no gênero, para que este caráter possa contribuir para esclarecer as relações filogenéticas dentro da ordem, uma vez que Meliaceae é considerada uma família mais proximamente relacionada com Simaroubaceae, que apresenta registros de NEFs, e Rutaceae, que não apresenta nenhum dado da ocorrência destas estruturas.