

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF**

**ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA COMPARADA DOS COLÉTERES  
DE ESPÉCIES DE *PSYCHOTRIA* L. (RUBIACEAE) EM  
REMANESCENTES FLORESTAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**FERNANDA GOMES TRINDADE**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ**

**ABRIL, 2013**



ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA COMPARADA DOS COLÉTERES  
DE ESPÉCIES DE *PSYCHOTRIA* L. (RUBIACEAE) EM  
REMANESCENTES FLORESTAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**Fernanda Gomes Trindade**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia e  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Maura Da Cunha

Campos dos Goytacazes, RJ

Abril, 2013

ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA COMPARADA DOS COLÉTERES  
DE ESPÉCIES DE *PSYCHOTRIA* L. (RUBIACEAE) EM  
REMANESCENTES FLORESTAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**Fernanda Gomes Trindade**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia e  
Biotecnologia.

Aprovado em 02 de abril de 2013

Comissão examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdirene Moreira Gomes - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Espellet Klein - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Herika Chagas Oliveira – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maura Da Cunha - LBCT/CBB/UENF (**Orientadora**)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual no setor de Biologia Vegetal do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação da Dra. Maura Da Cunha, com financiamento de apoio a pesquisa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Bolsa de Mestrado concedida pela CAPES.

*Dedico este trabalho aos meus pais Jorge Fernando de  
Azevedo Trindade e Heloisa da Conceição Pinheiro  
Gomes Trindade. Por terem me ensinado os melhores  
valores que o ser humano deve ter e por terem me apoiado e  
incentivado nas escolhas da minha vida.*

"Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido"

(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus pais, por terem me ensinado verdadeiros valores, pelo amor e dedicação. Dedicolhes este trabalho porque a vocês devo a minha integridade como ser humano. Além de me ensinarem que a melhor herança que os pais podem deixar para os filhos é o estudo, vocês me ensinaram a ser honesta, a lutar e a jamais permitir que alguma pressão ou dificuldade fira a nobreza do meu caráter. A vocês, minha eterna gratidão.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Maura Da Cunha, por ter me guiado em mais esta etapa e pelos anos que tem dedicado à minha formação acadêmica, desde a minha apresentação à Anatomia Vegetal e à microscopia, durante a Iniciação Científica, até a conclusão desta dissertação. Por me ensinar que acima de tudo devemos ter paixão pelo que fazemos. Por todo carinho e confiança no meu trabalho. Com certeza é uma “mãe científica”, e a melhor que alguém poderia ter! Para você, meu MUITO OBRIGADO!

Ao Dr. Emílio de Castro Miguel pela coorientação não documentada. Mas principalmente pelo acolhimento e aprendizado, me ensinando a caminhar com minhas próprias pernas. Pela amizade, carinho, confiança e incentivo ao meu trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Valdirene Moreira Gomes, por toda ajuda e incentivo durante a minha trajetória. Por em alguns momentos me auxiliar como se fosse um de seus alunos e não medir esforços para tanto.

Ao pesquisador Sebastião José da Silva Neto pela ajuda na identificação das espécies estudadas.

À Seu Vavá por toda ajuda no campo, pelas boas risadas e brincadeiras e principalmente pelos verdadeiros ensinamentos. Sem dúvida ir para Itatiaia sem Seu Vavá não tem graça.

Ao atual e antigo chefe de laboratório de Biologia Celular e Tecidual por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, chefe do laboratório de Sanidade Animal (Hospital Veterinário/Uenf), por ter aberto as portas do laboratório. Aos técnicos que me auxiliaram a realizar uma das técnicas necessárias para realização deste trabalho.

A todos os técnicos do laboratório em especial à Beatriz Ferreira Ribeiro pela ajuda na realização de diversas etapas deste trabalho, mas principalmente pela amizade estabelecida, pela atenção e pelas indispensáveis massagens que aliviavam e quebravam um pouco os períodos estressantes nas tardes na Uenf.

Às secretárias da pós-graduação Beatriz e Marlene pela importante ajuda nas horas de desespero com tantos formulários, normas e procedimentos burocráticos.

Às secretárias do anexo LBCT, em especial Gerusa e Luciana pela ajuda e direcionamento em prestações de contas e pela alegria que passam quando conversamos.

À Dona Maria, pela enorme paz de espírito que é transmitida pelos abraços que acalmam até a alma no momento de desespero. Além do bem para o estomago com os maravilhosos bolos, feijão tropeiro, saladas, tortas...

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPQ, FAPERJ, pela bolsa de Mestrado (CAPES) e por todo o apoio financeiro.

Aos órgãos, SISBIO e INEA, que proporcionaram a realização deste trabalho através das licenças concedidas para pesquisa e coleta de material nos remanescentes florestais do Rio de Janeiro.

Aos amigos do laboratório: Carlos Eduardo Sanches, Camila Ribeiro Alexandrino, Germana Bueno, Glaziele Campbel, João Victor Castelar, Márcio Chaves, Marcos Vinícios de Almeida, Saulo Pireda Fernandes, Vanessa da Silva, Cris Tullii, Jonas Marques e Guilherme Rabelo. Obrigado pela ajuda e convivência que tanto me fez aprender e tanto me trouxe risos e felicidades. Em especial à Camilinha que me ensinou e me ajudou em tantas etapas da minha vida acadêmica e pelas boas risadas durante as noites intermináveis de processamento no laboratório.

Ao meu grande amigo de longa data João Victor. Por me fazer rir diversas vezes com suas brincadeiras e palhaçadas e me dar força nos momentos ruins. Além de mostrar que mesmo em momentos difíceis não podemos deixar de se divertir.

As minhas duas e grandes amigas Janaína Sales e Aline Licurgo pela grande amizade, carinho e dedicação. Pela ajuda nos momentos difíceis, estando perto ou longe sempre se fazem presentes. Pelos momentos de zuação e doidera. Pela diversão e alegria que sempre me proporcionaram. Obrigada piruas!

A todos os meus amigos de longa e curta data e aos colegas por fazerem hoje parte do que eu sou.

Ao meu querido Marcos Pereira Botelho, que além de grande amigo e companheiro, é meu incrível parceiro para todos os momentos e lugares. Pelos maravilhosos momentos de diversão, alegria e curtidão que sempre se fazem presente em nosso relacionamento. Pelo grande apoio e enorme paciência, principalmente nesta etapa final de trabalho, vendo e ouvindo mil vezes minhas apresentações, reclamações, choros... O meu MUITO OBRIGADO por fazer parte da minha vida e me deixar fazer parte da sua. Espero estar sempre ao seu lado.

Aos meus padrinhos Eduardo, Gisele e Ângela que sempre me incentivaram na minha escolha de vida. Pela preocupação e pelas palavras certas nos momentos difíceis. Pelo carinho, amizade e dedicação.

Aos meus avós pela lição de vida. Não importa de onde vem ou qual o seu sobrenome, mas aonde quer chegar e quem leva consigo. Especialmente ao meu vôpai, Jorge, o ser mais evoluído que já conheci na vida. Pela paz de espírito e pelos maiores ensinamentos da minha vida.

Ao meu grande irmão, Neto, com suas doideras e maluquices sempre me fazendo rir. Pelas bagunças deixadas pela sala e cozinha e banheiro, que pelo menos serviu para ajudar a dividir o estresse com a dissertação.

A todos os meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso e sempre me incentivaram no meu caminho. A minha família Botelho que sempre me acolheu e me faz sentir uma pessoa especial.

E a todas as pessoas que apesar de não mencionadas, não estão esquecidas e que me acolheram nessa nova fase da minha vida que foi fazer parte da UENF.

## Sumário

Resumo.....	XI
Abstract.....	XII
Introdução.....	1
Floresta atlântica.....	2
A família Rubiaceae.....	3
O gênero <i>Psychotria</i> L.....	4
Estípulas.....	5
Estruturas secretoras.....	6
Coléteres.....	7
Exsudados e mecanismos de produção e liberação.....	9
Senescência e morte celular programada (MCP).....	11
Objetivos.....	14
Objetivo geral.....	14
Objetivos específicos.....	15
Capítulo 1.....	16
Introdução.....	17
Material e métodos.....	18
Área de estudo e material botânico.....	18
Preparo de amostras para microscopia.....	19
Testes histoquímicos.....	20
Resultados.....	21
Morfologia, localização e distribuição dos coléteres.....	21
Histologia dos coléteres.....	23
Tipo de coléter.....	23
Histoquímica.....	24
Ilustrações.....	26
Tabela 1.....	38
Tabela 2.....	39
Discussão.....	40
Conclusões.....	47

Capítulo 2.....	48
Introdução.....	49
Material e métodos.....	50
Material botânico e área de estudo.....	50
Preparo de amostras para microscopia.....	50
Análise <i>in situ</i> (TUNEL) da fragmentação do DNA.....	51
Resultados.....	52
Ultraestrutura.....	52
Ensaio TUNEL.....	55
Ilustrações.....	56
Discussão.....	70
Conclusões.....	74
Considerações finais.....	76
Referências bibliográficas.....	78

## Resumo

Os coléteres são estruturas secretoras encontradas na face adaxial de diversos órgãos de diferentes membros de 60 famílias de Angiospermae. A presença, distribuição e forma destas estruturas secretoras na superfície adaxial de órgãos vegetativos pode constituir uma característica relevante para a família Rubiaceae e para o gênero *Psychotria*. A função biológica da secreção produzida pelos coléteres envolve o aumento da proteção dos tecidos meristemáticos, onde o exsudado gerado pode auxiliar na proteção física e/ou química contra estresses ambientais. Durante o processo de produção até a externalização da secreção os tecidos dos coléteres sofrem transformações bioquímicas e ultraestruturais, sendo estas características importantes a serem analisadas para compreender os processos de funcionamento celular durante seu desenvolvimento. Sendo assim esta pesquisa teve como objetivos: i) investigar de forma comparativa a distribuição e anatomia dos coléteres presentes nos ápices vegetativos de seis espécies de *Psychotria* (*P. capitata* Ruiz & Pav.; *P. carthagenensis* Jacq.; *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl.; *P. pubigera* Schltl.; *P. ruelliifolia* Müll.Arg.; *P. suterella* Müll.Arg); ii) Caracterizar quimicamente a secreção; iii) Analisar as mudanças à nível subcelular durante o desenvolvimento dos coléteres em *P. leiocarpa*, *P. pubigera* e *P. suterella*; iv) Investigar os aspectos do transporte de substâncias pela parede periclinal externa; e v) Caracterizar e analisar o processo de senescência e morte celular programada dessas estruturas nas três espécies citadas acima. Para tanto, ápices vegetativos das seis espécies foram coletados em remanescentes florestais no estado do Rio de Janeiro e processadas segundo técnicas usuais em microscopia óptica, histoquímica, microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os coléteres de cinco espécies são caracterizados anatomicamente por uma epiderme secretora em paliçada e eixo central parenquimático. Já a espécie *P. Suterella* apresenta uma epiderme secretora reduzida. Os coléteres apresentam-se em quatro formas diferentes e são distribuídos em única ou mais linhas ou em pequenos grupos na superfície adaxial das estípulas. Os estágios de desenvolvimento dos coléteres foram definidos em: estágio secretor inicial e estágio secretor tardio. Nas espécies *P. leiocarpa*, *P. pubigera* e *P. suterella* também foi possível caracterizar os dois estágios de desenvolvimento à nível subcelular. Entretanto a senescência não foi bem definida quanto ao nível subcelular, já que as células secretoras entram em processo de morte celular programada enquanto ainda estão em atividade secretora, como evidenciado pelo ensaio TUNEL em *P. Pubigera* e *P. leiocarpa*. A característica mucilaginosa da secreção demonstra que estas estruturas funcionam na prevenção da dessecação nos tecidos meristemáticos, bem como, a presença de alcalóide na secreção sugere que estas estruturas auxiliam também na defesa contra microorganismos. Os resultados relacionados ao modo de externalização da secreção revelou que os estratos cuticulares da parede periclinal externa se reorganizam de acordo com a passagem da secreção e tendem a se acumular no estrato cuticular.

Palavras-chave: Estrutura secretora. Microscopia. Morte celular programada.

## Abstract

Colleters are secretory structures found on the adaxial surface of the different organs in different members of 60 families of Angiospermae. The presence, distribution and shape of these secretory structures on the adaxial surface of vegetative organs may be an important characteristic for the Rubiaceae family and the *Psychotria* genus. The biological function of secretion involves increasing the protection of meristematic tissues, where the exudate generated by colleter can help protect physical and/or chemical against environmental stresses. During the process of externalization the production until the secretion of colleters tissues pass through biochemical and ultrastructural changes, which are important features to be analyzed to understand the processes of cellular functions during development. Therefore, this research was to objectives: i) comparative investigation of the distribution and anatomy of colleter present in shoot apices of six species of the *Psychotria* genus; ii) chemically characterize the secretion; iii) subcelular analyze of changes during the development of colleters in *P. leiocarpa*, *P. pubigera* and *P. suterella* iv) investigate aspects of transport of substances by the outer cell wall; and v) characterize and analyze the senescence process and programmed cell death of these structures in the three species mentioned above. Therefore, shoot apices of the six species were collected in Atlantic Forest remnants in the state of Rio de Janeiro and processed by usual techniques in optical microscopy, including histochemistry, scanning and transmission electron microscopy. In five species colleters are characterized anatomically by a palisade secretory epidermis and parenchymatous central axis. Already the species *P. Suterella* has a reduced secretory the epidermis. Colleters present in four different forms and are distributed in one or more lines or small groups in the adaxial surface of the stipules. Colleters present in four different forms distributed on one or more lines or triangles adaxial surface of stipules. The developmental stages of colleters were defined: initial secretory stage and late secretory stage. In species *P. leiocarpa*, *P. pubigera* and *P. suterella* was also possible to characterize the two stages of development the subcellular level. However senescence hasn't been well defined as the subcellular level, since secreting cells enter programmed cell death process while still in secretory activity, as evidenced by TUNEL assay on *P. Pubigera* and *P. leiocarpa*. The mucilage characteristic of the secretion demonstrates that these structures has function to prevent desiccation meristematic tissue as well as the presence of alkaloid in the secretion suggests that these structures also assists in defense against microorganisms. The results related to the externalization mode of secretion revealed that the cuticular layers of the outer cell wall reorganize themselves according to the passage of the secretion and tend to accumulate in the cuticle.

Keywords: Secretory structure. Microscopy. Programmed cell death.

## INTRODUÇÃO

As estruturas secretoras em plantas são definidas como uma célula ou grupo de células capazes de produzir exsudados que podem ser mantidos no interior da célula secretora ou serem externalizados (Fahn, 1979). Diversos trabalhos relatam que muitas destas estruturas podem atuar em processo de defesa das plantas, especialmente pela ação dos seus exsudatos (Fahn, 1979; Dickison, 2000; Thomas *et al.*, 1989; Thomas & Dave, 1989a, b; Thomas, 1991; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006).

O estudo de estruturas secretoras em plantas vem contribuindo para diferentes áreas da botânica recebendo enfoques ecológico, funcional, taxonômico e econômico. Por exemplo, dentre as Angiospermae, a secreção produzida pelo estigma é utilizada na hidratação e fornecimento de nutrientes para o grão-de-pólen (Cruden & Lyon, 1985), portanto, essencial para o ciclo de vida da planta. Outro exemplo é o exsudado produzido por coléteres que foi descrito apresentando propriedades antifúngicas, compondo um possível mecanismo de proteção química para planta (Miguel *et al.*, 2006). A existência, a forma e o produto secretado destas estruturas secretoras, muitas vezes, são características valiosas em estudos taxonômicos, subsidiando como ferramenta para futuras análises filogenéticas (Solereeder, 1908; Lersten & Curtis, 1995; Castro *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2004).

Coléteres são estruturas secretoras especializadas na produção de mucilagens, gomas ou resinas. Estas estruturas estão localizadas na superfície adaxial de diferentes órgãos vegetativos e/ou reprodutivos e foram primeiramente chamadas de coléteres por Hanstein (1848 apud Thomas, 1991). A função principal dos coléteres relaciona-se com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, sendo estes lubrificados e protegidos contra dessecação, herbívoros e patógenos (Thomas *et al.*, 1989; Thomas & Dave, 1989a, b; Thomas, 1991). Na família Rubiaceae, a presença de estípulas interpeciolares portadoras de coléteres é uma das características vegetativas mais importantes, que a distingue da maioria das outras famílias de sua ordem (Robbrecht, 1988). Nesta família, os coléteres também ocorrem em pecíolos (Johansson, 1987), cálice (Robbrecht, 1987; Dave *et al.*, 1988), brácteas, bractéolas e corola (Thomas & Dave, 1989c).

Durante os últimos anos, estudos sobre coléter vêm sendo realizados pela equipe de pesquisa coordenada pela Dra. Maura Da Cunha, principalmente quanto a

caracterização a morfologia, anatomia e ultraestrutura (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2009; Miguel *et al.*, 2010), além de estudos do mecanismo de secreção e sua composição (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2010; Tullii *et al.*, 2013) e estudos de mecanismo de defesa da planta (Miguel *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2006).

Neste sentido esta dissertação tem por objetivo descrever os coléteres de seis espécies do gênero *Psychotria* de remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro, principalmente quanto a aspectos estruturais e da composição química de sua secreção. Frisando avaliar se as características de presença ou ausência de coléteres, da sua distribuição no órgão e da sua anatomia poderiam apontar caracteres que possam ser utilizadas entre espécies de *Psychotria* e de delimitação da Tribo. Além de avaliar se a senescência dos coléteres é dirigida por eventos de morte celular programada.

## **FLORESTA ATLÂNTICA**

Os Domínios da Mata Atlântica são complexos de ecossistemas de grande importância ecológica, pois abriga uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil e do mundo (Ribeiro *et al.*, 2009). Por ocupar uma grande extensão com área de latitude e longitude muito variada, diferentes tipos de relevo, solo e condições climáticas, esse bioma possui um dos mais altos graus de riqueza de espécies e taxas de endemismo no planeta, incluindo mais de 20.000 espécies de plantas (Ribeiro *et al.*, 2009).

No Brasil, esse bioma se estende do Rio Grande do Sul ao Piauí, apresentando diferentes formas de relevo, paisagens e características climáticas diversas. Ao todo são 1.363.000 Km<sup>2</sup> de Mata Atlântica, englobando 17 estados brasileiros, resultando numa área de aproximadamente 16% do território brasileiro (Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2010). Entretanto, mesmo com todo esse potencial ecológico e riqueza de espécies o referido bioma vem sofrendo uma imensa perda de território (Ribeiro *et al.*, 2009).

Desde o descobrimento do Brasil a Mata Atlântica foi gradativamente reduzida por impactos de diferentes ciclos de exploração, passando pelo surgimento e concentração das cidades e núcleos industriais, pelas atividades de agricultura e de pecuária e pelo aumento da densidade demográfica (Rocha & Feldmann, 2006). Atualmente, os maiores remanescentes deste Bioma estão localizados em poucas

áreas na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, e hoje não ultrapassa a marca de 7% do seu total (Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2010).

A associação entre a destruição sofrida no passado e os altos níveis de riqueza e de endemismo incluiu a Mata Atlântica no cenário mundial como um dos 34 “hotspots” de biodiversidade (Mittermeier *et al.*, 2004). O estado do Rio de Janeiro abriga uma série de reservas de remanescente florestais, desde Florestas Ombrófilas a Matas de Tabuleiros, compondo mais de 80 Unidades de Conservação (Viana, 2007).

Com exemplo destas reservas encontradas no estado, podemos citar o Parque Nacional do Itatiaia, a Reserva Biológica do Tinguá e Reserva Biológica da Ilha Grande, as quais estão expostas a diferentes influências ambientais, fazendo com que esse ecossistema abrigue uma grande diversidade ecológica, revelando em seus domínios uma grande variedade de famílias de plantas, dentre elas, a família Rubiaceae.

## **A FAMÍLIA RUBIACEAE**

A família Rubiaceae, pertencente à ordem Gentianales, possui distribuição cosmopolita concentrada nos trópicos (Robbrecht, 1988), apresentando aproximadamente, 13.100 espécies dispostas em 611 gêneros e representa a maior família de plantas lenhosas nos trópicos (Govaerts *et al.*, 2007). Segundo Mabberley (1997) e Delprete & Jardim (2012), a família ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermae, perdendo apenas para as Orchidaceae, Asteraceae e Fabaceae. Na região neotropical, as Rubiaceae estão representadas por 217 gêneros e 5.000 espécies (Delprete & Jardim, 2012). No Brasil, a família compreende aproximadamente 120 gêneros e 2.000 espécies correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora e ocorrendo como um importante elemento em quase todas as formações naturais (Souza & Lorenzi, 2008).

Além da elevada riqueza de espécies, a família Rubiaceae destaca-se por possuir espécies com valor histórico e econômico como o café (*Coffea arabica* L.), o jenipapo (*Genipa americana* L.) e a quina (*Cinchona calisaya* Wedd.), que possui o quinino usado no tratamento da malária (Govaerts *et al.*, 2007). As espécies são, em sua maioria, árvores de pequeno porte ou arbustos frequentes no subosque (Souza

& Lorenzi, 2008) e pode ser facilmente reconhecida em campo devido às suas folhas simples, geralmente opostas e pela presença de estípulas interpeciolares (Robbrecht, 1988).

Robbrecht (1988) através da utilização de caracteres morfológicos aliados a dados fitogeográficos propôs a divisão da família em quatro subfamílias, porém estudos mais recentes têm proposto uma nova divisão em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (Rova *et al.*, 2002; Robbrecht e Manen 2006; Bremer e Eriksson, 2009). E embora as características morfológicas sejam bem definidas quanto à família, as delimitações em nível das subfamílias, das tribos e dos gêneros têm sido discutidas não só em razão da grande riqueza de espécies, mas também pela ausência de caracteres morfológicos disponíveis para a definição dos grupos (Nepokroeff *et al.* 1999),

A subfamília Rubioideae é representada por ervas ou arbustos, sendo caracterizada pela presença de cristais de ráfides, prefloração da corola valvar e indumento de septado (articulado). Esta apresenta distribuição mundial e a maioria das tribos e espécies são tropicais ou subtropicais, mas algumas espécies ocorrem nas regiões temperadas (Bremer & Eriksson, 2009). Bremer e Manen (2000) analisaram 151 gêneros e reconheceram 16 tribos, dentre elas a tribo Psychotrieae, que é formada por aproximadamente 50 gêneros, alguns deles com delimitação incerta e controversa, como no caso de do gênero *Psychotria*.

### **O GÊNERO *PSYCHOTRIA* L.**

O gênero *Psychotria* L. é pantropical e subtropical, comumente representado por arbustos, pequenas árvores e ervas, e raramente por epífitas. São encontrados nos dois hemisférios e comum no sub-bosque de matas tropicais apresentando aproximadamente 2.000 espécies (Hamilton, 1990; Taylor, 1996; Davis *et al.*, 2001).

Por apresentar um grande número de espécies, este gênero apresenta dificuldade na delimitação de suas fronteiras, sendo motivo de grande controvérsia entre alguns autores. Libot *et al.* (1987) relata que esta dificuldade de delimitação está relacionada principalmente com os gênero *Palicourea* e *Cephaelis*. Desde o primeiro estudo sistemático em Rubiaceae, onde o gênero *Psychotria* foi separado de *Palicourea* por Schumann (1981), ainda não há consenso quanto às características mais adequadas na separação entre as espécies incluídas nestes

dois gêneros, justamente por estes serem considerados morfologicamente muito semelhantes. Esta dificuldade de delimitação vem provocando muitas mudanças na classificação hierárquica intrafamiliar, como nas tribos, gêneros e subgêneros (Andreasen & Bremer, 2000; Piesschaert *et al.*, 2000).

Baseado em caracteres morfológicos e na distribuição geográfica o gênero *Psychotria* é subdividido em três subgêneros: *Psychotria* (pantropical), *Tetramerae* (algumas espécies da África e Madagascar) e *Heteropsychotria* (espécies neotropicais) (Steyermark, 1972; Lopes *et al.*, 2004). Na América do Sul o gênero *Psychotria* compreende dois subgêneros, o subgênero *Psychotria*, com estípulas interpeciolares tanto persistentes como decíduas, e frutos vermelhos ou alaranjados e o subgênero *Heteropsychotria*, com estípulas sempre persistentes, geralmente unidas ao redor do caule formando um tubo e bilobadas, e os frutos geralmente azuis ou negros (Taylor *et al.*, 2007).

Espécies dos dois subgêneros são facilmente encontradas nos remanescentes florestais no estado do Rio de Janeiro, e para esta dissertação foram selecionadas as espécies *P. leiocarpa* Cham. & Schltld., *P. pubigera* Müll. Arg. e *P. carthagenensis* Jacq., que estão compreendidas dentro do subgênero *Psychotria* (Nepokroeff *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007). E as espécies *P. suterella* Müll. Arg., *P. ruellifolia* (Cham. & Schltld.) Müll. Arg. e *Psychotria capitata* Ruiz & Pav., que estão compreendidas no subgênero *Heteropsychotria* (Nepokroeff *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007). E como dito anteriormente, os dois subgêneros possuem em comum a presença de estípulas interpeciolares, e tal característica vegetativa, em geral, é marcante para o gênero e para a família como um todo, e constitui um importante papel para identificação de espécies no campo.

## ESTÍPULAS

Estípulas, em muitas famílias de dicotiledôneas podem possuir estruturas capazes de secretar mucilagens, gomas ou resinas (Lersten, 1974a). Em Rubiaceae as estípulas são apêndices presentes aos pares na base do pecíolo e, em sua maioria, são fusionados a uma estrutura interpeciolar em ambos os lados do caule entre as folhas opostas (Robbrecht, 1988) ou possuem uma bainha que une o par de estípulas (Souza & Souza, 2008). Fahn (1990) reporta que em algumas plantas as estípulas podem ser verdes parecidas com as folhas, tendo capacidade

fotossintética, mas sua principal função é proteger as folhas jovens em desenvolvimento.

De acordo com Robbrecht (1988), a presença de estipulas interpeciolares é uma das características vegetativas mais importantes em Rubiaceae, que a distingue da maioria das outras famílias. Sabe-se que nessa família a estipula pode ser decídua ou persistente, recobrando o ápice vegetativo e, quando persistentes as gemas axilares, oferecendo proteção na forma de uma barreira física aos meristemas (Fahn, 1990). Fahn (1979) ainda relata a existência de estipulas jovens possuindo estruturas secretoras de mucilagem.

## **ESTRUTURAS SECRETORAS**

A atividade secretora é inerente a todas as células vivas (Roshchina & Roshchina, 1993), sendo esta característica mais evidente e intensa em alguns tipos celulares. Assim, muitas células apresentam especializações decorrentes de processos de diferenciação que auxiliam ou otimizam sua atividade secretora (Carvalho & Recco-Pimentel, 2007). As estruturas secretoras estão presentes em diferentes órgãos das plantas e são caracterizadas por suas distintas formas (Dickison, 2000).

Em plantas, as estruturas secretoras são responsáveis pela produção de diversas substâncias que desempenham funções como: defesa contra herbivoria e patógenos, atração de polinizadores e adaptação ambiental (Esaú, 1976; Fahn, 1979; Cutter, 1978). E para o desempenho destas funções as estruturas secretoras são especializadas e exibem diferentes graus de complexidade.

De acordo com Fahn (1979), as estruturas secretoras se originam de diferentes tecidos meristemáticos e devem ser classificados principalmente do ponto de vista funcional. Em estudos realizados por Fahn (1979, 1988) foi organizada uma listagem dos diferentes tipos de estruturas secretoras de plantas. Neste estudo, o autor classifica as estruturas secretoras principalmente quanto à sua morfologia e à composição química da secreção.

Além disso, as estruturas secretoras formam um grupo polifilético, o que significa dizer que os processos evolutivos levam as diferentes estratégias de síntese e externalização de exsudados (Fahn, 1979; Laurence *et al.*, 2000). Os tecidos secretores sofrem transformações relativamente rápidas, fazendo com que

sua estrutura tenha morfologia, ultraestrutura, e até mesmo seu conteúdo bioquímico diferenciado em um curto período de dias, ou até mesmo horas. Esta característica torna difícil à caracterização dos diversos tecidos que possuem função secretora (Fahn, 1979).

Algumas características citológicas comuns às células de tecidos secretores são paredes primárias delgadas, núcleo grande, citoplasma denso, vacúolos pequenos e numerosas mitocôndrias, que evidenciam alta atividade metabólica (Fahn, 1979, 1988). Fahn (1979, 1988) ainda relata que a frequência de outras organelas varia de acordo com o material secretado.

Nas células secretoras dos ductos de goma de *Lannea coromandelica* (Anacardiaceae), por exemplo, o citoplasma é rico em ribossomos, em retículo endoplasmático rugoso, em mitocôndrias, vacúolos, em corpos paramurais e em gotas lipídicas. Venkaiah (1992) comprovou ainda em seu estudo que em algumas etapas da diferenciação dos ductos resiníferos de *L. coromandelica* foi encontrado cisternas de complexo de Golgi.

Os laticíferos encontrados em *Chamaesyce thymifolia* (Euphorbiaceae), por sua vez, em células ainda não diferenciadas apresentaram um citoplasma denso, abundância de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e pequenos vacúolos, enquanto os laticíferos diferenciados exibiram uma degeneração destas organelas, restando apenas a membrana plasmática e partículas de látex (Da Cunha *et al.*, 1998).

Dentre da diversidade de estruturas secretoras existentes, o objeto de estudo desta dissertação é o coléter, um dos diferentes tipos de estruturas secretoras que, até hoje, é alvo de discussão na literatura sobre o ponto de vista de sua morfologia e função.

## **COLÉTERES**

Os coléteres ocorrem em 60 diferentes famílias de Angiospermae, estando presentes em 379 gêneros, sendo que a maior presença foi registrada na família Rubiaceae, com 140 gêneros, seguida por Apocynaceae, com 41 gêneros (Thomas, 1991). Para a distinção de famílias, as variações dos coléteres apresentam-se pouco úteis, mas em termos de gêneros e subgêneros em Rubiaceae, as variações como: a presença em maior ou menor número de coléteres no interior da estípula e/ou do

cálice; a forma da distribuição dos coléteres e sua localização no interior da estípula e/ou do cálice se tornam bastante consistente (Robbrecht, 1988).

No gênero *Simira* (Rubiaceae), por exemplo, foram descritos a forma da distribuição dos coléteres na estípula em três espécies. Para a espécie *S. pikia* os coléteres se encontram distribuídos em uma linha na base da estípula, já para a espécie de *S. rubra* os coléteres se encontram distribuídos em diversas linhas na base da estípula. Já o conjunto dos coléteres de *S. glaziovii* formam dois triângulos na base da estípula (Klein *et al.*, 2004), podendo ser estas variações utilizadas como uma característica taxonômica para as espécies em questão.

O termo coléter é derivado do grego “colla” significando cola, goma, referindo-se ao exsudato pegajoso produzido por estas estruturas (Thomas & Dave, 1990a). A descrição que abrange a maior parte dos estudos encontrados, principalmente em espécies da família Rubiaceae, é a de que os coléteres são constituídos por um eixo central alongado, formado por parênquima fundamental, circundado por um estrato epidérmico em paliçada sendo as células epidérmicas responsáveis pela secreção (Thomas, 1991; Da Cunha & Vieira, 1997).

Os coléteres podem apresentar variações morfológicas sendo estas importantes para a sistemática da família. Lersten (1974a, b) descreveu seis tipos de coléteres em Rubiaceae com base na aparência da sua epiderme: “standard” (padrão), “intermediate” (intermediário), “dendroid” (dendróide), “brushlike” (tipo escova), “reduced” (reduzido), “irregular epidermal cells” (epiderme irregular). O tipo padrão é o mais comum e mostra algumas diferenças entre as espécies em tamanho e em ausência/presença de constrição na base (Robbrecht, 1988).

A classificação destas estruturas secretoras em relação à morfologia e anatomia é bem discutida. O uso do termo “coléter” varia entre diferentes autores devido ao critério usado ao definir estas estruturas, como morfologia, localização e natureza química da secreção (Leitão & Cortelazzo, 2008). Segundo Mayer e colaboradores (2011), o termo deve ser empregado levando em consideração apenas à composição e a função do exsudado. Já outros autores relatam que uma estrutura para ser classificada como coléter depende também da anatomia e ontogênese, devendo ter origem tanto epidérmica quanto subepidérmica (Thomas, 1991; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.* 2006).

Outros autores também descrevem as características de origem para coleteres como: Ramayya & Bahadur (1968), que definiram que os coleteres se

desenvolvem a partir de emergências, ao demonstrar que em algumas espécies de Apocynaceae os coléteres se originam da epiderme e de camadas de células subepidérmicas; Horner & Lersten (1968) e Miller *et al.*, (1983), descrevem que para *P. bacteriophila* e *P. kirkii*, respectivamente, os coléteres são iniciados nas protoderme adaxial de estípulas jovens, projetando-se na cavidade formada entre as estípulas, as folhas e o ápice caulinar; e Appezzato-da-Glória & Estelita (2000), em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, descrevem que as células epidérmicas se formam pela divisão anticlinal das células da protoderme do seu local de origem, enquanto que as da subprotoderme dividem-se periclinalmente para a formação das células do eixo central.

Estudos sobre a ultraestrutura de coléteres ressaltam a grande quantidade de retículo endoplasmático, com localização periférica e perinuclear, e o acúmulo de secreção entre a membrana plasmática e a parede das células secretoras (Horner & Lersten 1968; Dexheimer & Guenin, 1981; Miller *et al.*, 1983). A observação de organelas como plastídio também foi relatada, entretanto sua função não foi esclarecida (Klein *et al.*, 2004; Barreiro, 2007). Alguns autores relatam que a degradação de amido dos plastídios tem sido associada com fonte de energia para os processos metabólicos em estruturas glandulares e, provavelmente, fornecem substrato para a síntese dos precursores dos componentes hidrofílicos da secreção (Durkee *et al.*, 1984; Monteiro *et al.*, 1999).

Apesar de todos os estudos a cerca dessas estruturas secretoras existem, ainda, algumas persistem dúvidas e discussões sobre sua origem, e o seu mecanismo de secreção, ou seja, a forma pela qual o exsudato deixa a estrutura secretora, sendo pouco conhecidos, por exemplo, a passagem da secreção pela parede periclinal externa.

## **EXSUDADOS E MECANISMOS DE PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO**

Os exsudados de plantas são classificados de acordo com sua composição química, e apresentam uma ampla distribuição entre as famílias de plantas superiores (Fahn, 1979). Como exemplo, as resinas são um tipo de mistura de terpenos, de ésteres e de fenóis; o látex é composto de alcalóides, vitaminas, poliisoprenos, enzimas, lipídeos, aminoácidos livres e malato de cálcio; as gomas e mucilagens têm composições similares, que constituem em heteropolissacarídeos

complexos e compostos proteicos (Strasburger, 1953). Nos coléteres, a função biológica da secreção envolve o aumento da proteção dos tecidos meristemáticos (Robbrecht, 1988; Ramayya & Bahadur 1968; Esaú, 1974; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2006).

O processo de produção e secreção de substâncias envolve transformações morfológicas, bioquímicas e ultraestruturais nas células secretoras. Durante esse processo, a ultraestrutura celular é modificada de acordo com a fase da vida da estrutura e/ou do produto a ser produzido (Gaffal *et al.*, 2007). Em geral, os coléteres começam a liberar a secreção para o meio externo antes da expansão foliar, à qual estão ligados. Neste estágio, o coléter geralmente possui coloração amarelada e o exsudato é um material pegajoso, o qual pode recobrir completamente o ápice caulinar (Thomas, 1991; Klein *et al.*, 2004; Paiva & Machado, 2004; Paiva, 2009; Tullii *et al.*, 2013). Porém o mecanismo de liberação do exsudado na maioria dos casos não foi elucidado.

Na literatura foi descrito para *P. carthagenensis* (Rubiaceae) a ocorrência de poros na superfície do coléter, na qual se acredita que seja o canal para a saída da secreção (Vitarelli & Santos, 2009). Outros trabalhos relatam que a externalização da secreção ocorre quando a cutícula se rompe e o material é, então, liberado para o espaço extracelular. Warming (1883) relatou esta característica em coléteres da espécie *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae); Curtis & Lersten (1974) em glândulas de resina na espécie *Populus deltoides* (Salicaceae) e Mohan & Inamdar, (1986) em nectários extraflorais na espécie *Plumeria rubra* (Apocynaceae).

Outra forma pela qual o exsudato do coléter passa pela parede celular e pela cutícula, quando esta está presente e não se rompe também é descrita pela literatura, mas ainda não elucidado. O trabalho de Durkee *et al.* (1984) com *Passiflora foetida* (Passifloraceae) é um exemplo do não rompimento da cutícula na glândula de resina, porém os autores não conseguiram estabelecer uma forma de liberação do exsudado. O mesmo ocorre para os coléteres descritos nas espécies de *Simira glaziovii*, *S. rubra*, *S. pikia*, *Psychotria nuda*, *Bathysa nicholsonii*, *B. gymnocarpa*, *B. stipulata* e *Alseis pickelii* (Rubiaceae) (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006, 2009, 2010; Tullii *et al.*, 2013).

Mahlberg e Kim (1992) sugerem que em *Cannabis* (Cannabaceae) existem cavidades secretoras na parede externa dos tricomas glandulares, onde as mesmas servem de saída do exsudato. Miguel *et al.* (2010) descreve em espécies de *Bathysa*

(Rubiaceae) a modificação estrutural da parede periclinal externa para a passagem da secreção, porém o processo pelo qual a secreção é externalizada não foi evidenciado. Segundo Paiva (2006a), o acúmulo de secreção no espaço subcuticular nos coléteres *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) parece promover a expansão da cutícula, o que lhe confere um aspecto frouxo e flácido, demonstrando como esses exsudados podem ser externalizados.

O estudo da secreção e das mudanças subcelulares que ocorrem durante o processo secretor, ou seja, de síntese até a externalização da secreção, permite observar a dinâmica do processo de liberação da secreção tanto da célula secretora para a parede periclinal externa, quanto a posterior liberação para o meio externo, além da possibilidade de correlacionar a estrutura com o funcionamento de determinadas organelas envolvidas na síntese da secreção. As modificações estruturais, inclusive na parede celular, ocorridas durante o processo secretor podem culminar na morte da célula secretora e, posteriormente, a senescência da estrutura secretora. Essa morte se dá por um processo organizado denominado de morte celular programada (Gunawardena *et al.*, 2007).

### **SENESCÊNCIA E MORTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)**

A senescência em plantas pode ser observada em vários níveis, desde a senescência de órgãos a de células especializadas, e tem sido definida como um evento regulado geneticamente o qual leva à morte as células, órgãos ou organismos. A senescência é acompanhada por mudanças morfológicas e/ou alterações nas propriedades bioquímicas e biofísicas do metabolismo (Streit *et al.*, 2005).

Na maioria dos casos, órgãos e plantas senescentes apresentam eventos de morte celular programada (MCP), pelo fato do processo ser geneticamente determinado, sob o controle de reguladores endógenos e requerer ativação ordenada por genes específicos (Hadfield & Bennett, 1997). Entretanto detalhes de caracterização citológica e molecular dos eventos que regem tais fenômenos de senescência e MCP são escassos.

No caso de estruturas secretoras, o curto ciclo de vida faz com que as mudanças estruturais e bioquímicas também ocorram muito rápidas, dificultando o estudo e compreensão do processo. No caso específico de coléteres Thomas &

Dave (1989b) mostraram que a senescência em *Allamanda cathartica* (Apocynaceae) é um processo organizado que envolve primeiro a lignificação da epiderme secretora, levando a uma perda da identidade do tecido e subsequentemente, o eixo central adquire as mesmas características.

Tais características são similares com as observações feitas em coléteres de *Gardenia* (Rubiaceae) (Dave *et al.*, 1987, 1988), e em outros gêneros da família Apocynaceae como, *Calotropis* (Kuriachen & Dave, 1989), e *Roupelia* (Thomas *et al.*, 1989). Appezzato-da-glória & Estelita (2000) também descrevem esta característica em coléteres de espécies de *Mandevilla* (Apocynaceae) e relatam que depois de cessar a sua função secretora, os coléteres senecem com uma mudança gradual de cor verde para castanho-escuro e esta alteração prossegue até a maturação foliar.

Em recente trabalho, Miguel *et al.* (2010) mostraram o processo de morte celular programada em eventos de senescência de coléteres de *Bathysa gymnocarpa* K. Schum. e *B. stipulata* (Vell.) J. Presl. (Miguel *et al.*, 2010), onde a fase senescente é definida pela morfologia do coléter, mas não é bem definida em nível subcelular nas células secretoras. Estes autores relatam evidências que sugerem que a MCP se inicia na fase secretora, ou seja, durante o processo de síntese da secreção e liberação da secreção para o meio intercelular. Contudo são necessários mais experimentos para avaliar esse fenômeno.

Para as plantas, Van Doorn e Woltering (2005) primeiramente descreveram três tipos de MCP: autofagia, apoptose-like e necrose-like. E foram categorizadas em relação aos três tipos de MCP estabelecidas pelos tipos morfológicos em metazoários. O processo autofágico consiste no maior sistema de degradação e reciclagem em células eucarióticas (Van Doorn & Woltering, 2005). As características morfológicas da autofagia incluem vacuolização, degradação do conteúdo citoplasmático e ligeira condensação da cromatina (Bursch, 2001). Deve-se ressaltar que a autofagia nem sempre leva à morte celular, visto que também pode levar a reciclagem para manter as funções essenciais e homeostase celular (Rose *et al.*, 2006).

Outro processo de MCP que se inicia em célula vegetal é um processo similar à morte animal do tipo I, a apoptose. Esse processo tem origem evolutiva bastante antiga, o que justifica tais similaridades (Reape *et al.*, 2008). A maior parte dos autores afirma que, em células vegetais, não existe o processo de apoptose real, já

que para esse processo é necessário que os corpos apoptóticos sejam degradados em outras células, o que não ocorre em plantas. Uma das suposições para este fato é que as paredes celulares espessas de células vegetais impedem a fagocitose (Van Doorn & Woltering, 2005). Dessa forma, o termo utilizado em células vegetais é *apoptose-like* e não *apoptose* (Reape *et al.*, 2008; Reape & McCabe, 2008). O processo de MCP *apoptose-like* pode ser deflagrado por indução de estresse abiótico, durante o desenvolvimento celular e pela indução de resposta de hipersensibilidade (Danon *et al.*, 2000).

O processo de MCP *necrosis-like*, ou MCP não lisossomal, ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que não há envolvimento de lisossomos como nos outros casos. O que acontece, aparentemente é a inibição das principais vias biossintéticas, pela desestabilização das membranas, ou por outros modos ainda não desvendados (Van Doorn & Woltering 2005). Entretanto, os autores relatam que de um modo geral os processos de MCP desencadeiam mudanças na ultraestrutura celular (Van Doorn & Woltering, 2005). As características principais relacionadas a este processo são retração do citoplasma, alteração na morfologia nuclear e posterior clivagem do DNA (Green & Kroemer, 1998; Danon *et al.*, 2000; McCabe & Leaver, 2000; Van Doorn & Woltering, 2005).

Após a caracterização dos três tipos de MCP em plantas (Van Doorn & Woltering, 2005), Van Doorn *et al.* (2011) relatam que apesar da morfologia da MCP em planta, serem bem caracterizadas em alguns casos, os mecanismos moleculares que controlam essa MCP estão começando a emergir, gerando ainda confusão sobre a classificação de MCP em plantas. Neste trabalho, Van Doorn *et al.* (2011) sugerem uma nova classificação baseada em critérios morfológicos e de acordo com essa classificação, o uso do termo "apoptose" não se justifica em plantas, mas pelo menos duas classes majoritárias de MCP podem ser distinguidas: a morte celular vacuolar e a necrose.

Durante a morte celular vacuolar, o conteúdo das células é removido por uma combinação do processo semelhante de autofagia e liberação de hidrolases pelos vacúolos líticos colapsados. Já a necrose é caracterizada por ruptura precoce da membrana plasmática, o encolhimento do protoplasto e ausência de características de células vacuolares, ou seja, grande presença de vacúolos no citoplasma. A morte celular vacuolar é comum durante a formação de tecidos e órgãos e de eliminação, enquanto que a necrose é tipicamente encontrada sob estresses abiótico. Van Doorn

*et al.* (2011) ainda relatam que alguns exemplos de MCP em planta, não podem ser atribuídos a qualquer uma das classes principais, porque são classificados como modalidades distintas. Estas são MCP associada com a resposta hipersensitiva (HR) a agentes patogénicos biotróficos, o que pode manifestar características de ambos, necrose e morte celular vacuolar (Van Doorn *et al.*, 2011).

Van Doorn *et al.* (2011) ainda relatam que o uso arbitrário, e por vezes, contraditórios de terminologia tem sido um problema no domínio da investigação de morte celular em planta e no mesmo ano publica um “opinion paper” sobre as classes de MCP em plantas comparada com as de animais (Van Doorn, 2011). Van Doorn (2011) sugere dois tipos de morte celular programada, e relata que em uma classe de MCP identificado em Van Doorn *et al.* (2011) foi dado um nome que é logicamente incorreto. Van Doorn (2011) relata que denominar de “morte celular vacuolar” é errado, porque como o vacúolo também está envolvido na MCP relacionada à HR, que requer proteínas vacuolares, não seria correto chamar de morte não vacuolar, sendo assim, cria uma nova classificação, denominando em morte celular autolítica e a não autolítica. E relata que a classe de MCP chamada de “autolítica” por Van Doorn (2011), foi chamada de “morte celular vacuolar” em Van Doorn *et al.* (2011) e a classe de MCP “não autolítica” chamada por Van Doorn (2011), possui características similares a chamada de “necrose” por Van Doorn *et al.* (2011).

A classificação para identificação da MCP em plantas seguida nesta dissertação foi a “autolítica” e “não autolítica” (Van Doorn, 2011). Entretanto, a presente classificação de MCP em planta não é estática, e estará sujeita a nova revisão, especialmente quando vias bioquímicas específicas forem mais bem definidas.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Caracterizar comparativamente a anatomia, ultraestrutura e desenvolvimento de coléteres de seis espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae) de remanescentes de Floresta Atlântica do Estado do Rio de Janeiro.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a micromorfologia e anatomia dos coléteres presente em ápices vegetativos das espécies *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl., *P. pubigera* Müll.Arg., *P. suterella* Müll.Arg., *P. ruelliifolia* Cham. & Schldl.; *P. capitata* Ruiz & Pav. e *P. carthagenensis* Jacq.;
- Identificar caracteres anatômicos de distribuição e forma dos coléteres que possam auxiliar a delimitação das espécies em questão;
- Caracterizar histoquimicamente os coléteres das seis espécies em questão;
- Descrever de forma comparativa a ultraestrutura dos coléteres de *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl., *P. pubigera* Müll.Arg., *P. suterella* Müll. Arg.;
- Caracterizar os aspectos morfológicos e ultraestruturais das células secretoras caracterizando a senescência e o processo de MCP das espécies de *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl., *P. pubigera* Müll.Arg., *P. suterella* Müll. Arg.

## *Capítulo 1*

Caracterização anatômica dos coléteres de espécies do gênero *Psychotria* L. (Rubiaceae): distribuição, variação morfológica e composição química da secreção

## INTRODUÇÃO

A subfamília Rubioideae, pertencente à família Rubiaceae, compreende 16 tribos, entre elas a tribo Psychotriaceae que abriga entre outros, os gêneros *Psychotria*, *Palicourea* e *Rudgea* (Robbrecht, 1988; Bremer & Manen, 2000), três taxa que apresentam realocação de espécies entre si em uma vasta discussão na literatura (Taylor, 1989, 1996; Nepokroeff *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2010, 2011; Borhidi, 2011).

A delimitação do gênero *Psychotria* dentro da tribo Psychotriaceae não é claramente definida, assim como, a delimitação dos subgêneros *Psychotria* e *Heteropsychotria*, principalmente quando comparados com os gêneros *Palicourea* e *Cephaelis* (Steyermark, 1972; Taylor, 1996; Nepokroeff *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2001). Estudos recentes no gênero *Psychotria* utilizando, por exemplo, características anatômicas da folha (Moraes *et al.*, 2011a, 2011b) e do lenho (Marques, 2012) sugerem existir caracteres com potencial para serem utilizados como diagnósticos para delimitação do gênero e separação de espécies. Porém ainda existe a necessidade de mais estudos identificando tais caracteres para enriquecer o entendimento deste taxa.

Os dois subgêneros possuem em comum a presença de estipulas interpeciolares portadoras de coléter, e tal característica vegetativa, em geral, é marcante para todo gênero (Robbrecht, 1988), podendo esta característica especialmente quando analisada em detalhes constituir uma ferramenta para caracterização taxonômica. No estado do Rio de Janeiro as espécies *P. leiocarpa* Cham. & Schtdl., *P. pubigera* Müll. Arg. e *P. carthagenensis* Jacq., que estão compreendidas dentro do subgênero *Psychotria* e as espécies *P. suterella* Müll. Arg., *P. ruelliifolia* (Cham. & Schtdl.) Müll. Arg. e *Psychotria capitata* Ruiz & Pav., que estão compreendidas no subgênero *Heteropsychotria* (Nepokroeff *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007) são facilmente encontradas no estado do Rio de Janeiro.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar comparativamente a morfologia e anatomia dos coléteres ocorrentes nas estipulas das seis espécies listadas acima, a fim de sugerir dados para contribuir com a sistemática do gênero. Bem como, identificar a composição química da secreção dessas estruturas, a fim de sugerir suas funções de defesa para planta.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ÁREA DE COLETA E MATERIAL BOTÂNICO

O estudo foi realizado em três reservas de remanescentes florestais no Estado do Rio de Janeiro. O Parque Nacional do Itatiaia e a Reserva Biológica do Tinguá sob licença do SISBio, nº 13575-1 e a Reserva Biológica de Ilha Grande sob licença do INEA 022/2011.

A Reserva Biológica do Tinguá compreende seis municípios do estado do Rio de Janeiro: Nova Iguaçu, Duque de Caxias, Petrópolis, Miguel Pereira, Queimados e Japeri. Sua localização está entre as latitudes 22°22' e 22°45' S e longitudes 43°40' e 43°05'W. O clima é tropical úmido, com temperaturas em média variando entre 15°C a 27°C e a pluviosidade média varia de 1500mm a 2600mm, com regime de distribuição periódica (Ibama, 2006). O Parque Nacional do Itatiaia, localizado no sudoeste do Estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22°19' e 22°45' S e longitudes 44°45' e 44°50' W, com altitudes entre 700 e 2.787 metros sobre o mar. O clima é mesotérmico com temperatura média anual entre 15°C e 27°C e a pluviosidade média varia de 1250mm a 1500mm anuais (Santos & Zinkan, 2000). A Reserva Biológica de Ilha Grande está localizada na Vila Dois Rios, na vertente sudeste da Ilha Grande, dentro dos limites do município de Angra dos Reis/RJ, entre as latitudes 23°5' S e longitudes 23°14' W. O clima é quente e úmido, sem déficit hídrico, com temperatura média anual de 23°C e com precipitação média anual variando de 1.515mm a 2.200mm (Araújo & Oliveira, 1988).

Ápice vegetativo, caulinar ou gema apical está localizado na extremidade do eixo principal e dos ramos do sistema caulinar. No ápice vegetativo se encontra o meristema apical caulinar, que além de contribuir para o crescimento em comprimento (altura) do caule, origina os primórdios foliares (que se diferenciarão em folhas) e as gemas axilares, que aparecem na axila de cada folha (Appenzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006). No caso do gênero *Psychotria*, os ápices vegetativos são envolvidos por um ou mais pares de estípulas, e na face interna das estípulas é possível encontrar os coléteres.

Ápices vegetativos de indivíduos adultos, incluindo as estípulas e o meristema apical caulinar, das seis espécies foram coletados com auxílio de tesoura de poda. Exsiccatas do material foram depositadas no Herbário UENF na Universidade

Estadual do Norte Fluminense sob os números de registro H5969 – *P. suterella*; H5976 – *P. pubigera*; H5977 – *P. leiocarpa*; H5978 – *P. ruelliifolia*; H5979 – *P. capitata*; e no Herbário da Faculdade de Formação de Professores (UERJ/São Gonçalo) sob o número de registro 12807 – *P. carthagenensis*.

## PREPARO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA

Ápices vegetativos inteiros foram fixados em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05M em pH 7,2, a temperatura ambiente nos locais de coleta. Posteriormente, as estípulas foram dissecadas com auxílio de bisturis e pinças.

Para microscopia eletrônica de varredura, fragmentos das estípulas que continham coléteres, foram lavados três vezes, por 45 minutos, com o mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas por uma hora em uma solução de tetróxido de Ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,05M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas novamente com o mesmo tampão e desidratadas em série cetônica: 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100% por uma hora em cada etapa. Em seguida, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico (CPD030 Bal-tec). Os fragmentos das estípulas e dos ápices caulinares contendo coléteres foram afixados com fita adesiva de carbono e cola de prata em suportes de alumínio, cobertos com uma fina camada de ouro (SCD 050 Bal-tec) e observados em microscópio eletrônico de varredura (DSEM962 e EVO40 ZEIS).

Para a microscopia óptica, as amostras de fragmentos das estípulas que continham coléteres foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas em série cetônica como descrito anteriormente. Então, os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon®) utilizando série crescente de resina em acetona. A polimerização da resina foi realizada a 60°C em estufa de circulação fechada. Após a polimerização da resina, foram feitos cortes semifinos (0,5-0,6µm de espessura) em ultramicrotomo (Reichert Ultracuts®) com auxílio de faca de diamante (Diatome®). As secções foram dispostas em lâminas, coradas com azul de toluidina, e montadas com Entellan®.

Para a ontogênese dos coléteres, ápices caulinares de *P. pubigera*, *P. leiocarpa*, *P. suterella* foram submetidos a duas etapas de infiltração em Xilol por uma hora cada e, a seguir, a três etapas de banho de parafina por uma hora cada,

realizado pelo processador de tecido automático (Leica TP 1020). Posteriormente, as amostras foram incluídas em parafina com auxílio do equipamento de inclusão de parafina (Leica EG 1150H) e depois foram obtidas secções transversais e longitudinais do material, (3-6 $\mu$ m de espessura), através do micrótomo de rotação (Leica RM2145) As amostras foram colhidas e submetidas a três lavagens em Xilol por dois minutos cada, quatro lavagens em álcool (duas vezes 100%, uma vez 95% e uma vez 70%) com duração de um minuto cada lavagem, uma lavagem em água corrente por um minuto e uma lavagem em água deionizada por um minuto. As secções dispostas em lâminas foram coradas com coloração dupla de hematoxilina e eosina e colocadas em estufa a 60°C para secagem e, posteriormente, lavadas três vezes em xilol por dois minutos cada lavagem e montadas com Entellan®.

A observação foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS). As imagens foram obtidas através da câmara Cannon Power Shot 14 mpxel acoplada ao microscópio, com o auxílio do programa Axiovision (Zeiss).

## **TESTES HISTOQUÍMICOS**

Amostras foram desidratadas em série alcoólica: 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100% por uma hora em cada etapa. Posteriormente infiltradas em historesina (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) utilizando série crescente de resina em álcool etílico. A polimerização da resina foi realizada em temperatura ambiente. Posteriormente, foram obtidas secções transversais e longitudinais do material, (3,0-6,0  $\mu$ m de espessura), através do micrótomo de rotação (Leica RM2255) As secções foram dispostas em lâminas e submetidas a diferentes reagentes segundo técnicas usuais de anatomia vegetal (Kraus & Arduin, 1997; Ascensão, 2003), afim de, evidenciar grupos químicos presentes na secreção e nas células que compõem os coléteres.

Para a identificação dos alcalóides foi utilizado o reagente de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte, 1983) e a presença destes compostos foi detectada pela coloração castanho-avermelhado. Para detecção de amido foi utilizado Lugol (Johansen, 1940), identificado através da reação que provoca uma coloração marrom/roxo. Para detecção de lipídios totais foram feitos testes com Sudan IV 0,03 % (Pearse, 1980). A presença destes compostos foi detectada pela coloração laranja/vermelho. Para a identificação de proteínas totais foi utilizado Azul de

Comassiê (Fischer, 1968), o qual revela presença da proteína pela coloração azul. Para detecção de taninos foi utilizado Vanilina Clorídrica (Mace *et al.*, 1974). A presença destes compostos foi evidenciada em vermelho. Para a identificação dos compostos fenólicos foi utilizado Cloreto Férrico (Johansen, 1940), evidenciando uma reação que provoca coloração marron/preto. Para revelação compostos pécnicos e mucopolissacarídeos, os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de vermelho de Rutênio 0,02 % por (Chamberleim, 1932). A presença destes compostos foi detectada pela coloração vermelha/rósea. Para detectar a ocorrência de substâncias ácidas e básicas, os cortes foram submetidos solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% (O'Brien *et al.*, 1964). Através da reação de metacromasia revelada pelo corante, os compostos ácidos adquirem uma coloração azul clara e tons de verde e os compostos básicos adquirem uma coloração roxa/azul escura. Para a identificação de polissacarídeos foi utilizado o reagente de Schiff (McManus, 1948). A presença destes compostos foi detectada pela coloração rósea. Para detecção da presença de cutícula, os cortes foram submetidos ao reagente Auramina O 0,01% por 5 minutos no escuro (Heslop-Harrison & Knox, 1981). A presença da cutícula foi observada em microscopia de fluorescência (filtro: excitação, 470 a 490nm e emissão, 515 a 565nm). Para a identificação de ácidos graxos foi utilizado o Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico (Ganter e Jollès, 1969). A detecção deste composto foi evidenciada pela coloração verde escuro. Para identificação da natureza química dos cristais, cortes foram submetidos a ácidos clorídrico 10%, nítrico 10% e acético glacial. A detecção da composição de oxalato de cálcio foi observada pela dissolução dos cristais, sem notar a efervescência (Kraus & Arduin, 1997).

## RESULTADOS

### MORFOLOGIA, LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS COLÉTERES

Os ápices vegetativos das espécies estudadas são revestidos externamente por um par de estípulas persistentes (figs. 1-6), na qual se encontram os coléteres ancorados na base das mesmas. Na espécie *P. carthagenensis* a estípula é inteira com ápice arredondado (fig. 1). Nas espécies *P. leiocarpa*, *P. pubigera*, *P. suterella*, *P. capitata* e *P. ruelliifolia* cada estípula que compõe o par formam duas cerdas

aciculares (figs. 2-6). Quando seccionados transversalmente, o ápice vegetativo revela o primórdio foliar envolvido por outro par de estípulas (fig. 7). Em ambas as estípulas, ou seja, mesmo na mais externa quanto na mais interna, os coléteres estão em diferentes estágios de desenvolvimentos (fig. 8).

Os estágios de desenvolvimento podem ser identificados pela coloração do coléter ao longo do desenvolvimento, podendo variar de leitoso a marrom, sendo esta uma das características para definição de dois estágios de desenvolvimento: estágio secretor inicial e estágio secretor tardio. No estágio secretor inicial, os coléteres possuem coloração leitosa e amarelada e ao longo do desenvolvimento possuem coloração parda e marrom, sendo esta coloração iniciada no ápice do coléter, sugerindo a sua senescência (fig. 8).

Quanto à forma da distribuição dos coléteres no interior da estípula, nas espécies *P. leiocarpa* e *P. suterella*, os coléteres são distribuídos em uma única linha horizontal na base da estípula (fig. 9), enquanto em *P. pubigera* formam de duas a três linhas horizontais na base da estípula (fig. 10). Já em *P. carthagenensis*, os coléteres formam uma linha na vertical (fig. 11) e em *P. ruelliifolia* e *P. capitata* os coléteres formam um pequeno grupo na base da estípula (figs. 12, 13). Em todas as espécies foram observados tricomas tectores entre os coléteres (figs. 11-13). Cristais de oxalato de cálcio do tipo estilóide e feixe de ráfide foram encontrados nas células parenquimáticas no eixo central dos coléteres (figs. 14, 15).

A superfície dos coléteres não apresenta ornamentação no decorrer de seu desenvolvimento. No estágio inicial de desenvolvimento a superfície dos coléteres é lisa, contudo, ao longo do desenvolvimento essa estrutura se torna irregular, pela formação de bolsas com acúmulos de secreção no interior do coléter (figs. 16, 17). A secreção também foi observada na superfície dos coléteres, além de microrganismos tanto na secreção quanto na superfície dos coléteres (figs. 18).

A secreção possui caráter higroscópico, se tornando viscosa quando úmida e cristalizada quando seca. Esta secreção apresenta coloração parda para as espécies *P. leiocarpa* e *P. carthagenensis*, enquanto em *P. pubigera*, a coloração é amarelada. Já em *P. suterella*, *P. ruelliifolia* e *P. capitata*, a secreção não apresenta coloração.

O resumo das características está exposto na tabela 1.

## HISTOLOGIA DOS COLÉTERES

Inicialmente os coléteres se formam por projeções da epiderme da estípula, onde as células que constituem a epiderme em paliçada dos coléteres são de origem protodérmica formando apenas uma camada de células responsáveis pela secreção, como demonstrado em *P. pubigera* (figs. 19-24). As células parenquimáticas do eixo central do coléter são de origem do meristema fundamental, sendo a descrição acima confirmada pela ontogenia em cortes seriados em *P. pubigera*, *P. leiocarpa*, *P. suterella*. Entretanto, nas demais espécies estudadas foram observadas que os tecidos que constituem os coléteres também são de origem mista, mas não foram confirmados por ontogênese.

Os coléteres das espécies estudadas possuem estrutura anatômica similar, consistindo em um eixo central alongado de células parenquimáticas levemente irregulares, circundado por um extrato epidérmico de células paliçadas revestido por uma cutícula (figs. 25, 26, 30-32). Em *P. suterella* as células epidérmicas são reduzidas, sendo caracterizada como epiderme reduzida (fig. 29). As células epidérmicas apresentam citoplasma denso e são alongadas transversalmente com pouco espaço intercelular (figs. 25, 26, 31), exceto em *P. suterella*, onde estas células apresentam citoplasma pouco denso (fig. 29). As células parenquimáticas apresentam pouco espaço intercelular (fig. 26), e o citoplasma é pouco denso, apresentando vacúolos com acúmulo de substância ao longo de seu desenvolvimento (fig. 26). Foi observado constrição na base dos coléteres em todas as espécies, como observado em *P. suterella* (fig. 29). Apenas nas espécies *P. leiocarpa* e *P. capitata* foram observados traço vascular no eixo central (fig. 31).

O resumo das características está exposto na tabela 1.

### TIPO DE COLÉTER

Os coléteres das espécies estudadas variam quanto a sua morfologia e anatomia (figs. 10, 13, 29, 33). Neste sentido, foram identificados, definidos e classificados quatro tipos de coléteres distinguidos com base na morfologia e na anatomia das células secretoras.

*Tipo cilindriforme* - Coléteres do tipo cilindriforme foram encontrados na maioria das espécies, são elas: *P. leiocarpa*, *P. pubigera*, *P. carthagenensis* e *P.*

*ruelliifolia*. Possuem formato cilíndrico, com ápice arredondado e uniforme na largura ao longo do corpo até a base, diferindo em comprimento e em largura entre as espécies (figs. 10-12). As células parenquimáticas são cilíndricas e alongadas longitudinalmente, variando de três a cinco camadas e com citoplasma pouco denso. A epiderme é uniestratificada disposta em paliçada e possuem citoplasma denso (figs. 25, 26).

*Tipo filiforme-like* - Este tipo foi encontrado somente na espécie *P. capitata*. Os coléteres possuem o corpo fino e alongado, com ápice terminado em ponta aguda (fig. 13) As características anatômicas são similares às do tipo cilindriforme descritas anteriormente (fig. 30).

*Tipo reduzido* - Os coléteres do tipo reduzido foram encontrados somente na espécie *P. suterella*. Essas estruturas são cilíndricas, com ápice arredondado (fig. 9). As células parenquimáticas são alongadas longitudinalmente, variando de duas a três camadas e apresentam citoplasma pouco denso. A epiderme uniestratificada é disposta uma ao lado da outra com células reduzidas e com citoplasma pouco denso (fig. 29).

*Tipo ramificado* - Este tipo foi observado em duas espécies. Em *P. ruelliifolia* as características morfológicas e anatômicas são similares ao tipo cilindriforme, diferindo apenas na ramificação do corpo do coléter. A metade apical é totalmente livre, com a organização anatômica igual ao tipo cilindriforme (fig. 32). Na metade basal do coléter é possível observar a união das células parenquimáticas e posteriormente das células paliçadas, formando um único coléter (figs. 32-34). Em *P. suterella* as características anatômicas são similares ao tipo reduzido, diferindo apenas pela ramificação (figs. 27, 28).

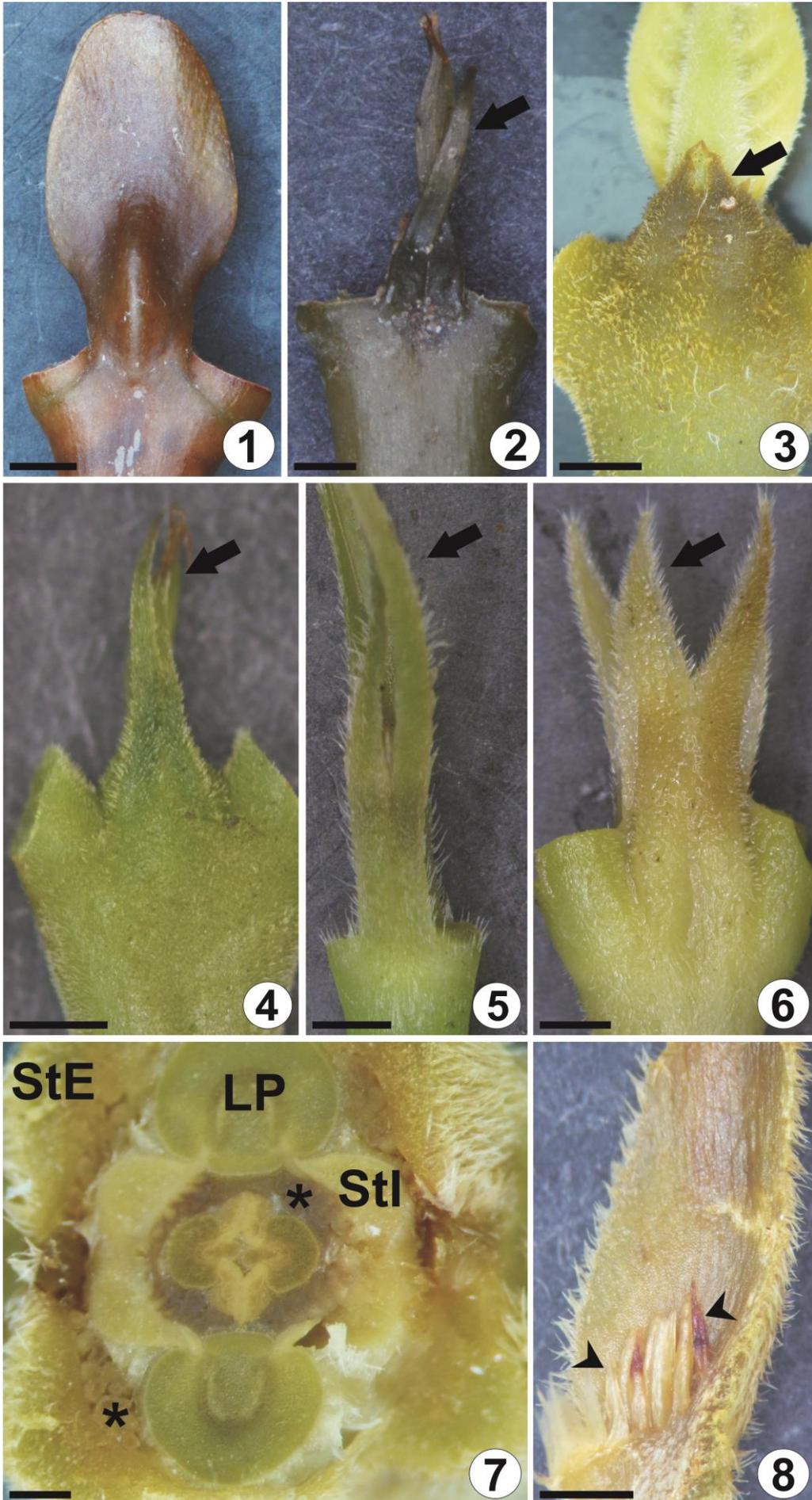
O resumo das características está exposto na tabela 1.

## HISTOQUÍMICA

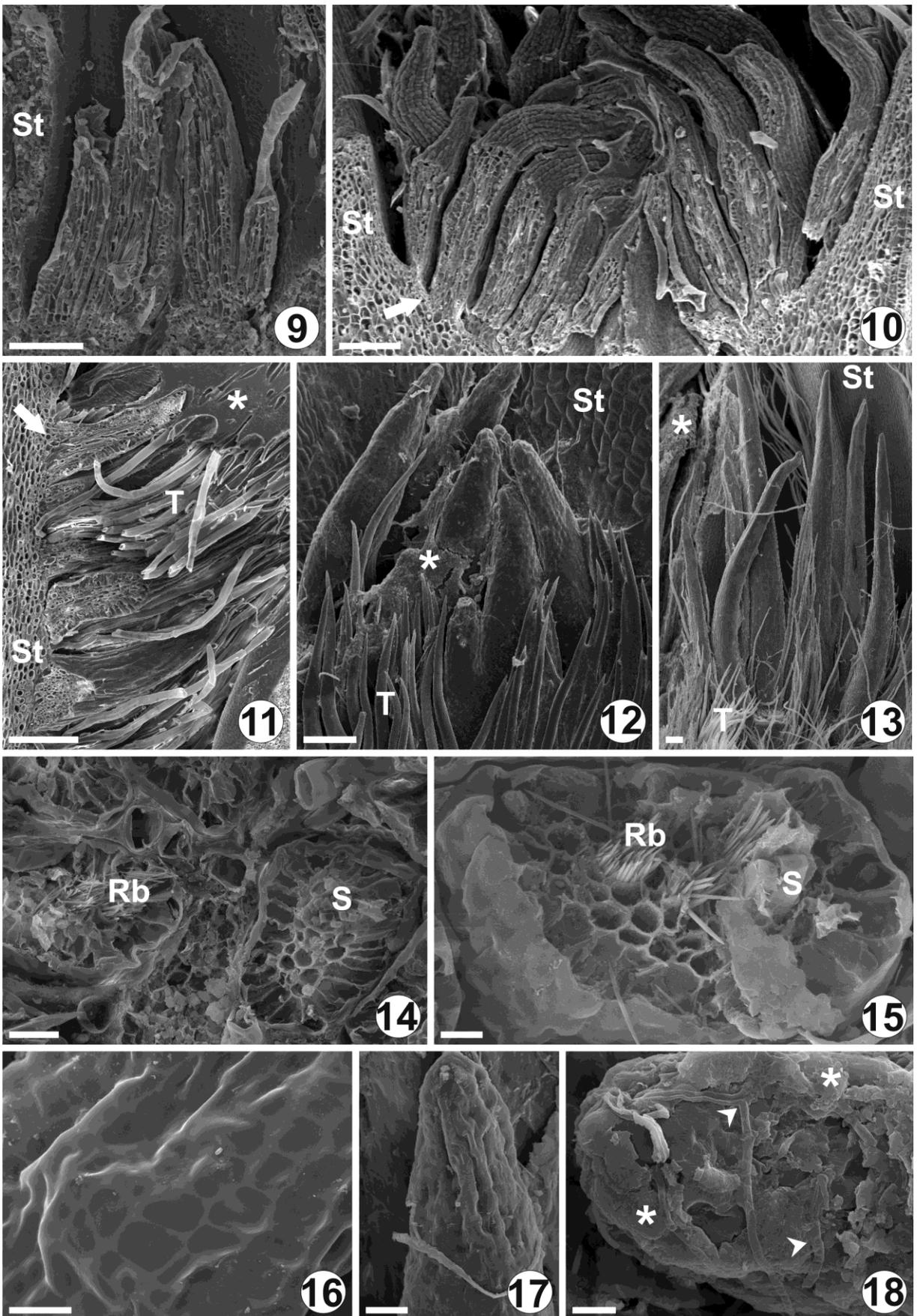
Os testes histoquímicos revelaram caráter misto da secreção, com composição lipofílica e hidrofílica. A marcação de azul de toluidina evidenciou nas células do coléter e na secreção a presença de substâncias ácida pela coloração azul e verde e básica pela coloração roxa (figs. 35, 36). A reação com o com Sudan IV revelou a presença de lipídeo apenas na parede periclinal externa do coléter (fig. 37).

Na fase inicial de desenvolvimento, a secreção é composta predominantemente por mucopolissacarídeo e proteína (fig. 38). Testes com acetato de cobre e ácido rubeânico revelou a presença de ácidos graxos nas células parenquimáticas durante a fase inicial (fig. 39). Somente durante o desenvolvimento do coléter foi observado marcação nas células em paliçada (fig. 40). A mesma característica ocorre para a marcação de alcalóide. Sendo que a marcação nas células em paliçada começa na parte apical do coléter (figs.41, 42). O resumo de todos os testes histoquímicos está exposto na tabela 2.

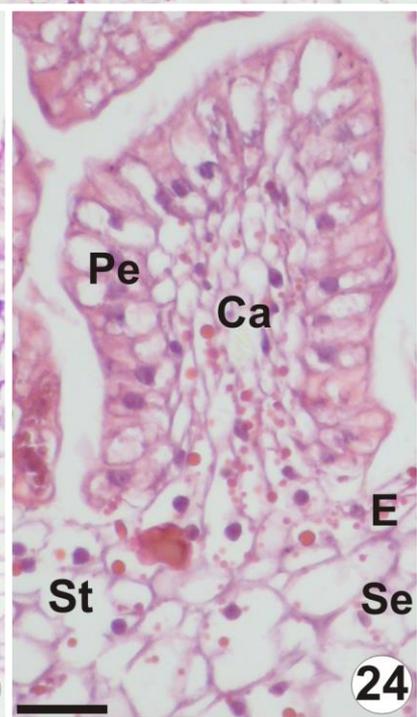
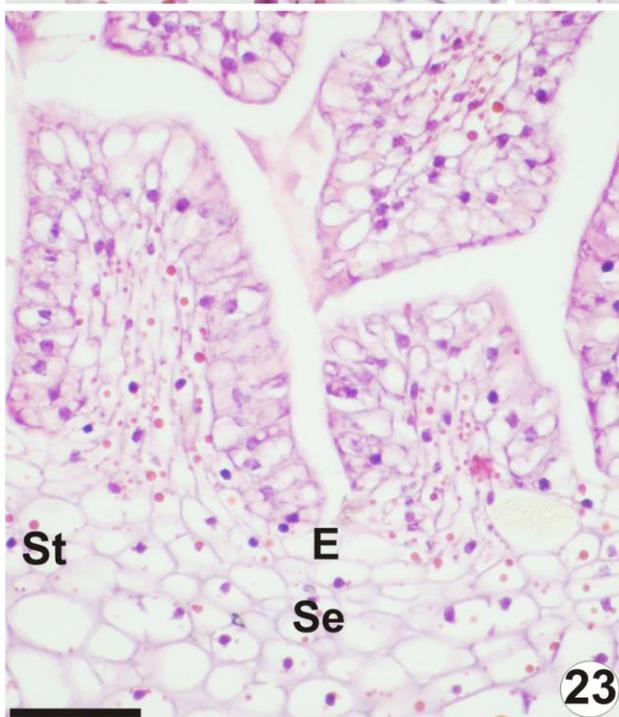
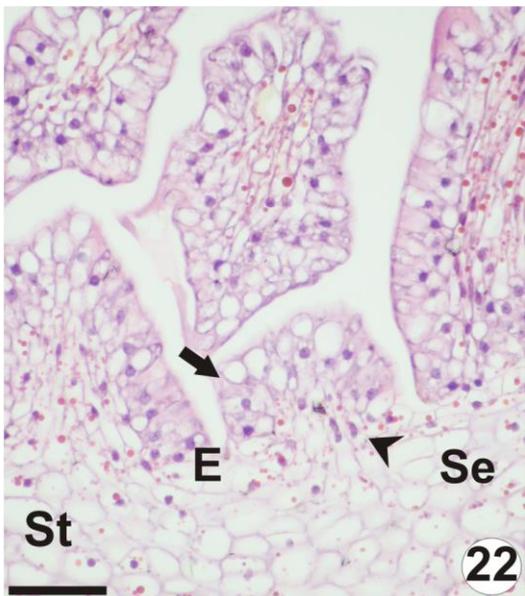
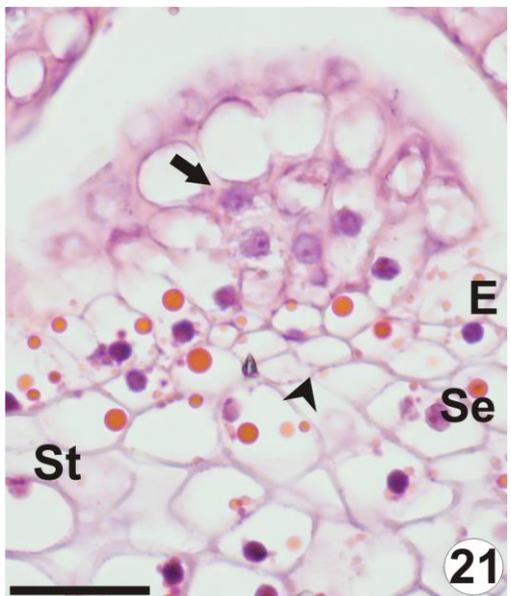
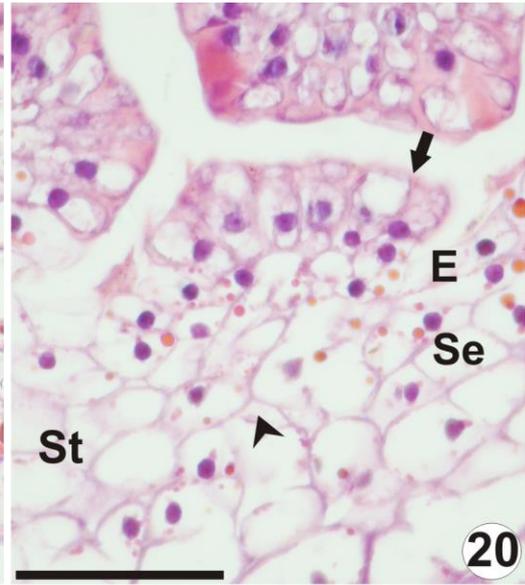
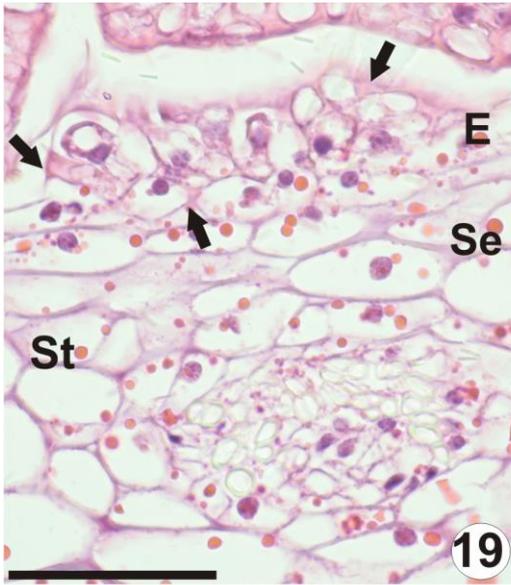
**Figuras 1-8.** Morfologia das estípulas das seis espécies de *Psychotria*. 1, Ápice vegetativo de *P. carthagenensis*; 2, Ápice vegetativo de *P. leiocarpa*; 3, Ápice vegetativo de *P. pubigera*; 4, Ápice vegetativo de *P. suterella*; 5, Ápice vegetativo de *P. capitata*; 6, Ápice vegetativo de *P. ruelliifolia*; 7. Secção transversal do ápice vegetativo evidenciando um par de estípulas externa (StE) envolvendo o primórdio foliar (LP), note o par de estípulas interno (StI) envolvendo outro primórdio foliar. Observe os coléteres (\*) entre o par de estípulas e o primórdio foliar. 8. Estípula destacada do ápice vegetativo mostrando coléteres em diferentes estágios de desenvolvimento (cabeça de seta). Seta, cerdas aciculares. Estereomicroscópio. Barras: 1, 2, 3, 5, 6 e 8, 1mm; 4 e 7, 0,5mm.



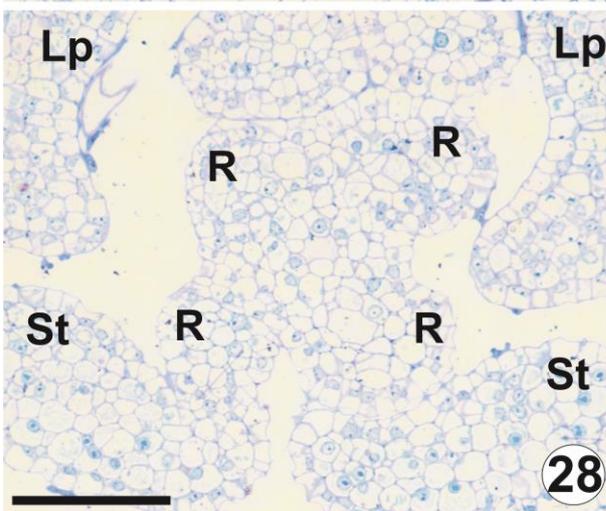
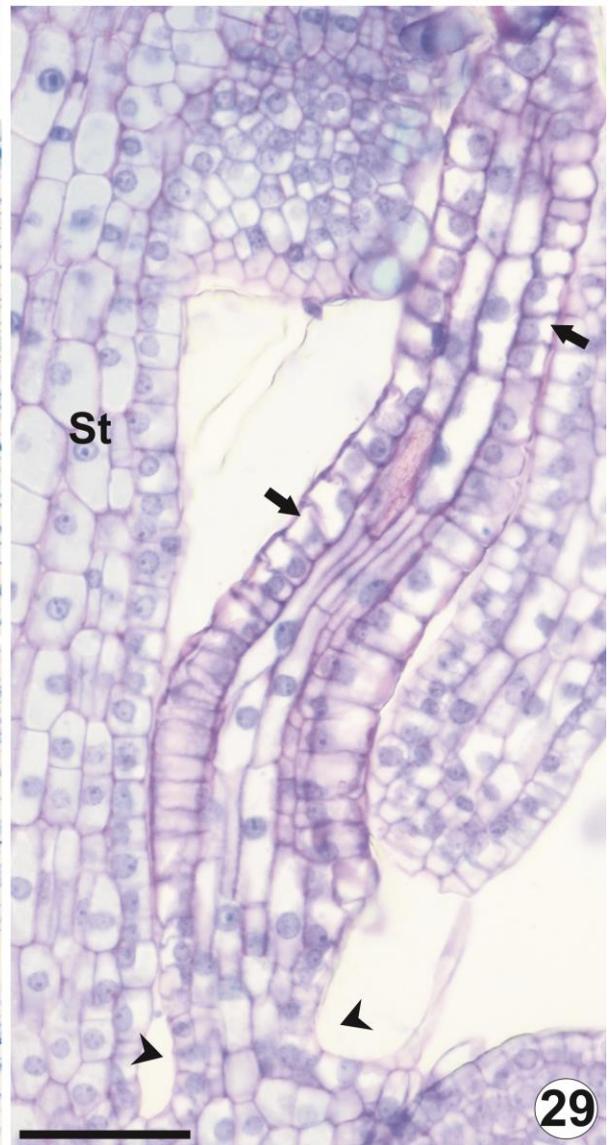
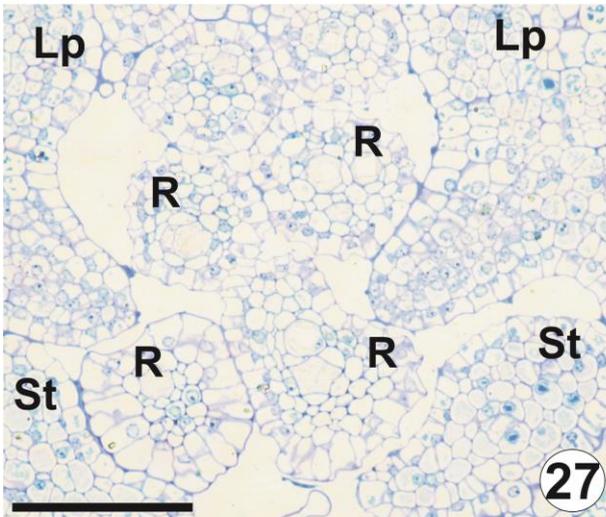
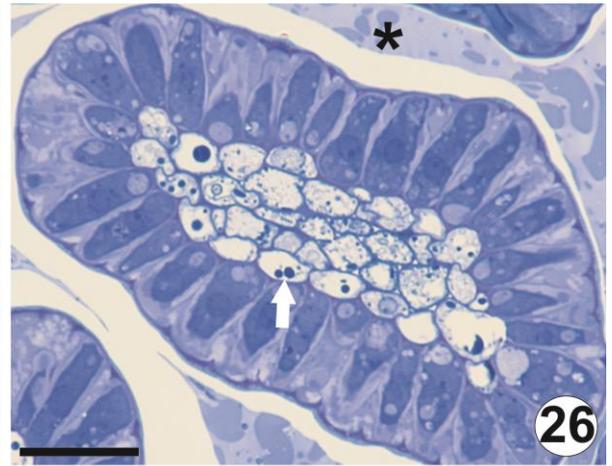
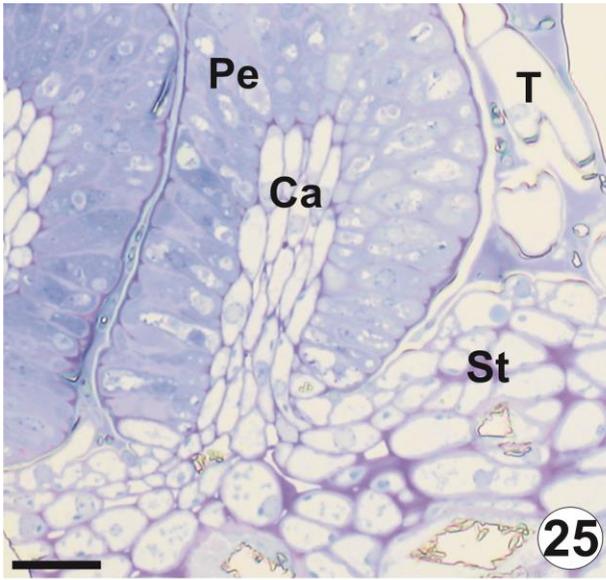
**Figuras 9-18.** Distribuição dos coléteres nas estípulas das seis espécies de *Psychotria*. 9, *P. suterella*; 10, 15, *P. pubigera*; 11, *P. carthagenensis*; 12, 17, 18; *P. ruelliifolia*; 13, *P. capitata*; 14, 16, *P. leiocarpa*; 9-11, secção longitudinal do ápice vegetativo; 12, 13, 16-18, estípula destacada do ápice vegetativo; 14, 15, secção transversal do ápice vegetativo. 9. Coléteres do tipo reduzido dispostos em única linha horizontal na base da estípula; 10. Coléteres cilíndricos dispostos em linha horizontal na base da estípula (St); 11. Distribuição dos coléteres em linha vertical na base da estípula; 12. Coléteres cilíndricos distribuídos em pequeno grupo no centro da base da estípula; 13. Coléteres filiforme-*like* distribuídos em pequeno grupo no centro da base da estípula; 14. Cristais em feixe de ráfides (Rb) e estilóide (S) no eixo central dos coléteres; 15. Cristais em feixe de ráfide e estilóide no eixo central do mesmo coléter; 16. Detalhe da superfície do coléter com bolsa de secreção; 17. Superfície do coléter; 18. Micro-organismo na secreção e na superfície do coléter. Seta, inserção do coléter; T. tricoma tector; asterisco, secreção; cabeça de seta, micro-organismo; Microscopia eletrônica de varredura. Barras: 9, 10, 12, 13, 100µm; 11, 200µm; 14, 17, 20µm; 15, 16, 18, 10µm.



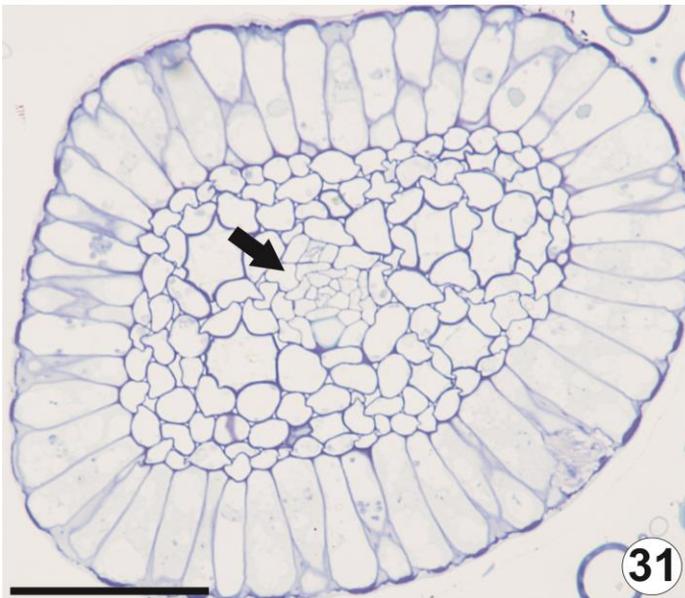
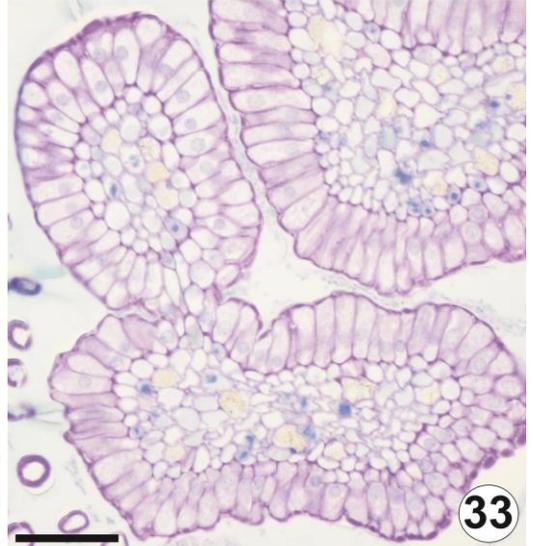
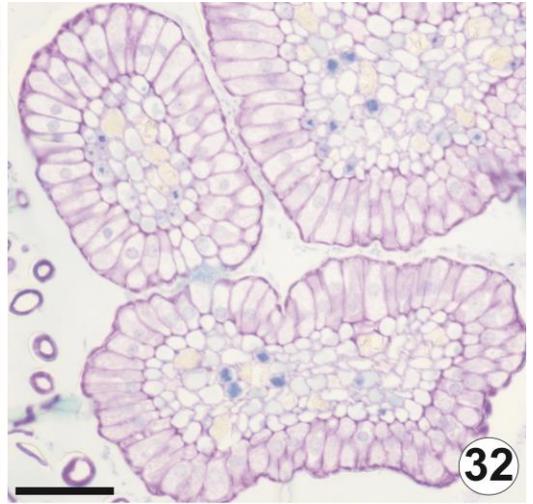
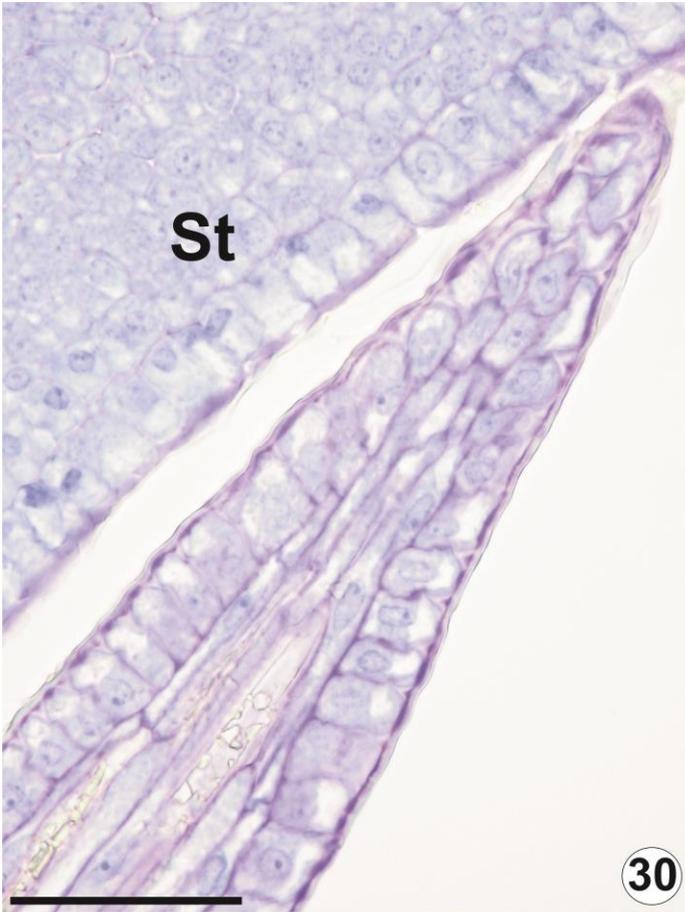
**Figuras 19-24.** Ontogênese dos coléteres de *Psychotria pubigera*. 19-24, Secção transversal do ápice vegetativo. 19, 20. Células da epiderme precursoras coléter (seta); 21. Início da diferenciação das células da subepiderme (cabeça de seta) e diferenciação das células da epiderme em células da epiderme do coléter (seta); 22-24. Desenvolvimento das células em paliçada formando a epiderme secretora dos coléteres (seta) e das células parenquimáticas do eixo central (cabeça de seta) formando o coléter; 24. Coléter desenvolvido. St, estípula; E, epiderme; Se, subepiderme; Pe, epiderme em paliçada; Ca, eixo central. Microscopia óptica. Barras: 19, 20, 22, 23, 50µm; 21, 24, 25µm.



**Figuras 25-29.** Anatomia e diferentes tipos dos coléteres. 25, *Psychotria leiocarpa*; 26, *P. pubigera*, 27-29, *P. suterella*. 25. Secção transversal do ápice vegetativo evidenciando inserção do coléter na estípula; 26. Coléter cilíndrico, note substância nas células parenquimáticas (seta branca); 27, 28. Secções transversais seriadas do ápice vegetativo mostrando sequência da ramificação (R); 29. Secção longitudinal evidenciando as células reduzidas da epiderme secretora (seta preta) do coléter tipo reduzido e constrição na base (cabeça de seta). Pe, epiderme em paliçada; Ca, eixo central; E, epiderme; Se, subepiderme; T, tricoma; \*, secreção; St, estípula; Lp, primórdio foliar. Microscopia óptica. Barras: 25, 26, 25µm; 27-29, 50µm.



**Figuras 30-34.** Anatomia e diferentes tipos dos coléteres. 30, 31, *Psychotria capitata*; 32-34, *P. ruelliifolia*. 30. Secção longitudinal do ápice vegetativo evidenciando coléteres tipo filiforme-like, 31. Corte transversal do coléter, note traço vascular (seta preta); 32-34, Secções transversais seriadas do ápice vegetativo mostrando sequência da ramificação. St, estípula. Microscopia óptica. Barras: 30-34, 50µm



**Figuras 35-42.** Testes histoquímicos. 35-37, 39, 40, *Psychotria ruelliifolia*; 38, *P. carthagenensis*; 41, 42, *P. pubigera*. 36-40, secção transversal do coléter; 41, 42, secção longitudinal do coléter. 35. Coléter em estágio inicial corado com azul de toluidina, note acúmulo de substancia nas células parenquimáticas (cabeça de seta); 36. Coléter em estágio tardio corado com azul de toluidina, note a secreção nas células em paliçada (\*); 37. Teste com Sudan IV evidenciando marcação apenas na parede periclinal externa; 38. Teste com vermelho de rutênio evidenciando marcação nas células em paliçada (\*), incluindo evidências das poções polissacarídicas; 39. Coléter em estágio inicial com teste de acetato de cobre/ácido rubeânico, note marcação apenas nas células parenquimáticas (cabeça de seta); 40. Coléter em estágio tardio com teste de acetato de cobre/ácido rubeânico, note marcação apenas nas células em paliçada (\*); 33. Coléter em estágio inicial corado com Dragendorff, note a reação positiva no eixo central (seta preta); 34. Coléter em estágio tardio corado com Dragendorff evidenciando reação positiva no eixo central (seta preta) e no ápice do coléter nas células em paliçada (seta branca). Microscopia óptica. Barras: 35, 36, 40, 50µm; 37, 10µm; 38, 39, 41, 42, 25µm.

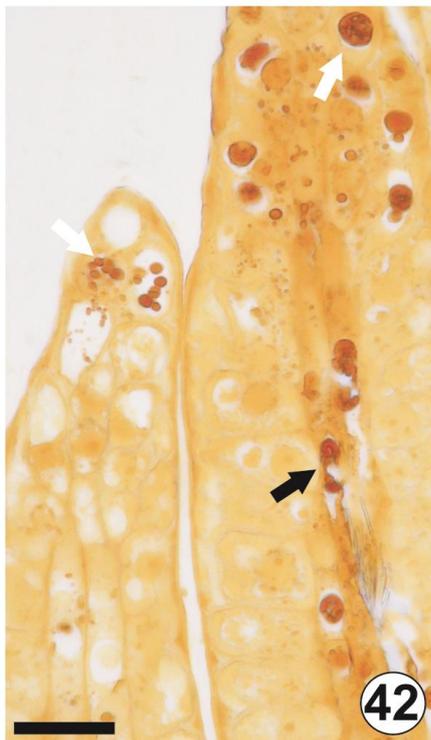
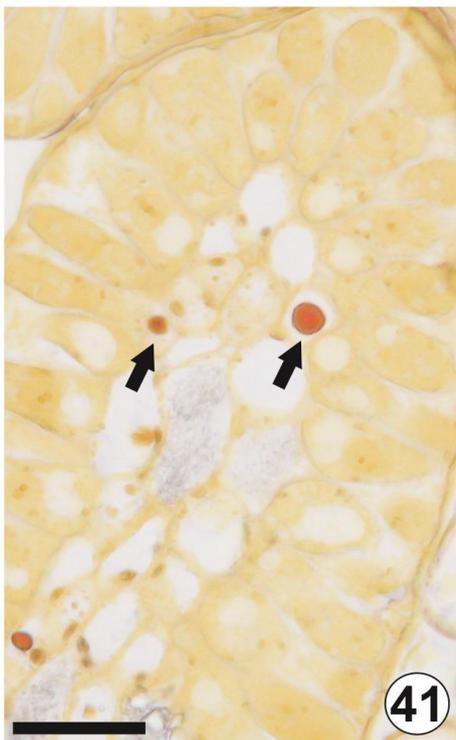
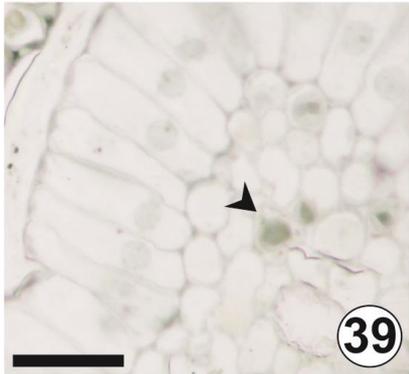
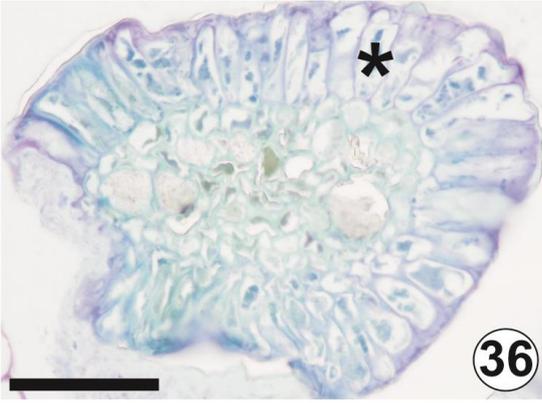




Tabela 2. Histoquímica dos coléteres do gênero *Psychotria*.

Reagente	Metabólitos	Reação					
		Espécies					
		<i>P. l</i>	<i>P. p</i>	<i>P. s</i>	<i>P. c</i>	<i>P. r</i>	<i>P. cp</i>
Dragendorff	Alcalóide	(+), Ps, Pp	(+), Ps, Pp	-	(+), Ps, Pp	(+), Ps, Pp	-
Lugol	Amido	-	-	-	-	-	-
Sudan IV	Lípideos	(+), Ppe					
Azul de Comassie	Proteínas	(+), Ps					
Vanilina	Taninos	-	-	-	-	-	-
Cloreto Férrico	Fenóis	-	-	-	-	-	-
Vermelho de Rutênio	Mucopolissacarídeos	(+), Ps, Pc					
Azul de toluidina	Compostos ácidos e básicos	(+), Ps, Pp					
Reagente de Schiff	Polissacarídeos	(+), Ps, Pc					
Auramina O	Cutícula	+	+	+	+	+	+
Acetato de cobre e ácido rubeânico	Ácidos graxos	(+), Ps, Pp					
Ácido clorídrico	Cristais de oxalato de cálcio	+	+	+	+	+	+

*Sinais positivos indicam a presença e os sinais negativos a ausência da reação. Ps, protoplasto célula secretora; Pp, protoplasto célula parenquimática; Ppe, parede periclinal externa; Pc, parede celular; (P.l), P. leiocarpa; (P. p) P. pubigera; (P. s) P. suterella; (P. c), P. carthagenensis; (P.r), P. ruelliifolia; (P.cp), P. capitata*

## DISCUSSÃO

Os coléteres de espécies de *Psychotria* foram caracterizados quanto sua morfologia e anatomia, além da caracterização química da secreção. Foram observados diferenças entre sua morfologia e distribuição.

As espécies estudadas apresentam coléteres na superfície adaxial das estípulas, como observado em outros gêneros da família Rubiaceae (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006; Barreiro *et al.*, 2007). Os coléteres das seis espécies se originam e desenvolvem na base das estípulas, que envolvem os primórdios foliares. A presença dos coléteres na estípula sugere um papel de proteção contra dessecação do meristema apical e dos primórdios foliares (Ramayya & Bahadur, 1968; Thomas, 1991). Paiva (2009) relata que a secreção de coléteres possui um caráter higroscópico, sugerindo a relação da capacidade de hidratação da secreção com a proteção contra dessecação. Esta característica também foi observada nas seis espécies estudadas neste trabalho, sugerindo estar relacionada com o papel de defesa do ápice vegetativo contra fatores abióticos.

Os coléteres foram observados cercados por tricomas tectores embebidos por secreção. As espécies apresentam uma diferente forma de distribuição dos coléteres na estípula. Nas espécies *P. leiocarpa* e *P. suterella*, os coléteres estão distribuídos em uma única linha horizontal, enquanto em *P. pubigera* formam de duas a três linhas horizontais. Já em *P. carthagenensis*, os coléteres formam uma linha na vertical. Em *P. ruelliifolia* e *P. capitata* os coléteres formam um pequeno grupo. Vitarelli & Santos (2009) descreveram a anatomia dos coléteres da estípula de *P. carthagenensis*, mas não mencionam a organização e distribuição dos coléteres na estípula. Tais formas de distribuição podem constituir caracteres a serem empregados para auxiliar na identificação entre as espécies do gênero *Psychotria*, bem como auxiliar na segregação das espécies dentro dos subgêneros e entre os gêneros afins como *Palicourea* (Bremer & Eriksson, 2009). Moraes *et al.* (2011b) descreveram características micromorfológicas e anatômicas da folha de espécies de *Psychotria* e utilizaram caracteres como presença de domácias, presença de cristais em estilóide entre outros para subsidiar a taxonomia do gênero. Outros trabalhos relatam a importância taxonômica em nível genérico dos coléteres, utilizando características como a forma de organização, distribuição na estípula e

tipo de coléter para auxiliar na separação de espécies (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.* 2006; Martins *et al.* 2010).

A descrição anatômica do coléter, principalmente em espécies da família Rubiaceae, é a de que os coléteres são constituídos por um eixo central alongado, formado por parênquima fundamental, circundado por um estrato epidérmico em paliçada sendo as células epidérmicas responsáveis pela secreção (Thomas, 1991; Da Cunha & Vieira, 1997). A classificação destas estruturas secretoras em relação à morfologia e anatomia é bem discutida. O uso do termo "coléter" varia entre diferentes autores devido ao critério usado ao definir estas estruturas, como morfologia, localização e natureza química da secreção (Leitão & Cortelazzo, 2008). A classificação mais aceita e difundida, é que uma estrutura para ser classificado como coléter depende tanto da anatomia e ontogênese quanto a composição e a função do exsudado (Thomas, 1991; Rocha *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006; Paiva & Machado, 2006a,b).

Os coléteres das espécies *P. leiocarpa*, *P. pubigera* e *P. suterella* se originam da protoderme e do meristema fundamental, nas demais espécies estudadas os tecidos que constituem os coléteres são mistos, mas não foram confirmados por ontogênese. Esta característica, da origem dos tecidos serem tanto da subepiderme quanto da epiderme, é comum na família Rubiaceae (Lersten, 1974a, b; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006, 2009). Coléteres também são descritos com uma origem somente protodérmica em outras famílias, o que permite serem classificados como tricomas, segundo Solereder (1908). Entretanto os autores Rocha (2002), Paiva & Machado (2006a) e Paiva, (2009) descrevem coléteres de origem somente protodérmica, apresentando somente um grupo de células secretoras multicelulares. Sendo assim, apesar de não apresentarem origem mista, são considerados coléteres por estes autores, que justificam esta hipótese pela união das características anatômicas e natureza química da secreção. Porém, ainda existe uma larga discussão para identificar e descrever tal estrutura. Sendo às vezes, o termo usado de forma incorreta para classificação de algumas estruturas.

Dentro da família Rubiaceae os coléteres apresentam variações morfológicas e anatômicas importantes, principalmente em relação à delimitação genérica. Lersten (1974a, b) descreveu seis tipos de coléteres em Rubiaceae com base na aparência da sua epiderme: "standard" (padrão), "intermediate" (intermediário), "dendroid" (dendróide), "brushlike" (tipo escova), "reduced" (reduzido), "irregular

epidermal cells” (epiderme irregular). O tipo padrão é o tipo mais comum de coléter, pela qual as outras formas parecem derivar (Lersten, 1974b). Foram observados quatro tipos de coléter nas espécies estudadas. Nas espécies *P. leiocarpa*, *P. pubigera*, *P. carthagenensis* e *P. ruelliifolia*, os coléteres são similares anatomicamente ao tipo padrão, mas na morfologia são mais cilíndricos. Estes coléteres apresentaram algumas diferenças entre as espécies em tamanho e comprimento, sendo estes denominados tipo cilindriforme. O tipo reduzido foi observado somente em *P. suterella*. Este tipo em geral possui uma redução nas células secretoras da epiderme, como descrito por Lersten (1974b). Miguel *et al.* (2009) relatam a presença de coléteres do tipo cilindriforme e lacrimiforme inseridos na base da estípula de *Psychotria nuda*. O tipo lacrimiforme não foi observado em nenhuma das espécies deste estudo, já o tipo cilindriforme foi observado na maioria das espécies estudadas exceto para *P. suterella* e *P. capitata*. O tipo de coléter observado por Vitarelli & Santos (2009), em *Psychotria carthagenensis* foi classificado como tipo padrão, porém são semelhantes ao tipo cilindriforme descrito por Miguel *et al.*, 2009. O termo padrão é utilizado por diversos pesquisadores, entretanto, os coléteres apresentam variações morfológicas que permitem a implantação de novos termos para melhor classificação destas estruturas.

Robbrecht (1983) descreveu o tipo “filiform” (filiforme), com células extremamente reduzidas e consistindo somente em único eixo estreito de células alongadas axialmente. Esta forma não foi observada em nenhum dos três gêneros de Rubiaceae estudados por Lersten (1974a,b). Entretanto um tipo similar foi observado somente na espécie *P. capitata*. Este tipo foi denominado *filiforme-like*. Morfologicamente possui característica semelhante ao tipo denominado por Robbrecht (1983), mas difere anatomicamente, pois em *P. capitata* o coléter um eixo central formado por células parenquimáticas circundadas por um estrato epidérmico em paliçada.

Outro tipo de coléter ainda não descrito em Rubiaceae é o tipo ramificado, e neste trabalho foi observado em *P. ruelliifolia* e *P. suterella*. Este tipo de coléter já foi observado em algumas espécies de diferentes gêneros de Apocynaceae, tais como coléteres calicinais em *Forsteronia* (Rio, 2006), coléteres foliares e calicinais em *Temnadenia* (Martins *et al.*, 2010) e coléteres calicinais em *Mandevilla* (Simões *et al.*, 2006).

Baseado na descrição de Lersten (1974b), Simões *et al.* (2006) sugerem uma série hipotética de transformações nos coléteres calicinais em Apocynaceae através da variação do tipo padrão em três diferentes tipos de coléter: “bifurcado”, “laminar” e “séssil”. Três diferentes mecanismos foram supostos para a provável variação morfológica dos coléteres calicinais em Apocynaceae. A separação, proliferação e alongamento celular. Para o tipo bifurcado foi proposto o mecanismo de separação, com as células do corpo principal sendo separadas em duas ou mais partes distintas (Simões *et al.*, 2006). Além de bifurcado outros termos são encontrados na literatura para descrever o tipo ramificado, tais como partido e fimbriado. O termo “ramificado” parece ser o mais adequado, sendo necessário o ajuste na terminologia para evitar equívocos na hora da descrição.

Cinco diferentes tipos de coléteres já foram descritos dentro do gênero *Psychotria* (Lersten, 1974a; Miguel *et al.*, 2009). No presente trabalho foram observados dois tipos de coléteres ainda não descritos para o gênero *Psychotria*, o tipo ramificado em *P. ruellifolia* e *P. suterella* e filiforme-like, observado apenas em *P. capitata*. Essas variações morfológicas e anatômicas, bem como, as variações de distribuição e organização dos coléteres são passivas de serem utilizadas como caracteres diagnósticos para identificação das espécies dentro do gênero em questão; uma vez que, pequenas variações presentes em poucos casos, devem ser consideradas como caracteres taxonômicos (Lersten, 1975).

Em todas as espécies estudadas de *Psychotria*, os coléteres apresentam contração na base. Esta característica foi observada em outros gêneros da família Rubiaceae como, *Pavetta*, *Neorosea* e *Tricalysia* (Lersten, 1974a), *Simira* (Klein *et al.*, 2004) e *Bathysa* (Miguel *et al.*, 2006), sugerindo apenas uma característica morfológica comum dos coléteres no gênero e na família Rubiaceae, assim como em outras famílias botânicas (Appezato-da-Gloria e Estelita, 2000).

Traços vasculares foram observados nas células parenquimáticas dos coléteres das espécies *P. leiocarpa* e *P. capitata*, sendo aparentemente uma característica sem qualquer importância na atividade secretora das células. Na literatura há relato de traço vascular em coléteres de origem mista em diversos gêneros de diferentes famílias, *Strophanthus* e *Funtumia* (Woodson & Moore, 1938), *Holarrhena*, *Vallaris* e *Wrightia* (Rao & Ganguli, 1963), *Aganosoma* (Dave *et al.*, 1987), *Nerium* (Thomas & Dave 1989b), *Mandevilla* (Appezato-da-Gloria & Estelita, 2000), *Simira* (Klein *et al.*, 2004) e *Bathysa* (Miguel *et al.*, 2010). Entretanto, não há

nenhuma relação de otimização da atividade celular do coléter com a presença de vascularização (Klein *et al.*, 2004). Appezzato-da-Gloria & Estelita (2000) sugerem que a presença de traço vascular está relacionada com a proximidade dos feixes vasculares com a região de origem do coléter. Nas espécies estudadas de *Psychotria* foi observada vascularização na porção da estípula próxima aos coléteres. Tal característica nos permite inferir que, a relação da origem do traço vascular está intimamente relacionada com a proximidade entre o feixe vascular e as células que formam o eixo central dos coléteres.

A presença e ausência de determinados tipos de inclusões minerais nos tecidos vegetais podem constituir um caráter taxonômico para famílias e gêneros botânicos. A presença de cristais em Rubiaceae constitui um importante marcador para a anatomia e sistemática da família e subfamília Rubioideae (Jansen *et al.*, 2002), a qual se insere o gênero *Psychotria* (Bremer, 2009). Delprete e Jardim (2012) citam a presença de idioblastos contendo ráfides de oxalato de cálcio com uma das características que separa Rubioideae das demais subfamílias. Este tipo de idioblasto foi observado em todas as seis espécies estudadas.

Franceschi & Nakata (2005) relatam que a presença de cristais em plantas está relacionada com fatores genéticos e a intensidade com fatores abióticos, assim como sua morfologia, composição e distribuição. Idioblastos contendo cristais em estilóide, feixe de ráfide, drusas e prismáticos tem sido descritos em diferentes órgãos de espécies do gênero *Psychotria* (Vieira *et al.*, 1992; Da Cunha & Vieira, 1993/1997; Quinteiro *et al.*, 2006; Moraes, 2011b). Em coléteres, os cristais são descritos apenas nas células parenquimáticas que constituem o eixo central (Ramayya & Bahadur, 1968; Lersten, 1974a; Dave *et al.*, 1988; Thomas & Dave, 1989b,c, 1990a; Thomas, 1991). Cristais do tipo feixe de ráfide e estilóides foram observados com frequência nas células parenquimáticas da estípula e do eixo central dos coléteres nas espécies aqui estudadas, sendo a presença de cristais na estípula um possível fator para a presença dos cristais no eixo central destes coléteres. Outros trabalhos sobre coléteres em *Psychotria* relatam a presença de cristais do tipo feixe de ráfide e estilóide no eixo central (Vitarelli & Santos, 2009; Miguel *et al.*, 2009). A presença destes dois tipos de cristais sugere a possível utilização desta característica anatômica como subsidio taxonômico, auxiliando a delimitação do gênero dentro da tribo, constituindo um importante caractere para a sistemática da família.

A presença de cristais nas plantas está relacionada com a regulação de cálcio e detoxificação (Franceschi & Nakata, 2005). Entretanto estudos também relatam que os cristais possuem a uma função de defesa contra herbivoria. Esta característica geralmente está atribuída ao seu formato, por exemplo, o tipo feixe de ráfide que possui as extremidades afinadas, podendo causar danos ao aparelho bucal de pequenos insetos (Ward *et al.*, 1997; Hudgins *et al.*, 2003; Franceschi & Nakata, 2005; Korth *et al.*, 2006). A presença destes cristais parece estar ligada a fatores genéticos como descritos acima, porém como estas estruturas estão relacionadas à proteção dos ápices caulinares, podem também estar relacionadas ao mecanismo de defesa da planta neste local.

Tricomas tectores junto à coléteres nas estípulas foram relatados em diferentes espécies de famílias botânicas (Dave *et al.*, 1987; Rio *et al.*, 2002; Gonzalez & Tarragó, 2009; Miguel *et al.*, 2010). A função de alguns tricomas tectores é atribuída à proteção contra o ataque de insetos e patógenos, através da formação de uma barreira física. Estes podem estar também envolvidos na redução de perda de água e no aumento da tolerância a condições de stress abiótico, incluindo temperaturas extremas e de irradiação UV. (Yang & Ye, 2012). No caso dos tricomas tectores junto aos coléteres, sugerimos por uma ação indireta, que auxiliam a manter a secreção retida no ápice vegetativo através da formação de uma barreira física.

Nos coléteres, a hipótese sobre a função biológica da secreção envolve o aumento da proteção dos tecidos meristemáticos (Robbrecht, 1988; Thomas, 1991). Diversos autores concordam com essa hipótese, na qual o exsudato gerado pelo coléter exerce função de mecanismo de defesa, seja contra dessecação ou contra ataque de patógeno e de herbivoria (Ramayya & Bahadur 1968; Esaú, 1974; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006). A secreção dos coléteres pode ser composta apenas por mucopolissacarídeos, ou uma mistura de substâncias lipofílicas e de mucilagem (Fahn 1979, 1990, Thomas 1991), tais como os ácidos graxos e compostos fenólicos (Demarco, 2008, Castro & Demarco, 2008). Em Rubiaceae, a composição da secreção é predominantemente mucilaginosa, entretanto trabalhos com espécies de *Simira* e *Bathysa* descrevem a presença de proteínas que podem estar relacionada com a defesa química contra patógenos (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2006).

A mucilagem ajuda a prevenir a dessecação em regiões meristemáticas com células ainda com uma fina cutícula (Martins, 2012). A presença de mucilagem na secreção produzidas pelos coléteres é descrita em diversas famílias, Apocynaceae (Thomas & Dave, 1989), Rubiaceae (Klein *et al.*, 2004), Caryocaraceae e Fabaceae (Paiva & Machado, 2006a,b). Nas espécies de *Psychotria* estudadas, os coléteres secretam mucilagem durante todo o desenvolvimento do coléter e secretam composto lipídico e alcalóide somente durante o estágio tardio de desenvolvimento. Esta característica é descrita em *Mandevilla illustris* e *M. velutina* (Apocynaceae) (Apezzato-da-Gloria & Estelita, 2000), mas não a presença de alcalóide.

A presença de alcalóide nos coléteres está provavelmente ligada à característica do gênero *Psychotria*. Este se destaca na família Rubiaceae pela produção de alcalóides bioativos (Nepokroeff *et al.*, 1999), e estão presentes em diferentes partes da planta (Verota *et al.*, 1999; Henriques *et al.*, 2004; Moraes, 2011a). Moraes (2011) sugere que a presença de alcalóide em *Psychotria* é um caráter diagnóstico em relação a outros gêneros como *Simira* e *Bathysa*. Investigações químicas sobre estes compostos também têm ajudado a estabelecer novos limites principalmente entre subgênero *Heteropsychotria* com o gênero *Palicourea* (Taylor, 1889, 1996; Lopes *et al.*, 2004). Uma das funções dos alcalóides para as plantas está relacionada com a defesa contra animais e insetos devido à toxicidade desta substância (Henriques *et al.*, 2004; Moraes, 2011a). A presença de alcalóide na secreção das espécies de *Psychotria* estudadas indica a relação com o papel de defesa da planta contra fatores bióticos.

Nódulos bacterianos em folhas foram relatados em diferentes espécies de *Psychotria* (Lersten, 1974a) e Lersten (1974, 1975) relata uma correlação entre a formação dos nódulos bacterianos e secreção produzida pelos coléteres. Neste sentido, a mucilagem também seria um atrativo para micro-organismos oportunistas, como fungos e bactérias (Martins, 2012). Nas espécies observadas neste estudo foram observados fungos e bactérias embebidos na secreção e na superfície do coléter. Mas não foi observado formação de nódulo bacteriano, sugerindo apenas uma relação de defesa, onde a secreção serve como barreira física e química contra esses micro-organismos (Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006).

Nas espécies estudadas de *Psychotria* foi observado acúmulo de secreção nos espaços periplasmáticos. Durante o desenvolvimento dos coléteres, o acúmulo de secreção se torna mais evidente, deixando a superfície dos coléteres irregular.

Na literatura foi descrito a ocorrência de poros na superfície dos coléteres em *P. carthagenensis*, na qual se acredita que seja o meio para a saída da secreção (Vitarelli & Santos, 2009). A mesma espécie foi investigada neste estudo e não foi observada a ocorrência destes poros. Outros trabalhos relatam que a externalização ocorre quando a cutícula se rompe e o material é, então, liberado para o espaço extracelular (Thomas, 1991; Curtis & Lersten, 1974; Mohan & Inamdar, 1986). Também é descrito que o exsudado do coléter passa pela parede celular e pela cutícula sem que haja o rompimento (Durkee *et al.*, 1984; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006, 2009, 2010).

## CONCLUSÕES

Os coléteres das espécies de *Psychotria* estudadas neste capítulo são caracterizados anatomicamente por uma epiderme secretora em paliçada e eixo central parenquimático, com exceção da espécie *P. suterella* que apresenta as células da epiderme secretora reduzidas. Através das análises anatômicas e histoquímicas foi possível identificar dois estágios de desenvolvimento dos coléteres, uma fase secretora inicial e outra fase secretora tardia. Os coléteres apresentam-se em quatro formas diferentes e são distribuídos em única ou mais linhas ou em pequenos grupos na superfície adaxial das estípulas.

A secreção apresenta uma mistura de substâncias lipofílica e hidrofílica, sendo predominantemente hidrofílica durante a fase secretora inicial e lipofílica durante a fase secretora tardia. Também foi observada a presença de alcalóide na secreção e nas células secretoras dos coléteres durante a fase secretora tardia. A presença de alcalóides na secreção revela além da proteção contra dessecação, a secreção também pode desempenhar uma proteção contra micro-organismos.

Não foi observado rompimento da cutícula e nem poros na superfície dos coléteres, mas o mecanismo pelo qual a secreção deixa as células epidérmicas secretoras do coléter não foi elucidado. Porém sugere-se o exsudado do coléter passa pela parede celular e pela cutícula sem que haja o rompimento.

## Capítulo 2

Ultraestrutura e caracterização do desenvolvimento dos coléteres cilíndricos em ápices vegetativos de *Psychotria pubigera*, *P. leiocarpa* e *P. suterella* (Rubiaceae)

## INTRODUÇÃO

As células de tecidos secretores são normalmente caracterizadas por conter abundância de mitocôndrias, pequenos vacúolos e citoplasma denso, sendo que a frequência de outras organelas varia de acordo com o material secretado (Fahn, 1988). Estudos sobre a ultraestrutura de coléteres ressaltam a grande quantidade de retículo endoplasmático, com localização periférica e perinuclear, presença de plastídios e o acúmulo de secreção entre a membrana plasmática e a parede das células secretoras (Horner & Lersten 1968; Dexheimer & Guenin, 1981; Miller *et al.*, 1983; Klein *et al.*, 2004; Barreiro, 2007).

Apesar da ampla ocorrência de coléteres em Rubiaceae, poucos são os estudos detalhados sobre os aspectos ultraestruturais das células secretoras e o modo de secreção, além da descrição dos processos de morte celular programada, a maioria dos trabalhos descreve a sua anatomia e ocorrência (Lersten & Horner, 1967; Horner & Lersten, 1968; Dexheimer & Guenin, 1981; Miller *et al.*, 1983; Thomas & Dave, 1989*a, b*; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012).

O processo de morte celular programada em eventos de senescência vem sendo mencionados em coléteres (Dave *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1989; Appezzato-da-glória & Estelita, 2000; Miguel *et al.*, 2010; Tulli *et al.*, 2013). De uma forma geral, a maior parte dos estudos sobre esse tema mostra fases diferentes do desenvolvimento, destacando uma fase inicial (ou secretora) e tardia (ou senescente). A fase senescente é definida pela morfologia do coléter, mas não é bem definida em nível subcelular nas células secretoras.

Neste trabalho foram descritos a ultraestrutura, o desenvolvimento e o modo de secreção e o processo de morte celular dos coléteres em *P. pubigera* Müll. Arg., *P. leiocarpa* Cham. & Schldl. e *P. suterella* Müll. Arg.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL BOTÂNICO E ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em duas reservas de remanescentes florestais no Estado do Rio de Janeiro. O Parque Nacional do Itatiaia e a Reserva Biológica do Tinguá sob licença do SISBio, nº 13575-1.

A Reserva Biológica do Tinguá compreende seis municípios do estado do Rio de Janeiro: Nova Iguaçu, Duque de Caxias, Petrópolis, Miguel Pereira, Queimados e Japeri. Sua localização está entre as latitudes 22°22' e 22°45' S e longitudes 43°40' e 43°05'W. O clima é tropical úmido, com temperaturas em média variando entre 15°C a 27°C e a pluviosidade média varia de 1500mm a 2600mm, com regime de distribuição periódica (Ibama, 2006). O Parque Nacional do Itatiaia, localizado no sudoeste do Estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22°19' e 22°45' S e longitudes 44°45' e 44°50' W, com altitudes entre 700 e 2.787 metros sobre o mar. O clima é mesotérmico com temperatura média anual entre 15°C e 27°C e a pluviosidade média varia de 1250mm a 1500mm anuais (Santos & Zinkan, 2000).

Ápices vegetativos de indivíduos adultos, incluindo as estípulas e o meristema apical caulinar, das seis espécies foram coletados com auxílio de tesoura de poda. Exsiccatas do material foram depositadas no Herbário UENF na Universidade Estadual do Norte Fluminense sob os números de registro H5969 – *P. suterella*; H5976 – *P. pubigera*; H5977 – *P. leiocarpa*; H5978.

### PREPARO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA

Ápices vegetativos inteiros foram fixados em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05M em pH 7,2, a temperatura ambiente nos locais de coleta. Posteriormente, as estípulas foram dissecadas com auxílio de bisturis e pinças.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, depois de fixadas como descrito acima, fragmentos das estípulas que continham coléteres foram lavadas três vezes, por 45 minutos, com o mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas por uma hora em uma solução de tetróxido de Ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Posteriormente,

foram lavadas novamente com o mesmo tampão e desidratadas em série cetônica crescente de: 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100% por uma hora em cada etapa. Então, os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon®) que foi, posteriormente, polimerizada a 60°C em estufa de circulação fechada. Após a polimerização da resina, foram feitos cortes semifinos (0,5-0,6µm de espessura) em ultramicrótomo (Reichert Ultracuts®) com auxílio de faca de diamante (Diatome®). As secções foram dispostas em lâminas, coradas com azul de toluidina, e montadas com Entellan®. Posteriormente foram feitos cortes ultrafinos (aproximadamente 70nm de espessura). Estes cortes foram coletados em grades de cobre de 300 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 5 %, por 20 minutos, e citrato de chumbo 1%, por 5 minutos em temperatura ambiente (Reynolds, 1963) e, posteriormente, observados no microscópio eletrônico de transmissão (TEM 900 ZEISS), a uma aceleração de voltagem de 80 KV.

Para detectar polissacarídeos ácidos e compostos pécticos, evidenciando a composição da parede celular e da secreção, foi realizado o teste citoquímico através do método de marcação com vermelho de rutênio (Luft, 1971). Para tanto, os fragmentos dos ápices caulinares e estípulas foram previamente fixados como descrito anteriormente, entretanto com adição de 0,05 mg/L de vermelho de Rutênio à temperatura ambiente. A seguir foram lavados por 24 horas no mesmo tampão contendo 0,05 mg/L de vermelho de Rutênio, desidratados, incluídos, polimerizados e seccionados como descrito anteriormente. Posteriormente foram obtidos cortes ultrafinos (aproximadamente 70nm de espessura), coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. Após esses procedimentos, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão (EM-ZEISS 900), a uma aceleração de voltagem de 80 KV. A marcação foi visualizada pela variação da eletrondensidade. O controle foi feito excluindo o vermelho de Rutênio das etapas onde foi utilizado.

### **ANÁLISE *IN SITU* (TUNEL) DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA**

A detecção da fragmentação de DNA foi realizada utilizando técnicas de detecção *in situ*. Grupos 3'-OH livres nas terminações de DNAs fragmentados foram marcados com o kit TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated, dUTP-biotin Nick End-Labeling” – TUNEL-Roche). Para tal, as amostras dos ápices caulinares foram fixadas como descrito anteriormente e desidratadas em série etílica

crescente de 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100% por uma hora em cada etapa e infiltrados em historesina (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) utilizando-se série crescente de resina em álcool etílico. A polimerização da resina foi realizada em temperatura ambiente. Posteriormente, foram obtidas secções transversais e longitudinais do material, (3,0-6,0 µm de espessura), através do micrótomo de rotação (Leica RM2255). Os cortes obtidos foram dispostos em lâminas e submetidos aos reagentes do kit TUNEL, de acordo com as instruções do fabricante.

## RESULTADOS

### ULTRAESTRUTURA

Os coléteres das espécies *P. leiocarpa* e *P. pubigera* consistem em um eixo central alongado de células parenquimáticas levemente irregulares, circundado por um extrato epidérmico de células paliçadas revestido por uma cutícula (figs. 1, 5). Em *P. suterella* as células epidérmicas são reduzidas, sendo caracterizada como epiderme reduzida (fig. 10).

Com base nas características morfológicas, como mudança de coloração do coléter; anatômicas, como desorganização celular dos coléteres; de variação da composição química das células durante o desenvolvimento dos coléteres, como a presença de composto lipídico e alcalóide somente durante o estágio tardio de desenvolvimento, descritas no capítulo 1 foi possível indicar dois estágios de desenvolvimento. Com a descrição ultraestrutural das células da epiderme foi possível confirmar e definir os dois estágios secretores no desenvolvimento dos coléteres: um estágio secretor inicial e um estágio secretor tardio.

A característica marcante para classificação do estágio secretor inicial é a intensa atividade celular nas células em paliçada, sendo observada a grande quantidade e variedade de organelas relacionadas com síntese de substâncias ligadas a secreção (figs. 1-13). Já o estágio secretor tardio tem como característica marcante, a presença de grandes vacúolos, desestruturação nuclear, além da menor intensidade e de algumas organelas (figs. 14-19).

No estágio secretor inicial as células da epiderme em paliçada, apresentam citoplasma denso e levemente retraído, criando o espaço entre o citoplasma e a

membrana plasmática (espaço protoplasmático) (figs. 1, 2, 8). Disposto pelo citoplasma nota-se retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi bem desenvolvidos (figs. 2, 4, 6, 7, 11, 12). Os plastídeos são polimórficos variando de globóides a ameboides e não apresentam membranas internas, apresentam estroma denso com material granuloso. Estes são observados próximos ao núcleo e aos vacúolos fusionados (figs. 4, 7). Os vacúolos são encontrados em diferentes tamanhos e são observados próximos um dos outros, sugerindo fusão dos mesmos, além de apresentarem depósito de material osmiofílico e debris celulares (figs. 4, 6, 7, 11, 12). O núcleo é conspícuo com presença de eucromatina e heterocromatina condensada e evidente (figs. 4, 7, 13). A parede periclinal externa é espessa e morfologicamente dividida em camada polissacarídica, estratos cuticulares divididos em uma porção arborescente e outra reticulada e cutícula propriamente dita como pode ser observado em *P. pubigera* (fig. 2). A secreção é eletrondensa, porém menos que o citoplasma. A secreção apresenta aspecto granular e é frequentemente observada nos espaços protoplasmáticos (figs. 2, 8), conferindo sinuosidade as paredes anticlinais (fig. 8). A secreção também foi observada nos espaços entre uma célula e outra (espaços extraprotoplasmáticos) e ao longo do desenvolvimento celular é observada com maior frequência, como mostrado em *P. leiocarpa* (fig. 7). Microrganismos foram observados no espaço extracelular entre a secreção (fig. 9).

Em *P. suterella* as características das células secretoras diferem das outras duas espécies analisadas, como a densidade do citoplasma e a presença das organelas. Não foi observado retração do citoplasma e o mesmo possui aspecto granular, mas não é tão denso como observado nas outras duas espécies estudadas (figs. 10-12). Em todo citoplasma nota-se retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi (figs. 10-13). Os plastídeos possuem estroma denso sem membranas internas e pequenas inclusões eletronlucentes e são observados próximos ao núcleo (fig. 13). Os espaços extraprotoplasmáticos não são expressivos e a visualização da secreção no meio extracelular não é frequente.

As células parenquimáticas dos coléteres das três espécies, em sua maioria, são arredondadas e levemente irregulares e possuem pouco espaço intercelular (figs. 1, 5, 10). O citoplasma está localizado na periferia das células e possui aspecto granuloso, mas não é tão denso quando comparado às células secretoras (figs. 3, 6, 11). Dispostas pelo citoplasma observa-se a presença de organelas como,

mitocôndrias e plastídios com grãos de amido (figs. 3, 6, 11). Grandes vacúolos recobrem a maior parte do citoplasma (figs. 3, 6, 11), e dentro destes são observados debris celulares (figs. 6, 11) ou com presença de substância eletrondensa (fig. 3).

No estágio secretor tardio as células secretoras das três espécies apresentam citoplasma com aspecto granuloso e reduzido a periferia da célula (figs. 14, 15, 19). Grandes vacúolos com debris celulares são observados recobrimdo a maior parte da célula (figs. 14, 15, 17, 19). Pelo citoplasma observam-se mitocôndrias e plastídios globóides com estroma homogêneo e denso, com inclusões fortemente elétrondensas e pequenas inclusões eletronlucentes (figs. 15, 16, 19). O núcleo apresenta material granuloso e pouca heterocromatina visível (fig. 19). A secreção é homogenia e eletrondensa, com presença de corpos eletronlucentes e está localizada frequentemente nos espaços extraprotoplasmáticos, como observado em *P. pubigera* (figs. 17, 18, 19).

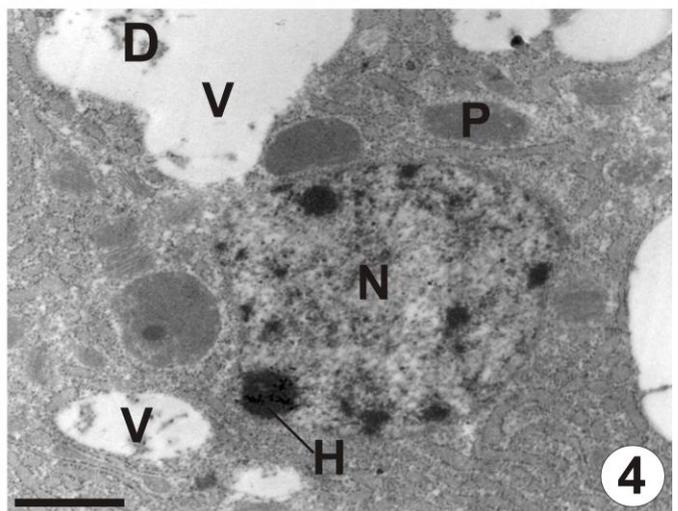
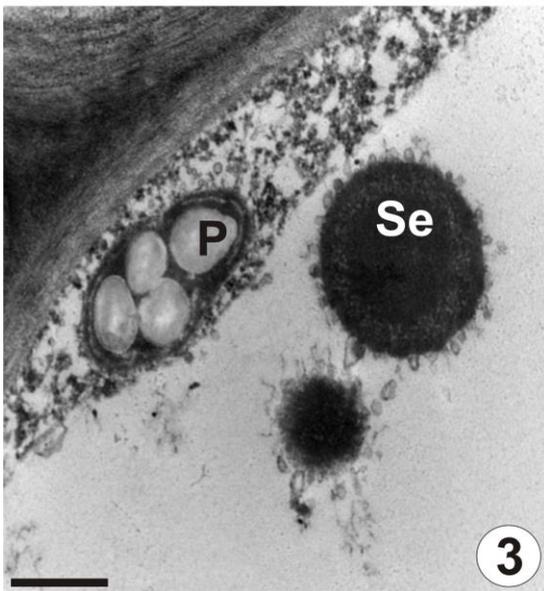
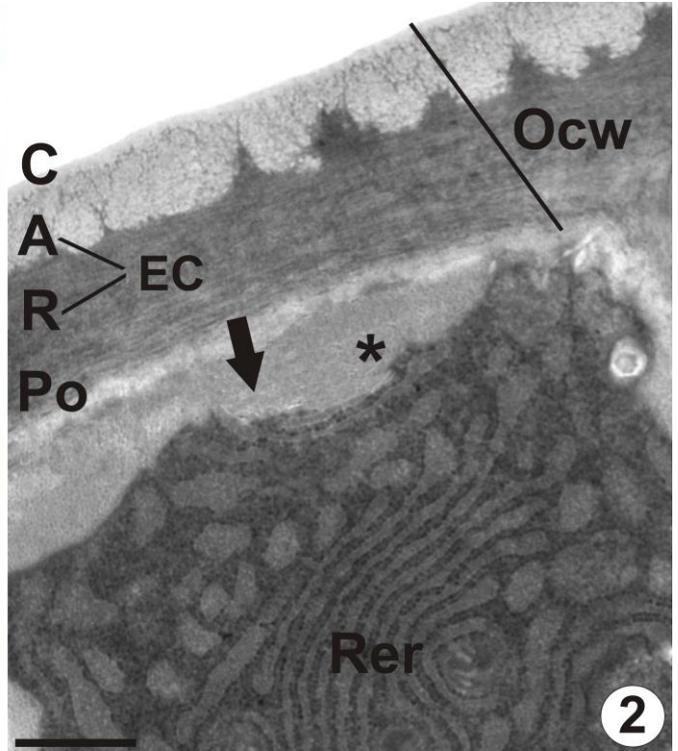
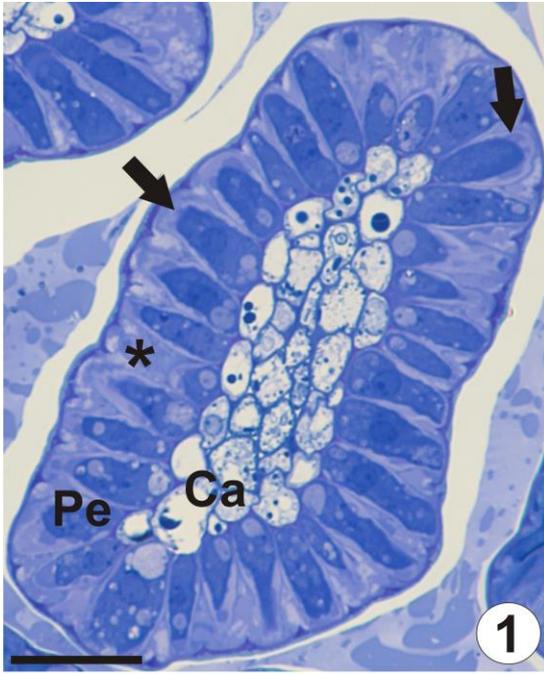
A estrutura da parede periclinal externa dos coléteres das três espécies se reorganiza de acordo com a passagem da secreção. Em algumas partes, as camadas arborescente e reticulada aparecem desorganizadas, sugerindo a passagem da secreção até a cutícula (figs. 20, 21). A cutícula foi observada destacada da parede periclinal externa *P. leiocarpa* (fig. 22).

A marcação com a contrastação de rotina evidencia os estratos cuticulares, marcando as camadas arborescente e reticulada (figs. 23, 24). Utilizando a técnica de detecção com vermelho de rutênio, a camada arborescente foi mais marcada do que a camada reticulada (figs. 25, 26). A reação foi intensa na porção mais externa da camada arborescente e na cutícula (figs. 25, 26), evidenciando a marcação da secreção. A secreção possui aspecto granuloso e aglutinado, possivelmente pela presença de ácidos graxos evidenciados pela histoquímica no capítulo 1 (fig. 26). A grande presença de secreção na camada arborescente indica que a secreção passa lentamente pela parede e tende a se acumular na cutícula até o possível rompimento e externalização total da secreção (figs. 25, 26).

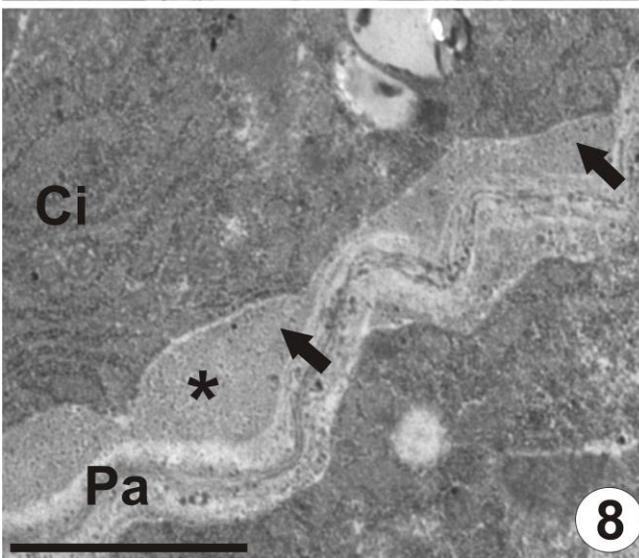
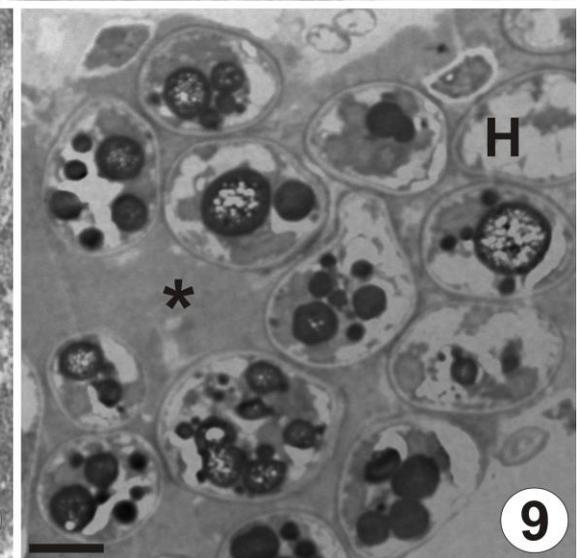
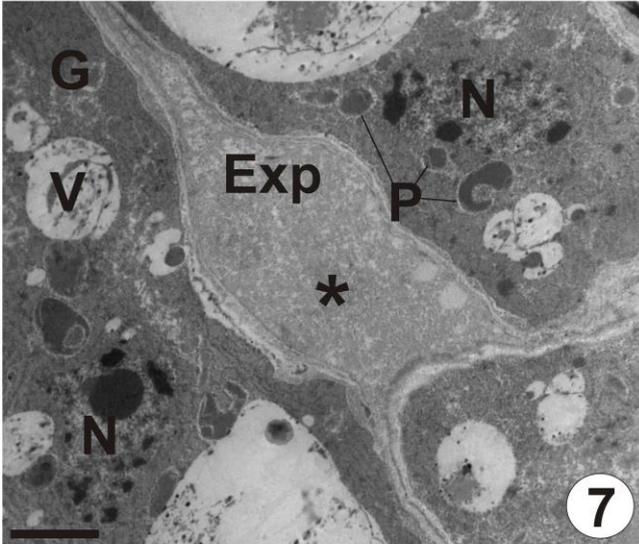
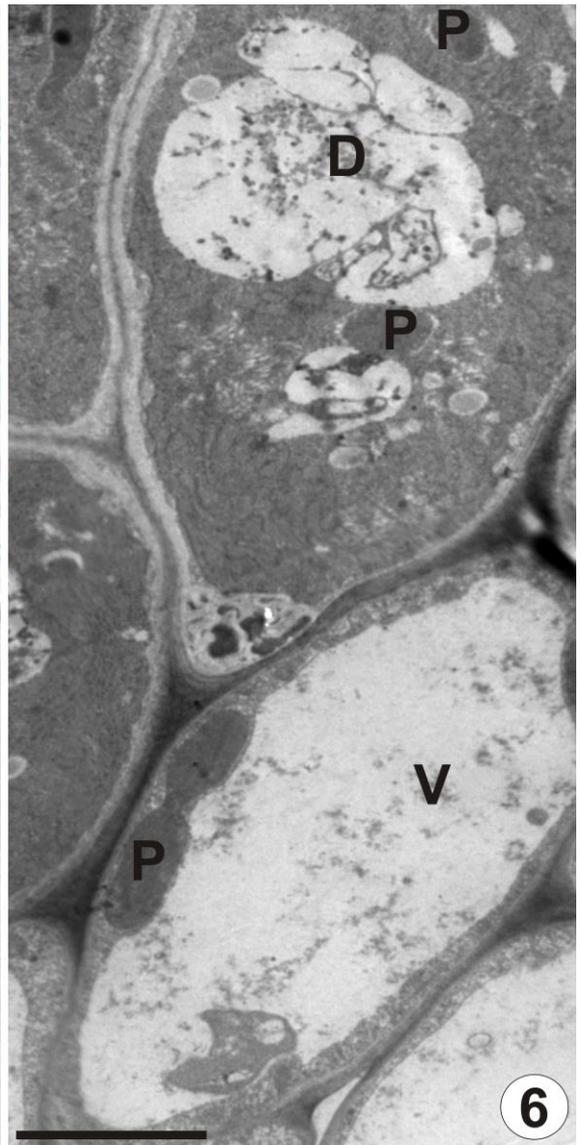
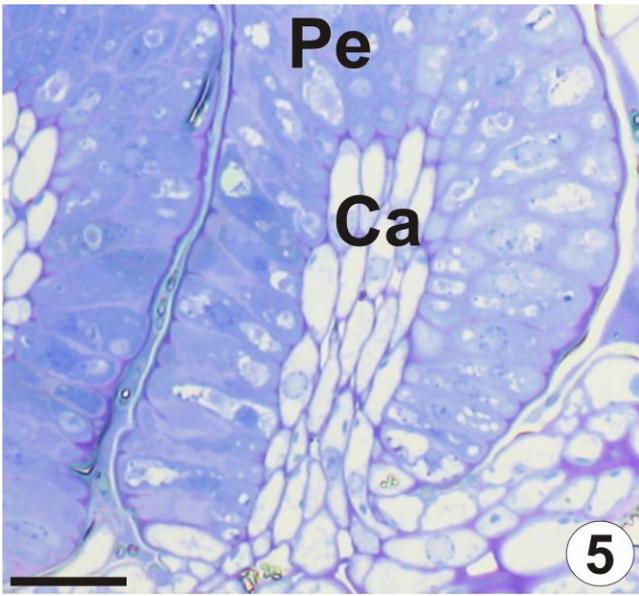
## ENSAIO TUNEL

O ensaio para detecção de fragmentação de DNA foi realizado nas três espécies, sendo reação TUNEL-negativa para os núcleos dos coléteres em *P. suterella*. A reação TUNEL-positivo ocorreu nos dois estágios de desenvolvimento do coléter para as espécies *P. leiocarpa* e *P. pubigera*. A aparência e a intensidade da fluorescência nos núcleos marcados em vermelho indica fragmentação do DNA nuclear, mostrando a degradação nuclear em células tanto do estágio secretor inicial (figs. 29, 30, 35, 36) quanto do estágio secretor tardio (figs. 31, 32, 37, 38). No estágio secretor inicial de desenvolvimento, observaram-se núcleos redondos com marcação positiva sutil para algumas células e intensa para outras (figs. 29, 30, 35, 36). No estágio secretor tardio foi observada marcação positiva e intensa nas células da epiderme secretora (figs. 31, 32, 37, 38). A morfologia dos núcleos foi alterada para um contorno irregular em algumas células.

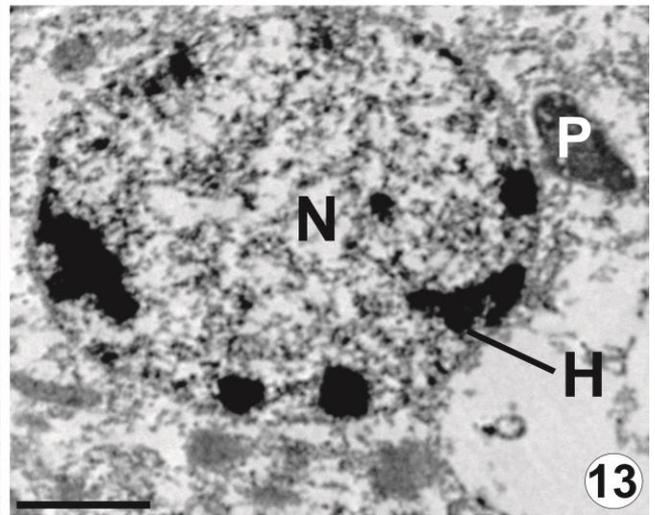
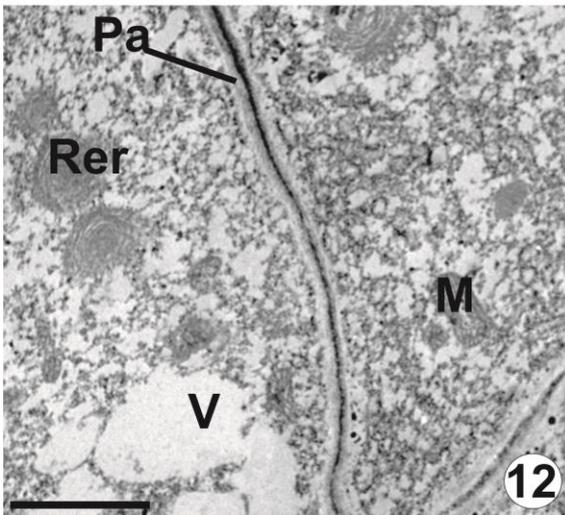
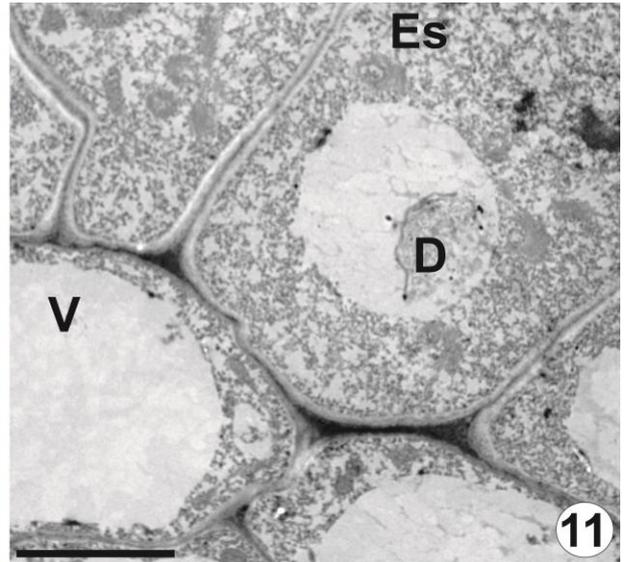
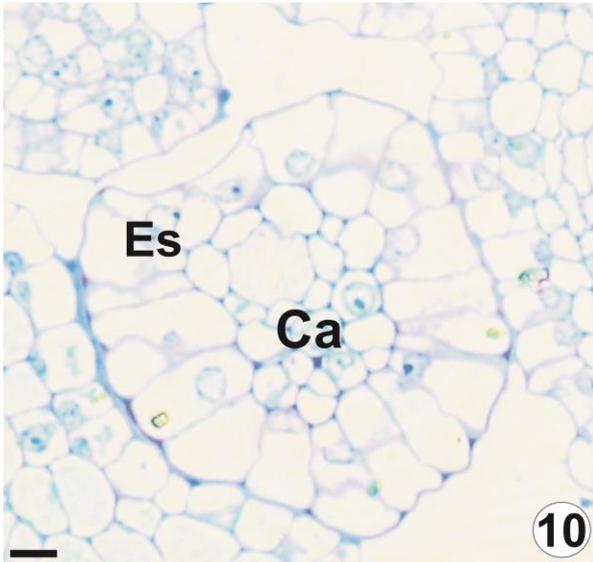
**Figuras 1-4.** Caracterização ultraestrutural dos coléteres de *Psychotria pubigera* em estágio secretor inicial. 1. Secção transversal do coléter evidenciando a estrutura das células epidérmicas em paliçada e as parenquimáticas. Note retração do citoplasma (seta) e acúmulo de secreção nesses espaços (\*); 2. Porção apical da célula secretora evidenciando a periclinal externa (Ocw), note a camada polissacarídica (Po), estrato cuticular (EC) dividido em camada arborescente (A) e reticulada (R) e a cutícula (C). Note retração do citoplasma (seta) e acúmulo de secreção (\*) nos espaços protoplasmáticos. Observe retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido; 3. Detalhe da célula parenquimática do eixo central. Observe o citoplasma na periferia da célula com presença de plastídio com grãos de amido e grande vacúolo com substância eletrondensa (Se); 4. Citoplasma denso da célula em paliçada e a presença de pequenos vacúolos e mitocôndrias. Pe, epiderme em paliçada; Ca, eixo central; C, cutícula; Rer, retículo endoplasmático rugoso; M, mitocôndria; V, vacúolo; P, plastídio; N, núcleo; D. debris; H. heterocromatina. 1. Microscopia óptica. 2-4. Microscopia eletrônica de transmissão. Barras: 1, 25µm; 2, 3, 250µm, 4, 500µm.



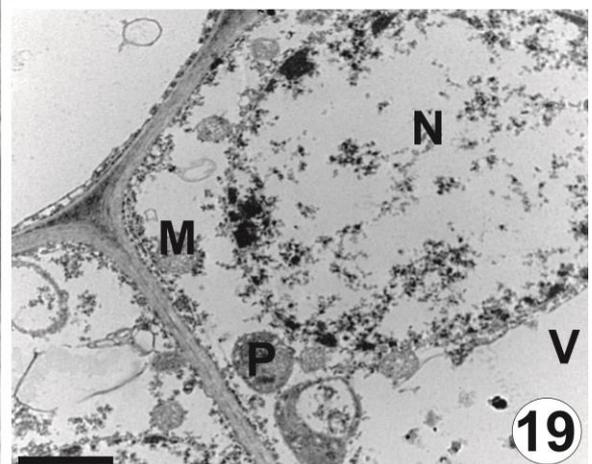
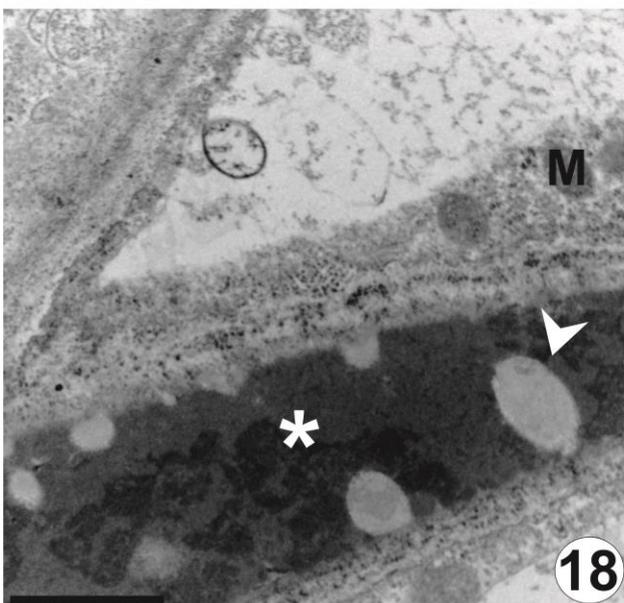
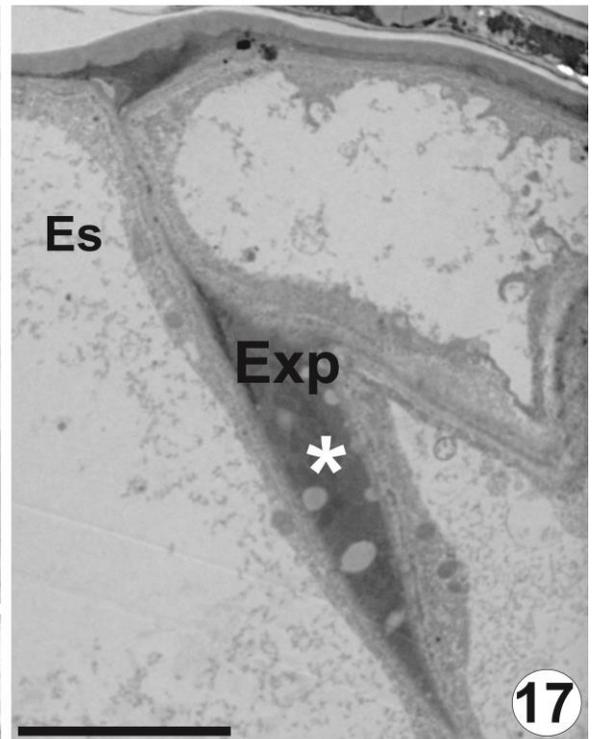
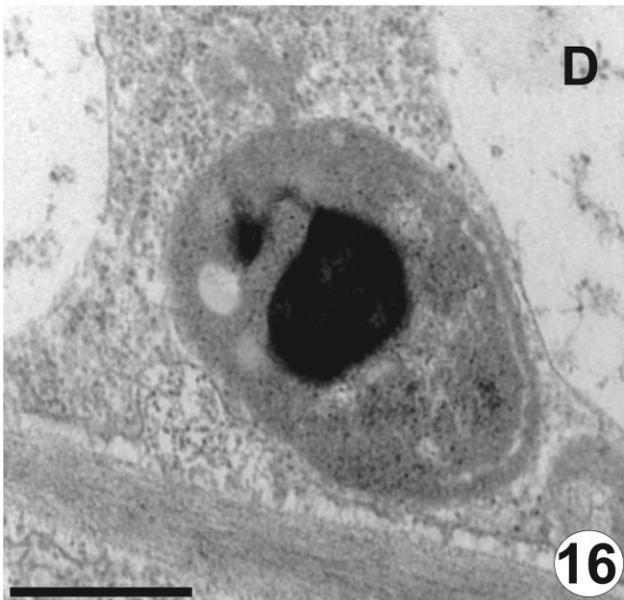
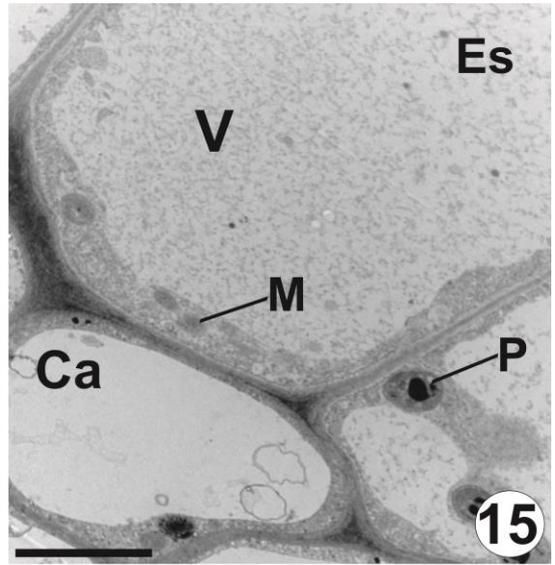
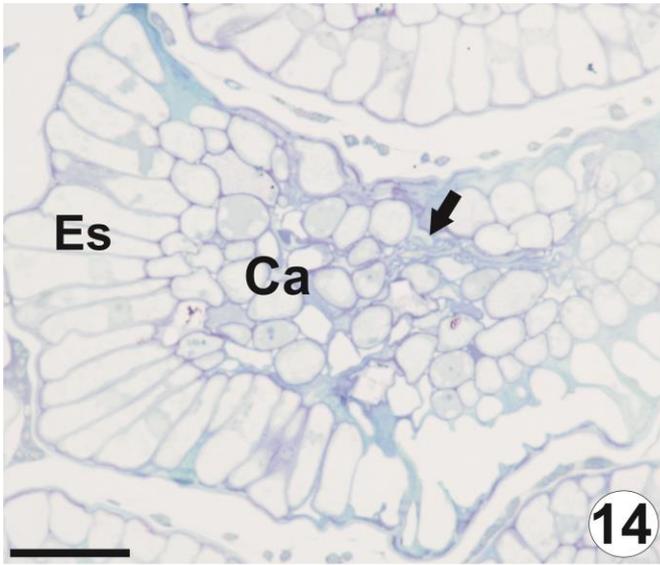
**Figuras 5-9.** Caracterização ultraestrutural dos coléteres de *Psychotria leiocarpa* em estágio secretor inicial. 5. Secção transversal do coléter evidenciando anatomia das células em paliçada e as parenquimáticas do eixo central; 6. Células da epiderme em paliçada, com citoplasma denso e a presença de vacúolos em diferentes tamanhos e plastídios. Células parenquimáticas com citoplasma na periferia apresentando plastídios e algumas mitocôndrias e vacúolo cobrindo a maior parte da célula; 7. Espaços extraprotoplasmático (Exp) com acúmulo de secreção (\*), note no citoplasma das células em paliçada a presença marcante de pequenos vacúolos com material osmiofílico, plastídios com material granuloso e núcleo conspícuo; 8. Acúmulo de secreção (\*) no espaço protoplasmático formado pela retração do citoplasma (seta). Note a sinuosidade na parede anticlinal (Pa); 9. Microrganismo na secreção. Pe, epiderme em paliçada; Ca, eixo central; V, vacúolo; P, plastídio; D, debris; N, núcleo; (\*), secreção. 5, Microscopia óptica; 6-9, Microscopia eletrônica de transmissão. Barras: 5, 25µm; 6, 5µm; 7, 2µm; 8, 1µm; 9, 1,25µm.



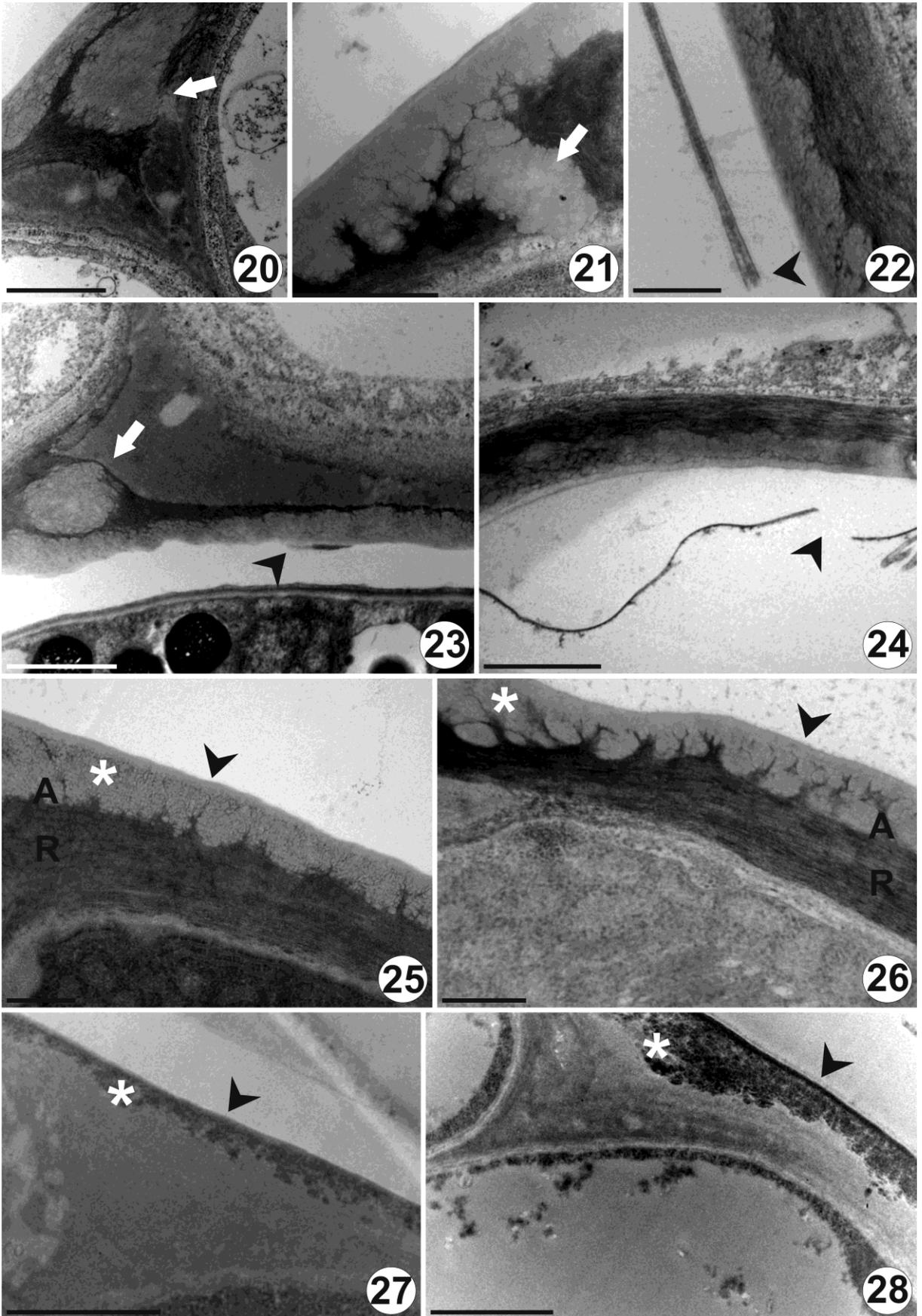
**Figuras 10-13.** Caracterização ultraestrutural dos coléteres de *P. suterella* em estágio secretor inicial. 10. Secção transversal do coléter, note as células da epiderme reduzida e as parenquimáticas do eixo central; 11. Células da epiderme reduzida com citoplasma granular e a presença de vacúolos com debris celulares. Células parenquimáticas com citoplasma na periferia apresentando algumas mitocôndrias e vacúolo cobrindo a maior parte da célula; 12. Citoplasma das células da epiderme reduzida com presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso; 13. Célula da epiderme reduzida evidenciando núcleo com heterocromatina evidente e plastídio. Es, epiderme secretora; Ca, eixo central; M, mitocôndria; V, vacúolo; D, debris; Rer, retículo endoplasmático rugoso; P, plastídio; N, núcleo; H, heterocromatina. 10, Microscopia óptica. 11-13, Microscopia eletrônica de transmissão. Barras: 10, 5 $\mu$ m; 11, 1 $\mu$ m; 12, 500 $\mu$ m; 13, 0,5 $\mu$ m.



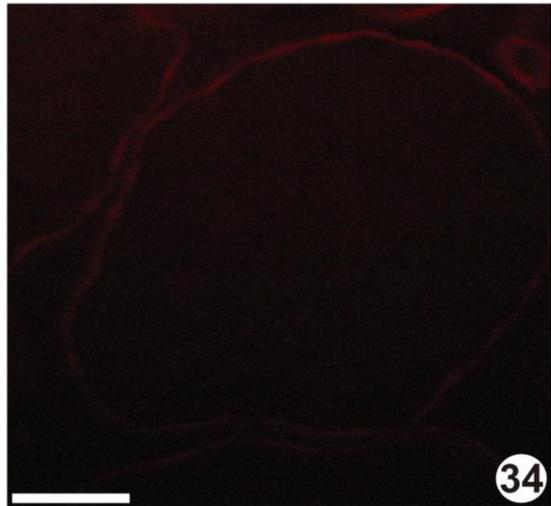
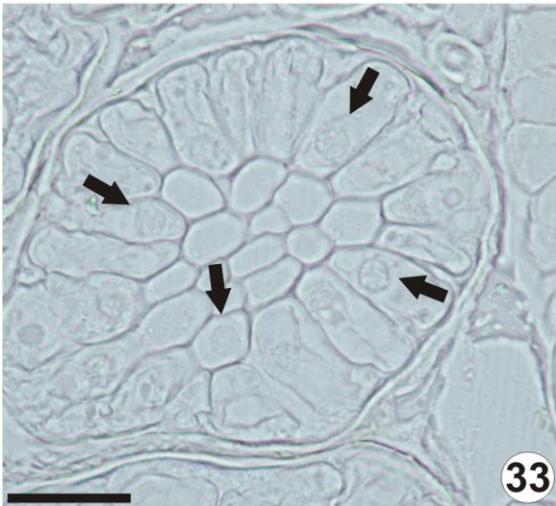
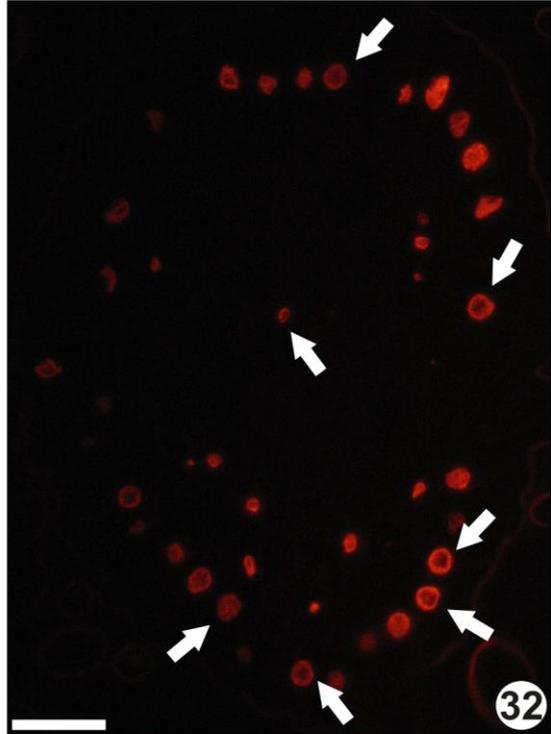
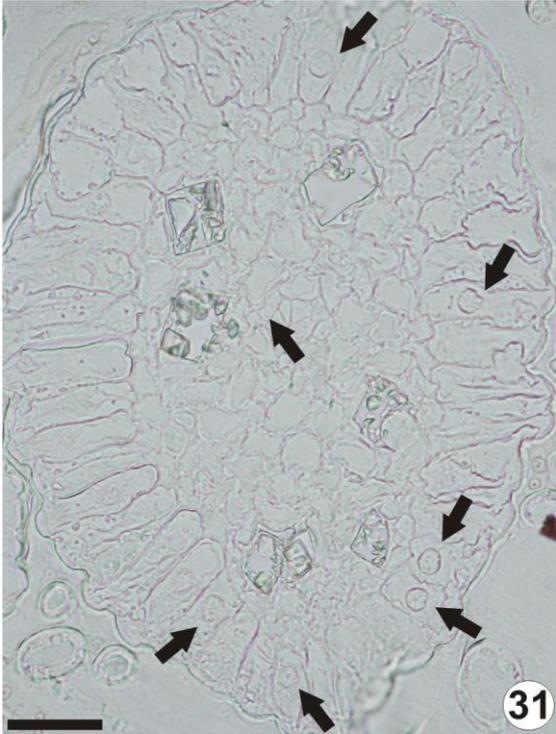
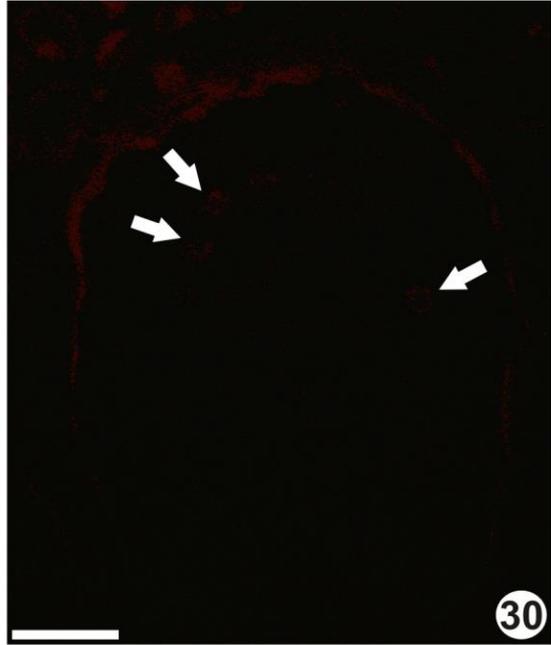
**Figuras 14-19.** Caracterização ultraestrutural dos coléteres em estágio secretor tardio. 14-16, *P. leiocarpa*; 17, 18, *P. pubigera*; 19, *P. suterella*. 14. Secção transversal do coléter com desorganização do eixo central (seta) e células da epiderme desestruturadas; 15. Células epidérmicas apresentando vacúolo desenvolvido com debris celulares e o citoplasma restrito a periferia da célula exibindo mitocôndrias e plastídio; 16. Plastídio com substância eletrondensa no estroma; 17. Células da epiderme com acúmulo de secreção (\*) no espaço extraprotoplasmático. 18. Detalhe do espaço extraprotoplasmático com corpos eletrólucos (cabeça de seta) na secreção (\*), note mitocôndrias no citoplasma; 19. Detalhe do núcleo. Note mitocôndrias e plastídios com corpos eletrólucos. Es, epiderme secretora; Ca, eixo central; D, debris; V, vacúolo; Exp, espaço extraprotoplasmático; M, mitocôndria; P, plastídio; N, núcleo. 14. Microscopia óptica. 15-19. Microscopia eletrônica de transmissão. Barras: 14, 25µm; 15, 1µm; 16, 200nm; 17, 2µm; 18, 19, 500nm.



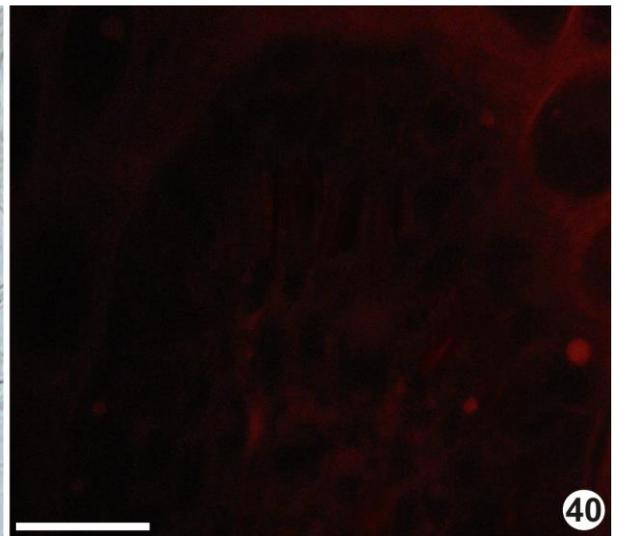
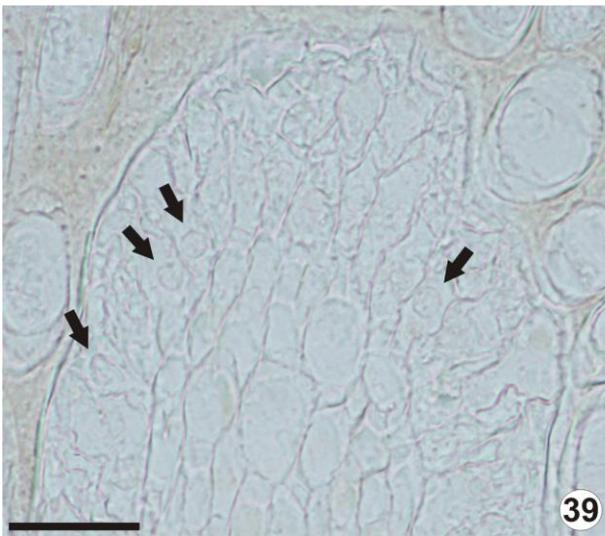
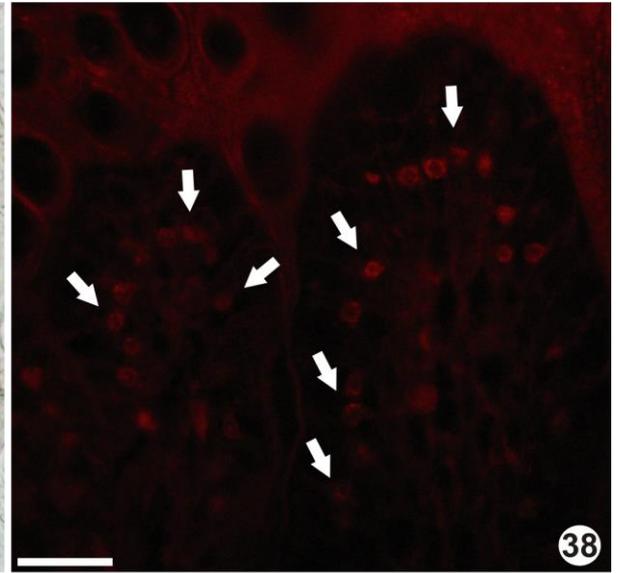
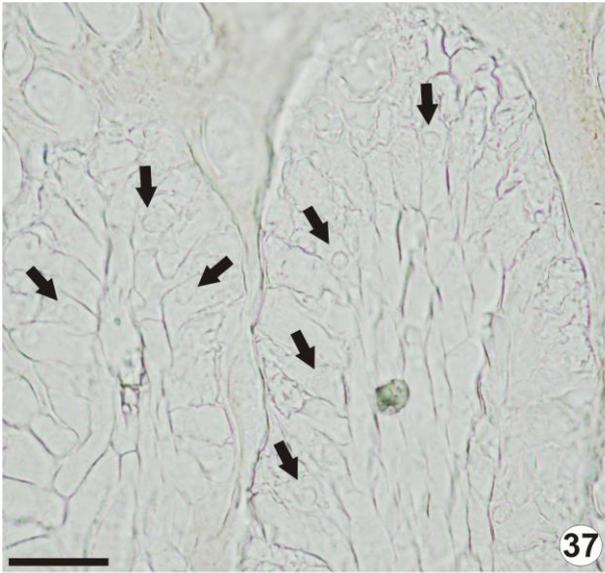
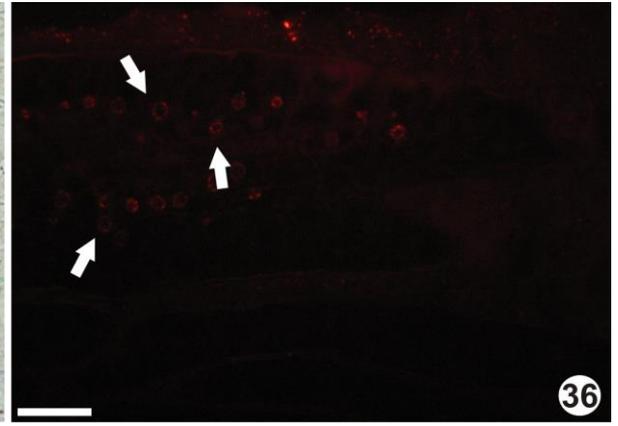
**Figuras 20-28.** Citoquímica da parede periclinal externa dos coléteres. 20, 24, 25, 27, *Psychotria pubigera*; 23, *P. suterella*; 21, 22, 26, 28, *P. leiocarpa*. 20-26, Contrastação rotina; 27, 28, Teste com vermelho de Rutênio. 20, 21, 23. Estratos cuticulares, apresentando desorganização da camada polissacarídica e estratos cuticulares (seta); 22-24. Possível rompimento da cutícula (cabeça de seta); 25, 26. Organização da parede periclinal externa, detalhe da marcação dos estratos cuticulares; 27, 28. Marcação com vermelho de rutênio evidenciando o acúmulo de secreção na camada mais externa da parede (\*) e na cutícula (cabeça de seta). A. arborescente; R. reticulada. Microscopia eletrônica de transmissão. Barra: 20, 2µm; 21, 0,5µm; 22, 250nm; 23, 24, 1 µm; 25, 200nm; 26-28, 500nm.



**Figuras 29-34.** Ensaio TUNEL em cortes transversais de coléteres de *Psychotria pubigera*. 29, 30. Coléter em estágio inicial evidenciando reação positiva nos núcleos com fragmentação de DNA. note marcação sutil na imagem 30; 31, 32. Coléter em estágio tardio apresentando marcação intensa; 33, 34. Controle negativo. Seta branca e preta, indicação do núcleo. 29, 31, 33. Microscopia óptica campo claro. 30, 32, 34. Microscopia óptica fluorescência. Barras: 29-34, 25µm.



**Figuras 35-40.** Ensaio TUNEL em cortes transversais de coléteres de *Psychotria leiocarpa*. 35, 36. Coléter em estágio inicial evidenciando reação positiva nos núcleos com fragmentação de DNA; 37, 38. Coléter em estágio tardio evidenciando reação positiva nos núcleos com fragmentação de DNA; 39, 40. Controle negativo. Seta branca e preta, indicação do núcleo. 35, 37. Microscopia óptica campo claro. 36, 38, 40. Microscopia óptica fluorescência. Barras: 35-40, 25µm.



## DISCUSSÃO

Com relação à ultraestrutura, já foi observado que as células de tecidos secretores são caracterizadas por apresentarem citoplasma denso, conter abundância de mitocôndrias e pequenos vacúolos, sendo que a frequência de outras organelas varia de acordo com o material secretado (Fahn, 1988). Os coléteres das três espécies estudadas no estágio secretor inicial apresentaram nas células da epiderme secretora, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi bem desenvolvidos, mitocôndrias, vacúolos em diferentes tamanhos e plastídeos. Essas características indicam que, nesta fase, os coléteres já se encontram em atividade secretora (Thomas 1991; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006, 2009; Paiva & Machado 2006a).

Como descrito anteriormente, no estágio secretor inicial, os coléteres apresentam células com características de grande atividade de síntese da secreção. Por exemplo, a abundância de retículo endoplasmático na fase secretora de coléteres encontrada nas espécies aqui estudadas foi também descrita por Mohan & Inamdar (1986), por Klein *et al.* (2004) e por Barreiro (2006). Estudos como de Dexheimer & Guenin (1981) mostram a importância do retículo plasmático rugoso e complexo de Golgi na produção de mucilagem, além de proteínas e de lipídeos (Machado *et al.* 2012). Werker & Kislev (1978) sugeriram que em pelos radiculares de *Sorghum* (Poaceae) a mitocôndria pode desempenhar um papel na produção de mucilagem em espécies. Neste sentido, as características observadas destas organelas no estágio secretor inicial dos coléteres das três espécies de *Psychotria* sugerem o importante papel destas na síntese de precursores da secreção, visto que previamente por testes histoquímicos apresentados no capítulo 1, foi identificado predominantemente mucilagem na secreção dos coléteres. Ainda que ao longo do desenvolvimento também tenha sido detectada a presença de ácidos graxos.

Plastídios com inclusões granulosas e eletronlucentes foram observados no estágio inicial de desenvolvimento dos coléteres nas espécies estudadas, entretanto no estágio tardio foi observado com grande frequência inclusões fortemente osmiofílicas e também eletronlucentes no estroma, além de estarem associados a retículo endoplasmático rugoso e ao núcleo. Com base nestas características e aliado aos trabalhos que descrevem o envolvimento desta organela com a produção

de compostos lipofílicos (Fahn, 1979, 1988; Sachetti *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2006; Favorito-de-Carvalho, 2009), nos permite inferir que a presença dos plastídeos, assim como suas mudanças ao longo do desenvolvimento dos coléteres está relacionada com a síntese de substâncias lipofílicas. Estes dados corroboram com os resultados dos testes histoquímicos realizados no capítulo 1, mostrando a presença e o aumento de ácidos graxos nas células dos coléteres durante o seu desenvolvimento. A presença de grãos de amido no estroma dos plastídios nas células parenquimáticas durante o estágio inicial dos coléteres das espécies estudadas pode estar associada a uma fonte de energia para os processos metabólicos, assim como outros autores sugeriram para coléteres (Durkee *et al.*, 1984), cavidades secretoras (Monteiro *et al.*, 1999) e tricomas (Machado *et al.*, 2006).

Com base nas características ultraestruturais pode-se sugerir que a secreção produzida pelos coléteres das espécies estudadas possui natureza mista (hidrofílica e lipofílica). De fato, o aspecto da secreção acumulada no espaço extraprotoplasmático entre as células secretoras difere entre os estágios de desenvolvimento. Durante o estágio secretor inicial, os depósitos apresentam aspecto granuloso, características de secreção predominantemente mucilagínosa, enquanto no estágio secretor tardio possuem aspecto mais homogêneo e fortemente osmiofílico com presença de corpos eletrólucos. Tais características são semelhantes as descritas por Machado *et al.* (2012) em coléteres de *Alibertia sessilis* (Rubiaceae). As células parenquimáticas do eixo central e as células epidérmicas do coléter das três espécies de *Psychotria* apresentam vacúolos com deposição de alcalóide e que posteriormente vêm a compor a secreção. O retículo endoplasmático rugoso, o vacúolo e o plastídio também estão relacionados com a síntese de alcalóide (Marinho, 2009).

As características descritas para as três espécies estudadas, como, a retração no citoplasma, o acúmulo de secreção nos espaços extraprotoplasmáticos e a presença e as características das organelas que compõem o citoplasma das células do coléter são compatíveis com a atividade secretora descrita por Fahn, 1988. Já a presença de vacúolos com deposição de alcalóide e condensação da cromatina nuclear são indícios de morte celular programada, sendo estas ocorrentes desde o estágio inicial de desenvolvimentos dos coléteres para as três espécies de *Psychotria* (Schussler & Longstreth, 1996; Klein *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2006;

Miguel *et al.*, 2009). Entretanto, os tecidos secretores sofrem transformações relativamente rápidas, fazendo com que sua estrutura e até mesmo seu conteúdo bioquímico diferenciado em um curto período de tempo (Dickison, 2000; Miguel *et al.*, 2006; Gaffal *et al.*, 2007). Esta característica torna difícil à caracterização dos diversos tecidos que possuem função secretora, bem como, estabelecer seus estágios de desenvolvimento (Fahn, 1979).

No estágio secretor tardio foi observada uma aparente diminuição na quantidade de mitocôndria, plastídios e retículo endoplasmático, desaparecimento do complexo de Golgi e um concomitante aumento dos vacúolos que passam a recobrir a maior parte do citoplasma. Estas observações estão de acordo com as características do processo de morte celular programada (Bursch, 2001; Van Doorn & Woltering, 2005). A morte celular e dissolução citoplasmática após uma fase de secreção intensa é a etapa final do desenvolvimento da maioria das células glandulares (Fahn, 1979). Venkaia (1992) relata que as células epiteliais de ductos em senescência mostram vacuolização e degeneração do citoplasma. Paiva & Machado (2006a) observaram coléteres em estado de senescência com as mesmas características. Miguel *et al.* (2006) notou gradativa degradação citoplasmática ocorrendo paralelamente à plasmólise durante o processo de senescência de coléteres de *Bathysa nicholsonii* (Rubiaceae). De um modo geral os caracteres relacionados a este processo são retração do citoplasma, alteração na morfologia nuclear e posterior clivagem do DNA (Green & Kroemer, 1998; Danon *et al.*, 2000; McCabe & Leaver, 2000; Van Doorn & Woltering, 2005).

Uma das características bioquímicas notáveis de morte celular programada é a fragmentação de DNA nuclear (Martz & Howell, 1989; McConkey *et al.*, 1990; Ucker, 1991). Sendo assim, foi realizado um ensaio de TUNEL nas espécies *P. leiocarpa*, *P. pubigera* e *P. suterella* a fim de estabelecer uma ligação entre as alterações ultraestruturais observadas durante os estágios de desenvolvimento dos coléteres e a ocorrência de morte celular programada. Para as espécies *P. leiocarpa*, *P. pubigera* o ensaio revelou fragmentação do DNA desde o estágio secretor inicial de desenvolvimento dos coléteres. E ao longo do desenvolvimento do coléter a fragmentação ocorre com maior frequência e intensidade. Com base nestes dados, pode-se sugerir que a fragmentação do DNA é uma das primeiras manifestações de morte celular programada nos coléteres estudados. Esta característica também foi observada em folhas jovens de *Nicotiana tabacum* L.

(Solanaceae) (Uzelac *et al.*, 2008) e em coléteres de *Alseis pickelli* (Rubiaceae) (Tullii *et al.*, 2013).

Para a espécie de *P. suterella* o resultado para fragmentação do DNA nuclear foi TUNEL- negativo, Entretanto, não significa que o processo de morte celular não tenha sido iniciado. É possível que no tipo de morte celular programa ocorrente no coléter desta espécie fragmentação do DNA nuclear se inicia tardiamente.

Van Doorn (2011) sugeriu a classificação de dois tipos de morte celular em plantas baseado em caracteres morfológicos: morte celular autolítica e não autolítica. A morte celular autolítica muitas vezes manifesta-se por uma gradual diminuição do volume do citoplasma e um concomitante aumento do volume vacuolar. Tais características se assemelham as observadas nas espécies estudadas, o que nos permite inferir que a morte celular ocorrente nas espécies estudadas é do tipo autolítica. Entretanto pouco se sabe sobre a morte celular em plantas e a definição dos processos é bastante discutida, sendo encontradas diversas classificações na literatura (Danon *et al.*, 2000; Van Doorn & Woltering, 2005; Van Doorn *et al.*, 2011; Van Doorn, 2011).

Nos coléteres das espécies estudadas foi possível observar a passagem de secreção pela parede periclinal externa, nos dois estágios de desenvolvimento, evidenciada pela técnica de citoquímica, porém não foi detectada a presença de poros nem canais nesta parede. A ausência dessas estruturas também foi verificada em *Passiflora foetida* (Passifloraceae) (Durkee *et al.*, 1984), *Prestonia coalita* (Apocynaceae) (Rio *et al.*, 2002), em três espécies de *Simira* (Rubiaceae) (Klein *et al.*, 2004), *Cariocar brasiliensis* (Caryocaraceae) (Paiva & Machado, 2006b), *Bathysa nicholsonii* (Rubiaceae) (Miguel *et al.*, 2006), *Rauvolfia sellowii* (Apocynaceae) (Marasca, 2008), espécies de *Asclepiadeae* (Apocynaceae) (Demarco, 2008) e em *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) (Paiva, 2009). A grande presença de secreção na camada arborescente indica que a secreção passa lentamente pela parede e tende a se acumular na cutícula até o possível rompimento e externalização total da secreção. Esta evidencia foi observada nas espécies *P. pubigera* e *P. leiocarpa*, podendo constituir um indício que a forma final de liberação da secreção dos coléteres nas três espécies de *Psychotria* ocorra por ruptura da cutícula como o resultado da pressão exercida pela secreção acumulada no espaço subcuticular (Mohan & Inandar, 1986; Paiva *et al.*, 2001). Esta forma de liberação da secreção dos coléteres também foi relatada por Thomas & Dave (1989a) e Paiva & Machado

(2006a,b). Paiva (2009) ressalta que o acúmulo dos produtos de secreção entre a parede e a cutícula parece promover uma pressão que permite o fluxo de secreção atravessar a barreira cuticular, provavelmente por rupturas. Assim, a secreção pode ser liberada sem requisitos de energia. No entanto, Miguel *et. al.* (2006) sugere que a secreção passaria pela parede celular através de desorganização de suas camadas. Nas espécies estudadas também foi observado a desorganização nas camadas que compõem a parede periclinal externa, sendo um indício de como a secreção passa pela parede até a cutícula.

## CONCLUSÕES

As características a nível subcelular das células da epiderme secretora diferem entre uma espécie. Para as espécies *P. leiocarpa* e *P. pubigera* as células da epiderme apresentam como característica marcante o citoplasma eletrondenso e sua leve retração, já em *P. suterella* não ocorre retração do citoplasma e o mesmo possui aspecto granular, mas não é tão denso como observado nas outras duas espécies estudadas. As três espécies compartilham a presença de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, complexo de Golgi e plastídeos. Para as três espécies, nas células parenquimáticas o citoplasma está localizado na periferia das células e possui aspecto granuloso e não é tão denso quando comparado às células secretoras.

Através da descrição ultraestrutural das células da epiderme foi possível confirmar e definir os dois estágios secretores no desenvolvimento dos coléteres: um estágio secretor inicial e um estágio secretor tardio. A característica marcante para classificação do estágio secretor inicial é a intensa atividade celular nas células em paliçada, sendo observada a grande quantidade e variedade de organelas relacionadas com síntese de substâncias ligadas a secreção. Já o estágio secretor tardio tem como característica marcante, a presença de grandes vacúolos e a desestruturação nuclear.

A senescência não é bem definida quanto ao nível subcelular, já que as células secretoras entram em processo de morte celular programada enquanto ainda estão em estágio secretor inicial. Tais observações foram possíveis através da marcação da fragmentação do DNA nuclear.

A parede periclinal externa dos coléteres é dividida em três camadas. Os resultados relacionados ao modo de externalização da secreção revelou que os estratos cuticulares da parede periclinal externa se reorganizam, de acordo com a passagem da secreção. Também foi observado ruptura da cutícula, sendo a união destas características o possível modo de externalização da secreção dos coléteres.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa utilizou-se de um estudo morfológico e anatômico para caracterizar os coléteres de espécies de *Psychotria*, podendo fornecer possíveis dados para subsidiar a taxonomia complexa desde gênero e contribuir para entender o desenvolvimento desta estrutura. E aliado aos estudos da composição química dos coléteres, afim de, estabelecer o papel da secreção para a planta, e os estudos ultraestruturais para analisar de forma mais detalhada o comportamento das células secretoras ao longo do desenvolvimento, tornou possível observar a dinâmica celular e o comportamento da parede periclinal externa. Com a união destes dados foi possível identificar que os coléteres passam por um processo de senescência até a sua morte celular e a detecção da fragmentação do DNA veio a revelar que o processo de morte celular possivelmente começa desde o estágio inicial de desenvolvimento para as espécies *P. leiocarpa* e *P. pubigera*.

Constatou-se que, embora os coléteres presentes nos ápices vegetativos das espécies de *Psychotria* possuam padrão anatômico parecido, constituído por um eixo central de células parenquimáticas, revestido por uma epiderme unisseriada em paliçada, o estudo revelou diferenças morfológicas, tornando possível identificar quatro tipos diferentes de coléteres nas espécies estudadas do gênero *Psychotria*, além da diferente distribuição dos coléteres na estípula. Essas variações morfológicas e anatômicas, bem como, as variações de distribuição e organização dos coléteres são passivas de serem utilizadas como caracteres diagnósticos para identificação das espécies dentro do gênero em questão; uma vez que, pequenas variações presentes em poucos casos, devem ser consideradas como caracteres taxonômicos.

O estudo da composição química das células secretoras e da secreção dos coléteres revelou uma mistura de substâncias lipofílica e hidrofílica, além da presença de alcalóide. Estes dados, aliado a literatura, constata o papel biológico da secreção nas interações destas plantas com o ambiente, constituindo um importante papel de defesa dos tecidos em desenvolvimento nos ápices vegetativos contra fatores biótico e abiótico.

A análise ultraestrutural é de grande importância para entender os processos de síntese da secreção em células secretoras. O estudo detalhado das células secretoras permitiu avaliar o comportamento das possíveis organelas envolvidas na

síntese da secreção, bem como, estabelecer correlações da presença e características de determinadas organelas com o material secretado. Concomitante foi possível observar o desenvolvimento dos coléteres ao longo da sua atividade secretora, e através da técnica TUNEL revelar que a morte celular ocorre desde os primeiros estágios de desenvolvimento. Sendo necessários mais estudos a cerca destas estruturas, para entender o seu desenvolvimento e compreender os processos de morte celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREASEN, K. & BREMER, B. 2000. Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear, and chloroplast DNA data. *American Journal of Botany*, 87: 1731-1748.
- ANDERSSON, L. & ROVA, J. H. E. 1999. The rps16 intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 214: 161-186.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO. 2006. *Anatomia Vegetal*. 2th ed. UFV. Viçosa, MG, Brasil.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA, M. E. M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. Velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 23: 113-120.
- ARAÚJO, D. S. D. & OLIVEIRA, R. R. 1988. Reserva Biológica Estadual da Praia do Sul (Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro): lista preliminar da flora. *Acta Botânica Brasílica*, 1(2): 83-94.
- ASCENSÃO, L. 2003. Técnicas histoquímicas convencionais e de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de cerrado. Instituto de Biologia. Departamento de Botânica. Universidade Estadual Paulista.
- BARREIRO, D. P. & MACHADO, S.R. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae - *Rev. Bras. Bot.*, 30 (3): 387-399.
- BREMER, B. 1996. Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. *Opera Botânica Bélgica*, 7: 33-50.
- BREMER, B. & ERIKSSON, T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International journal of plant sciences*, 170(6): 766-793.
- BREMER, B. & MANEN, J. F. 2000. Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 225(1): 43-72.
- BONKE, M.; THITAMADEE, S.; MÄHÖNEN, A. P.; HAUSER, M.; HELARIUTTA, Y. 2003. APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 181-186.
- BORHIDI, A. 2011. Transfer of the Mexican species of *Psychotria* subgen. *Heteropsychotria* to *Palicourea* based on morphological and molecular evidences. *Acta Botânica Hungria*, 53(3-4): 241-250.

- BURSCH, W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.*, 8: 569-581.
- CASTRO, M. M. & DEMARCO, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Nat. Prod. Commun.*, 3: 1273–1284,
- CASTRO, M. M.; LEITÃO-FILHO, H. F.; MONTEIRO, W. R. 1997. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 20: 163-174.
- CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2007. *A célula*. 2ª Ed. Barueri, SP.
- CHAMBERLAIN, C. J. 1932. *Methods in plant histology*. 5ª ed. Chicago, The University of Chicago Press, 416 p.
- CRUDEN, R. W. & LYON, D. L. 1985. Patterns of biomass allocation to male and female functions in plants with different mating systems. *Oecologia*, 66: 299-306.
- CURTIS, J. D. & LERSTEN, N. R. 1974. Morphology, seasonal variation and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany*, 61: 835-845.
- CUTTER, E. G. 1978. *Plant Anatomy. Part I: Cells and tissues*. 2nd. ed., Edward Arnold, London.
- DA CUNHA, M.; COSTA, C. G.; MACHADO, R. D.; MIGUENS, F. C. 1998. Distribution and Differentiation of the Laticifer System in *Chamaesyce thymifolia* (L.) Millsp. (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Neerl*, 47(2): 209-218.
- DA CUNHA, M. & VIEIRA, R. C. 1997. Anatomia foliar de *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). *Rodriguésia*, 49: 39-50.
- DA CUNHA, M.; GOMES, V. M.; XAVIER FILHO, J.; ATTIAS, M.; SOUZA, W.; MIGUENS, F. C.. 2000. Laticifer System of *Chamaesyce Thymifolia*. A Closed Host Environment for Trypanosomatids. *Biocell*, 24(2): 123-132.
- DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38:647-655.
- DAVE, Y.; THOMAS, V.; KURIACHEN, P. M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosoma caryophyllata* G. Don. *Pakistan Journal of Botany*, 19: 243-248.

- DAVE, Y.; KURIACHEN, P. M.; THOMAS, V. 1988. Development, structure and senescence of colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 57:3-7.
- DAVIS, A. P., BRIDSON, D., JARVIS, C., GOVAERTS, R. L. 2001. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 135: 35–42.
- DELPRETE, P. G. & JARDIM, J. G. 2012. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*, 63(1), 101-128.
- DELPRETE, P. G. & R. CORTÉS-B. 2004. A phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using trnL-F and ITS sequence data. *Taxon*, 53: 347–356.
- DEMARCO, D. 2008. Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécies de *Asclepiadeae* (R.BR) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Tese (doutorado em Biologia Vegetal). Campinas/SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- DEXHEIMER, J. & GUENIN, F. 1981. Étude de la sécrétion de mucilage par le trichomes stipulaires de *Psychotria bacteriophyla* (Rubiaceae). *Cytologia* 46:731-747.
- DICKISON, W. C. 2000. Integrative plant anatomy. San Diego. Harcourt Academic Press. 533p.
- DURKEE, L. T.; BAIRD, C. W.; COHEN, P. F. 1984. Light and electron microscopy of the resin glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, 71: 596-602.
- ESAÚ, K. 1976. Anatomia vegetal. Barcelona: Ediciones Omega, S. A., 3ª. Ed.
- FAHN, A. 1979. Secretory tissues in Plants. Academic Press, London.
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108: 229-257.
- FAHN, A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FAVORITO-DE CARVALHO, S. 2009. Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* cham. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas). Botucatu/SP, Universidade Estadual Paulista – UNESP.
- FISCHER, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16: 92-96.

- FRANCESCHI V. R. & NAKATA, P. A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 41-71.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). 2010. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período 2008-2010, relatório parcial. São Paulo, 120 p.
- GAFFAL, K. P.; FRIEDRISH, G. J.; EL-GAMMAL, S. 2007. Ultrastructural Evidence for a Dual Function of the Phloem and Programmed Cell Death in the Floral Nectary of *Digitalis purpurea*. *Annals of Botany*, 99: 593-607.
- GANTER, P. & JOLLÉS, G. 1970. *Hitologie normale at pathologique*. Vol II, Gauthier, Villars, Paris.
- GATTUSO, M.; DI SAPIO, O.; GATUSO, S. & LI PEREYRA, E. 2004. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. *Phytomedicine*, 11 (2-3): 213-223.
- GREEN, D. & KROEMER, G. 1998. The central executioners of apoptosis caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology.*, 8: 267-271.
- GONZALEZ, A. M. & TARRAGÓ, J. R. 2009. Anatomical Structure and Secretion Compounds of Colleters In Nine *Ilex* Species (Aquifoliaceae) From Southern South America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160: 197-210.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RUHSAM, M.; BRIDSON, D. M.; DAVIS, A. P. 2007. *World checklist & bibliography of Rubiaceae*. The Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- GUNAWARDENA, A. H. L. A. N.; GREENWOOD, J. S.; DENGLER, N. G. 2007. Cell wall degradation and modification during programmed cell death in lance plant, *Aponogeton madagascariensis* (Aponogetonaceae). *American Journal of Botany*, 94: 1116-1128.
- HADFIELD, K. A. & BENNETT, A. B. 1997. Programmed senescence of plant organs. *Cell Death Differentiation*, 4: 662-670.
- HAMILTON, C. H. 1990. Variations on a dystylous theme in a Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Mem. New York Botanical Garden*, 55: 62-75.
- HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; VON POSER, G. L.; FETT-NETO, A. G.; SCHRIPSEMA, J. N. 2004.  $\beta$ -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry*, 65: 449-454.

- HESLOP-HARRISON J. & KNOX R. B. 1981. Plant histochemistry: retrospect and prospect. In: Stoward PJ, Polak JM, eds. Histochemistry: the widening horizons, 1-10.
- HORNER, H. T. & LERSTEN, N. R. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). American Journal of Botany, 55: 1089-1099.
- HUDGINS, J. W.; KREKLING, T.; FRANCHESCHI, V. R. 2003. Distribution of calcium oxalate crystals in the secondary phloem of conifers: a constitutive defence mechanism? New Phytologist, 159: 677–690.
- IBAMA. 2006. Plano de Manejo da Reserva Biológica do Tinguá-RJ. Brasília. 1(2): 1-23.
- JANSEN, S., ROBBRECHT, E., BEECKMAN, H., & SMETS, E. 1997. Wood anatomy of the predominantly African representatives of the tribe Psychotrieae (Rubiaceae-Rubioideae). IAWA Journal, 18 (2): 169 -196.
- JANSEN, S., ROBBRECHT, E., BEECKMAN, H., & SMETS, E. 2000. Aluminium accumulation in Rubiaceae: an additional character for the delimitation of the subfamily Rubioideae. International Association of Wood Anatomists Journal, 21: 197-212.
- JANSEN, S.; ROBBRECHT, E.; BEECKMAN, H.; SMETS, E. 2002. A survey of the systematic wood anatomy of the Rubiaceae. IAWA J, 23: 1–67.
- JOHANSEN, D. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. 52p.
- JOHANSSON, J. T. 1987. Revision of the genus *Prismatomeris* Thw. (Rubiaceae, Morindae). Opera Botânica, 94: 1-62.
- KLEIN, D. E.; GOMES, V. M.; SILVA-NETO, S. J. & CUNHA, M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). Annals of Botany, 94: 733-740.
- KORTH, K. L.; DOEGE, S. J.; PARK, S. H.; GOGGIN, F. L.; WANG, Q.; GOMEZ, S. K.; LIU, G.; JIA, L.; NAKATA, P. A. 2006. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defence against chewing insects. Plant Physiology, 141: 188-195.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural (EDUR). Seropédica, RJ.

- KURIACHEN, P. M. & DAVE, Y. 1989. Structural development and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). *Journal of Phytological Research*, 2: 7-14.
- LAURENCE, M. P.; MOTTE-FLORAC; MCKEY, D. B. 2000. Secretory structures on the leaf rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): Implications for the evolution of nectary glands. *American Journal of Botany*, 87: 327-338.
- LEITÃO, C. A. E. & CORTELAZZO, A. L. 2008. Structural and histochemical characterization of the colleters of *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany*, 56: 161-165.
- LERSTEN, N.R. 1974a. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodules in *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 61: 973-981.
- LERSTEN, N. R., 1974b. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 69: 125 - 136.
- LERSTEN, N. R. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 71: 311-319.
- LERSTEN, N. R. & CURTIS, J. D. 1995. Two foliar idioblasts of taxonomic significance in *Cercidium* and *Parkinsonia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *American Journal of Botany*. 82:565-570.
- LERSTEN, N. R. & HORNER, H. T. J. R. 1967. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriifila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 55: 1089-1099.
- LOPES, S.; VON POSER, G. L.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; Sobral, M. E.; Zuanazzi, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). *Biochemical systematics and ecology*, 32(12): 1187-1195.
- LUFT, J. H., 1971. Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.* 171: 369 - 376.
- MABBERLEY, D. J. 1997. *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press, Cambridge.

- MACE M., E.; BELL, A., A.; STIPANOVIC, R., D. 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathol*, 64: 1297-1302.
- MACHADO, S. R. 2005. Glandular structures in plants: cell changes during the secretory cycle. *Braz. J. Morphol. Sci*, 12.
- MACHADO, S. R.; BARREIRO, D. P.; ROCHA, J. F.; RODRIGUES, T. M. 2012. Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora*, 207(12): 868– 877.
- MACHADO, S. R.; GREGÓRIO, E. A.; GUIMARÃES, E. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria Montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany*. 97(3): 357-369.
- MACHADO, S. R.; GREGORIO, E. A.; YANAGIZAWA, Y.; CARMELLO, S. M. 1995. Ultrastructural aspects of the peltate glandular trichomes of the gynoecium in *Zeyheria digitalis* (Vell.) Hoehne (Bignoniaceae). *Revta brasil. Bot*, 18: 197-205.
- MAHLBERG, P.G. & KIM, E. S. 1992. Secretory vesicles formation in glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannbaceae). *American Journal of Botany*, 79(2): 166-173.
- MARASCA, R. M. 2008. Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Dissertação (mestrado em Biologia Vegetal). Campinas/SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- MARINHO, S. R. M. 2009. Função dos alcalóides indólicos monoterpénóides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Dissertação (mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal). Porto, Portugal. Universidade do Porto – U.Porto.
- MARQUES, J. B. C. 2012. Anatomia Comparada do lenho de espécies de *Psychotria* L. (Rubiaceae) da Ilha Grande, RJ. Dissertação (mestrado em Biociências e Biotecnologia). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- MARTINS F. M.; KINOSHITA L.; CASTRO M. DE M. 2010. Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 519-530.

- MARTINS, F. M. 2012. Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae-Apocynoideae-Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Brazilian Journal of Botany*, 35(1), 59-69.
- MARTZ, E., & HOWELL, D. M. 1989. CTL: virus control cells first and cytolytic cells second? *Immunol.*, 10: 79–86.
- MAYER, J. L. S.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2011. Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* 206: 185-190.
- MCCABE, P. E.; LEAVER, C. J. 2000. Programmed cell death in cell cultures. *Plant Molecular Biology*, 44: 359-368.
- MCCONKEY, D. J.; ORRENIUS, S.; JONDAL, M. 1990. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol.* 11: 120–121.
- MCMANUS, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol*, 23:99-108.
- MIGUEL, E. C.; GOMES, V. M.; DE OLIVEIRA, M. A.; DA CUNHA, M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, secretion protein composition and antifungal activity. *Plant Biology*, 8: 715-722.
- MIGUEL, E. C.; KLEIN D. E.; DE OLIVEIRA, M. A.; DA CUNHA, M. 2010. Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* K. Schum. and *B. stipulata* (Vell.) C. Presl. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 33: 455-466.
- MIGUEL, E. C.; MORAES, D.G. & DA CUNHA, M. 2009. Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schldl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. *Acta Botânica Brasílica*, 23: 1034-1039.
- MILLER, I. M., SCOTT, A. & GARDNER, I. C. 1983. The development, structure and function of dendroid colleters in *Psychotria kirkii* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 51: 621-630.
- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOUREX, J.; FONSECA, G. A. B. 2004. Hotspots revisited. CEMEX, Mexico City, 392p.
- MOHAN, J. S. S. & INAMDAR, J. R. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectarines of *Plumeria rubra* L. *Annals of Botany*, 57: 389-401.

- MONTEIRO, W. R.; FAHN, A.; CALDEIRA, W.; CASTRO, M. M. 1999. Ultrastructural observations on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae). *Flora*, 194: 113-126.
- MORAES, T. M. S. 2011. Caracterização Anatômica e micromorfológica da folha de espécies da família Rubiaceae, prospecção alcaloídica e atividade biológica de extratos foliares de *Psychotria* L. Tese (doutorado em Biociência e Biotecnologia). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- MORAES, T. M. S.; BARROS, C. F.; KAWASHIMA, C. G.; MIGUENS, F. C. & DA CUNHA, M. 2011a. Domatia and leaf blade structure of *Rudgea eugenioides* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 9: 25-32.
- MORAES, T. M.S.; RABELO, G. R.; ALEXANDRINO, C.R.; SILVA NETO, S. J. & DA CUNHA, M. 2011b. Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Botânica Brasília*, 25: 178-190.
- NEPOKROEFF M., BREMER B. & SYTSMA K.J. 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. *Systematic Botany*, 24(1): 5–27.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59: 368-373.
- PAIVA, E. A. S. 2009. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *C. R. Biologies*, 332: 1078–1084.
- PAIVA, E. A. S., & MACHADO, S. R. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology*, 66(1B): 301-308.
- PAIVA, E. A. S. & MACHADO, S. R. 2006a. Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae Caesalpinioideae) colleters. *Revista Biologia Tropical*, 54 (3): 943-950.
- PAIVA, E. A. S. & MACHADO, S. R. 2006b. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology*, 66(1B), 301-308.
- PAIVA, E. A. S.; MORAIS, H. C.; ISAIAS, R. M. S.; ROCHA. D. M. S.; OLIVEIRA, P. E. 2001. Occurrence and structure of extrafloral nectaries in *Pterodon*

- pubescens* Benth. and *Pterodon polygalaeflorus* Benth. (Fabaceae-Papilionoideae). Pesq. Agropec. Bras., 36: 219-224.
- PEARSE, A. G. E. 1980. Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical technology. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- PIESSCHAERT, F.; ANDERSSON, L.; JANSEN, S.; DESSEIN, S.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. 2000. Searching for the taxonomic position of the African genus *Collettoecema* (Rubiaceae): morphology and anatomy compared to an rps 16-intron analysis of the Rubioideae. Canadian Journal of Botany, 78(3): 288-304.
- QUINTEIRO, M. M. C.; TEIXEIRA, D. C.; MORAES, M. G.; SILVA, J. G. 2006. Anatomia foliar de *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. (Rubiaceae). Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. da Vida, 26(2): 30-41.
- RAMAYYA, N. & BAHADUR, B. 1968. Morphology of the "squamellae" in the light of their ontogeny. Current Science, 37: 520-522.
- RÃO, V. S.; GANGULI, A. 1963. Studies in the floral anatomy of the Apocynaceae. Journal of the Indian Botanical Society, 42: 419-435.
- REAPE, T. J.; MCCABE, P. F. 2008. Apoptotic-like programmed cell death in plants. New Phytologist., 180: 13–26
- REAPE, T. J.; MOLONY, E. M.; MCCABE; P. F. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. Journal of Experimental Botany, 3: 435–444.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque 8 stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. 2009. Biological Conservation, 142: 1141-1153.
- RIO, M. C. 2006. Estudos anatômicos em espécies de *Forsteronia* G.Mey (Apocynaceae) de cerrado. Tese (doutorado em Biologia Vegetal) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RIO, M. C.; CASTRO, M. M.; KINOSHITA, L. S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). Revista Brasileira de Botânica., 25(3): 339-349.
- ROBBRECHT, E. 1983. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae) 3. *Probletoctemon* revived as a section of subgenus *Tricalysia*. Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie, 53: 299-320.

- ROBBRECHT, E. 1987. The african genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae).4. A Revision of the species of section *Tricalysia* and section *Rosea*. Bulletin van Nationale Plantentuin van Belgie 57:39-208.
- ROBBRECHT, E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Opera Botany Belgium, 1: 1-271.
- ROBBRECHT, E. 2004. Generic distribution patterns in subsaharan African Rubiaceae (Angiospermae). Journal of Biogeography, 23, 311–328.
- ROBBRECHT, E. & MANEN, J. F. 2006. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16, trnL-trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. Systematics and Geography of Plants 76: 85-145.
- ROCHA, A. A. & FELDMANN, F. J. 2006. A Mata Atlântica é aqui. E daí? História e luta da Fundação SOS Mata Atlântica. São Paulo, Terra Virgem.
- ROCHA, J. F., NEVES, L. J.; PACE, L. B. 2002. Estruturas secretoras em folhas de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda. Revista Universidade Rural, Série Ciências de Vida, 22: 43-55.
- ROSE, L. T.; BONNEAU, L.; DER, C.; MARTY-MAZARS, D.; MARTY, F. 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. Biol. Cell, 98: 53-67.
- ROSHCHINA, V. V. & ROSCHINA, V. D. 1993. The excretory function of higher plants. Springer- Verlag, Berlin.
- ROVA, J. H. E., DELPRETE, P. G., ANDERSON, L., ALBERT, V. A., 2002. A trnL-F CPDNA sequence study of Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of Rubiaceae. American Journal of Botany 89: 145-159.
- SACHETTI, G.; ROMAGNOLI, C.; NICOLETTI, M.; DI FABIO, A.; BRUNI, A. E POLI, F. 1999. Glandular trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure. Annals of Botany. 83, 87-92.
- SANTOS, Â. A. & ZIKAN, C. E. 2000. Descrição Geral do Parque Nacional de Itatiaia. Cadernos FBDS, 3: 21.

- SCHUSSLER, E. E. & LONGSTRETH, D. J. 1996. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismaceae). *American Journal of Botany*, 83: 1266-1273.
- SIMÕES, A. O.; CASTRO, M. DE M.; KINOSHITA, L. S. 2006. Calycine colleter of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 387-398.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- SOUZA, V. C. & LORENZI, H. 2008. *Botânica sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa, 703 p.
- SOUZA, D. C. D. & SOUZA, M. C. D. 2008. Levantamento florístico das tribos *Psychotrieae*, *Coussareeae* e *Morindeae* (Rubiaceae) na região de Porto Rico, alto rio Paraná. *Acta Scientiarum*, 20: 207-212.
- STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; DA COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- STEYERMARK, J. 1972. Botany of the Guyana Highlands. *Memoris of the New York Botanical Garden*, 23: p. 227-832.
- STRASBURGER, E. 1953. *Tratado de botânica*. Ed. Manuel Marin e Cia. Barcelona.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. 2005. As clorofilas. *Ciência Rural*. Santa Maria, 35(3): 748-755.
- SVENDSEN, A. B.; VERPOORTE, R. 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- TAYLOR, C. M. 1989. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. *Systematic Botany Monography*, 26:1-102.
- TAYLOR, C. M. 1996. Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the Neotropics. *Opera Bot. Bélgica*, 261–270.
- TAYLOR C., M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. 2007. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. *Rodriguésia*, 58 (3): 549-616.
- TAYLOR, C. M., LORENCE, D. H. AND GEREAU, R. E. 2010. Rubiacearum Magna Hama. Pars XXV: The nocturnally flowering *Psychotria domingensis-Coussarea hondensis* group plus three other Mesoamerican *Psychotria* transfer to *Palicourea*. *Novon* 20(4): 481-492.

- TAYLOR, C. M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, J.; HAMMEL, B.; LORENCE, D. H.; PERSSON, C.; DELPRETE, P. G. & GEREAU, R. E. 2011. Rubiacearum Americanarum Magna Hama. Pars XXVIII: New taxa, new combinations, new names, and lectotypification for several species found in Mexico and Central America. *Novon*, 21(1): 135–148.
- THOMAS, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany.*, 68: 287 - 305.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989a. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean Journal of Botany*, 32: 163- 172.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989b. Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany*, 64: 201-203.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1989c. The colleters of *Alstonia scholaris* L. (Apocynaceae). *Indian Botanical Contactor*, 6: 25-29.
- THOMAS, V. & DAVE, Y. 1990a, Mode of secretion in the colleters of *Alstonia scholaris* (Apocynaceae). *Phyton*, 30(2): 209 -212.
- THOMAS, V.; DAVE, Y.; MENON, A. R. S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany* 8:493-496.
- TULLII, C. F.; MIGUEL, E. C.; LIMA, N. B.; FERNANDES, K. V. S.; GOMES, V. M.; DA CUNHA, M. 2013. Stipular colleters of *Alseis pickellii* Pilger et Shmale (Rubiaceae): structure, histochemistry and programmed cell death. *Botany*, aceito para publicação.
- UCKER, P. S. 1991. Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biol.*, 3: 103–109.
- UZELAC, B.; JANOSEVIĆ, D.; BUDIMIR, S. 2008. In situ detection of programmed cell death in *Nicotiana tabacum* leaves during senescence. *J. Microsc.*, 230: 1-3.
- VAN DOORN, W. G. 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of experimental botany*, 62: 4749–61.
- VAN DOORN, W. G.; BEERS, E. P.; DANGL, J. L.; FRANKLIN-TONG, V. E.; GALLOIS, P.; HARA-NISHIMURA, I.; JONES, A. M.; KAWAI-YAMADA, M.; LAM, E.; MUNDY, J.; MUR, L. A. J.; PETERSEN, M.; SMERTENKO, A.; TALIANSKY, M.; VAN BREUSEGEM, F.; WOLPERT, T.; WOLTERING, E.;

- ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKOVA, P. V. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18: 1241–6.
- VAN DOORN, W. G. & WOLTERING, E. J. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plant. *Trends Plant Sci.*, 10: 117-122.
- VENKAIAH, K. 1992. Development, ultrastructure and secretion of gum ducts in *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merrill (Anacardiaceae). *Ann. Bot.*, 69: 449-457.
- VEROTTA, L.; PETERLONGO, F.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. 1999. High-performance liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry analyses of the alkaloid extracts of Amazon *Psychotria* species. *Journal of Chromatography A*, 841(2): 165-176.
- VIANA, D. 2007. Gestão Participativa em Unidades de Conservação no estado do Rio de Janeiro. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal). Rio de Janeiro, RJ, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 18p.
- VIEIRA, F. A.; DA CUNHA, M.; KLEIN, D. E.; GOMES, V. M.. 2006. Purification and characterization of B-, 3-glucanase from colleters secretion of the *Simira glaziovii* (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 881-888.
- VIEIRA, R. C.; GOMES, D. M. S.; FERRAZ, C. L. 1992. Anatomia foliar de *Psychotria nuda* Wawra e *Psychotria leiocarpa* Mart. (Rubiaceae). *Hoehnea*, 19: 185-195.
- VITARELLI, N. C. & SANTOS, M. 2009. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta bot. bras*, 23(4): 923-928.
- YANG, C. & YE, Z. 2012. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-12.
- WARD, D. SPIEGEL, M. & SALTZ, D. 1997. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 333-346.
- WARMING, E. 1883. Tropische Fragmente II. *Rhizophora mangle* L. *Bot. Jb*, 4, 519.
- WERKER, E. & KISLEV, M. 1978. Mucilage on the root surface and root hairs of *Sorghum*: heterogeneity in structure, manner of productions and site of accumulation. *Annals of Botany*, 42: 809-816.

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