

SARA FERNANDES GALVÃO

**EFEITOS DO NEVOEIRO ÁCIDO EM FOLHAS DE *Joannesia princeps*  
VELL. (EUPHORBIACEAE): AVALIAÇÕES MORFOANATÔMICAS,  
FISIOLÓGICAS E QUÍMICAS.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

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

T

G182e  
2014 Galvão, Sara Fernandes, 1982-  
Efeitos do nevoeiro ácido em folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) : avaliações morfoanatômicas, fisiológicas e químicas / Sara Fernandes Galvão. - Viçosa, MG, 2014.  
53f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Luzimar Campos da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Joannesia princeps*. 2. Necrose foliar. 3. Pigmentos fotossintetizantes. 4. Compostos orgânicos voláteis. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Mestrado em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 634.92282

SARA FERNANDES GALVÃO

**EFEITOS DO NEVOEIRO ÁCIDO EM FOLHAS DE *Joannesia princeps*  
VELL. (EUPHORBIACEAE): AVALIAÇÕES MORFOANATÔMICAS,  
FISIOLÓGICAS E QUÍMICAS.**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2014.

---

Silvia Ribeiro de Souza

---

Kacilda Naomi Kuki

---

Luzimar Campos da Silva  
(Orientadora)

Aos que tentam.  
Dedico

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

A CAPES, pela concessão da bolsa através do Programa PNADB.

À professora Luzimar Campos da Silva pelas leituras sugeridas ao longo dessa orientação e pela dedicação.

Aos coorientadores Aristéa Azevedo e Wagner Araújo pelo apoio e sugestões ao longo da pesquisa.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal, que contribuíram ao longo de trinta meses, por meio das disciplinas e debates, para o desenvolvimento desta pesquisa e para meu desenvolvimento acadêmico.

À Prof.<sup>a</sup> Silva Ribeiro de Souza e ao Prof. Eraldo por viabilizarem etapas importantes desta pesquisa.

Aos funcionários da UFV Aurora Sato, Patrícia Fonseca, Rogério Gomide e Celso, pela presteza e atendimento quando necessário.

Aos colegas Carla Arce, Alexandre, Sandra, Genáina e ao Alexmiliano.

Aos colegas do Coral Voix-là, especialmente ao Cléber Silva, Rodrigo Luíz, Gracia Gonçalves, Vicente Mendes e demais coristas, por serem fundamentais para minha adaptação nesse novo contexto de vida.

Às colegas de classe Deborah Soares, Itainá Gonçalves, Laísa Castro, Lays Nery, Eliza Loubach, Haynna Fernandes e ao Tiago Pereira pelos momentos de amizade e apoio moral, psicológico, financeiro etc. viabilizando minha permanência no mestrado.

À Andrea Lanna, por suportar tanto mau humor e por insistir para que eu tivesse algumas atitudes, às quais me abriram portas.

Ao Juvenal, por dar o sangue por minha pesquisa.

Aos amigos Alfredo Kani, Mustafa Turgay Ejderoglu e Joaquim Kobongo, que fisicamente estavam distantes, mas sempre estiveram presentes com suas palavras motivadoras.

Ao MSc. Willie Anderson Vieira, que mesmo sem sair de Recife, esteve ao meu lado todos os dias, desde os mais ordinários até os mais especiais.

Às “Meninas do 302” Danielle Brito, Tatiane Oliveira, Monalessa Pereira e Liliane Tsai, Rosilene Mesquita e Larisse Quartaroli por me acolherem logo que cheguei à cidade, constituindo minha primeira família viçosense e por me acolherem nos meses finais dessa etapa.

Às “Meninas do 301” Carolina Garbin, Andrea Aon, Luíza Fagundes, Julia Ângulo e Nathália Sant’Anna por serem minha segunda família viçosense, convivendo com harmonia.

Às minhas avós Lindaura Lacerda (In memoriam) e Anísia Soares Lima, pela compreensão por minha ausência neste período tão delicado de suas vidas.

Ao meu pai Humberto Galvão Filho, minha mãe Nilda Fernandes Galvão e aos meus irmãos Luciano, Nilberto e Geisa, que empreenderam grande esforço para me manter bem, apesar da distância e outras dificuldades.

Aos muitos que me ajudaram, mesmo que os nomes não foram citados, os guardo na memória de forma muito grata.

## **Biografia**

Sara Fernandes Galvão, filha de Humberto Galvão Filho e Nilda Fernandes Galvão, nasceu em Vitória da Conquista, BA, em 21 de agosto de 1982.

Ingressou na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia em agosto de 2004 e concluiu o curso em agosto de 2009.

Realizou estágio voluntário por um ano, trabalhando com anatomia do corpo vegetativo de Malvaceae, de 2005 a 2006.

Foi bolsista de iniciação científica por um ano, trabalhando com anatomia floral e ecofisiologia da germinação de sementes de Cactaceae, de 2006 a 2007.

Em 2011 iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, trabalhando com Anatomia Vegetal. Concluindo o trabalho com a apresentação da dissertação intitulada “Efeitos do nevoeiro ácido em folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): avaliações morfoanatômicas, fisiológicas e químicas” em fevereiro de 2014.

“... Quem hoje é vivo corre perigo  
E os inimigos do verde da sombra  
O ar que se respira  
E a clorofila das matas virgens  
Destruídas vão lembrar  
Que quando chegar a hora  
É certo que não demora  
Não chame Nossa Senhora  
Só quem pode nos salvar  
É caviúna, cerejeira, baraúna,  
Imbuia, pau-d'arco, solva,  
Juazeiro, jatobá,  
Gonçalo-alves, paraíba, itaúba,  
Louro, ipê, paracaúba,  
Peroba, massaranduba,  
Carvalho, mogno, canela, imbuzeiro,  
Catuaba, janaúba, aroeira, araribá,  
Pau-ferro, angico, amargoso, gameleira,  
Andiroba, copaíba, pau-brasil, jequitibá.”

Augusto Jatobá

## Resumo

GALVÃO, Sara. Fernandes, MSc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Efeitos do nevoeiro ácido em folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): avaliações morfoanatômicas, fisiológicas e químicas.** Orientador: Luzimar Campos da Silva. Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo; Wagner Luiz Araújo.

*Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) é uma espécie florestal de ampla distribuição no território brasileiro e cujo potencial para uso como bioindicadora tem sido recentemente estudado. O presente trabalho objetivou analisar morfofisiologicamente e quimicamente a estrutura foliar e os nectários extraflorais de *J. princeps* expostos ao nevoeiro ácido. No experimento I, mudas foram submetidas ao nevoeiro ácido com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  até o  $\text{pH}=3,0$  e para controle,  $\text{pH}=6,0$ , durante 21 dias. Durante o experimento foram realizadas análises: sintomatológica, biométrica, de índice de clorofilometria por extensão, de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*. Ao final, foram coletadas amostras foliares para estudos em microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e quantificação de clorofilas e carotenoides. Os testes histoquímicos foram realizados a fim de detectar a presença de carboidratos, lipídeos, terpenoides e proteínas. No experimento II, plantas jovens foram submetidas ao nevoeiro ácido ( $\text{pH}=3,0$ ) e como referência, utilizou-se plantas não expostas ao poluente. Neste experimento foram realizadas análises: sintomatológica, de pigmentos fotossintetizantes (clorofilometria e concentração), da fluorescência da clorofila *a*, dos compostos orgânicos voláteis (COVs), das alterações anatômicas em microscopia de luz e histoquímica para detecção da presença de carboidrato, lipídeos, alcaloides e terpenoides. No experimento I o crescimento das folhas jovens foi menor em plantas expostas ao nevoeiro ácido. Estas apresentaram diminuição do índice de clorofilometria e redução na razão clorofila total/carotenoide. Não houve diferença significativa nos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* entre os tratamentos. As necroses causadas pelo nevoeiro ácido apresentam-se como pontos negros nos nectários e como pontos negros com aréolas amarelas ou bronzeadas nos folíolos. O surgimento das necroses iniciou após a segunda exposição ao nevoeiro ácido e intensificou de forma exponencial entre o 7º e 13º dia, diminuindo posteriormente até o equilíbrio. As alterações anatômicas observadas foram: colapso celular, hiperplasia, hipertrofia e acúmulo de compostos fenólicos. Nos nectários de plântulas submetidas ao nevoeiro ácido observou-se o descolamento das ceras epicuticulares e perfurações na cutícula. As células apresentaram aspecto plasmolizado e houve aceleração da senescência dos nectários no segundo nó. Os testes histoquímicos detectaram lipídios e proteínas estruturais, amido e terpenoides nos mesmos tecidos de plantas de ambos os tratamentos, os quais apresentaram resultado negativo para alcaloides. No experimento II necroses venais e intervenais surgiram no segundo dia de exposição ao nevoeiro ácido nas folhas em expansão. As análises de pigmento fotossintetizantes, fluorescência da clorofila *a* não apresentaram diferenças

estatisticamente significativas. Os testes histoquímicos detectaram amido, lipídios estruturais e terpenoides nos mesmos tecidos de plantas de ambos os tratamentos. Dos COVs coletados, 16 são comuns aos dois tratamentos, a saber: nonano; decano; mesytilene;  $\beta$ -myrcene; acetato de 3-hexen-1-ol; limoneno;  $\beta$ -ocimeno; hexanol-2-etil; 4,8,dimetil-1,3,7-nonatrieno; dodecane; decanal; octadecano e ciclohexanol-5-metil-2; tridecano; nonadecano; tetracontano. Funções distintas são atribuídas a estes compostos, desde estruturais até infoquímicos, atuando na atração ou repulsão de artrópodes. As respostas elicitadas pelo nevoeiro ácido acarretam o aparecimento de necroses que podem ser observadas e contabilizadas. Os aspectos fisiológicos e químicos permitem compreender a interação entre a planta e o ambiente na presença de nevoeiro ácido.

## Abstract

GALVÃO, Sara Fernandes, MSc., Universidade Federal de Viçosa, february 2014. **Effects of acid mist on leaves *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): morphological anatomic, physiological and chemical evaluations.** Advisor: Luzimar Campos da Silva. Coadvisors: Aristeia Alves Azevedo; Wagner Luiz Araújo.

*Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) is a forest species widely distributed in Brazil and whose potential for use as a bioindicator has been studied recently. The present study aimed to analyze morfofisiologicamente and chemically leaf structure and extrafloral nectaries *J. princeps* exposed to acid mist. In the first experiment, seedlings were subjected to acid mist with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> until pH = 3.0 and control pH = 6.0 for 21 days. During the experiment analyzes were performed: symptomatology, biometrics, index chlorophyllometry by extension, gas exchange and chlorophyll a fluorescence. Finally, leaf samples were collected for studies using light microscopy, scanning electron microscopy and quantification of chlorophylls and carotenoids. The histochemical tests were performed in order to detect the presence of carbohydrates, lipids, proteins and terpenoids. In the second experiment, young plants were subjected to acid mist (pH = 3.0) as a reference and was used plants not exposed to the pollutant. In this experiment analyzes were performed: symptomatology, photosynthetic pigments (chlorophyllometry and concentration), the chlorophyll a fluorescence, volatile organic compounds (VOCs), anatomical changes under light microscopy and histochemistry for the presence of carbohydrates, lipids, alkaloids and terpenoids. In the first experiment the growth of young leaves was lower in plants exposed to acid mist. These showed a decrease in the rate of chlorophyllometry and reduction in the ratio total chlorophyll / carotenoid. There was no significant difference on leaf gas and chlorophyll a fluorescence parameters, between treatments. Necroses caused by acid mist appear as black spots in nectaries and as black spots with yellow or tan circle around their. The emergence of necrosis began after the second exposure to acid mist and intensified exponentially between 7° and 13° days, decreasing thereafter until the balance. The anatomical changes observed were: cellular collapse, hyperplasia, hypertrophy and accumulation of phenolic compounds. Nectaries in seedlings subjected to acid mist was observed detachment of the waxes and punctures the cuticle. Cells presented plasmolized appearance and was accelerated senescence of nectaries on the second node. Histochemical tests detected lipids and structural proteins, starch and terpenoids in the same tissues in plants of both treatments, which were negative for alkaloids. In experiment II venal and interveinal necrosis appeared on the second day of exposure to acid mist in expanding leaves. Analyses of photosynthetic pigment, chlorophyll a fluorescence showed no statistically significant differences. The histochemical tests detected starch, structural lipids, and terpenoids in the same plant tissues in both treatments. VOCs collected, 16 are common to the two treatments, namely nonane; Dean; mesytilene;  $\beta$ -myrcene; 3-hexen-1-ol acetate; limonene;  $\beta$ -ocimene; -2-ethyl hexanol; 4,8, dimethyl-1,3,7-nonatrieno; Dodecane; decanal; Cyclohexanol and octadecane-5-methyl-2; tridecane; nonadecane; tetracontano. Different roles are assigned to these compounds, structural and infochemicals, acting on the attraction or repulsion of arthropods. The responses elicited by acid mist cause the onset of necrosis that can be observed and recorded. The physiological and chemical aspects

allow us to understand the interaction between the plant and the environment in the presence of acid mist.

## Sumário

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introdução .....                                                                                            | 1  |
| Material e métodos.....                                                                                     | 5  |
| - Obtenção do material vegetal .....                                                                        | 5  |
| - Exposição ao nevoeiro ácido .....                                                                         | 6  |
| - Análise biométrica .....                                                                                  | 6  |
| - Sintomatologia visual .....                                                                               | 6  |
| - Determinação de pigmentos .....                                                                           | 7  |
| - Determinação das trocas gasosas.....                                                                      | 7  |
| - Fluorescência da Clorofila a .....                                                                        | 8  |
| - Caracterização anatômica .....                                                                            | 8  |
| - Análises estatísticas .....                                                                               | 10 |
| - Exposição ao nevoeiro ácido .....                                                                         | 10 |
| - Sintomatologia visual .....                                                                               | 10 |
| - Determinação de pigmentos .....                                                                           | 11 |
| - Fluorescência da Clorofila a .....                                                                        | 11 |
| - Análise dos compostos orgânicos voláteis .....                                                            | 11 |
| - Caracterização anatômica .....                                                                            | 12 |
| Resultados .....                                                                                            | 13 |
| Experimento I: Exposição de plântulas de <i>Joannesia princeps</i> ao nevoeiro ácido por 20 dias .....      | 13 |
| - Análises estatísticas .....                                                                               | 13 |
| - Análise biométrica .....                                                                                  | 13 |
| - Sintomatologia visual .....                                                                               | 13 |
| - Determinação de pigmentos .....                                                                           | 14 |
| - Determinação das trocas gasosas.....                                                                      | 14 |
| - Fluorescência da clorofila a.....                                                                         | 14 |
| - Caracterização anatômica .....                                                                            | 14 |
| - Alterações estruturais em microscopia de luz.....                                                         | 16 |
| - Alterações estruturais em microscopia eletrônica de varredura .....                                       | 17 |
| Experimento II: Exposição de plantas jovens de <i>Joannesia princeps</i> ao nevoeiro ácido por 3 dias ..... | 17 |
| - Sintomatologia visual .....                                                                               | 17 |
| - Determinação de pigmentos .....                                                                           | 17 |
| - Fluorescência da clorofila a .....                                                                        | 18 |

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| - Compostos voláteis.....                           | 18 |
| - Caracterização anatômica .....                    | 18 |
| - Alterações estruturais em microscopia de luz..... | 19 |
| Discussão .....                                     | 19 |
| Considerações finais .....                          | 26 |
| Referências.....                                    | 27 |
| Figuras .....                                       | 34 |

## Introdução

Com o aumento das atividades antropogênicas que modificam a atmosfera amplia-se a busca por informações sobre a sensibilidade das espécies arbóreas quanto à precipitação ácida (Shigihara et al., 2009). Diferentes países têm estudado os efeitos dos poluentes sobre as espécies nativas a fim de melhorar o manejo florestal e impedir sua depleção.

Florestas e ecossistemas no sudeste do Brasil são potencialmente suscetíveis à problemas relacionados com a deposição ácida por causa do aumento nos produtos derivados de petróleo, gás natural e carvão usados para gerar energia nos diversos setores econômicos na região (Mello e Almeida, 2004).

Um exemplo é o Parque Estadual do Rio Doce (PERD), que é uma grande área de floresta tropical semidecídua sob a proteção legal do estado de Minas Gerais. O PERD está localizado em uma área conhecida como “Vale do Aço”, coexistindo com muitas carvoarias e grandes indústrias de ferro (Sant’Anna-Santos et al., 2006). Análises prévias demonstraram que o pH da precipitação nesta região varia entre 3,47 e 7,62, podendo causar impacto sobre a vegetação local (Sant’Anna-Santos et al., 2006). Das cinco espécies coletadas e estudadas, *Joannesia princeps* foi a que apresentou maior sensibilidade à chuva ácida (Silva et al., 2000; Silva et al., 2005), desde então tem sido alvo de estudos sobre respostas à poluição atmosférica.

*Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) possui porte arbóreo, é encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste, em floresta pluvial de mata atlântica e é popularmente conhecida como andá-açu, boleira, cotieira e purga-de-cavalo, dentre outros nomes populares (Balbach, 1981; Souza e Lorenzi, 2005; Silva et al., 2006). *J. princeps* é uma planta decídua, heliófita, característica de terrenos secos da encosta pluvial atlântica. Possui folhas compostas digitado-partidas com três a cinco folíolos, alternas, pecíolo cilíndrico, duas glândulas na base e no ápice do pecíolo, peciólulos de coloração carmim, sulcados na face adaxial e coloração verde claro na face abaxial, folíolos membranáceos, glabros e ovalados a elípticos (Carvalho, 2003). Os frutos contêm, geralmente, duas sementes (Balbach, 1981; Chaves e Davide, 1996), que possuem sabor agradável parecido com o do amendoim (Nishioka e Escalante, 2007), mas sua ingestão acidental pode causar efeitos tóxicos principalmente em crianças (Souza e Lorenzi, 2005). Segundo Dos Anjos et al. (2012) *J. princeps*

requer uma alta demanda de luz e é tolerante à fotoinibição por estresse luminoso, pois possui uma alta capacidade de dissipação de energia.

As glândulas presentes no pecíolo de *J. princeps* são consideradas nectários extraflorais (Carvalho, 2003). Nectários são estruturas secretoras que liberam um líquido aquoso (néctar), que contém altas concentrações de mono e dissacarídeos, principalmente glicose, frutose e sacarose (Fahn, 1979; 1990; Buvat, 1989; Nicolson et al., 2007). Pequenas quantidades de outras substâncias também podem estar presentes (Fahn, 1979; Evert et al., 2006, Nicolson et al., 2007). Na estrutura de nectários de espécies de Euphorbiaceae foram encontradas antocianinas; em *Ricinus communis*, corpos proteicos cristalinos e material osmiofílico denso e taninos em *Euphorbia neriifolia* (Nicolson et al., 2007).

Os nectários extraflorais podem estar presentes em caules e folhas e, normalmente, não são associados com a polinização (Buvat, 1989; Evert et al., 2006, Nicolson et al., 2007). A funcionalidade dos nectários extraflorais como alternativa de afastar visitantes indesejados das flores constitui a “hipótese da distração”, a qual sugere a diminuição na visita de flores pelas formigas, que não são polinizadores efetivos (Wagner e Kay, 2002). Nichol e Hall (1988) afirmaram que os nectários presentes no pecíolo de folhas de *Ricinus communis* produzem néctar para formigas que desencorajam predadores, introduzindo a ideia da “hipótese da proteção”. Após simulações de ataques de pragas, que alteram a homeostase em plantas de *Ricinus communis* (Radhika et al. 2008) e *Macaranga tanarius* (Heil et al., 2001) com a exposição ao ácido jasmônico e de *Catalpa bignonioides* através da defoliação (Ness, 2003), ocorreu aumento da secreção de néctar e, concomitantemente, o comparecimento de formigas e vespas. Estes fatos atestam que os nectários extraflorais atuam como mediadores entre herbívoros e membros do terceiro nível trófico, constituindo um tipo eficaz de defesa, citado também por Evert et al. (2006) e Nicolson et al. (2007).

O néctar é uma recompensa pelo forrageamento, visto que estes visitantes são carnívoros ou predadores de herbívoros (formigas, vespas e aranhas), não constituindo a principal fonte de energia (Heil et al., 2007; Nicolson et al. 2007). Além da existência do néctar, o sucesso na distribuição espacial para o forrageamento em um mesmo indivíduo, a especificidade dos visitantes em cada espécie de planta e em cada órgão é facilitado por outro fator: a presença dos

compostos orgânicos voláteis (COV) produzidos pelas plantas, lhes permitindo a interação com o ambiente (Trigo et al., 2000; Heil et al., 2007; Lee et al. 2010)

Os COVs liberados estão relacionados às sinalizações planta-planta e a que envolve plantas, herbívoros e seus predadores (Iriti e Faoro, 2009; Blande et al., 2011). As plantas são capazes de identificar e priorizar cada via metabólica sinalizada, exercendo a estratégia de defesa mais apropriada a fim de minimizar um dano presente ou futuro, desse modo, preservando o crescimento dos órgãos vegetativos e reprodutivos (Choudhary et al., 2008).

A poluição atmosférica é um dos fatores ambientais que contribuem para alterações dos COVs na atmosfera, através da diluição e degradação dos compostos sinalizadores, alterando a sinalização planta-planta (Blande et al., 2011). O ozônio, por exemplo, pode oxidar os compostos voláteis que atraem parasitoides e assim, diminuir a eficiência contra os ataques de herbívoros (Radhika, 2008; Peltonen et al., 2010; Blande et al., 2011) e ainda, elicitar respostas idênticas à ação de herbívoros ou parasitas (Blande et al., 2010; Pinto et al., 2010).

O declínio das florestas tem sido alvo de estudos que apontem suas causas e formas de mitigar os efeitos (Iriti e Faoro, 2009). O aumento das atividades industriais e o uso de combustíveis fósseis elevam a liberação de subprodutos que podem afetar negativamente o ambiente (Peiter e Tobar, 1998; Singh e Verma, 2007; Seyyednjad et al., 2011; Ifeanyi e Ogbonna, 2012).

A precipitação ácida caracteriza-se por ter um pH  $\leq 5,6$ , resultante das interações entre gases lançados na atmosfera e o vapor de água, tendo como intermediários compostos químicos instáveis e muito reativos. O nevoeiro ácido interfere na organização bioquímica, fisiológica e morfológica das plantas (Evans, 1984; Brena, 2009). Pode ocasionar nas folhas: lesões necróticas, senescência prematura, injúrias nos estômatos, alterações na molhabilidade, aumento no número de tricomas e estômatos por unidade de área em folhas jovens, além de proliferação celular (hiperplasia) e alargamento celular anormal (hipertrofia) (Evans, 1982; Silva et al., 2005; Sant'Anna-Santos et al., 2006).

*J. princeps* foi estudada quanto à sensibilidade a poluentes atmosféricos, especialmente a chuva ácida, à chuva com flúor, e às emissões de uma siderúrgica, tendo demonstrado seu potencial como bioindicadora (Silva et al., 2000; Sant'Anna-Santos e Azevedo, 2007; Castro, 2008). Plantas bioindicadoras são as que, ao serem

expostas a poluentes, apresentam mudanças morfológicas, anatômicas, fisiológicas ou bioquímicas mensuráveis e assim, podem ser utilizadas para indicar estresses ambientais (Neufeu et al., 1985; Klumpp et al., 2001; Silva et al., 2005; Larcher, 2006; Simon et al., 2012).

Os trabalhos de Silva et al. (2005) e Sant'Anna-Santos e Azevedo (2007) descreveram os sintomas visuais e anatômicos causados pela chuva ácida nos folíolos de *J. princeps*, mas ainda não são conhecidos os efeitos da chuva ácida sobre nectários extraflorais, ao néctar exsudado e aos semioquímicos produzidos. Não há descrições sobre a plasticidade fenotípica ou a sensibilidade nos nectários extraflorais de *J. princeps* quanto à precipitação ácida, visto que os experimentos anteriores tinham como objetivo analisar a lâmina dos folíolos.

Portanto, não havendo dados sobre possíveis alterações nos nectários, não se pode inferir sobre interferências, causadas pela precipitação ácida nos nectários e se isto pode alterar as relações entre as plantas e o ambiente mediadas por estas glândulas.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a ocorrência de alterações morfoanatômicas, fisiológicas e químicas em folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), e, principalmente, nos nectários extraflorais, em resposta à exposição ao nevoeiro ácido.

## Material e métodos

### - Obtenção do material vegetal

O material biológico utilizado nos experimentos teve a mesma origem com a formação de uma população mista a partir de sementes de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), obtidas de três matrizes localizadas no campus da Universidade Federal de Viçosa e na propriedade denominada "Fazendinha" localizada no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Para desinfestação, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 5% durante 15 minutos, lavadas em água destilada três vezes de dois minutos cada e secas com papel toalha.

Para a quebra de dormência, as testas das sementes foram rompidas com martelo. As sementes foram umidificadas, por 24 horas, e semeadas em bandejas contendo areia lavada.

As bandejas foram molhadas diariamente com água. A germinação ocorreu sete dias após a semeadura. As plântulas permaneceram na bandeja com areia por um mês, período em que desenvolveram folhas em quatro nós acima dos cotilédones.

As plântulas foram transferidas das bandejas para vasos de dois litros contendo substrato constituído por latossolo vermelho-amarelo e areia (3:1 v/v). As plântulas foram cultivadas em casa de vegetação (Figura 1 A) com a aplicação de solução nutritiva de Hoagland (1/4 de força) a cada três dias por seis meses.

Após a obtenção das mudas, foram realizados dois experimentos, a saber:

- Experimento I: Exposição de plântulas de *J. princeps* (com cotilédone) ao nevoeiro ácido por 20 dias, com avaliação de:
  - análise biométrica;
  - sintomatologia visual;
  - determinação de pigmentos;
  - determinação de trocas gasosas;
  - fluorescência da clorofila a;
  - caracterização anatômica;
  - análises estatísticas.
- Experimento II: Exposição de plantas jovens de *J. princeps* (sem cotilédone) ao nevoeiro ácido por 3 dias, com avaliação de:
  - sintomatologia visual;

- determinação de pigmentos;
- fluorescência da clorofila a;
- caracterização anatômica;
- análise dos compostos voláteis;
- análises estatísticas.

- **Experimento I: Exposição de plântulas de *Joannesia princeps* ao nevoeiro ácido por 20 dias**

- Exposição ao nevoeiro ácido

Mudas de *J. princeps* com três meses de idade e possuindo quatro folhas (n=10) foram previamente selecionadas quanto ao tamanho e o estado fitossanitário. Estas foram submetidas a nevoeiros preparados com água acidulada com solução  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N até pH=3,0 (tratamento com nevoeiro ácido) e água deionizada pH=6,0 (tratamento controle).

As simulações dos nevoeiros foram realizadas em duas câmaras, adaptadas a partir do modelo proposto por Evans et al. (1977) (Figura 1 B, C), uma para controle e outra para o nevoeiro ácido. As plantas foram submetidas, diariamente, a nevoeiros simulados com duração de 15 minutos cada, durante 20 dias. Antes e depois da simulação, as plantas ficaram expostas durante 15 minutos a um painel luminoso sob irradiância de  $95\text{W.m}^{-2}$ .

- Análise biométrica

O comprimento do folíolo apical foi aferido em folhas do segundo nó das mudas e as medidas foram realizadas antes da primeira exposição aos nevoeiros e 24 horas após o último nevoeiro simulado. As folhas jovens, que surgiram após o início do experimento foram medidas 24 horas após o último nevoeiro simulado. A altura das plantas foi medida antes da primeira exposição aos nevoeiros e 24 horas após o último nevoeiro simulado.

- Sintomatologia visual

O tipo, o aparecimento e a localização dos sintomas visuais foram acompanhados e registrados com câmera fotográfica digital (modelo DSC-W120,

Sony, China) ao longo do experimento. As imagens dos folíolos apicais, do primeiro ao quarto nó de cada indivíduo, foram transferidas para computador e a quantificação das necroses foi realizada com o programa Anati Quanti 2.0.

- Determinação de pigmentos

Durante o experimento, foi realizada diariamente a clorofilometria, aferindo, diariamente, a intensidade de cor verde das folhas, expressa em na unidade índice SPAD. Esta medida foi realizada no folíolo apical das folhas marcadas do segundo nó, entre 7 e 9h da manhã, utilizando-se o medidor portátil de clorofila SPAD (modelo 502, Minolta, Germany). Foi realizada uma medida no folíolo apical da folha marcada de cada planta e calculou-se a média para cada tratamento utilizando-se o próprio medidor.

Os teores de clorofila a, clorofila b e carotenoides foram determinados com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator (Wellburn, 1994), sendo a coleta realizada 24 horas após o último nevoeiro simulado. Três discos foliares de 5 mm de diâmetro de cada repetição foram colocados em recipientes contendo 4ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio. Após 24 horas em banho-maria a 65°C, os valores de absorbâncias do extrato ( $A_{663,2}$  e  $A_{646,8}$  para clorofilas a e b, respectivamente e  $A_{470}$  para carotenoides) foram lidas em espectrofotômetro (modelo Genesys 2 PC, Thermo Spectronic, Canadá). Os teores dos pigmentos foram determinados e expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de acordo com a equação de Lichtenthaler (1987).

- Determinação das trocas gasosas

Foi utilizado um sistema aberto com um analisador de gases a infravermelho IRGA (modelo LI-6400XT, Li-cor Inc., EUA) para a determinação da taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), da condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), da razão entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) e da transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). As medições foram feitas no folíolo apical de folhas do segundo nó, em expansão, de seis indivíduos, sendo as leituras realizadas 24 horas após a aplicação do último nevoeiro ácido, entre 8:00 e 12:00 horas da manhã.

#### - Fluorescência da Clorofila a

Foram realizadas medições das variáveis de fluorescência da clorofila a, com o auxílio de um fluorômetro de pulso modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). As mesmas folhas utilizadas para avaliar trocas gasosas foram adaptadas ao escuro, na noite anterior, e pela manhã, foi realizada a leitura da fluorescência da clorofila a.

Enquanto os centros de reação estiveram completamente abertos com perda de calor mínima foi medida a fluorescência inicial ( $F_0$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ). A partir desses valores, foi calculado o rendimento quântico potencial do PSII,  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F$  (Genty et al., 1989).

Após a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante foi avaliada a fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação ( $F$ ) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz ( $F_m'$ ). A partir desses resultados, foi possível calcular a fluorescência mínima do órgão iluminado  $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0/F_m) + (F_0/F_m')]$  (Oxborough e Baker, 1997). Foi calculado o coeficiente de extinção fotoquímico pela fórmula  $qL = qp \cdot (F_0'/F)$  (Kramer et al., 2004). A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi calculada segundo Bilger et al. (1995),  $ETR = YII \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$ , onde  $YII = (F_m' - F_v)/F_m'$ ;  $PAR = 0,37$  é o fluxo de fótons ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII; 0,84 corresponde a fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas. Foram realizadas cinco leituras, com intervalos de quatro dias ao longo do experimento. A temperatura e a concentração de  $\text{CO}_2$  era ambiente, com uso de buffer. As leituras foram realizadas entre 8:00 e 12:00 da manhã.

#### - Caracterização anatômica

Para a caracterização anatômica, os meristemas apicais caulinares, nectários peciolares e fragmentos do folíolo apical, de folhas do primeiro ao quarto nó, foram fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (Karnovsky, 1965, modificado).

Amostras de nectários extraflorais do primeiro ao quarto nós também foram fixadas com sulfato ferroso e formalina 4% (Johansen, 1940) por 48 horas com o devido controle, para evidenciar os compostos fenólicos.

A fixação química foi seguida de desidratação em série etílica e a inclusão foi em resina glicol-metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras incluídas em metacrilato foram seccionadas a 5µm de espessura, transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com utilização de navalhas de vidro.

Para caracterização estrutural, as lâminas foram coradas com Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0 (Vidal, 1977).

Para os testes histoquímicos, nectários peciolares do primeiro ao quarto nó e fragmentos da lâmina foliar do segundo nó, não submetidos à fixação, foram seccionados longitudinalmente utilizando-se micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil).

Para os testes as amostras frescas seccionadas foram submetidas aos reagentes com: Sudan III (Pearse, 1980), para a detecção de lipídios totais; Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981), para evidenciação de alcalóides; Reagente de Nadi (David e Carde, 1964), para óleos essenciais e oleoresinas (Jensen, 1962).

As amostras de nectários incluídas em historesina foram submetidas aos reagentes: lugol (Johansen, 1940), para detecção de amido; xylidine ponceau 1% pH=2,5 (Vidal, 1970), para evidenciação de proteínas totais; vermelho de rutênio (Johansen, 1940), para pectinas e mucilagens; azul de alcião pH=2,5 (Pearse, 1980), para mucopolissacarídeos ácidos; sudan black B (Benes, 1964 modificado; Pearse, 1980, modificado), para localização de lipídios estruturais. A detecção de compostos fenólicos totais foi realizada com a fixação em sulfato ferroso e formalina 4% e a posterior inclusão em resina e seccionamento.

As lâminas de material incluído em resina foram montadas em Permunt (Kraus e Arduin, 1997), e as utilizadas na histoquímica foram montadas em água (Johansen, 1940).

Amostras de meristemas apicais caulinares, da lâmina foliar e de nectários de *J. princeps*, do primeiro ao quarto nó de ambos tratamentos, foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), a fim de avaliar a superfície. Para isto, após a fixação em Karnovsky (Karnovsky 1965, modificado), as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% preparado no mesmo tampão do Karnovsky (Bozzola e Russel 1992). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série

etífica, e levadas à secagem ao ponto crítico (Bozzola e Russel 1992), utilizando-se equipamento (modelo CPD030, Bal-Tec Balzers, Liechtenstein). Após a montagem do material nos suportes, houve a deposição metálica com ouro (Bozzola e Russel 1992) utilizando-se equipamento Sputter Coater (modelo FDU 010 da Balzers, Liechtenstein). A investigação e a documentação do material foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo Leo 1430VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra).

- Análises estatísticas

O experimento I consistiu de dois tratamentos: (i) nevoeiro ácido com pH=3,0; e (ii) controle com pH=6,0, com 10 unidades amostrais por tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a unidade experimental foi composta por uma planta por vaso.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste t e regressão não linear realizados nos programas Excel e SISVAR ( $P < 0,05$ ).

• **Experimento II: Exposição de plantas jovens de *Joannesia princeps* ao nevoeiro ácido por 3 dias**

- Exposição ao nevoeiro ácido

Mudas de *J. princeps* com seis a sete meses e possuindo quatro folhas ( $n=8$ ), previamente selecionadas, de acordo com o experimento I, foram submetidas, diariamente, a nevoeiros ácidos simulados com duração de 15 minutos cada. A câmara de simulação utilizada e os detalhes de aplicação do nevoeiro segue o explicado para o experimento I. Um grupo de mudas ( $n=8$ ), não foi submetido aos poluentes e permaneceu na casa de vegetação sendo utilizado como referência.

De cada tratamento, quatro indivíduos foram utilizados para a coleta dos voláteis e os outros, para as demais análises.

- Sintomatologia visual

A sintomatologia visual dos danos encontrados nas plantas expostas ao nevoeiro ácido foi avaliada, como relatada para o experimento I.

#### - Determinação de pigmentos

O índice SPAD foi avaliado no folíolo apical das folhas marcadas no segundo nó, 24 horas após a última exposição aos poluentes, utilizando-se o medidor portátil de clorofila SPAD (modelo 502, Minolta Camera Co. Ltd.). Foram feitas três leituras no mesmo folíolo. Após obtenção da média para cada folha amostrada, foi calculada a média para cada tratamento.

Os teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides foram determinados com a utilização do extrator dimetilsulfóxido (DMSO), como realizado no experimento I.

#### - Fluorescência da Clorofila a

As medições das variáveis de fluorescência da clorofila a, foram realizadas, como explicitado no experimento I, com o auxílio de um fluorômetro de pulso modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Foram realizadas duas leituras 24 horas após a última exposição aos poluentes. Para a primeira leitura, os folíolos avaliados foram adaptados ao escuro na noite anterior à leitura da fluorescência da clorofila a. Para a segunda leitura, os folíolos foram adaptados à luz

#### - Análise dos compostos orgânicos voláteis

A coleta dos compostos orgânicos voláteis (COV) da parte aérea das plantas foi realizada com a utilização de campânulas de vidro com fluxo constante de ar filtrado promovido por compressor e bombas de sucção numa vazão de 0.8 L/s. À saída de ar das campânulas foram colocados tubos com solução adsorvedora do tipo Super Q (Figura 2 A). As aerações foram realizadas num período de 24 horas e, ao final de cada aeração, os filtros foram lavados com 400µL de hexano. Alíquotas desta solução foram injetadas em cromatógrafo gasoso (modelo 17A v3, Shimadzu, Ozaka, Japão), acoplado ao espectrômetro de massa. A rampa de aquecimento do forno do cromatógrafo utilizada teve temperatura inicial de 35°C, sendo imediatamente aquecido a uma taxa de 5°C/min até chegar à temperatura de 280°C, na qual permaneceu por 5 minutos, completando a rampa de aquecimento.

Os compostos foram identificados com o programa GCMS Postrun Analyses (GCMS Solution, version 2.7, Shimadzu, Ozaka, Japão), utilizando as bibliotecas NIST08.LIB, NIST08s.LIB, Willey 7, LSCI e FFNSC 1.3, quantificados

individualmente em relação ao peso vivo da parte aérea de *J. princeps* de acordo com a área interna de seus respectivos picos.

- Caracterização anatômica

Os nectários peciolares e fragmentos da lâmina foliolar do primeiro ao quarto nós foram fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (Karnovsky, 1965, modificado).

A fixação foi seguida de desidratação em série etílica/butílica e a inclusão em Histosec®, conforme recomendação do fabricante.

As amostras incluídas em Histosec foram seccionadas a aproximadamente 5µm de espessura, transversal ou longitudinalmente, em micrótomo rotativo Spencer (modelo 820, American Optica, EUA) com utilização de navalhas de descartáveis.

Para caracterização estrutural, as lâminas foram coradas com Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,4 (Vidal, 1977).

Para os testes histoquímicos, nectários peciolares do primeiro ao quarto nós não submetidos à fixação e fragmentos de lâmina foliar foram seccionados utilizando-se micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil).

Amostras frescas foram seccionadas e coradas com Sudan Black B (Pearse 1980) para a detecção de lipídios totais; Reagente de Nadi (David & Carde, 1964), para óleos essenciais e oleoresinas; Reagente de Wagner (Furr & Mahlberg, 1981), para evidenciação de alcalóides, e lugol para detecção de amido (Jensen, 1962).

A montagem das lâminas de material incluído em parafina foi feita em Permount (Kraus e Arduin (1997); as lâminas utilizadas na histoquímica foram montadas em água (Johansen, 1940) ou em tampão fosfato de acordo com a indicação do teste.

Para análise e documentação fotográfica foi utilizado o fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com o sistema Axio Vision (Zeiss) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

## Resultados

### Experimento I: Exposição de plântulas de *Joannesia princeps* ao nevoeiro ácido por 20 dias

#### - Análises estatísticas

O experimento II consistiu de três tratamentos: (i) nevoeiro ácido com pH=3,0; (ii) referência, cujas plantas não foram expostas aos poluentes. Foram utilizadas 4 unidades amostrais por tratamento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e a unidade experimental foi composta por uma planta por vaso.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste t nos programas Sigma Plot 12.2 e SISVAR ( $P < 0,05$ ).

#### - Análise biométrica

O comprimento foliar (folha marcada) e o crescimento na altura das plantas de *J. princeps* expostas ao nevoeiro ácido não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação às plantas do tratamento controle (Figura 3 A, B). As folhas jovens, que surgiram após o início do experimento, apresentaram menor comprimento que as folhas do tratamento controle (Figura 3 C).

#### - Sintomatologia visual

As folhas das mudas de *J. princeps* submetidas ao nevoeiro com pH=6,0 não apresentaram alterações visuais (Figura 4 A). Também não foram observadas alterações nas folhas de *J. princeps* após a primeira exposição ao nevoeiro ácido.

Após a segunda exposição ao nevoeiro ácido, surgiram as primeiras necroses, as quais se apresentam como pontos negros na nervura principal do folíolo apical. No decorrer dos dias, formaram-se aréolas bronzeadas ao redor dos pontos negros (Figura 4 B).

Com o decorrer das exposições, novas necroses foram verificadas. Estas eram pontuais, ocupando regiões venais, intervenais e marginais da lâmina foliar. Algumas folhas ficaram encarquilhadas e enrugadas (Figura 4 B, C).

Após as simulações aos nevoeiros, as gotas permaneciam aderidas aos folíolos principalmente na face adaxial, na porção basal apical e na face adaxial; nas

calhas da face adaxial nos peciólulos; e nos nectários, envolvendo o par de glândulas do ápice do pecíolo (Figura 4 D, E), ou formando gotas menores no ápice de cada glândula (Figura 4 F, G). As nervuras de folhas a partir do quarto nó apresentaram enegrecimento e (Figura 4 H). Os nectários apresentaram necroses pontuais, principalmente em sua posição lateral (Figura 4 H, I, J).

Com a exposição diária das plantas ao nevoeiro ácido, o aumento no número de necroses se intensificou entre o 7º e o 13º dia. Após este período, a intensidade do surgimento de necroses diminuiu (Figura 5).

#### - Determinação de pigmentos

A concentração de clorofila total pelo método SPAD, ao final do experimento, foi maior em plantas do tratamento controle apresentando diferença significativa em relação às plantas do tratamento com nevoeiro ácido (Figura 6A). Entretanto, nas avaliações diárias não apresentaram diferença significativa (Figura 6B).

Os teores de clorofila total e carotenoides, bem como as razões de clorofila a/b não apresentaram diferença significativa das plantas expostas ao nevoeiro ácido em relação ao tratamento controle (Figura 6 B, D, E), enquanto a razão clorofila total/carotenoide foi menor no tratamento com nevoeiro ácido em relação ao controle (Figura 6 F).

#### - Determinação das trocas gasosas

As análises dos parâmetros de trocas gasosas realizadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Figura 7).

#### - Fluorescência da clorofila a

Os parâmetros de fluorescência da clorofila a não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Figura 8).

#### - Caracterização anatômica

As folhas de *J. princeps* são dorsiventrais e hipoestomáticas, com uma camada de parênquima paliádico e cinco a seis camadas de parênquima lacunoso. A nervura principal possui uma camada de colênquima angular subjacente à epiderme

abaxial e um feixe que forma uma cunha sob a epiderme adaxial. O feixe vascular da nervura principal é colateral. Ocorrem laticíferos e idioblastos cristalíferos contendo drusas ou compostos fenólicos dispersos pela lâmina foliar (Figura 9 A).

Os nectários de *J. princeps* possuem pedúnculo e porção secretora (Figura 9B). No pedúnculo (Pd), a epiderme é tabular e subjacente a esta ocorre parênquima clorofiliano envolvendo o sistema vascular, que é constituído por feixes vasculares que delimitam uma medula parenquimática. A porção secretora (S) é dilatada, o ápice é achatado e na borda possui células epidérmicas ordinárias tabulares rodeando a epiderme secretora constituída de células altas formando uma paliçada. A epiderme secretora é recoberta por cutícula espessa a qual apresenta porções mais delgadas e flanges conspícuas. Há formação de câmara subcuticular com deposição de secreção com posterior rompimento e liberação do exsudado (Figura 9 C).

Subjacente à epiderme secretora há camadas de parênquima nectarífero, cujas paredes se coram diferencialmente das demais células parenquimáticas, assumindo a coloração azul claro com azul de toluidina e não se coram com vermelho de rutênio e azul de alcão. Ocorrem laticíferos ramificados articulados adjacentes ao floema desde a base até a porção distal do nectário (Figura 9 D).

Os testes histoquímicos realizados para detectar a presença de açúcares redutores e pectinas nos tecidos dos nectários tiveram resultado positivo para as paredes celulares da epiderme secretora no primeiro nó, nas paredes do parênquima. A presença de mucopolissacarídeos ácidos foi evidenciada pelo azul de alcão em idioblastos cristalíferos e na câmara subcuticular. O vermelho de rutênio corou as paredes da epiderme secretora nos nectários do primeiro nó e as paredes das células parenquimáticas de nectários do primeiro ao quarto nó. Nos nectários, em ambos os tratamentos, os testes para alcaloides apresentaram resultado negativo e o teste para proteínas evidenciou proteínas estruturais (Figura 9 C). Os testes para lipídeos reagiram positivamente na cutícula, evidenciado a porção mais espessada desta sobre as células secretoras no ápice da glândula.

Na lâmina foliar, a reação para terpenoides foi positiva na cutícula, nos cloroplastos no mesofilo e na nervura principal, em gotas nos laticíferos, nas paredes dos elementos de vaso em ambos os tratamentos. Nas folhas de plantas expostas ao nevoeiro ácido houve reação positiva para terpenoide nos espaços intercelulares. No nectário, a reação foi positiva nas células epidérmicas em ambos os tratamentos e

subjacentes a estas, nos nectários expostos ao nevoeiro ácido. As células marcadas de azul, com o reagente de Nadi, não foram marcadas em testes para detecção de lipídeos. A reação para resinas foi negativa com o reagente de Nadi.

Na lâmina foliar, o teste com lugol foi positivo no parênquima paliçádico e lacunoso. Na nervura principal, a reação foi positiva no parênquima. Nos nectários, em ambos os tratamentos, o lugol não evidenciou acúmulo de amido.

Em ambos os tratamentos foram evidenciadas gotas de compostos fenólicos no parênquima paliçádico e idioblastos no parênquima lacunoso na lâmina foliar. No nectário, houve reação positiva nas células ordinárias da epiderme, em idioblastos nos tecidos parenquimáticos. Nas folhas expostas nevoeiro ácido houve acúmulo de compostos fenólicos em células adjacentes às necroses.

#### - Alterações estruturais em microscopia de luz

As plantas expostas à chuva ácida apresentaram alterações morfológicas observadas em microscopia de luz e eletrônica.

Na lâmina foliar ocorreram necroses em áreas com acúmulo de compostos fenólicos, colapso celular, e aspecto plasmolisado das células. Entre a área necrosada e a área saudável, foram encontradas hiperplasia, com multiplicação celular desordenada e hipertrofia celular, com células de tamanho maior que as demais.

As necroses do pedúnculo dos nectários se caracterizam por afastamento de células parenquimáticas subjacentes à epiderme com extravasamento de conteúdo celular e acúmulo de secreção entre as paredes. Há conteúdo com aparência granular e/ou fibrilar no interior das células. Houve a formação de espaços subepidérmicos com ou sem o rompimento da epiderme (Figura 12 A), a qual pode apresentar-se como uma superfície. A cutícula foi afetada tanto na lateral da glândula como na superfície secretora, destacando totalmente ou desprendendo placas.

Em nectários do segundo nó ocorreu a formação de zona de abscisão na base dos nectários (Figura 12 B, C), cujo tecido de cicatrização continha em média de seis camadas celulares (Figura 12 C). Na porção secretora, houve acúmulo de compostos fenólicos na epiderme secretora (Figura 12 D, E).

- Alterações estruturais em microscopia eletrônica de varredura

Os meristemas das plântulas de *J. princeps* submetidos ao nevoeiro ácido não apresentaram diferença estrutural em relação aos do controle (Figura 13).

No nectário do primeiro nó, de plantas submetidas ao nevoeiro com pH=6,0 a epiderme é homogênea e sem desprendimento de ceras epicuticulares (Figura 13 A). Do segundo ao quarto nó, ocorre secreção sobre a epiderme, a qual apresenta desprendimentos das ceras nos locais onde ocorrem hifas fúngicas (Figura 13 D, G, J).

Nos nectários do primeiro nó de plantas submetidas ao com pH=3,0, a cera epicuticular se desprende parcialmente expondo perfurações na cutícula (Figura 13 B e C). No segundo nó, são observadas fendas nas laterais do nectário, onde as hifas fúngicas crescem ocupando o lume (Figura 13 F). No terceiro nó, há acúmulo de secreções junto com as placas de cera descoladas (Figura 13 H e I). No quarto nó, ocorreu enrugamento e descolamento parcial das ceras epicuticulares com deslocamento da secreção (Figura 13 L) e células com aspecto plasmolizado (Figura 13 M).

## **Experimento II: Exposição de plantas jovens de *Joannesia princeps* ao nevoeiro ácido por 3 dias**

- Sintomatologia visual

Ao final do experimento as mudas de *Joannesia princeps* de referência não apresentaram alterações visuais (Figura 14A).

Após a terceira exposição das mudas ao nevoeiro ácido, seus folíolos apresentaram necroses caracterizadas como manchas negras pontuais, intervenais e marginais nas lâminas foliares de folhas jovens (Figura 14 B). Necroses foram observadas em peciólulos e pecíolos, incluindo os nectários.

- Determinação de pigmentos

O índice SPAD, os teores de clorofila total e carotenoides, bem como as razões de clorofila a/b e clorofila total/carotenoides, não apresentaram diferença significativa das plantas expostas ao nevoeiro ácido em relação ao tratamento controle (Figura 15).

- Fluorescência da clorofila a

Para os parâmetros da fluorescência da clorofila a ( $F_0$ ,  $F_v/F_m$ ,  $F_v'/F_m'$ ,  $\phi$ PSII, ETR, qL, qP) não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos (Figura 16).

- Compostos voláteis

Dos 54 compostos orgânicos voláteis identificados, 16 são comuns aos dois tratamentos, a saber: nonano; decano; mesytilene;  $\beta$ -myrcene; acetato de 3-hexen-1-ol; limoneno;  $\beta$ -ocimeno; hexanol-2-etil; 4,8,dimetil-1,3,7-nonatrieno; dodecano; decanal; octadecano e ciclohexanol-5-metil-2; tridecano; nonadecano; tetracontano; Nas plantas jovens de *J. princeps* do tratamento referência foram identificados 49 compostos orgânicos voláteis (COV) (Figura 12 A). Os compostos mais proeminentes foram 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene (EDMTT ou DMNT); metil salicilato;  $\beta$ -ocimeno; triacontano e hexametiltetracosano (esqualeno) (Figura 17 A)..

Nas plantas jovens de *J. princeps* expostas ao nevoeiro ácido foram identificados 51 COVs (Figura 12 B). Os compostos mais proeminentes são triacontano; hexacosano; pentacosano; benzene carbinol (fenilcarbinol) e tridecano (Figura 17 B).

- Caracterização anatômica

Os resultados dos testes do segundo tratamento apresentam-se semelhantes aos do primeiro experimento, apesar de utilizar técnicas diferentes.

Nos nectários das plantas de referência, a coloração com azul de toluidina corou de azul escuro as paredes celulares dos nectários e a cutícula; de azul claro a ciano as paredes das células do parênquima nectarífero e elementos de vaso; de verde o conteúdo das células com compostos fenólicos; e um matiz de azul até roxo a secreção acumulada na câmara subcuticular, indicando a presença de polissacarídeos ácidos (Figura 18)..

Nos nectários das plantas expostas ao nevoeiro, a coloração com azul de toluidina corou de azul escuro as paredes celulares e a secreção na câmara subcuticular; de azul claro a ciano as células do parênquima nectarífero e a cutícula; de verde o conteúdo de células com compostos fenólicos. As células secretoras se apresentaram mais integras em relação às dos nectários da referência, apesar das

demais células apresentam paredes disformes, com aparência de desidratação do protoplasto e também das paredes.

Em ambos tratamentos foram evidenciados compostos fenólicos em células epidérmicas ordinárias e secretoras, principalmente em locais onde houve o deslocamento da cutícula para a formação da câmara. Laticíferos, células parenquimáticas subjacentes à epiderme e adjacentes aos tecidos vasculares também assumiram coloração castanho escuro a negro com cloreto férrico.

As amostras submetidas ao Sudan black B evidenciaram a cutícula e lipídeos estruturais nos tecidos foliares, tanto no limbo quanto na glândula em ambos tratamentos.

A reação com o NADI foi positiva, corando de azul gotas que não reagiram com Sudan black B na epiderme e mesofilo dos folíolos, nos laticíferos, no parênquima fundamental, nas células secretoras e ordinárias da epiderme dos nectários.

A reação para detecção de alcaloides não foi positiva em ambos tratamentos.

As células do mesofilo e do parênquima fundamental na nervura principal dos folíolos reagiram positivamente com o lugol, não houve reação nas células dos nectários assim como no experimento 1.

#### - Alterações estruturais em microscopia de luz

As alterações observadas sobre nervuras como pontos negros margeados por uma aréola amarela ou marrom, em corte transversal, apresentam-se como enegrecimento e rupturas na cutícula e parede periclinal externa de células epidérmicas; formação de uma cunha composta de camadas de células parenquimáticas com paredes disformes subjacentes à epiderme; citoplasma com numerosas gotas de coloração castanho (Figura 19), cujas células que as apresentam correspondem às que reagiram positivamente aos testes para detecção de compostos fenólicos e formavam a aréola amarela ou bronzeada ao redor da necrose nas amostras do experimento 1.

### **Discussão**

As alterações morfológicas e químicas encontradas neste trabalho demonstram que o nevoeiro ácido pH=3,0 afeta a estrutura foliar de *Joannesia*

princeps, assim como já relatado para a chuva ácida pH=3,0 nesta espécie (Silva et al., 2005; Castro, 2008).

Em *J. princeps*, o crescimento foliar varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, apresentando maior sensibilidade em folhas mais jovens. De fato, as folhas que já se encontraram desenvolvidas quando as plantas foram expostas ao nevoeiro ácido tendem a ter maior resistência do que as folhas que se desenvolvem enquanto as simulações ocorrem, tendo em vista que a estrutura anatômica ainda não está totalmente diferenciada nas plântulas.

A ausência de alterações no crescimento em altura observado no experimento I também foi observada por Castro (2008) ao submeter plântulas de *J. princeps* ao nevoeiro ácido simulado com pH=4,5. Indivíduos de *Helianthus annuus* expostos à chuva ácida com pH=5,7; 4,5 e 3,0 (Lal e Singh, 2012) e plântulas de espécies arbóreas, como a macieira, ao serem expostas à precipitação com pH abaixo de 2,75 (Evans, 1984,), apresentaram o mesmo comportamento. Silva et al. (2005), após expor plântulas e mudas de *J. princeps* à chuva ácida com pH=3,0, encontraram menor crescimento nas plântulas expostas à chuva ácida, mas nas mudas não houve diferença significativa. Os dados deste trabalho corroboram os dados de Silva et al. (2005) e deve-se ressaltar a importância do estágio de desenvolvimento das plantas na sensibilidade de *J. princeps* à chuva ácida.

A aparência das necroses observadas em *J. princeps* tem o aspecto e localização semelhante ao descrito por Fan e Wang (2000) para cinco espécies arbóreas submetidas à chuva ácida simulada, todavia, este não tenha descrito surgimento de necroses venais.

Os resultados das análises de pigmentos refletem o dano acumulado e a tendência de diminuição dos teores de pigmentos fotossintetizantes. Os teores de pigmentos aferidos estão de acordo com o índice SPAD medido ao final do experimento. De acordo com Giri (2013), os pigmentos existem em um equilíbrio sob reações fotoquímicas como oxidação, redução, feofitinação e branqueamento reversível.

A baixa razão clorofila total/ carotenoides no tratamento com nevoeiro ácido em relação ao controle está relacionado ao estresse (Giri et al., 2013). Indivíduos de *Azadirachta indica*, *Mangifera indica*, *Nerium oleander* e *Delbergia sissoo* também apresentaram valores da razão clorofila total/carotenoide mais baixos em plantas

expostas a poluentes atmosféricos em relação ao controle (Giri et al., 2013). Entretanto, Petrova (2011) apresentou dados sobre estudos de poluição atmosférica utilizando *Betula pendula*, os quais demonstram aumento no teor de clorofilas em um grupo de plantas e decréscimo em outro grupo, em testes no mesmo período, mas em locais diferentes da cidade de Plovdiv. Segundo este autor, houve apenas a degradação de pigmentos de algumas plantas e em outras, concomitante à degradação dos pigmentos, houve também aumento dos pigmentos como mecanismo compensatório.

Os parâmetros de trocas gasosas deste estudo indicam que não houve alteração na resistência estomática, assim como foi observado por Castro (2008) ao expor *J. princeps* em campo às emissões de uma siderúrgica. Em plantas cuja resistência estomática diminui em resposta à precipitação ácida, há propensão ao estresse hídrico e aumento na sensibilidade aos poluentes gasosos (Evans, 1984).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila a não apresentaram alterações em *J. princeps*. O intervalo de tempo entre a exposição ao nevoeiro e as análises, pode ter afetado a detecção de episódios de fotoinibição dinâmica. O período de 24 horas é suficiente para o reestabelecimento de equilíbrio da concentração dos pigmentos, pois esta espécie é tolerante à altas taxas de irradiação solar e não apresenta variação da taxa de assimilação aparente de carbono (A) em condições de estresse luminoso (Dos Anjos et al., 2012).

O rompimento de ceras epicuticulares e orifícios observados na cutícula foram decorrentes do nevoeiro ácido, o qual modifica a estrutura química e as propriedades da cutícula através contato direto com a superfície da planta, aumentando a permeabilidade aos íons  $H^+$  e  $S^-$ , conforme citado por Baker e Hunt (1986). A cutícula pode repelir a água e permitir que a folha se seque rapidamente, evitar a lixiviação de íons e solutos polares da planta e diminuir a formação de ambiente propício para a colonização por microrganismos potencialmente prejudiciais (Riederer, 2006; Shigihara et al. 2009), além de prevenir a perda de hidratação (Shigihara et al. 2009). Porém, a deposição ácida acelera a fusão e a erosão de ceras e muda a composição química, aumentando a possibilidade de difusão de  $H^+$  para o interior da folha, a lixiviação dos nutrientes, alterando o equilíbrio iônico e iniciando o processo de morte celular (Shigihara et al., 2009).

No mesofilo, entre as células necrosadas e as saudáveis, ocorre multiplicação celular formando um tecido de cicatrização. Adjacentes a estas, ocorrem células com acúmulo de compostos fenólicos. Estes tipos celulares ocupam a área correspondente às aréolas bronzeadas ao redor dos pontos negros vistos na lâmina foliar. As necroses observadas nas folhas de *J. princeps*, são semelhantes às descritas por Silva et al. (2005), após expor plântulas de *J. princeps* à chuva ácida com pH=3,0 e semelhantes às descritas por Castro (2008), ao expor plântulas de *J. princeps*, em campo, às emissões de uma siderúrgica e ao nevoeiro simulado com pH=4,0. Contudo, não foi descrito tecido de cicatrização nas necroses visualizadas em folhas de *J. princeps* no trabalho de Castro (2008).

*J. princeps* responde nevoeiro ácido com um período inicial de adaptação, provavelmente utilizando compostos previamente existentes na planta, sejam esses constitutivos ou induzidos. Com a continuidade da exposição, o sistema de reparo celular se torna insuficiente para impedir injúrias e estas aumentam em número exponencial no tecido foliar. A intensidade do surgimento de necroses diminui após alguns dias provavelmente, pela expressão de genes e modificação de proteínas, elicitados pelo nevoeiro ácido. Estas respostas estão de acordo com os padrões biológicos de defesa discutidos por Barnes et al. (2007). O aumento de necroses na lâmina foliar de *J. princeps*, ao longo da exposição ao nevoeiro ácido não ocorre de forma linear como foi exposto Evans (1982; 1984) a partir dos dados obtidos em experimentos com outras espécies tanto arbóreas quanto herbáceas.

Com relação às alterações observadas nos nectários, muitas destas ocorreram ao longo do pedúnculo e, provavelmente, decorrentes do acúmulo as gotas de chuva, favorecida pelo relevo da superfície. As alterações ocorreram de forma mais acentuada nas laterais dos nectários e em alguns locais da superfície secretora, provavelmente nos locais onde a cutícula é menos espessa. Além da cutícula espessa e com flanges conspícuas (Silva et al., 2005, a secreção pode estar protegendo a superfície secretora. De acordo com Evans (1984), a capacidade de tamponamento nas superfícies das plantas pode diferir e a acidez das gotas pode ser alterada por compostos químicos como o néctar existente na superfície do nectário, visto que os açúcares podem reagir com o nevoeiro ácido, diminuindo o número de prótons livres.

A ausência de alcaloides nos nectários de *J. princeps* pode ser entendida como uma estratégia de defesa presente em espécies perenes e de crescimento lento,

as quais investem em outros compostos como os taninos (Feeny, 1992; Trigo et al., 2000)

O teste com lugol não evidenciou acúmulo de amido nos tecidos do nectário de *J. princeps* em ambos os experimentos, indicando que o nevoeiro ácido não altera este padrão em *J. princeps* e corrobora com Pacini et al. (2003), o qual afirma que em nectários extraflorais a produção dos carboidratos do néctar é resultado direto da fotossíntese sem o armazenamento destes em forma de amido na glândula das espécies estudadas.

Nas amostras foram evidenciados sítios com terpenoides que não foram marcados com testes para lipídeos, estas devem conter terpenoides não lipídicos. Provavelmente, os cloroplastos tiveram reação positiva com o Reagente de Nadi pela presença dos pigmentos fotossintetizantes clorofila a e b e carotenoides que são terpenoides de cadeias pesadas. As gotas presentes nos laticíferos podem ser látex ou guta, porém, são necessários testes específicos para a identificação destes compostos.

Verificou-se que após a exposição de *J. princeps* ao nevoeiro ácido simulado, além das alterações na lâmina foliar observadas anteriormente, ocorrem também necroses nos nectários do ápice do pecíolo.

No experimento II, os sintomas apresentados por *J. princeps* após exposição ao nevoeiro ácido, foram perceptíveis principalmente nas folhas como necroses pontuais em folhas jovens causadas por chuva ácida seguindo o padrão de respostas visuais apresentado por trabalhos anteriores em *J. princeps* (Silva et al, 2005) e outras espécies (Evans, 1987; Esposito et al., 2009).

Dos compostos orgânicos voláteis (COV) coletados em *J. princeps*, os três mais proeminentes no controle [4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene (EDMTT ou DMNT); metil salicilato;  $\beta$ -ocimeno] estão relacionados à interação planta-planta, responsáveis por elicitar a resposta a ataques de herbívoros, sendo induzidos por herbivoria (Arimura et al., 2009).

O DMNT é predominante em *Vigna unguiculata* e tem o aumento de sua produção induzido por peptídeos presentes na saliva da larva de *Spodoptera frugiperda*. Este volátil é detectado em numerosas vespas parasitoides e atrai inimigos naturais de herbívoros (Holopainen, 2004; Schmelz et al, 2012). A presença de DNMT na família Euphorbiaceae não foi citada nos registros como constituinte de

plantas intactas e apenas seus precursores (  $\beta$ -farnesene e  $\alpha$ -farnesene) foram encontrados em espécies do gênero *Croton* (Pino et al., 2006).

O DMNT encontrado em *J. princeps*, provavelmente foi produzido inicialmente, pelos dois grupos de plantas, que estavam sob as mesmas condições de cultivo. O mecanismo que elicitou tal composto não foi elucidado, visto que não foi verificada a presença de herbívoros nem áreas afetadas na parte aérea das plantas. Supõe-se que jasmonatos provenientes de culturas senescentes presentes na casa de vegetação possam ser os elicitores do DMNT. A diferença na quantidade deste composto aferida nos dois grupos, provavelmente está atrelada a mudanças metabólicas induzidas pelo nevoeiro ácido, as quais implicaram na diminuição de DMNT e podem prejudicar o sistema de defesa contra herbívoros em *J. princeps*.

Os compostos  $\beta$ -ocimeno e o 6-metil-5-hepten-2-ona encontrados em *J. princeps* foram encontrados também em três das espécies estudadas por Pino et al. (2006), como componentes constitutivos das espécies de *Croton* estudadas. O COV  $\beta$ -ocimeno foi encontrado em ambos os tratamentos, porém em maior quantidade em indivíduos da referência. Sabe-se que a via de síntese deste composto é dependente da luz e este é emitido por folhas intactas durante o dia (Frost et al., 2008), enquanto o COV 6-metil-5-hepten-2-ona foi encontrado somente em plantas expostas ao nevoeiro ácido.

O COV 3-hexen-1-ol (z3HOL) é derivado do ácido linolênico por um ramo da via octadecanoide, é um precursor do volátil de folhas verdes cis-3-hexenil acetato (z3HAC), cuja transformação final é realizada pela enzima aciltransferase, tendo seu conteúdo aumentado na planta mediante herbivoria ou recepção (Frost et al., 2008). Ambos estão presentes em *J. princeps* e são associadas à regulação de genes como as proteinases que inibem a produção de proteínas no intestino de herbívoros; a deidroflavonol redutase, que atua na biossíntese de taninos condensados que detém muitos herbívoros; a isoflavona redutase, que catalisa fitoalexinas, as quais são potentes antifúngicos (Frost et al., 2008). O terceiro composto mais proeminente nas análises de *J. princeps*, ocorrendo em todos os tratamentos foi o triacontano, o qual constitui-se de uma cadeia linear com 30 carbonos e é descrito como constituinte da cutícula de diversas espécies. Os picos identificados pelo CG-MS como triacontanos, foram observados mais de uma vez em diferentes tempos de retenção, provavelmente, pela presença de isômeros. Os maiores picos foram encontrados nas

plantas do tratamento com nevoeiro ácido pH=3,0, provavelmente, causado pela reação de hidrólise de moléculas presentes na superfície foliar, favorecendo assim, a degradação das ceras epicuticulares e a formação de orifícios na cutícula.

Os carotenoides, particularmente a xantofila zeaxantina, facilitam a dispersão térmica (NPQ), na ausência desta molécula, há aumento nos danos foto-oxidativos gerando necroses e até a morte (Demming-Adams e Adams, 2000).

Conclui-se que as folhas mais jovens apresentam sensibilidade diferenciada ao nevoeiro ácido, com o aparecimento precoce de sintomas distintos aos apresentados pelas folhas maduras. A sintomatologia visual tem demonstrado resultados expressivos com relação aos parâmetros fisiológicos e químicos. As necroses são facilmente detectáveis e passíveis de quantificação. Os testes histoquímicos, a quantificação e a identificação dos COVs são métodos mais refinados e indicam como a planta reage ao estresse causado pelos poluentes. As informações provenientes deste trabalho permitem compreender a ocorrência de estratégias diferentes como resposta para os poluentes atmosféricos em *Joannesia princeps*.

## Considerações finais

Ao final deste trabalho podemos afirmar que:

- As alterações estruturais causadas pelo nevoeiro ácido em *Joannesia princeps*, inicialmente, são perceptíveis ao nível celular, requerendo o uso de técnicas de anatomia vegetal para a visualização e compreensão dos danos;
- A exposição prolongada das plantas ao nevoeiro ácido torna o dano visível, aumentando o número de necroses por todo o folíolo e nectário no decorrer dos dias;
- Os nectários extraflorais de *J. princeps* apresentam necroses pontuais, nas laterais da glândula, principalmente no pedúnculo, quando expostos ao nevoeiro ácido;
- O nevoeiro ácido acelera a senescência dos nectários, havendo o desprendimento da glândula em folhas ainda em expansão;
- O índice SPAD se mostrou eficiente e prático na detecção de alterações na concentração de clorofila ao longo das exposições, visto que requer pouco tempo, é um método não invasivo ou destrutivo;
- O nevoeiro ácido modifica a quantidade dos compostos orgânicos voláteis constitutivos e aumenta a volatilização de moléculas provenientes da quebra de moléculas da cutícula e ceras epicuticulares;

Verificando as alterações morfológicas e químicas, podemos inferir que a relação entre o ambiente e indivíduos de *Joannesia princeps* expostas ao nevoeiro ácido, pH=3,0, pode ser modificada. Outros estudos poderão informar, com maior precisão, as consequências na variação dos infoquímicos e da recompensa energética através dos nectários e assim compreender a possibilidade de prejuízos e estratégias para mitigar estes eventos.

## Referências

- Arimura, G.; Kost, C.; Boland, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defence. **Biochimica et Biophysica Acta 1734**: 91-111.
- Balbach, A. 1981. **As plantas na medicina doméstica**. Vol. II. Edel, São Paulo.
- Baker, E. A.; Hunt, G. M. 1986. Erosion of waxes from leaf surfaces by simulated rain. **The New Phytologist 102**: 161-173.
- Barnes, J.; Davison, A.; Balaguer, L.; Manrique-Reol, E. 2007. Resistance to Air Pollutants: From Cell to Community. In: Pugnaire, F. I.; Valladares, F. eds. **Functional Plant Ecology**. 2º Ed. CRC Press, New York. p. 601-605.
- Benes, K. 1964. Detection of lipids in plant meristematic cell with aid of sudan black staining. **Biologia Plantarum 6**: 142-151.
- Bilger, W., Schreiber, U.; Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia 102**: 425-432.
- Bittner, M.; Alarcón, J.; Aqueveque, P.; Becerra, J.; Hernández, V.; Hoeneisen, M.; Silva, M. 2001. Estudio químico de espécies de la família Euphorbiaceae em Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química 46**: 419-431.
- Blande, J. D.; Holopainen, J. K.; Li, T. 2010. Air pollution impedes plant-to-plant communication by volatiles. **Ecology Letters 13**: 1172–1181
- Blande, J. D.; Li, T.; Holopainen, J. K. 2011. Air pollution impedes plant-to-plant communication, but what is the signal? **Plant Signaling & Behavior 6**: 1016-1018.
- Bozzola, J. J.; Russel, L. D. 1992. **Electron microscopy**. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 542p.
- Brena, N. A. 2009. **A chuva ácida e seus efeitos sobre as florestas**. Livraria Cultura, São Paulo. 70p.
- Buvat, R. 1989. **Ontogeny, cell differentiation and structure vascular plants**. Springer-Verlag, Berlin.
- Carvalho, P. E. R. 2003. **Espécies arbóreas brasileiras**. Embrapa, Colombo.

- Castro, L. N. 2008. **Utilização de caracteres morfoanatômicos na avaliação do efeito de poluentes em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae).** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Monografia.
- Chaves, M.M.F.; Davide, A.C. 1996. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Joannesia princeps* Vell. – Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes** **18**: 208-213.
- Choudhary, K.; Johri, B. N.; Prakash, A. 2008. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses. **Current Science** **94**: 595-604
- 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 Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris** **258**: 1338-1340.
- Demming-Adams, B.; Adams, W.W. 2000. Harvesting sunlight safely. **Nature** **403**: 371- 374.
- Dos Anjos, L.; Oliva, M. A.; Kuki, K. N. 2012. Fluorescence imaging of light climation of brazilian atlantic forest tree species. **Photosynthetica** **50**: 95-108.
- Esposito, M. P.; Ferreira, M. L.; Sant'Anna, S. M. R.; Domingos, M.; Souza, S. R. 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. **Atmospheric Environment** **43**: 619–623.
- Evans, L. S.; Gmur, N. S.; Costa, F. 1977. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **American Journal of Botany** **67**: 903-913.
- Evans, L. S. 1982. Biological effects of acidity in precipitation on vegetation: a review. **Environmental and Experimental Botany** **22**: 155-169.
- Evans, L.S. 1984. Botanical aspects of acidic precipitation. **Botanical Review** **50**: 449-90.
- Evert, R. F.; Eichorn, S. E. 2006. **Esau's Plant Anatomy**. 3 ed. John Wiley & Sons, New York.
- Fahn, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, London.
- Fahn, A. 1990. **Plant Anatomy**. 4 ed. Pergamon Press, Oxford.

- Fan, H. B.; Wang, Y. H. 2000. Effects of simulated acid rain on germination, foliar damage chlorophyll contents and seedling growth of five hardwood species growing in China. **Forest Ecology and Management** **126**: 321-329.
- Feeny, P. P., 1992. **Herbivores**: Their interactions with secondary plant metabolites. In: G. A. Rosenthal, M. R. Berenbaum Eds. Ecological and evolutionary processes. Vol 2. Academic Press, New York.
- Frost, C. J.; Mescher, M. C.; Dervinis, C.; Davis, J. M.; Carlson, J. E.; Moraes, C. M. 2008. Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. **New Phytologist** **180**: 722–734.
- Furr, M.; Mahlberg, P. G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** **44**: 153–159.
- Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Acta Biochimica et Biophysica** **990**: 87–92.
- Giri, S.; Shrivastava, D.; Deshmukh, K; Dubey, P. 2013. Effect of air pollution on chlorophyll content of leaves. **Current Agriculture Research Journal** **2**: 93-98.
- Heil, M.; Kock, T.; Fiala, B.; Booland, W.; Linsenmair, K. E. 2001. Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **98**: 1083-1088.
- Holopainen, J. K. 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. **Trends in Plant Science** **9**: 529-533.
- Ifeanyi, C. E.; Ogbonna, C. E. 2012. Evaluation of air pollution tolerance index (APTI) of some selected ornamental shrubs in Enugu city, Nigeria. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology** **1**: 22-25.
- Iriti, M.; Faoro, F. 2009. Chemical diversity and defense metabolism: how plants cope pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences** **10**: 3371-3399.
- Jensen, W. A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. W. H. Freeman & Co., San Francisco. 408p.

- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York. 523p.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137-138.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G.; Fomin, A. 2001. Um novo conceito de comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica** 24:511-518.
- Kramer, D. M; Giles, J.; Olavi, K.; Gerald, E. E. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research** 79: 209–218, 2004.
- Kraus, J. E.; Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR, Rio de Janeiro.
- Lal, N.; Singh, H. 2012. The effects of simulated acid rain of different pH-levels on biomass and leaf area in Sunflower (*Helianthus annuus*). **Current Botany** 3: 45-50.
- Larcher, W. 2006. **Ecofisiologia Vegetal**. 3ª Ed. RiMa. São Carlos. 437p.
- Lee, S.; Badieyan, S; Bevan, D. R.;Herde, M.; Gatz, C. Tholl, D. 2010. Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in Arabidopsis. **Current Issue** 107: 2120–2121.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of the photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 48: 350-382.
- Mello, W. Z.; Almeida, M. D. 2004. Rainwater chemistry at the summit and southern flank of the Itatiaia massif, Southeastern Brazil. *Environmental Pollution* 129:63-68.
- Neufeld, H.S.; Jernstedt, J.A.; Haines, B.L. 1985. Direct foliar effects of simulated acid rain. I. Damage, growth and gas exchange. **New Phytologist** 99: 389–405.
- Ness, J. H. 2003. *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. **Oecologia** 134: 210-218
- Nicolson, S. W.; Nepi, M.; Pacini, E. 2007. **Nectaries and nectar**. Springer, Netherlands.

- Nichol, P.; Hall, J. L. 1988. Characteristic of nectar secretion by extrafloral nectaries of *Ricinus communis*. **Journal of Experimental Botany** **39**: 573-586.
- Nishioka, S. A.; Escalante, R. D. 1997. Poisoning by ingestion of seeds of the fruit of the cotiera. **São Paulo Medical Journal/RPM** **115**: 1366-1367.
- Oxborough, K. e Baker, N. R. 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components calculation of  $qP$  and  $F_v'/F_m'$  without measuring  $F_o'$ . **Photosynthesis Research** **54**: 135–142
- Pacini, E.; Nepi, M; Vesprini, J. L. 2003 Nectar biodiversity: a short review. **Plant Systematic Evolution** **238**: 7–21.
- Pell, E. J.; Schlagnhauser, C. D.; Arteca, R. N.1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. **Physiologia Plantarum** **100**: 264–273.
- Pearse, A. G. 1980. **Histochemistry**. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Peiter, P.; Tobar, C. 1998. Poluição do ar e condições de vida: uma análise geográfica de riscos à saúde em Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Público Rio de Janeiro** **14**: 473-485.
- Peltonen, P. A.; Vapaavuori, E; Heinonen, J.; Julkunen-Tiito, R.; Holopainen, J. K. 2010. Do elevated atmospheric  $CO_2$  and  $O_3$  affect food quality and performance of folivorous insects on silver birch? **Global Change Biology** **16**: 918-935.
- Petrova, S. T. 2011. Biomonitoring Study of Air Pollution with *Betula pendula* Roth., from Plovdiv, Bulgaria. **Ecologia Balkanica** **3**: 1-10.
- Pino, J. A.; Marbot, R.; Payo, A.; Herrera, P.; Marti, M. P. 2006. Volatile leaf oils from Cuban Euphorbiaceae: *Croton rosmarinoides* Millsp., *Croton litoralis* Urb., *Croton spiralis* Muell. Arg. and *Croton myricifolius* Griseb. **Journal of Essential Oil Research** **18**: 256–260.
- Pinto, D. M.; Blande, J. D.; Souza, S. R.; Nerg, A.; Holopainen, J. K. 2010. Plant volatile organic compounds (vocs) in ozone ( $O_3$ ) polluted atmospheres: the ecological effects. **Journal Chemical Ecology**. DOI 10.1007/s10886-009-9732-3
- Radhika, V; Kost, C.; Bartram, S.; Heil, M; Boland, W. 2008. Testing the optimal hypothesis for two indirect defenses: extrafloral nectar and volatile organic compounds. **Planta** **228**: 449-457.

- Riederer, M.; Müller, C. 2006 *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford. p.1-6, 334.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Silva, L. C.; Azevedo, A. A.; Aguiar, R. 2006. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** **49**: 313-321.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Azevedo, A. A. 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociências** **5**: 48-50.
- Schmelz, E. A.; Huffaker, A.; Carroll, M. J.; Alborn, H. T.; Ali, J. G.; Teal, P. E.A. 2012. An amino acid substitution inhibits specialist herbivore production of an antagonist effector and recovers insect-induced plant defenses. **Plant Physiology** **160**: 1468–1478
- Seyyednjad, S.; Majdian, K.; Koochak, H.; Niknejad, M. 2011. Air pollution tolerance indices of some plants around industrial zone in South Iran. **Asian Journal of Biological Sciences** **4**: 300- 305.
- Singh, S.N.; Verma, A. 2007. **Phytoremediation of Air Pollutants: A Review**. Springer, Berlin Heidelberg, p. 293-314.
- Silva, L. C; Oliva, M.; Azevedo, A. A.; Silva, E. A. M.; Oliva, M. A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica** **23**: 385-393.
- Silva, L. C; Oliva, M. A.; Azevedo, A. A; Araújo J. M; Aguiar, R. 2005. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, Air, and Soil Pollution** **168**: 129–143.
- Silva, L. C.; Oliva, M. A.; Azevedo, A. A.; Araújo, J. M. 2006. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. **Water, Air and Soil Pollution** **168**: 129-143.
- Simon, J. E.; Simini, M.; Decoteau, D. R. **Using plants to monitor air pollution**. Cooperative Extension Service, Purdue University, Indiana. Disponível em: <[http://www.personal.psu.edu/drd10/Site/Publications\\_files/HO-195.pdf](http://www.personal.psu.edu/drd10/Site/Publications_files/HO-195.pdf)>.
- Acesso em: 08 mar 2012 às 16:54.

- Shigihara, A.; Matsumura, Y.; Kashiwagi, M.; Matsumoto, K.; Igawa, M. 2009. Effects of acid fog and ozone on the growth and physiological functions of *Fagus crenata* saplings. **Journal of Forest Research** 14: 394-399.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. 2005. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Trigo, J. R.; Bittrich, V.; Amaral, M. C.; Marsaioli A. J. 2000. Ecologia Química. **Chemkeys** 3:1-9.
- Vidal, B. C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine ponceau 2R. **Annales D'Histochimie** 15: 289-296.
- Vidal, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondrial ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Molecular and Biology** 22: 45-64.
- Wagner, D.; Kay, A. 2002. Do extrafloral nectaries distract ants from visiting flowers? An experimental test of an overlooked hypothesis. **Evolutionary Ecology Research** 4: 293–305
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvent with spectrophotometers of different resolutions. **Journal Plant Physiology** 144: 307–313.

## Figuras



Figura 1-(A) Plântulas de *Joannesia princeps* sobre bancadas na casa de vegetação. (B)- Disposição das plântulas antes de iniciar o nevoeiro. (C)- Visão geral das câmaras utilizadas para nevoeiro simulado: (1) controle pH=6,0 e (2) nevoeiro ácido pH=3,0. As- aspersores; Sa- solução ácida; Sc- solução controle; Si- sistema de iluminação artificial.

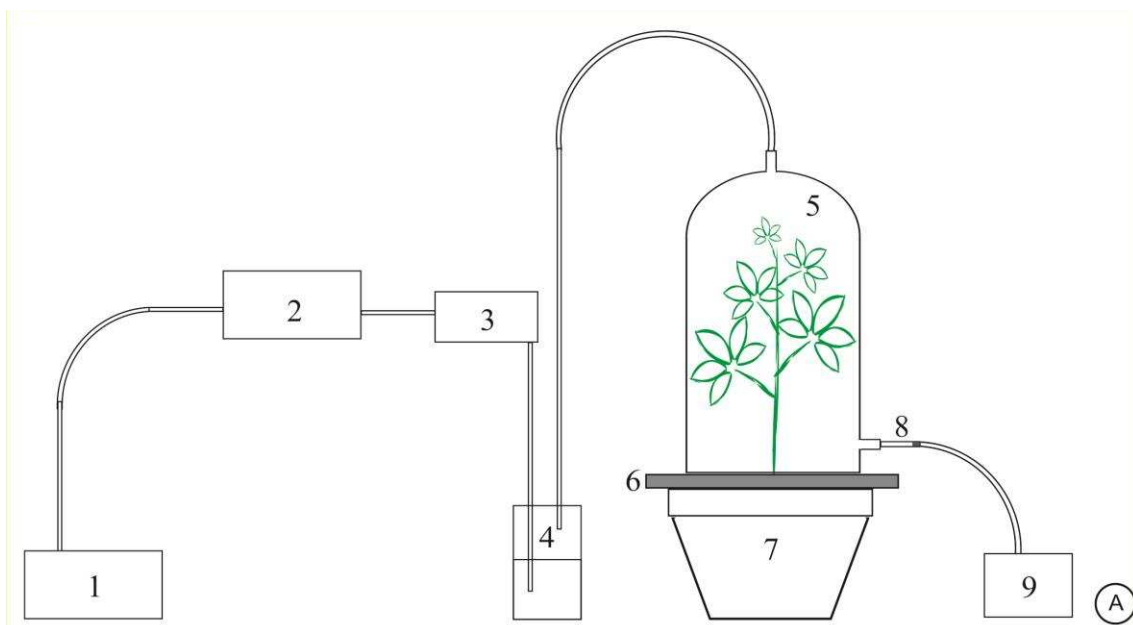


Figura 2- Esquema do sistema de coleta de compostos orgânicos voláteis. 1- Compressor de ar; 2- filtro de carvão; 3- medidor de vazão; 4- umidificador do ar; 5- câmara de vidro envolvendo a parte aérea da planta; 6- placa de teflon; 7- vaso contendo solo; 8- tubo contendo adsorvente; 9- bomba de sucção de ar.

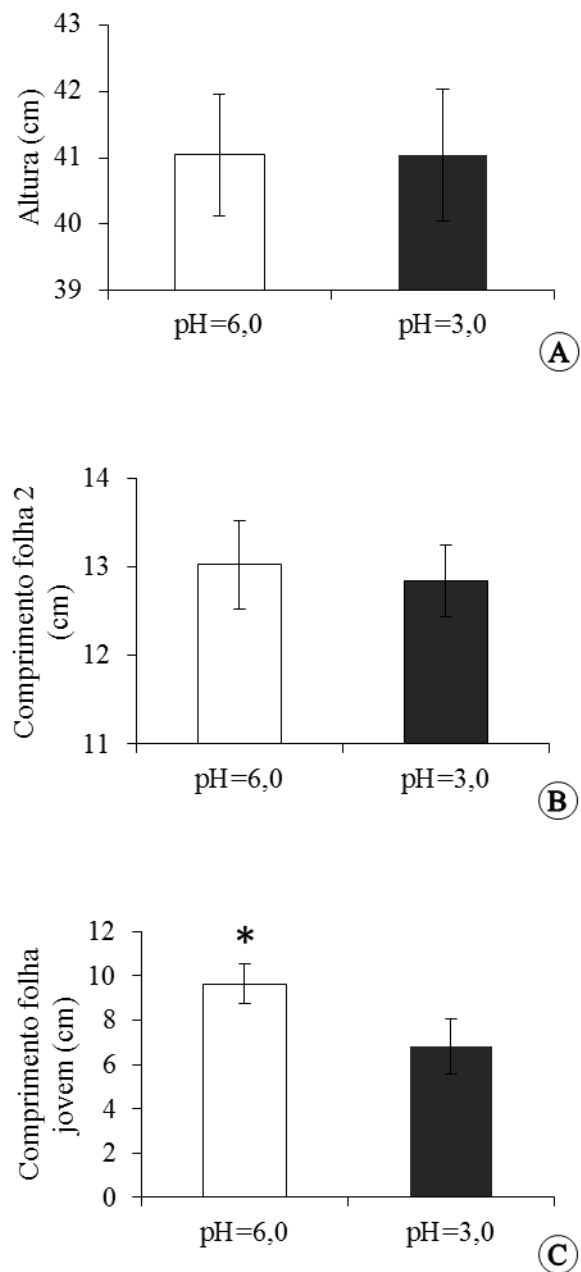


Figura 3- Biometria das folhas de *Joannesia princeps* expostos à nevoeiro pH=6,0 (controle) e nevoeiro ácido pH=3,0. (A) Altura da planta. (B) Comprimento do folíolo apical na folha marcada. (C) Comprimento do folíolo apical da folha jovem.(\*) ANOVA  $P < 0,05$ .

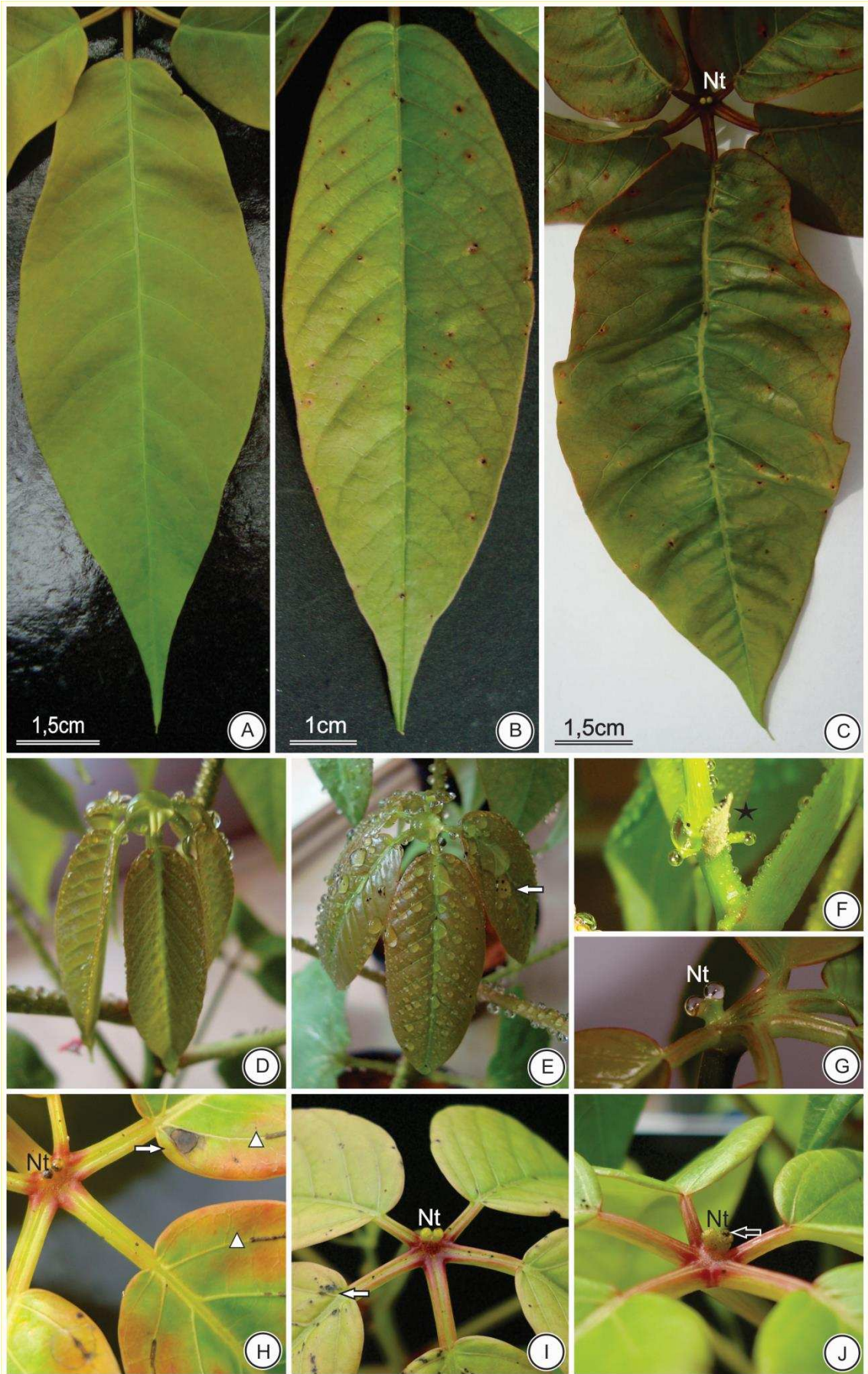


Figura 4- Aspecto das folhas de *Joannesia princeps* expostos à nevoeiro pH=6,0 (controle) e nevoeiro ácido pH=3,0. (A, D) Tratamento controle; (B-C, E-I) Tratamento com nevoeiro ácido. (A-C) Aparência dos folíolos. (D-F) Disposição das gotas após exposição ao nevoeiro. (G-I) Aparência dos nectários. Nt- Nectários extraflorais. Seta- Necroses. Estrela- Meristema apical caulinar com necrose pontual.

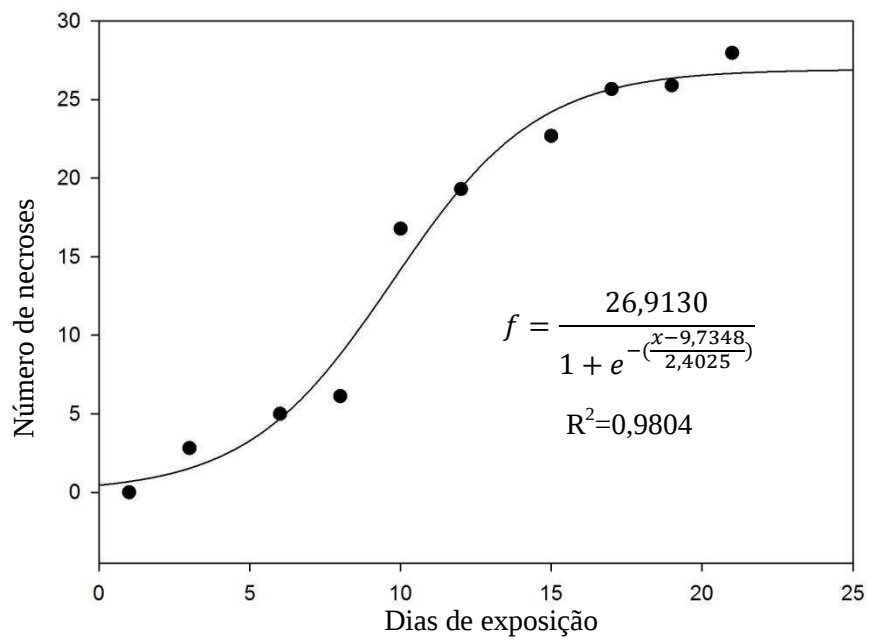


Figura 5- Relação entre número médio de necroses no folíolo apical e o tempo de exposição de plântulas de *Joannesia princeps* ao nevoeiro ácido pH=3,0.

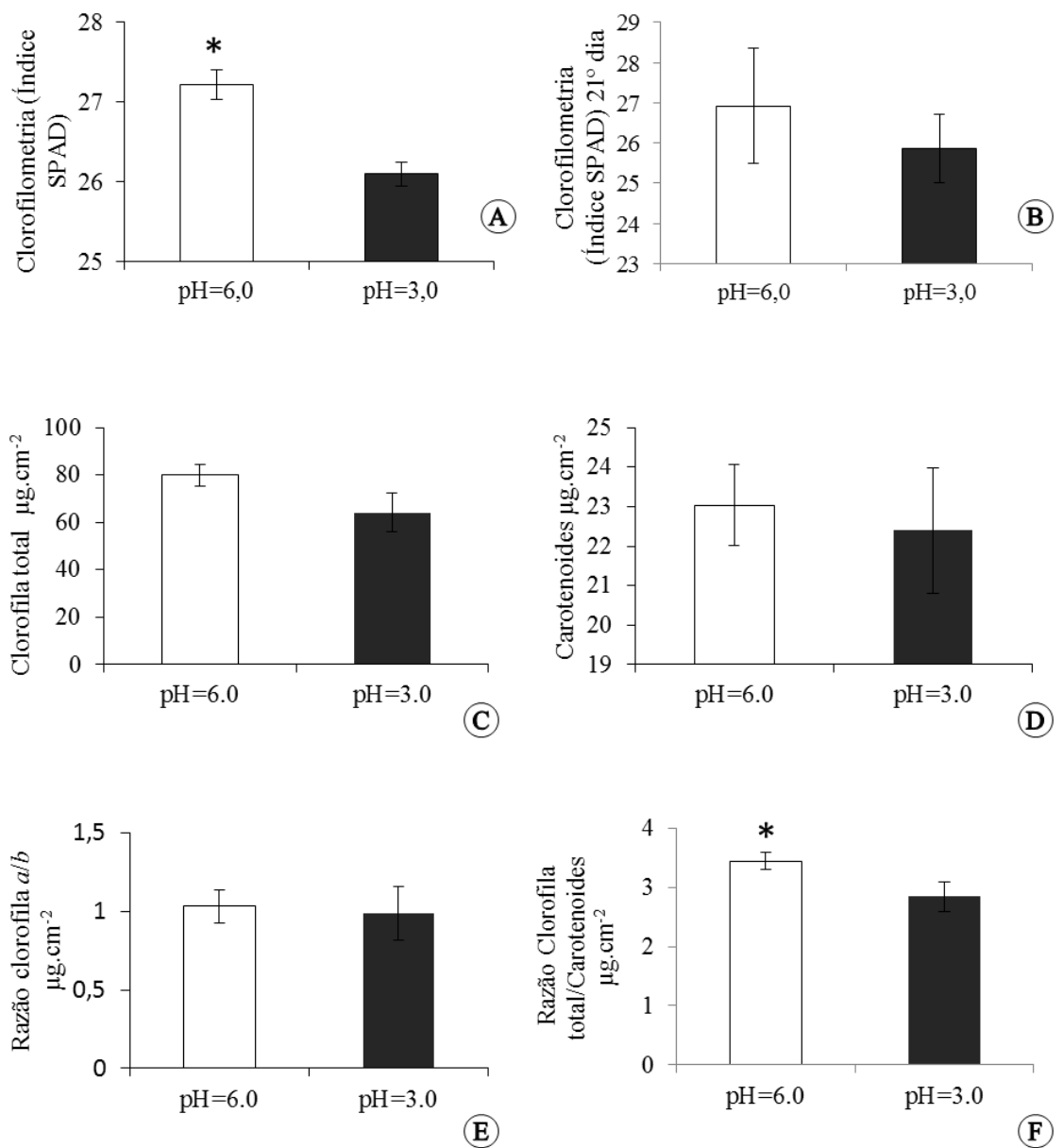


Figura 6-Concentração de clorofila total (índice SPAD) e teores de clorofila a, b e carotenoides em *Joannesia princeps* expostas com nevoeiro simulado controle (pH=6,0) e nevoeiro ácido (pH=3,0). (A) Clorofila total, índice SPAD acumulado. (B) Clorofila total, índice SPAD do dia da coleta. (C) Teor de clorofila total  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; (D) Teor de carotenoides  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . (E) Razão clorofila a/b  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . (F) Razão clorofila/carotenoide  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . (\*) ANOVA  $P < 0,05$ .

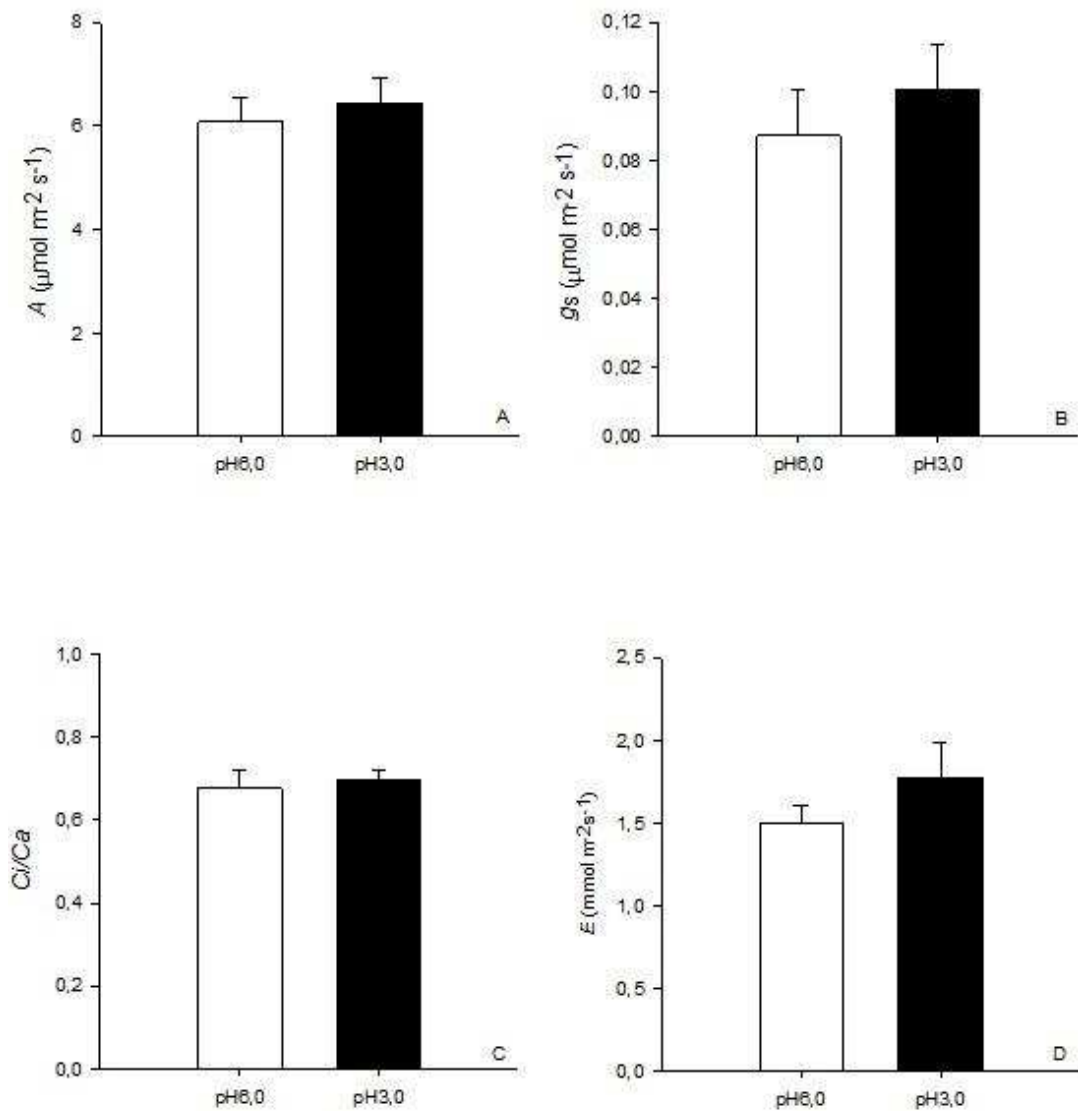


Figura 7- Quantificação das taxas de assimilação fotossintética líquida de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), taxa transpiratória ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e razão entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ,  $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-1}$ ) em plântulas de *Joannesia princeps* expostas ao nevoeiro controle (pH=6,0) e ao nevoeiro ácido (pH=3,0).

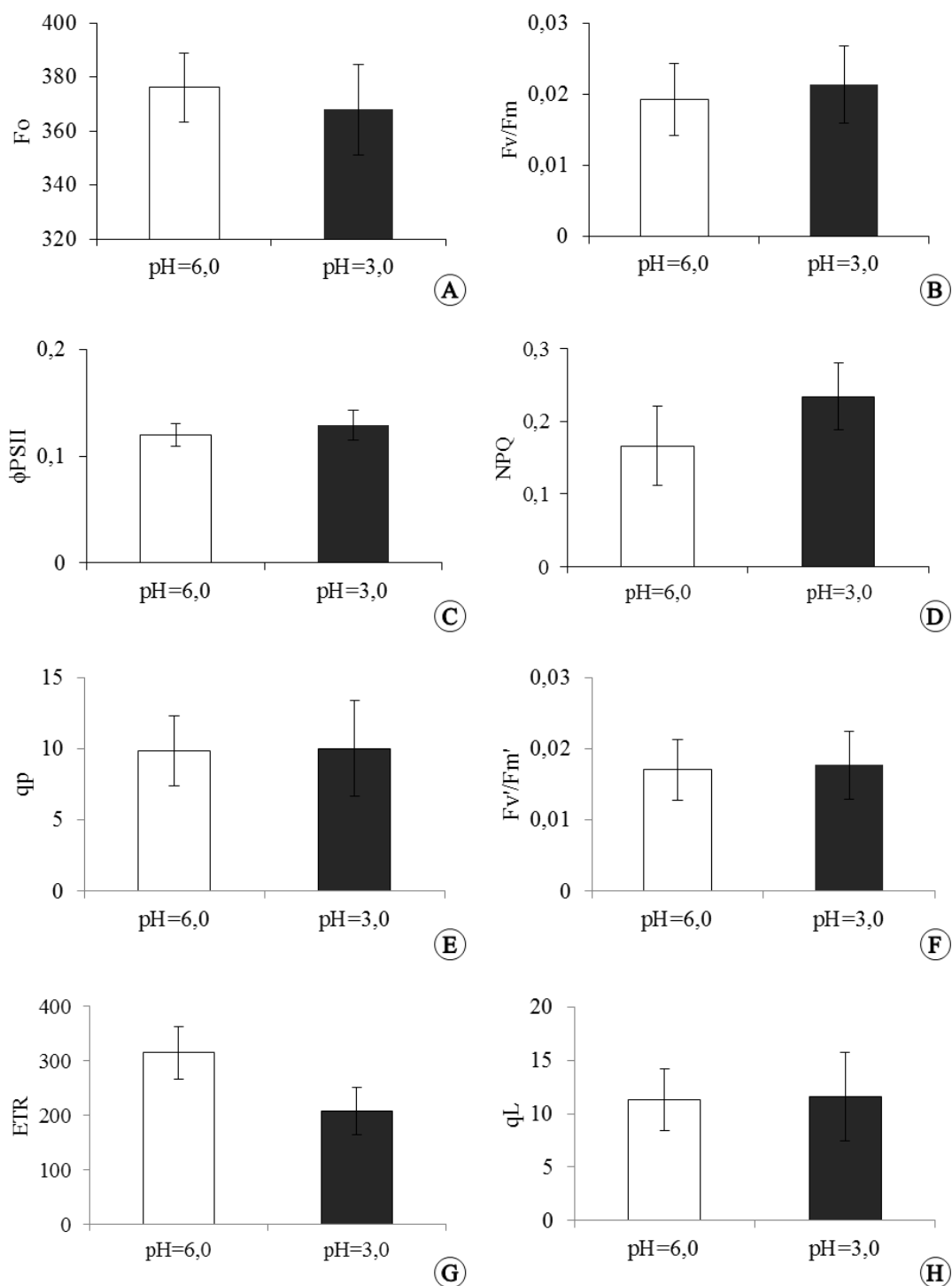


Figura 8- Parâmetros de fluorescência da clorofila a em plântulas de *Joannesia princeps* expostas ao nevoeiro controle (pH=6,0) e ao nevoeiro ácido (pH=3,0). (A) Quantificação da fluorescência inicial ( $F_0$ ); (B) Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ); (C) Rendimento quântico potencial do PSII ( $\phi_{PSII}$ ); (D) Dissipação não fotoquímica (NPQ); (E) Dissipação fotoquímica (qp); (F) Eficiência de captura de elétrons pelos centros de reação abertos ( $F_v'/F_m'$ ); (G) Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR); (H) Coeficiente de extinção fotoquímico (qL),

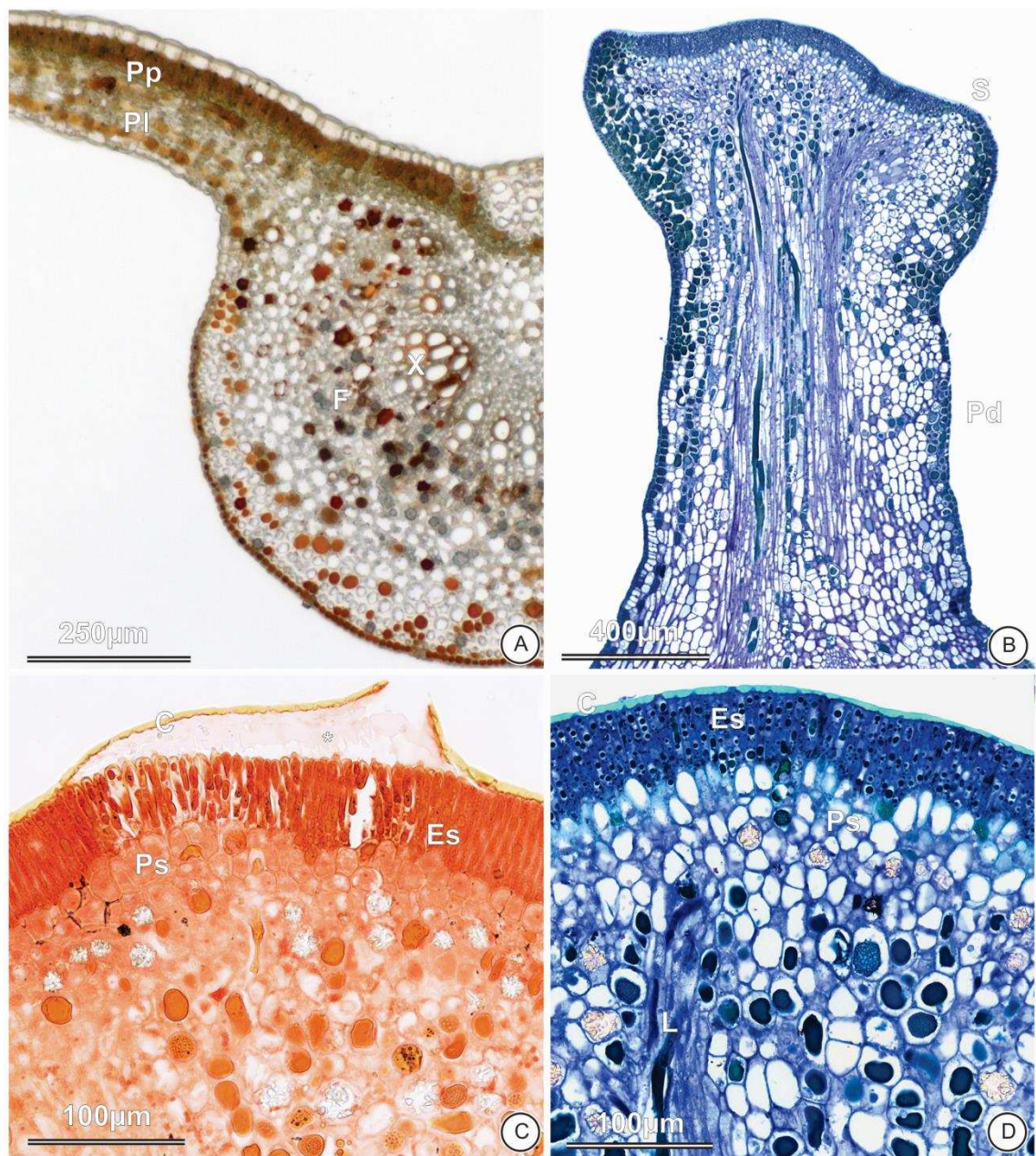


Figura 9- Lâmina foliar de *Joannesia princeps* e nectários peciolares. (A) secção transversal de lâmina foliar. (B) Secção longitudinal do nectário do ápice do pecíolo evidenciando duas regiões. Coloração: Azul de toluidina. (C) Detalhe do corte longitudinal do nectário com cutícula rompida câmara subcuticular (\*). Coloração: Xylidine ponceau. (D) Secção longitudinal do nectário com feixes vasculares e laticíferos. Coloração: Azul de toluidina. Pp- parênquima paliádico; Pl- parênquima lacunoso; S- porção secretora; Pd- pedúnculo; C- cutícula; Es- epiderme secretora; Pn- parênquima nectarífero; L- laticíferos.

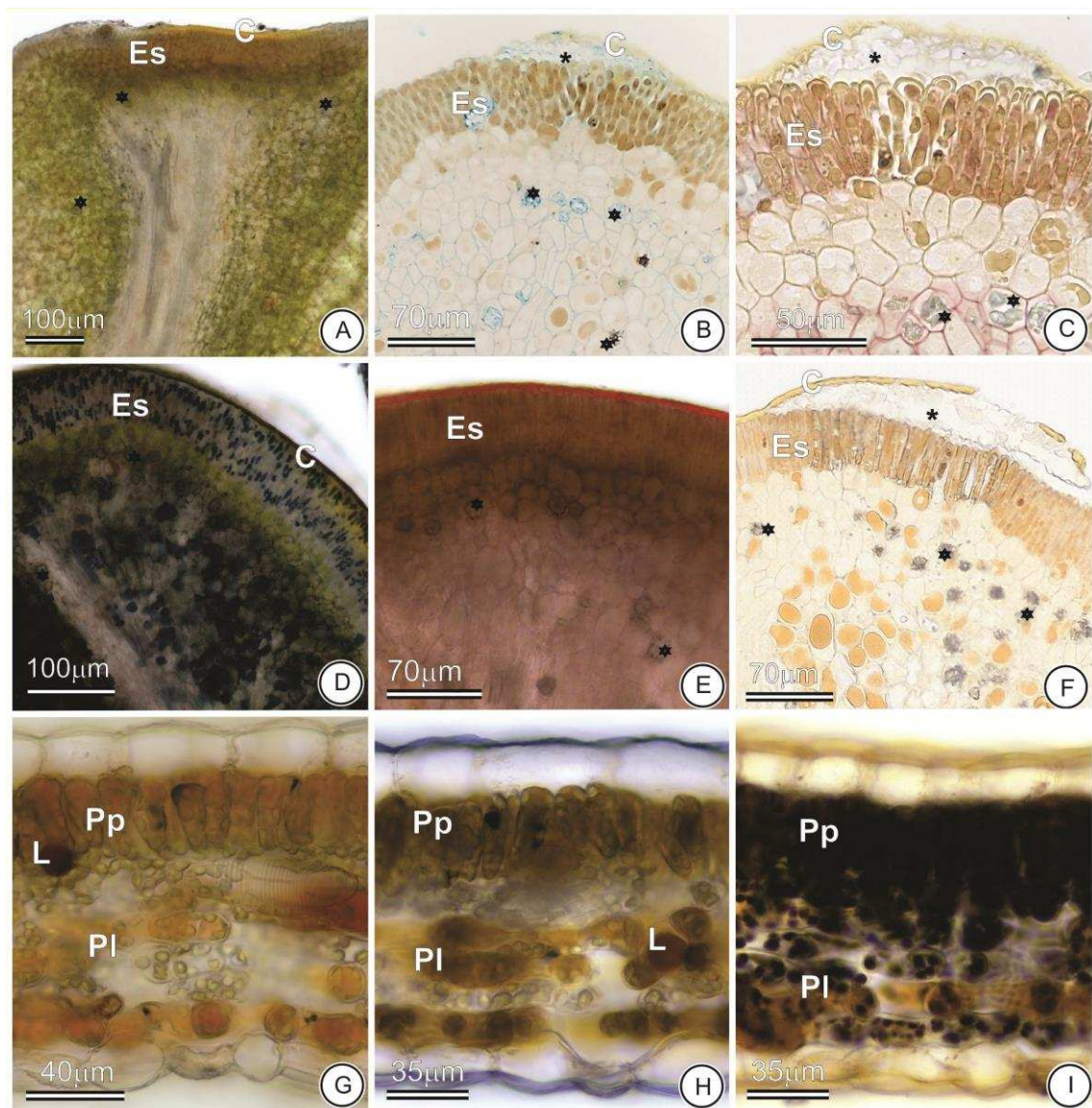


Figura 10- Histoquímica de folhas de *Joannesia princeps* utilizadas no experimento 1. (A-F) Secções longitudinais de nectários extraflorais do ápice do pecíolo. (G-H) Secções transversais do limbo do folíolo apical. (A e G) Branco (sem reagente). (B) Coloração: Azul de alciano pH=2,5. (C) Coloração: vermelho de rutênio. (D e H) Coloração: Reagente de NADI. (E) Coloração: Sudan III. (F e I) Coloração: Lugol. ★-Idioblasto cristalífero; \*-Câmara subcuticular; Es- Epiderme secretora; C- Cutícula; Pp- Parênquima paliçádico; Pl- Parênquima lacunoso; L- laticífero.

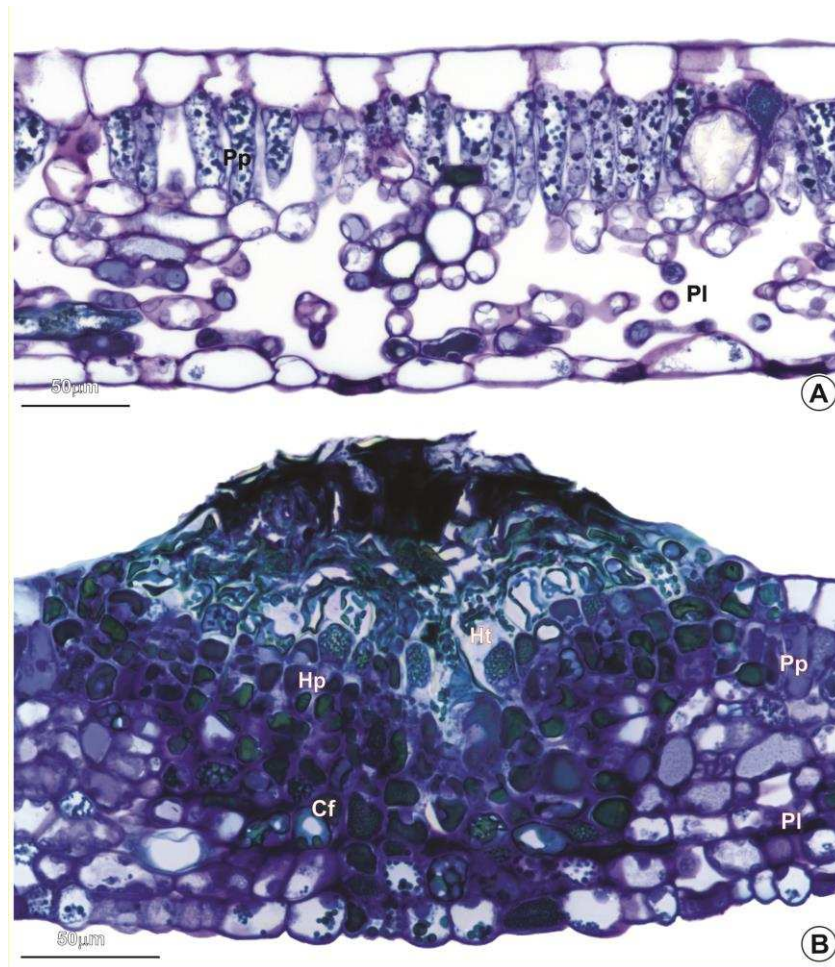


Figura 11- Corte transversal da lâmina do folíolo apical de *Joannesia princeps*. (A) Folha exposta ao nevoeiro controle, pH=6,0. (B) Folha exposta ao nevoeiro ácido, pH=3,0. Pp- parênquima paliçádico, Pl- parênquima lacunoso, Ht- hipertrofia, Hp- hiperplasia, Cf- composto fenólico. Coloração: Azul de toluidina.

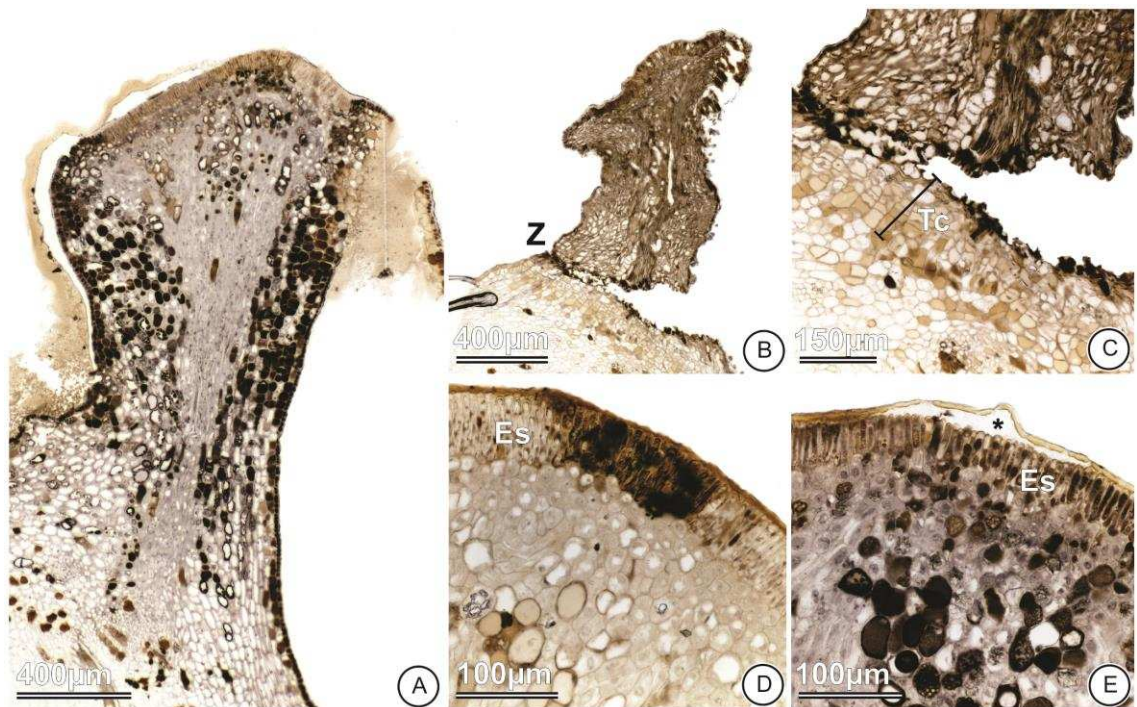


Figura 12- Nectários de *Joannesia princeps* expostos a nevoeiro ácido, pH=3,0. (A) Secção longitudinal do nectário. (B) Secção longitudinal de nectário do segundo nó senescente. (C) Detalhe da secção longitudinal do nectário evidenciando o tecido de cicatrização. (D, E) Detalhes da secção longitudinal do nectário. (A,B,C, E) Fixação com sulfato ferroso. (D) Branco com metanol e fixação com sulfato ferroso. \*- Câmara subcuticular; Z-zona de abscisão; Tc- tecido de cicatrização; Es- epiderme secretora; Fv- feixe vascular.

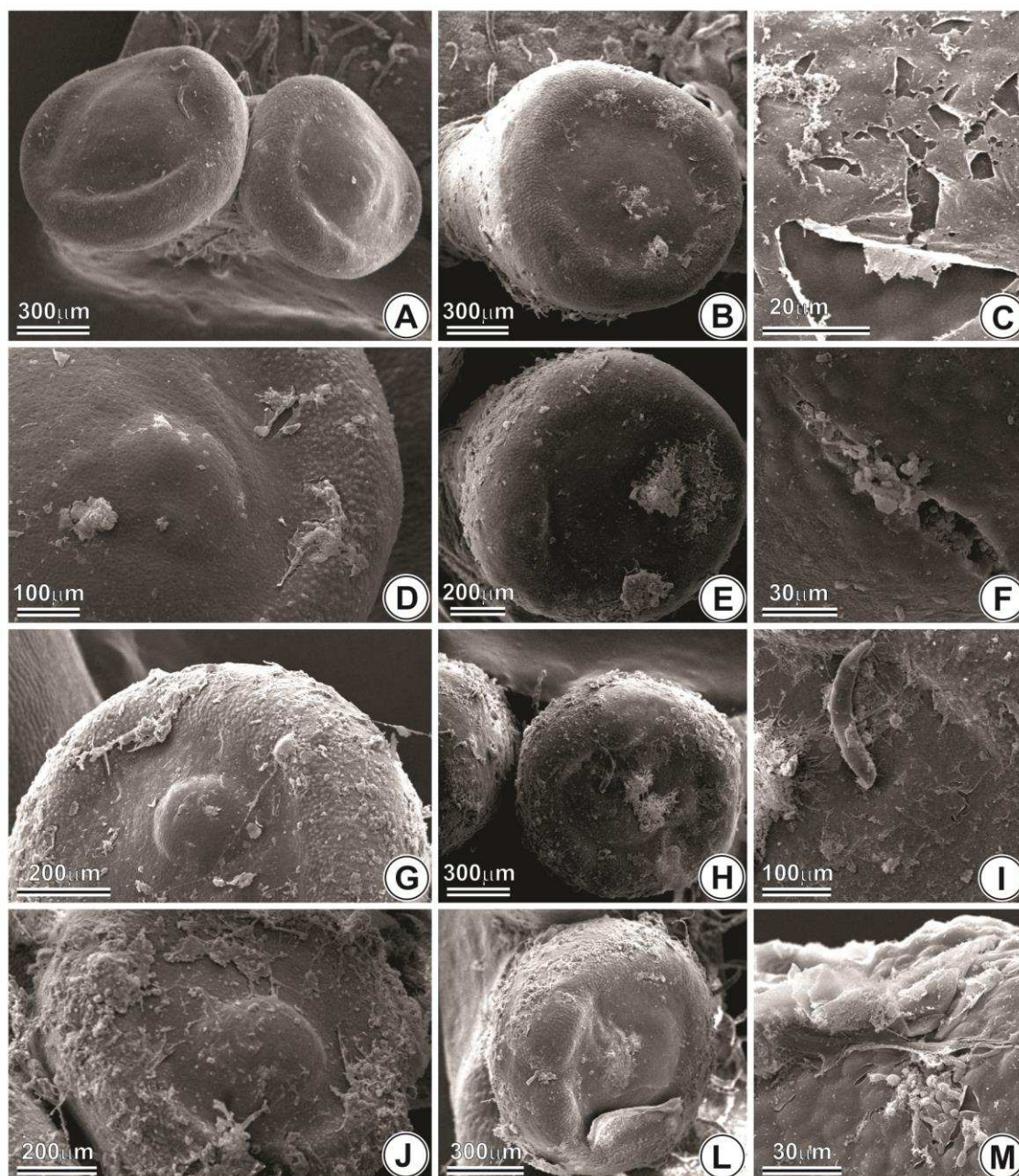


Figura 13-Nectários de *Joannesia princeps* expostos ao nevoeiro simulado controle (pH=6,0) e nevoeiro ácido (pH=3,0). Microscopia eletrônica de varredura. (A, D, G, J)- Tratamento controle. (B-C, E-F, H-I, L-M)- Tratamento com nevoeiro ácido.

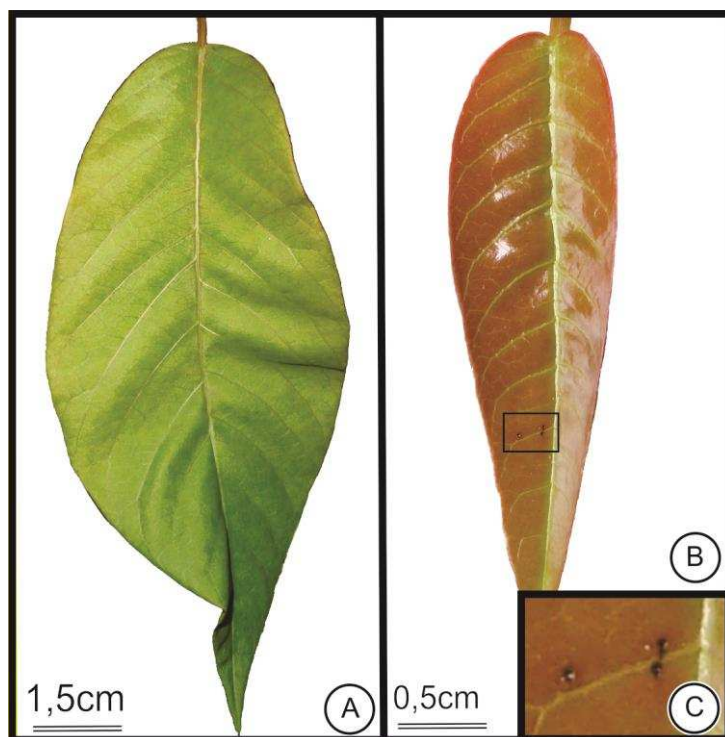


Figura 14- Aspecto do folíolo apical de *Joannesia princeps*. (A)Folíolo de referência, sem exposição à poluente. (B) Folíolo exposto ao nevoeiro ácido, pH=3,0. (C) Detalhe ampliado da imagem B mostrando necroses pontuais.

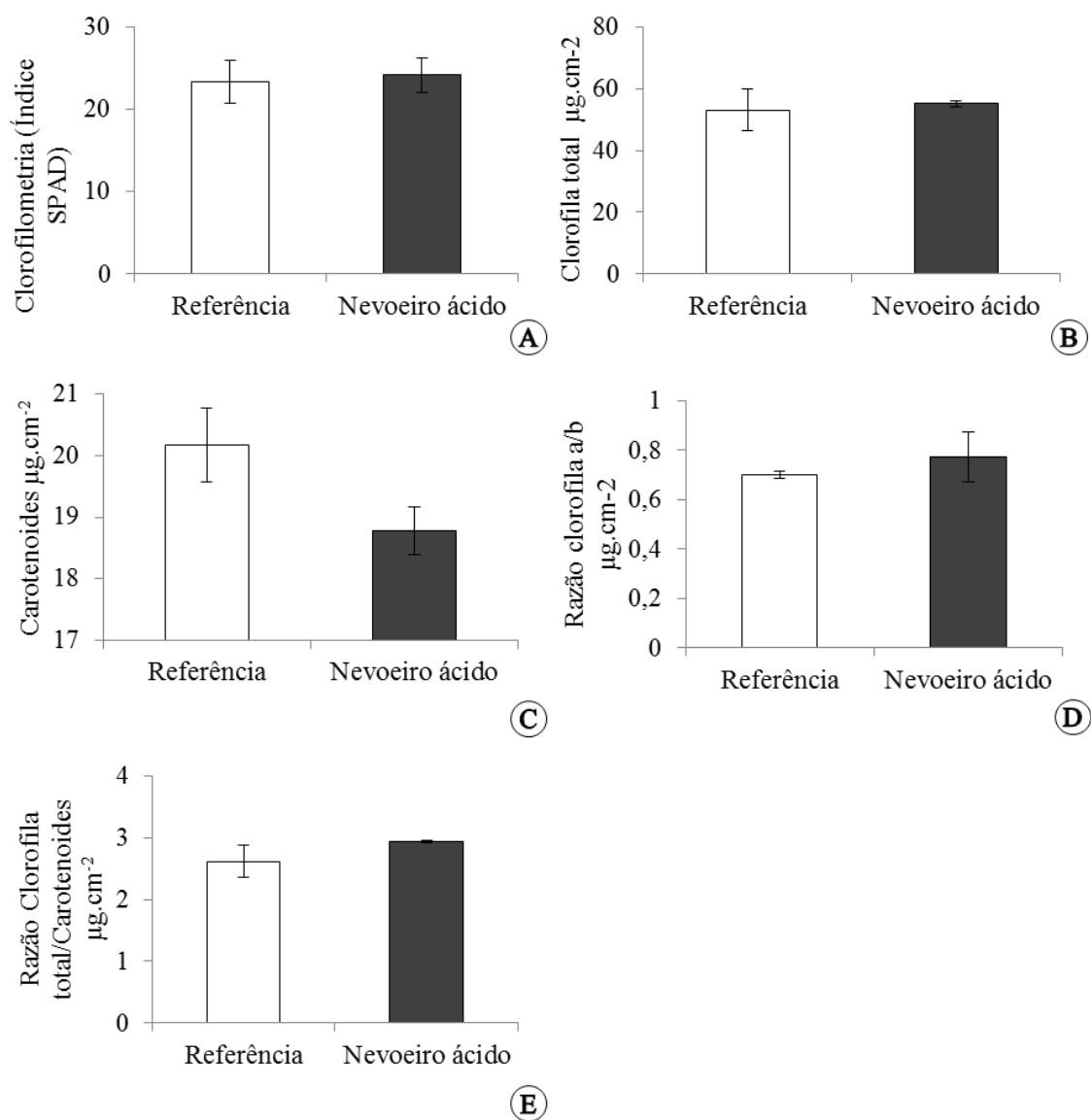


Figura 15- Pigmentos fotossintetizantes em *J. princeps* sem exposição à poluente (Referência) e exposta ao nevoeiro ácido. (A) Clorofila total, clorofilometria com índice SPAD. (B) Teor de clorofila total  $\mu\text{g.cm}^{-2}$ ; (C) Teor de carotenoides. (D) Razão clorofila a/b  $\mu\text{g.cm}^{-2}$ . (E) Razão clorofila/carotenoide  $\mu\text{g.cm}^{-2}$ .

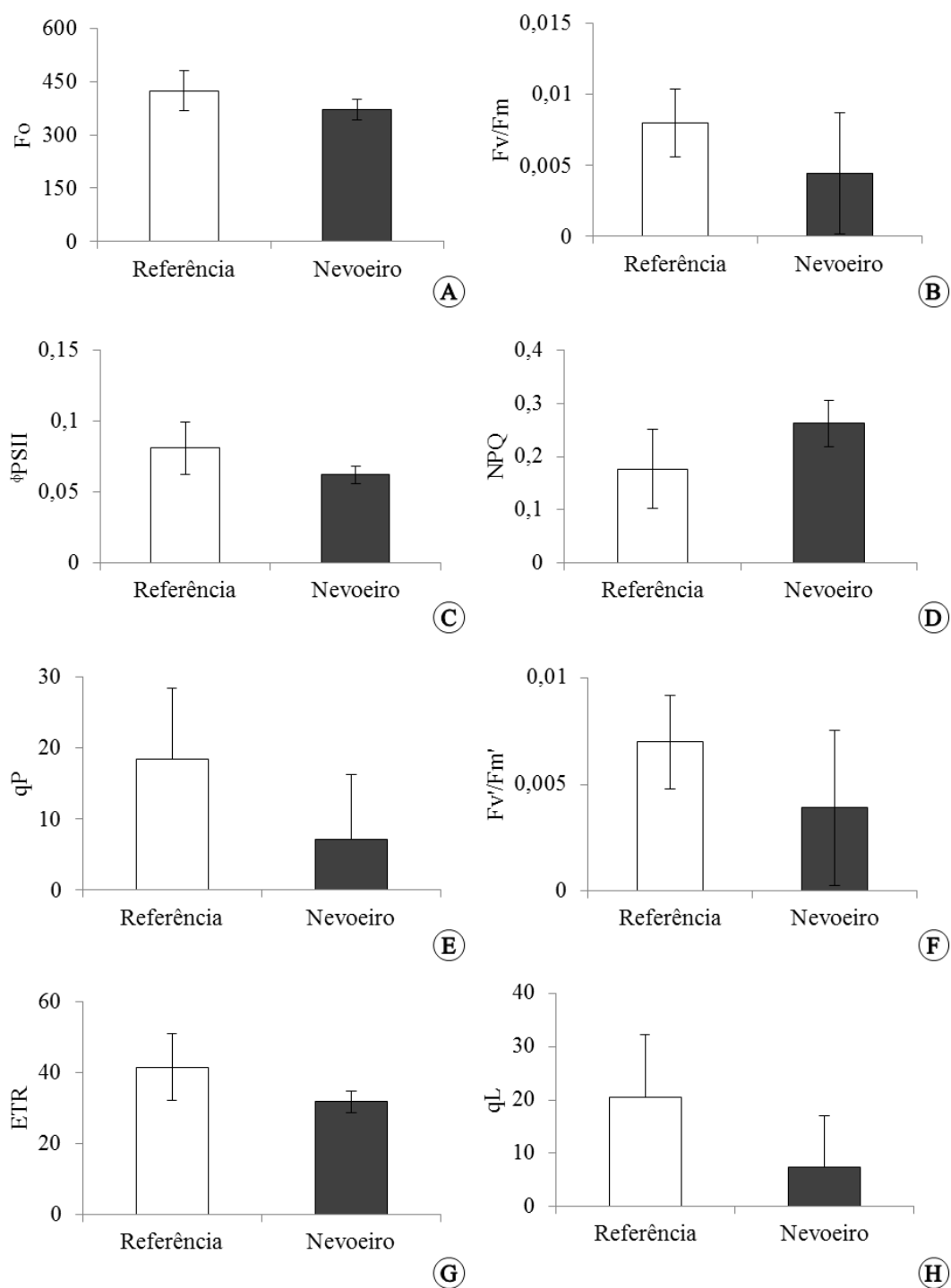


Figura 16- Parâmetros de fluorescência da clorofila a em plântulas de *Joannesia princeps* sem exposição à poluente (Referência) e expostas ao nevoeiro ácido. (A) Quantificação da fluorescência inicial ( $F_0$ ); (B) Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ); (C) Rendimento quântico potencial do PSII ( $\phi PSII$ ); (D) Dissipação não fotoquímica (NPQ); (E) Dissipação fotoquímica( $qP$ ); (F) Eficiência de captura de elétrons pelos centros de reação abertos ( $F_v'/F_m'$ ); (G) Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR); (H) Coeficiente de extinção fotoquímico ( $qL$ ),

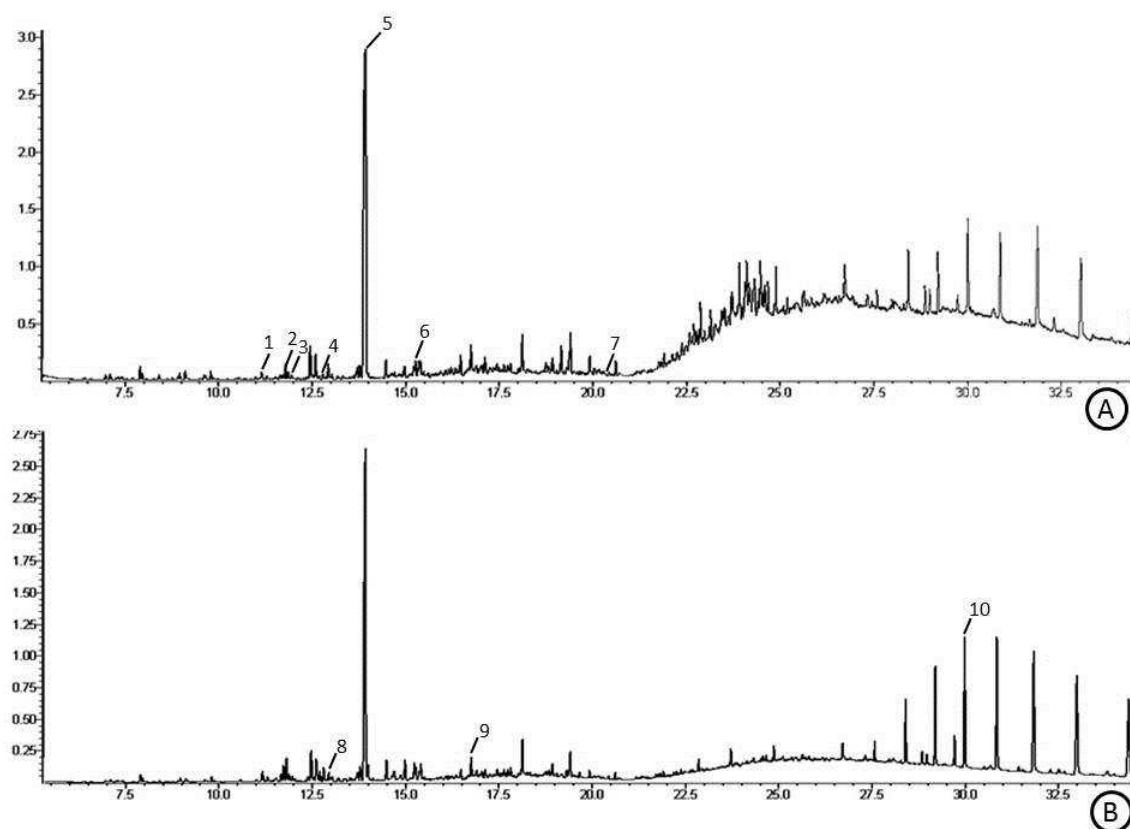


Figura 17- Cromatografias dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela parte aérea de plantas jovens de *Joannesia princeps* A- Planta do grupo de referência. B- Planta a ao nevoeiro ácido (pH=3,0). (1) Mesityleno; (2)  $\beta$ -mirceno; (3) Acetato de 3-hexen-1-ol; (4)  $\beta$ -ocimeno; (5) 4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno; (6) Metil salicilato; (7) Hexametiltetracosano; (8) Fenilcarbinol; (9) Tridecano; (10) Triacotano.

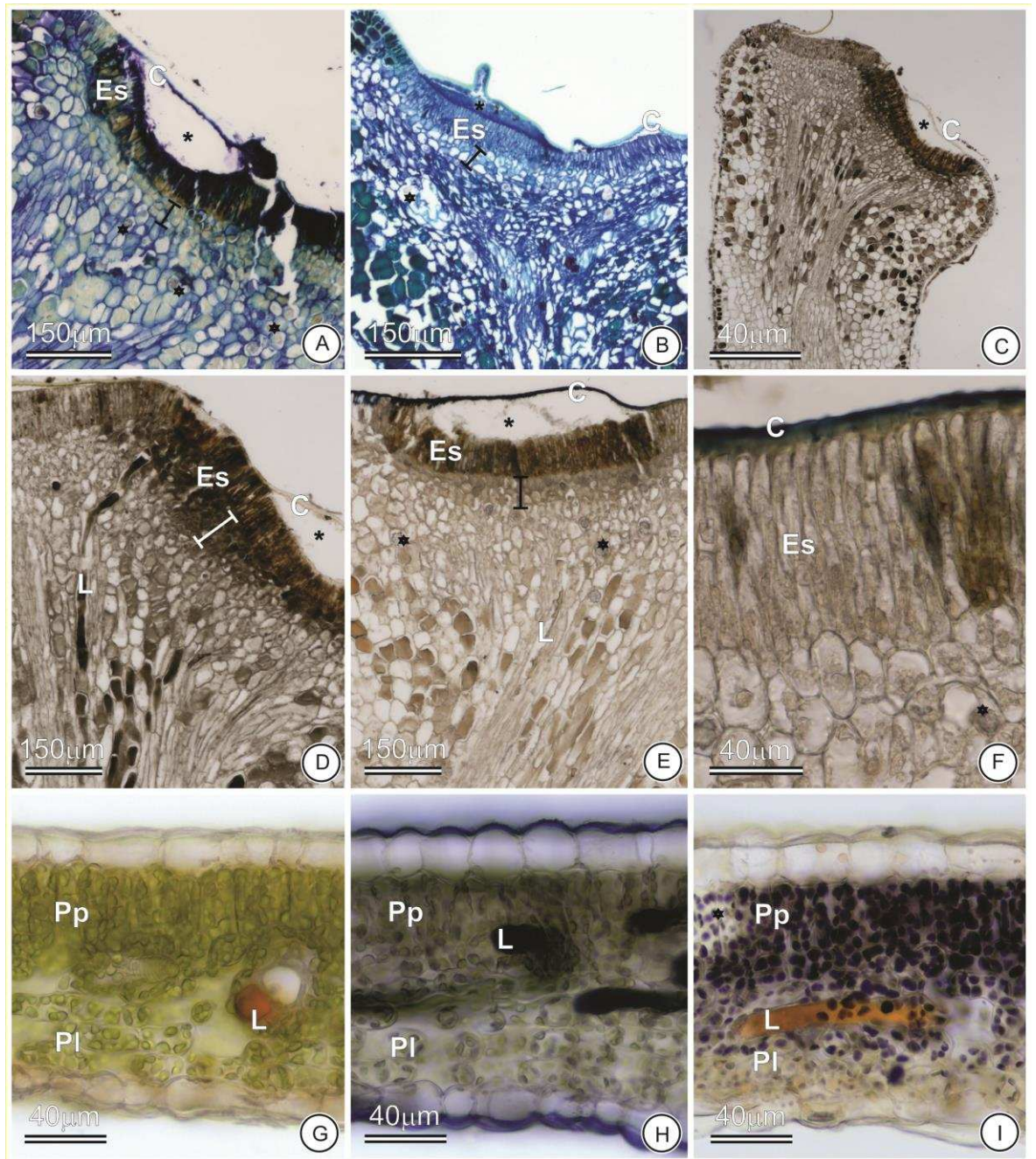


Figura 18- Histoquímica de folhas de *Joannesia princeps* utilizadas no experimento 1. (A-F) Secções longitudinais de nectários extraflorais do ápice do pecíolo. (G-H) Secções transversais do limbo do folíolo apical. (A e G) Branco (sem reagente). (B) Coloração: Azul de alcão pH=2,5. (C) Coloração: vermelho de rutênio. (D e H) Coloração: Reagente de NADI. (E) Coloração: Sudan III. (F e I) Coloração: Lugol. ★-Idioblasto cristalífero; \*-Câmara subcuticular; Es- Epiderme secretora; C- Cutícula; Pp- Parênquima paliçádico; Pl- Parênquima lacunoso; L- laticífero.

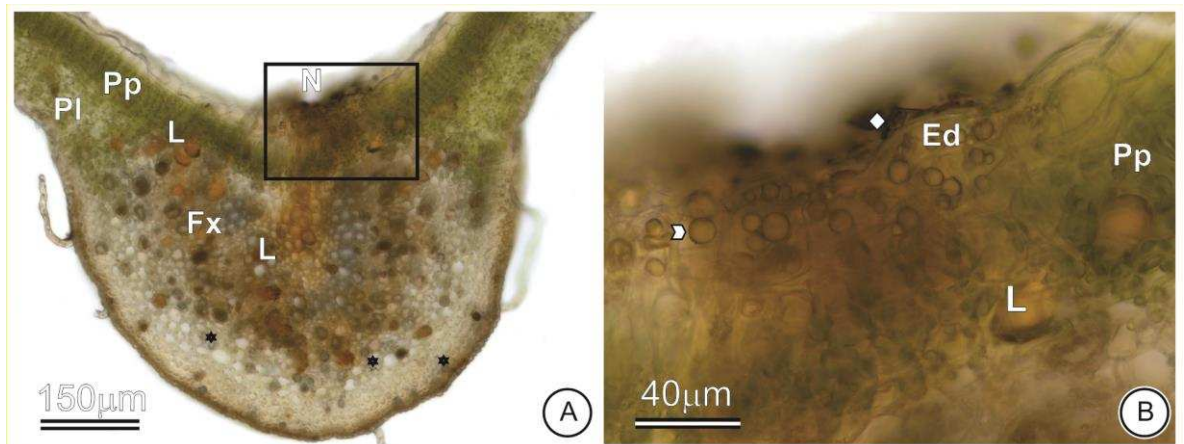


Figura 19- Anatomia de necrose venal em folha de *Joannesia princeps* em corte transversal. ★-Idioblasto cristalífero; >> - Gotas; ◊ - Parede periclinal externa e cutícula rompidos; Ed- Epiderme adaxial; Fx- Feixe vascular; L- Laticífero; Pl- Parênquima lacunoso; Pp- Parênquima paliçádico; N- Necrose.