

ULTRAESTRUTURA DOS COLÉTERES ESTIPULARES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SECREÇÃO EM *Alseis pickelli* PILGER ET SHMALE (RUBIACEAE)

Tullii C. F.¹, Miguel E. C.², Da Cunha M.³

¹UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, kristullii@hotmail.com

²UENF/ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, emiliocmiguel@yahoo.com.br

³UENF/ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, maurauenf@gmail.com

Resumo - *Alseis pickelli* é uma espécie pertencente à família Rubiaceae e possui estípulas nos seus ápices caulinares. Na superfície adaxial dessas estruturas são notadas estruturas secretoras denominadas coléteres. Neste trabalho foram investigados a ultraestrutura e histoquímica dos coléteres de *A. pickelli*. Ápices caulinares foram coletados na Estação Ecológica de Guaxindiba e processados de acordo com técnicas usuais para microscopia. Para estudos histoquímicos, secções das amostras foram submetidas a diferentes reagentes. Os coléteres em questão foram separados em três fases de desenvolvimento, definidas por mudanças em sua ultraestrutura. A secreção é composta principalmente de mucilagem, substâncias lipofílicas e proteínas. O estágio inicial já apresenta características de células secretoras com citoplasma denso, núcleo conspícuo, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. No estágio intermediário, tais características continuam evidentes, com a presença marcante de retículo endoplasmático liso e rugoso e complexo de Golgi hipertróficos. No estágio tardio, as células exibem características de senescência com citoplasma retraído e organelas não individualizáveis.

Palavras-chave: Histoquímica, estípula, estrutura secretora.

Área do Conhecimento: Botânica

Introdução

Rubiaceae é considerada uma das mais importantes famílias que compõem os sub-bosques das florestas neotropicais (LASKA, 1997) estando entre as cinco famílias de maior riqueza de espécies da Floresta Atlântica (PEREIRA & ARAÚJO, 2000). Neste Bioma encontra-se um ecossistema denominado Mata de Tabuleiros. No Estado do Rio de Janeiro, esta formação vegetal encontra-se restrita a Estação Ecológica de Guaxindiba (Mata do Carvão) onde se localizam indivíduos de *A. pickelli*. Na superfície adaxial das estípulas desta espécie foram observadas estruturas secretoras denominadas coléteres que se destacam por produzir uma secreção que

protege os meristemas e os órgãos em desenvolvimento contra o dessecamento (THOMAS, 1991). A secreção dos coléteres pode ser constituída apenas por mucilagem ou por uma mistura de mucilagem e compostos lipofílicos (FAHN, 1979), contudo, ainda não foi elucidado o mecanismo de secreção. Além disso, tais estruturas merecem mais estudos, tanto pela relevância taxonômica e filogenética, quanto pela possível importância para o sucesso adaptativo das espécies em seu hábitat. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a ultraestrutura e a histoquímica dos coléteres de *A. pickelli*.

Metodologia

Ápices caulinares de *Alseis pickelli* foram coletados na Estação Ecológica da Guaxindiba no município de São Francisco do Itabapoana – RJ. Fragmentos de estípulas foram selecionados e fixados em solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2. Pós-fixados em tetróxido de Ósmio 1%, no mesmo tampão. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de acetona, infiltradas e incluídas em resina epoxi. Em ultramicrotomo (Leica Reichert Ultracuts), foram retirados cortes ultrafinos de 70 a 90nm de espessura, estes foram coletados em grades de cobre de 300 mesh e contrastados com acetato de uranila 5%, por 20 minutos, e citrato de chumbo, por 5 min em temperatura ambiente. A análise e documentação foram realizadas no microscópio TEM 900 ZEISS.

Para a realização dos testes histoquímicos amostras de estípulas, previamente fixadas foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em historesina (Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Posteriormente, foram obtidas secções transversais e longitudinais do material, com 3,0µm de espessura, através de microtomo de mesa CUT 4050 (SLEE Technik GmbH, Mainz, Alemanha). O material seccionado foi submetido a diferentes corantes/reagentes, a seguir descritos: azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964, adaptado) para caracterização estrutural através da metacromasia da reação; azul de Comassie para proteínas totais (O'BRIEN & MCCULLY, 1981, adaptado), PAS (Ácido Periódico/Reagente de Schiff) para polissacarídeos neutros; vermelho de Rutênio para compostos pécicos; e mucopolissacarídeos (CHAMBERLEIM, 1932, adaptado), Sudan IV para lipídios (PEARSE, 1980, adaptado); e Auramina O para cutina (HESLOP-HARRISON & KNOX,

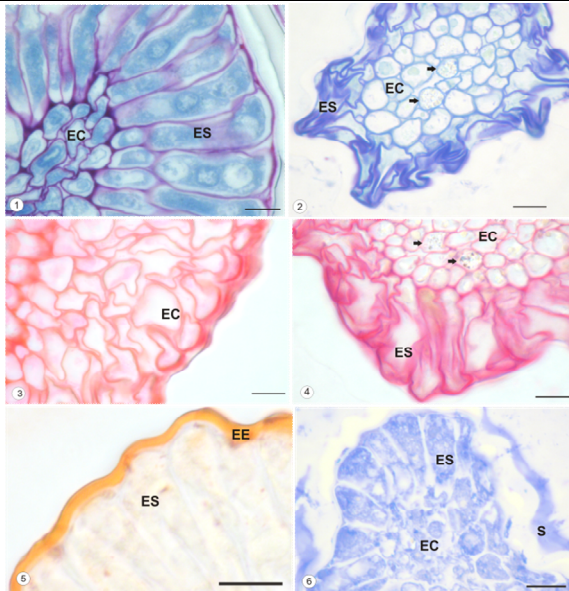
1981 adaptado). Lâminas semipermanentes foram montadas em água glicerinada e observadas no microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS). As imagens foram obtidas com a câmera Cannon Power Shot A640 acoplada ao microscópio.

Resultados

O ápice caulinar de *A. pickelli* exhibe sete nós. Os coléteres do primeiro e segundo nó foram definidos como em estágio inicial do desenvolvimento. O terceiro e quarto nós, como em estágio intermediário e o quinto, sexto e sétimo nó, como estágio tardio.

Em *A. pickelli*, os coléteres são cilíndricos, distribuídos em 2 triângulos na superfície adaxial das estípulas. Estas estruturas possuem epiderme secretora em paliçada e eixo central parenquimático, não vascularizado (fig.1). São notados cristais do tipo areia cristalífera nas células do eixo central (fig.2)

As histoquímicas revelaram o caráter mucilaginoso da secreção através da reação com PAS (fig.3) e vermelho de Rutênio (fig.4). A marcação com Sudan IV mostrou lipídios (fig.5). Testes com o azul de Comassie (fig.6) evidenciaram proteínas tanto nas células parenquimáticas e secretoras quanto na secreção. A Auramina O mostrou uma fina cutícula.



Figs. 1-6. Microscopia óptica. 1.Coléter em estágio inicial corado com azul de toluidina. 2.Coléter em estágio tardio, note cristais tipo areia cristalífera (seta). 3.Teste com PAS. 4.Vermelho de Rutênio. 5.Teste com Sudan IV. 6.Teste com azul de Comassie. Barras: 10 µm. EC-eixo central, ES-epiderme secretora, EE-espaço extraprotoplasmático, S-secreção.

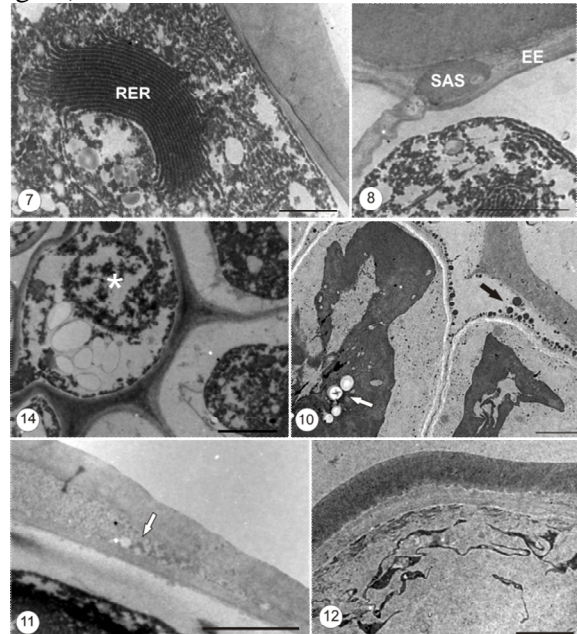
Coléteres em estágio inicial possuem células epidérmicas túrgidas, com citoplasma denso, núcleo conspícuo, retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi bem desenvolvidos (CG) (fig.7). No espaço extraprotoplasmático (EE) ocorrem sítios de acúmulo de secreção (SAS) (fig. 8). Posteriormente, células desta fase apresentam retração do citoplasma.

No estágio intermediário as células secretoras apresentam retículo endoplasmático liso (REL), RER e CG hipertróficos. No final deste estágio, algumas organelas, inclusive o núcleo, se apresentam com membranas desorganizadas (fig.9). A retração do citoplasma é marcante, nota-se acúmulo de glóbulos lipídicos no EE e de amiloplastos no citoplasma (fig.10).

A passagem de secreção pela parede periclinal externa foi observada (fig.11),

porém sem o rompimento da cutícula. Também não foi notada a presença de poros.

Nos coléteres do estágio tardio nota-se ausência de limites celulares, degradação do citoplasma e degeneração de organelas (fig.12).



Figs. 6-12. Microscopia eletrônica de transmissão. 7.Célula secretora (Cs) em estágio inicial. 8.Cs em estágio inicial com sítios de acúmulo de secreção. 9.Cs em estágio intermediário, note núcleo desorganizado (*). 10.Cs no final do estágio intermediário com acúmulo de glóbulos lipídicos (seta preta) e amiloplastos (seta branca). 11.Parede periclinal externa de um coléter, note presença de secreção (seta) 12. Cs em estágio tardio com organelas degradadas. Barras: µm. SAS-sítios de acúmulo de secreção. Barras: 8, 9, 10 e 12 – 2 µm; 7 e 11 - 1 µm.

Discussão

A. pickelli possui coléteres na superfície adaxial das estípulas que se apresentam num arranjo de dois triângulos como descrito em outras espécies de Rubiaceae (KLEIN et al., 2004; MIGUEL et al., 2006).

Estruturalmente, os coléteres possuem epiderme secretora em paliçada e eixo central parenquimático, sugerindo uma origem mista, a partir da protoderme e do meristema fundamental, o que permite concluir que, para esta espécie, os coléteres não devem ser considerados tricomas, como definido por SOLEREDER (1908), LERSTEN & HORNER (1968) e FAHN (1979), mas sim como emergências, terminologia discutida por RIO et al. (2002) e KLEIN et al., (2004).

Tais estruturas produzem uma secreção composta por mucilagem e lipídios como já observado em espécies de Apocynaceae (Demarco 2008), e em espécies de Rubiaceae, além destes compostos também foi observados proteínas (KLEIN et al. 2004; MIGUEL et al. 2006). O processo secretor inicia precocemente e continua durante toda expansão primórdios foliares. Este fato, segundo PAIVA (2009), confirma a hipótese de que os coléteres oferecem proteção para as folhas jovens.

A presença de proteínas foi detectada tanto nas células parenquimáticas e secretoras quanto na secreção, tal observação também foi feita em *A. sessilis* (BARREIRO, 2007). A identificação de proteínas na secreção de outras espécies de Rubiaceae já foi realizada por KLEIN et al. 2004 e MIGUEL et al. 2006.

Quando em estágio inicial de desenvolvimento a presença de CG e RER bem desenvolvidos, nas células epidérmicas, indicam que os coléteres já se encontram em atividade secretora. Estudos como de DEXHEIMER & GUENIN (1981) mostram a importância dessas organelas na produção de mucilagem.

A retração do citoplasma no estágio intermediário é mais acentuada no ápice dos coléteres do que na base, tal diferença pode pressupor que as células do ápice entrem primeiramente em morte celular, já que a retração do citoplasma é um dos primeiros sinais desse processo. A presença de REL,

RER e CG hipertróficos sugere grande atividade de síntese. Abundância de REL e RER na fase secretora de coléteres foi também descrita por MOHAN & INAMDAR (1986) e por PAIVA & MACHADO (2006). A desorganização de organelas no final deste estágio é uma mais característica de morte celular. A diminuição no número de organelas, também foi observado em coléteres senescentes de *H. stigonocarpa* (PAIVA E MACHADO, 2006)

Nesta fase foi possível observar a passagem de secreção pela parede, porém sem presença de poros nem rompimento da cutícula, essa mesma observação foi feita por RIO et al. (2002), MIGUEL et al. 2006, PAIVA & MACHADO (2006), MARASCA (2008) e Paiva (2009). SAS foram notados no EE, como descrito para *Bathysa nicholsonii* (MIGUEL et al. 2006)

No estágio tardio de desenvolvimento do coléter é observada ausência de limites celulares, degradação do citoplasma e degeneração de organelas, características ultraestruturais que indicam o processo de morte celular, (MIGUEL et al. 2006).

Conclusão

Os coléteres em estudo podem ser divididos em três fases de desenvolvimento: estágio inicial, estágio intermediário e estágio tardio, caracterizados pelas células secretoras. Estas estruturas secretam uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas, características evidenciadas através dos testes histoquímicos. A secreção heterogênea dos coléteres de *A. pickelli* protege as regiões meristemáticas contra o dessecamento. O exsudato é acumulado num espaço extraprotoplástico antes de ser liberado para o exterior através da parede e da cutícula, sem rompê-las.

A senescência é facilmente constatada na estrutura, porém não definidas em nível das células secretoras que começam o processo de

morte celular programada ainda em atividade. No entanto, mais evidências do processo tornam-se pertinente.

Referências

- APPEZATO-DA-GLORIA, B. & ESTELITA, M. E.M.,. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 23(2): 113 – 120, 2000.
- BARREIRO, D.P. & MACHADO, S.R. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae - **Rev. bras. Bot.** vol.30 (3), 2007.
- CHAMBERLAIN C.J. Methods in plant histology. 5ª ed. Chicago, The University of Chicago Press, 416 p., 1932.
- DEMARCO, D. Glândulas de órgãos vegetativos aéreos e florais de espécies de Asclepiadeae (R.BR) Duby (Asclepiadoideae, Apocynaceae) de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Campinas, Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2008.
- DEXHEIMER, J.; GUENIN, F. Étude de la sécrétion de mucilage par le trichomes stipulaires de *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). **Cytologia**, 46: 731 – 747, 1981..
- FAHN, A. Secretory tissues in Plants. Academic Press, London. 1979.
- HESLOP-HARRISON J, KNOX RB. Plant histochemistry: retrospect and prospect. In: Stoward PJ, Polak JM, eds. **Histochemistry: the widening horizons** . 1-10, 1981.
- KLEIN, D.E.; GOMES, V.M.; SILVA-NETO, S.J. & CUNHA, M. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). **Annals of Botany** 94: 733-740. 2004.
- LASKA, M.S. Structure of understory shrub assemblages in adjacent secondary and old growth tropical wet forests, **Costa Rica. Biotropica** 29: 29-37, 1997.
- LERSTEN, N.R. & HORNER, H.T.JR. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 55: 1089-1099, 1968.
- MARASCA, RM. Estruturas secretoras em *Rauvolfia sellowii* Müll.Arg. (Apocynaceae, Rauvolfioideae, Vinceae). Campinas, Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2008.
- MIGUEL, E.C., GOMES, V.M., DE OLIVEIRA, M.A., DA CUNHA, M. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, secretion protein composition and antifungal activity. **Plant Biology** 8: 715-722, 2006..
- MOHAN, J.S.S. & INAMDAR, J. R. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectarines of *Plumeria rubra* L. **Annals of Botany** 57: 389-401, 1996.
- O'BRIEN TP, MCCULLY ME. **The study of plant structure. Principles and Selected Methods**. Melbourne: Termarcaphi PTY Ltda. 1981.
- O'BRIEN, T. P., FEDER, N. & MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 368-373. 1964.
- PAIVA, E. A. S & MACHADO, S. R. Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) colleters. **Rev. Biol. Trop.** 54: 943-950, 2006.
- PAIVA, E. A. S. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). **C. R. Biologies** 332 1078–1084, 2009.
- PAIVA, E.A.S. & MACHADO, S.R. (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. **Brazilian Journal of Biology** 66: 301-308, 2006.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical**

technology. 4th ed. Churchill Livingston, Edinburgh. 1980.

PEREIRA, O.J. & ARAUJO, D.S.D. Análise florística das restingas dos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Pp. 25-63. In: F.A. Esteves & L.D. Lacerda (eds.). Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras. Macaé, NUPEM/UFRJ. 2000.

RIO, M.C.S.; CASTRO, M. M. & KINOSHITA, L. S. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 25: 339-349. 2002.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Clarendon Press, Oxford. 1908.

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

THOMAS, V. & DAVE, Y. Structure and necrosis of stipular colleters in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). **Belgian Journal of Botany** 123:67-72, 1990

WOODSON, RE Jr & MOORE, JA. The vascular anatomy and comparative morphology of Apocynaceae flowers. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** 65:135-165, 1938.