



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



LUCIMARA AMÉLIA DE SOUZA

**ESTRUTURAS SECRETORAS EM ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS DA SUBTRIBO CASSIINAE (FABACEAE,
CAESALPINIOIDEAE, CASSIEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Morfologia, Sistemática e
Diversidade Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

LUCIMARA AMÉLIA DE SOUZA

**ESTRUTURAS SECRETORAS EM ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS DA SUBTRIBO CASSIINAE (FABACEAE,
CAESALPINIOIDEAE, CASSIEAE)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração Morfologia, Sistemática e
Diversidade Vegetal**

**Orientador: Prof. Dr. Élder Antônio Sousa e Paiva
Universidade Federal de Minas Gerais**

BELO HORIZONTE – MG

2014

Dedico a todos que, apesar das
dificuldades, fazem pesquisa
no Brasil com amor
e dedicação.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Minas Gerais, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES/PNADB – Projeto 922/2010 e à FAPEMIG pela bolsa concedida durante o curso do Doutorado e aos auxílios para participação em congressos e eventos científicos, respectivamente.

Ao meu orientador Prof. Élder Paiva pela ótima orientação, atenção, paciência, amizade, por ser uma pessoa maravilhosa e exemplo de profissional a ser seguido.

Aos professores do departamento de Botânica pelos ensinamentos, em especial à Prof^a. Denise M.T. Oliveira que despertou em mim a vontade de cursar o Doutorado nesta instituição.

Ao CEMEL/ICB e suas técnicas, Olga e Ivete, pela colaboração no preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pelo preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu pela colaboração e parceria nos estudos ultraestruturais.

À Banca examinadora.

Ao Prof. Leandro Assis pelos sábios conselhos.

Ao Prof. Fernando Silveira pela ajuda com a análise de agrupamento.

Ao Prof. Luciano Paganucci por me receber e ajudar nas coletas em Feira de Santana.

À Ariane Barbosa e Cristiane Snak que me receberam em Feira de Santana.

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

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

À Lena Souza pelo apoio, carinho, amor, pelas palavras certas nos momentos difíceis.

À Ludmila Botelho pela companhia e ajuda com a tradução dos resumos.

Ao Vinícius Kuster pelos muitos momentos alegres que vivemos.

À Carolina Oliveira, companheira em muitos momentos dentro e fora do laboratório

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal e do Laboratório de Sistemática.

Aos amigos que fiz em Belo Horizonte, dentro e fora do ambiente acadêmico.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	12
Introdução geral.....	14
Objetivos gerais.....	16
Referências bibliográficas.....	17
Capítulo I – Nectários extraflorais em espécies de <i>Senna</i> (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae, Cassiinae): padrões morfológicos.....	20
Resumo.....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e métodos.....	23
Material vegetal.....	23
Microscopia de luz.....	23
Microscopia eletrônica de varredura.....	24
Microscopia eletrônica de transmissão.....	24
Ilustração do padrão de vascularização dos nectários.....	24
Resultados.....	25
Caracterização morfoanatômica.....	25
Padrão de vascularização dos NEFs elevados.....	26
Caracterização ultraestrutural do NEF da base do pecíolo de <i>Senna hirsuta</i>	26
Discussão.....	34
Caracterização morfoanatômica.....	34
Padrão de vascularização dos NEFs elevados.....	36
Caracterização ultraestrutural do NEF da base do pecíolo de <i>Senna hirsuta</i>	36
Referências bibliográficas.....	37
Capítulo II – Coléteres receptaculares em <i>Senna macranthera</i> (Fabaceae, Caesalpinioideae): análise estrutural e aspectos funcionais.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e métodos.....	44
Material vegetal.....	44

Microscopia de luz.....	44
Microscopia eletrônica de varredura.....	45
Microscopia eletrônica de transmissão.....	45
Resultados.....	45
Caracterização morfoanatômica.....	45
Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção.....	46
Discussão.....	51
Estrutura e função.....	51
Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção.....	52
Referências bibliográficas.....	53
Capítulo III – Organização estrutural e mecanismo de secreção de tricomas glandulares no pericarpo de <i>Senna occidentalis</i> (Fabaceae, Caesalpinioideae): coléteres pericarpiais.....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e métodos.....	60
Material vegetal.....	60
Microscopia de luz.....	60
Microscopia eletrônica de varredura.....	61
Microscopia eletrônica de transmissão.....	61
Resultados.....	61
Caracterização morfoanatômica.....	61
Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção.....	62
Discussão.....	65
Organização estrutural e função.....	65
Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção.....	66
Referências bibliográficas.....	68
Capítulo IV – Coléteres em embriões e plântulas de espécies de <i>Senna</i> (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae, Cassiinae): análise estrutural.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	72
Introdução.....	73

Material e métodos.....	74
Material vegetal.....	74
Microscopia de luz.....	74
Microscopia eletrônica de varredura.....	75
Resultados.....	75
Caracterização morfoanatômica.....	75
Discussão.....	79
Caracterização morfoanatômica.....	79
Aspectos taxonômicos.....	80
Referências bibliográficas.....	81
Capítulo V – Coléteres florais em Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae): relevância taxonômica.....	84
Resumo.....	84
Abstract.....	85
Introdução.....	86
Material e métodos.....	87
Material vegetal.....	87
Microscopia eletrônica de varredura.....	87
Resultados.....	88
Discussão.....	92
Subtribo Cassiinae.....	92
<i>Chamaecrista</i>	93
<i>Senna</i>	94
Referências bibliográficas.....	95
Anexo.....	97
Considerações finais.....	99

**Estruturas secretoras em espécies de leguminosas da Subtribo Cassiinae
(Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae)**

Resumo

Fabaceae (Leguminosae) é considerada uma das três maiores famílias de Angiospermae, contendo 730 gêneros e 19.500 espécies de distribuição cosmopolita, sendo no Brasil, encontrados cerca de 190 gêneros nativos e 2.100 espécies. Diversos grupos de leguminosas têm tido sua classificação alterada ao longo do tempo, caso da subtribo Cassiinae, que apresenta três gêneros resultantes da divisão de *Cassia lato sensu*: *Cassia stricto sensu*, *Chamaecrista* e *Senna*. Estruturas secretoras externas e internas são amplamente distribuídas em Caesalpinioideae, sendo citadas, nectários extraflorais, células mucilaginosas, canais e cavidades secretoras. A relevância das estruturas secretoras em Cassiinae fica patente quando se verifica que, em estudo filogenético, dois grandes clados são distintos em *Senna* com base na presença ou ausência de nectários extraflorais. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivos gerais averiguar a ocorrência de estruturas secretoras em frutos, sementes e plântulas de *Senna* e e em flores de indivíduos adultos de *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna* (Fabaceae, Caesalpinioideae). Pretende-se, ainda, identificar o tipo de estrutura secretora e inferir acerca da atuação destas na adaptação da planta ao ambiente, bem como na proteção de frutos e sementes, provendo informações que possam ser úteis para as análises filogenéticas do grupo. Os coléteres receptaculares de *Senna macranthera* localizam-se na base do receptáculo floral e apresentam desenvolvimento precoce, estando completamente desenvolvidos e em atividade secretora nos estágios finais do período de pré-antese. Os coléteres apresentam estrutura e dinâmica celular compatíveis com a síntese de polissacarídeos ácidos, como dictiossomos produzindo grande quantidade de vesículas, acúmulo de secreção de aspecto floculado no espaço periplasmático e subcuticular. Por ocasião da antese, a atividade secretora cessa e observa-se início de senescência dos coléteres. Os coléteres pericarpiais de *Senna occidentalis* correspondem a tricomas que se localizam na depressão correspondente à região mediana das valvas dos frutos; são funcionais durante o período compreendido entre a antese e o início da maturação dos frutos, quando se tornam senescentes. A secreção dos coléteres se acumula nos espaços periplasmático e subcuticular; do espaço subcuticular a secreção extravasa para o meio externo através de fissuras na cutícula. Os coléteres presentes nos embriões e plântulas de várias espécies de *Senna* localizam-se nas axilas dos cotilédones, lateralmente à plúmula, no ápice do eixo do embrião

e plântula. Os coléteres estão presentes no embrião antes da desidratação da semente, na plântula durante o processo de germinação e em plântulas de até sete dias, quando se tornam senescentes. A secreção tem natureza péctica e forma um filme cobrindo a região apical e as laterais do eixo do embrião e da plântula. Os coléteres florais foram observados em espécies de todos os gêneros de Cassiinae, destacando sua presença em *Chamaecrista*, nas seções *Apoucouita*, *Caliciopses*, *Chamaecrista* e *Xerocalyx* e em *Senna*, onde foram observados em todas as espécies analisadas, apresentando uma distribuição única na subtribo Cassiinae: dispersos pelo receptáculo floral. O estudo dos nectários extraflorais de espécies de *Senna* merece destaque pelo valor dos NEFs para a taxonomia, inferências filogenéticas e principalmente, pelo seu papel na dispersão e adaptação do gênero *Senna* aos diversos habitats. A presença de coléteres tem se mostrado de grande importância no gênero *Senna*, seja atuando na proteção contra dessecação de flores e frutos em fase de desenvolvimento, ou na facilitação da germinação de sementes, e estabelecimento das plântulas de várias espécies do gênero. A presença desta estrutura secretora em vários órgãos e espécies de *Senna* deve ser explorada no futuro em análises filogenéticas, com a expansão dos estudos para o gênero *Cassia* e *Chamaecrista*, tal como foi realizado para os coléteres florais, de modo que estes dados possam colaborar para o entendimento das relações na subtribo Cassiinae.

Palavras-chave: Cassiinae; coléter; interação planta-ambiente; morfoanatomia; nectário extrafloral; secreção

**Secretory structures in legumes species of the subtribe Cassiinae
(Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae)**

Abstract

Fabaceae (Leguminosae) is considered one of the three major families of Angiospermae, containing 730 genera and 19,500 species of cosmopolitan distribution, being in Brazil, found about 190 genera and 2,100 native species. Several legumes groups have been amended over time, for instance subtribe Cassiinae, which features three genera resulting from dividing *Cassia lato sensu* rating: *Cassia stricto sensu*, *Senna* and *Chamaecrista*. External and internal secretory structures are widely distributed in Caesalpinioideae, being cited, extrafloral nectaries, mucilage cells, secretory cavities and ducts. The relevance of secretory structures in Cassiinae becomes evident when we see that in phylogenetic analysis: two clades are distinct in *Senna* based on the presence or absence of extrafloral nectaries. Thus, the present work has the general objective to investigate the occurrence of secretory structures in fruits, seeds and seedlings of *Senna* and and flowers of *Cassia*, *Chamaecrista* and *Senna* (Fabaceae, Caesalpinioideae). The aim is also to identify the type of secretory structure and infer the presence of these in adaptation of plants to the environment as well as the fruits and seeds protection, providing information that may be useful for the phylogenetic analysis of the group. The receptaculares colleters of *Senna macranthera* are located at the base of the floral receptacle and present early development and are fully developed and in secretory activity in the final stages of pre-anthesis. Colleters present structure and cellular dynamics compatible with the acidic polysaccharides synthesis of, dictyosomes as producing large amount of vesicles, flaked appearance secretion accumulation in the periplasmic and subcuticular space. At anthesis, the secretory activity ceases and there is early senescence colleters. The pericarpiais colleters of *Senna occidentalis* match trichomes that are located in the region corresponding to the median of the fruit valves depression; are functional during the period between anthesis and early fruit ripening, when they become senescent. Colleter secretion accumulates in the periplasmatic and subcuticular spaces; subcuticular space secretion overflows to the outside through fissures in the cuticle. Colleters are present in embryos and seedlings of various *Senna* species are located in the axils of the cotyledons, lateral to the plumule, in the apex of the embryo axis and seedling. Colleters are present in the embryo of the seed prior to dehydration, in the seedling during germination and seedling up to seven days, when they become senescent. The secretion has pectic nature and form a film covering

the region of the apex and sides of the embryo and seedling. Floral colleter were observed in all genera of Cassiinae, highlighting their presence in *Chamaecrista*, in sections *Apoucouita*, *Caliciopses*, *Chamaecrista* and *Xerocalyx*, and *Senna*, which were observed in all species, presenting a unique distribution in the subtribe Cassiinae: scattered throughout the floral receptacle. The extrafloral nectaries study of *Senna* species deserves emphasis to the EFN amount for taxonomy, phylogenetic inferences and especially for his role in the genus *Senna* dispersal and adaptation to diverse habitats. The presence of colletes has proved to great importance in the genus *Senna*, is acting in protection against flowers and fruits desiccation in development, or in facilitating seed germination and seedling establishment for several genus species. The presence of this structure in several secretory organs and species of *Senna* should be explored in future phylogenetic analyzes, with the studies expansion to *Cassia* and *Chamaecrista* genera, as was done for the floral colletes, so that these data can contribute to understanding of relationships in subtribe Cassiinae.

Keywords: Cassiinae; colleter; extrafloral nectary; morphoanatomy; plant-environment interaction; secretion

Introdução geral

Fabaceae (Leguminosae) é considerada uma das três maiores famílias de Angiospermae, contendo 730 gêneros e 19.500 espécies de distribuição cosmopolita, sendo no Brasil, encontrados cerca de 190 gêneros nativos e 2.100 espécies (Lewis *et al.*, 2005). Classicamente, a família é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae (Judd *et al.*, 2002). De acordo com Souza & Lorenzi (2005), os recentes estudos filogenéticos vêm apontando para o reconhecimento de três subfamílias monofiléticas, Cercidae (*ipsis litteris*), Mimosoideae e Faboideae, além de Caesalpinioideae, que é claramente parafilética. Como esta interpretação ainda não foi generalizadamente aceita, a família Fabaceae será referida neste trabalho subdividida nas três subfamílias clássicas, *sensu* Judd *et al.* (2002).

Fabaceae possui grande importância econômica, sendo numerosas espécies utilizadas como alimento, forragem, fonte de madeira e, ainda, como ornamentais. Algumas também são utilizadas para a extração de gomas, resinas, óleos, corantes ou como medicinais (ver Almeida *et al.*, 1998; Maroni *et al.*, 2006), o que chama a atenção para a ampla diversidade de estruturas secretoras que devem estar presentes e, muitas vezes, são negligenciadas nas descrições estruturais por serem pouco conspícuas.

Predominantemente tropical, a subfamília Caesalpinioideae compreende 161 gêneros e cerca de 3.000 espécies (Lewis *et al.*, 2005); de acordo com Breteler (1995), subdivide-se em cinco tribos: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae, Detarieae e Macrolobieae, distribuídas principalmente na América do Sul, África Tropical e Sudoeste da Ásia, sendo pouco representada na América do Norte e em outras áreas da região temperada (Cowan, 1981). Apesar de discordâncias entre as relações dos grupos tradicionalmente incluídos em Caesalpinioideae, há consenso quando se trata de sua posição polifilética (Lavin *et al.*, 2005). Dentre os maiores gêneros de Caesalpinioideae destacam-se: *Bauhinia* L. (Cercidae), *Chamaecrista* Moench. e *Senna* Mill. (Cassieae), *Caesalpinia* (Caesalpinieae) (Cronquist, 1981).

A tribo Cassieae foi reestruturada na década de 1980 (Irwin & Barneby, 1982), quando se deu a proposição da subtribo Cassiinae, incluindo três gêneros resultantes da divisão de *Cassia lato sensu*: *Cassia stricto sensu*, *Senna* e *Chamaecrista*. O gênero *Cassia s.s.* apresenta aproximadamente 30 espécies de distribuição circuntropical (América, África, Madagascar, Ásia, Malásia e Austrália) (Lewis *et al.*, 2005). *Senna* compreende cerca de 350 espécies (Marazzi & Sanderson, 2010), também de distribuição circuntropical, em maior número nas

Américas, pouco frequente na Ásia e Oceania; algumas poucas espécies estendem-se por climas quentes e desérticos, por vezes ocorrendo em regiões temperadas do norte e sul das Américas (Irwin & Barneby, 1982). *Chamaecrista* possui aproximadamente 330 espécies, principalmente neotropicais, centradas especialmente no leste do Brasil (Lewis *et al.*, 2005).

Análises filogenéticas têm demonstrado que Cassiinae constitui um grupo bastante complexo, há hipóteses conflitantes quanto ao relacionamento dos três gêneros da subtribo. O estudos conduzidos por Bruneau *et al.* (2001, 2008) e Manzanilla & Bruneau (2012) sugeriram maior afinidade entre *Cassia* e *Senna*, considerando *Chamaecrista* como um clado distinto, corroborado pelos estudos conduzidos por Marazzi *et al.* (2006). Outros trabalhos apoiam *Senna* como grupo irmão de *Chamaecrista*, mas não relacionado à *Cassia* (Herendeen *et al.*, 2003).

Embora os estudos anatômicos desenvolvidos com espécies de Fabaceae sejam numerosos, relativamente à dimensão da família eles se tornam escassos. Podem ser citadas descrições clássicas, como as apresentadas por Solereder (1908) e por Metcalfe & Chalk (1950), que reuniram as características anatômicas de relevância taxonômica nas principais famílias das dicotiledôneas, fazendo referência a presença de alguns tipos de estruturas secretoras. Segundo Keeler (2009), estruturas secretoras, tais como nectários extraflorais, ocorrem em aproximadamente 6% das leguminosas. Deve-se enfatizar que em muitas espécies estas estruturas são funcionais apenas em folhas muito jovens, o que dificulta a identificação e resulta em falso-negativos. Não raro encontramos na literatura registros inéditos de ocorrência de determinada estrutura secretora para Fabaceae ou um de seus gêneros, como, por exemplo, o primeiro relato de nectários pericarpiais em Fabaceae (Paiva, 2009b), de coléteres em Caesalpinioideae (Paiva & Machado, 2006) e de idioblastos secretores em *Caesalpinia echinata* (Teixeira & Machado, 2007).

Estruturas secretoras em Caesalpinioideae são amplamente distribuídas, sendo citadas, dentre outras, células mucilaginosas, canais e cavidades secretoras (Solereder, 1908). Coléteres, descritos por Thomas (1991) como ausentes em Caesalpinioideae, foram descritos em *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado, 2006), *Chamaecrista* (De-Paula & Oliveira 2007; De-Paula & Oliveira, 2012; Coutinho *et al.*, 2013) e em *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009a), o que desperta para a subamostragem e o desconhecimento destas estruturas na família. Deve-se ressaltar o impacto que estas descobertas podem representar para a compreensão das relações bióticas e abióticas mediadas por estruturas secretoras em Fabaceae.

Fahn (1979) sugere que estruturas secretoras conferem às plantas que as possuem capacidade de sobrevivência no seu ambiente, podendo estar relacionadas com as condições edáficas e climáticas, promovendo interação com população circunvizinha, proteção contra patógenos e herbívoros. Solereder (1908) mencionou a utilidade das estruturas secretoras na taxonomia, incluindo a análise dos tipos estruturais (células secretoras, fusão de células, cavidades ou canais secretores), da composição química do exsudato e da posição que ocupam dentro do corpo do vegetal, que podem caracterizar desde ordens até tribos, gêneros ou, até mesmo, espécies. Isto é possível porque diferentes estruturas secretoras podem ser encontradas em diferentes partes de uma mesma planta ou então estar confinadas a um de seus órgãos (Fahn, 1979; Evert & Eichhorn, 2006).

Nectários extraflorais (NEFs) estão presentes em um grande número de espécies de *Senna*, e apresentam grande relevância taxonômica. Entretanto, a organização anatômica e ultraestrutural dos NEFs, bem como aspectos ecológicos, são pouco conhecidos (Fleet & Young, 2000). Nectários extraflorais são estruturas secretoras de néctar presentes em órgãos vegetativos (Caspary, 1848). O néctar secretado por esta estrutura representa uma fonte de recurso alimentar que atrai diversas espécies de formigas que, geralmente, exibem comportamento agressivo contra herbívoros (Schultz & McGlynn, 2000).

Embora os registros da ocorrência de coléteres em Caesalpinioideae sejam recentes, e restritos às espécies supracitadas, estima-se que a ocorrência destas estruturas possa ser bastante ampla nesta subfamília (Paiva EAS, dados não publicados). Coléteres são estruturas glandulares que produzem secreção mucilagínosa e/ou resinosa, podem estar presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, e desempenham a função de proteção contra dessecação durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Thomas, 1991).

Acompanhar a dinâmica da produção de estruturas secretoras, os vários estágios de sua atividade e a senescência pode ser muito relevante para favorecer a interpretação de fases fenológicas complexas, como a frutificação, e para entender o papel das estruturas secretoras no embrião e na plântula, correlacionando-as com o estabelecimento da plântula durante a fase imediatamente pós-seminal.

Objetivos gerais

Tendo em vista a relevância das estruturas secretoras para a compreensão de relações taxonômicas e filogenéticas, o presente trabalho tem por objetivos gerais realizar a prospecção de estruturas secretoras em flores, frutos, sementes e plântulas de espécies da subtribo

Cassiinae, descrever a morfoanatomia e organização ultraestrutural das estruturas secretoras predominantes nos *taxa* estudados, bem como elucidar a composição dos produtos de secreção e analisar as estruturas encontradas em relação ao ambiente, provendo informações que possam ser úteis para as análises filogenéticas do grupo.

Referências bibliográficas

- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. 1998.** *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Embrapa, Planaltina.
- Breteler FJ. 1995.** *The boundary between Amherstieae and Detarieae (Caesalpinioideae)*. In *Advances in Legume Systematics, part 7* (Crisp MD, Doyle JJ, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Bruneau A, Forest F, Herendeen PS, Klitgaard BB, Lewis GP. 2001.** Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* **26**: 487–514.
- Bruneau A, Mercuri M, Lewis GP, Herendeen PS. 2008.** Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Botany* **86**: 697-718.
- Casparry R. 1848.** *De Nectariis*. PhD Thesis. Bonn: Elverfeldae.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2013.** Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): new evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1709-1720.
- Cowan RS. 1981.** *Caesalpinioideae*. In *Advances in Legume Systematics, part 1* (Pohill RM, Raven PH, eds.). Royal Botanical Gardens, Kew.
- Cronquist A. 1981.** *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Coloumbia University Press, New York.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2007.** Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biociências* **5(1)**: 348–350.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2012.** Seed ontogeny of *Chamaecrista* and its systematic implications in Cassiinae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **298(9)**: 1659-1669.
- Evert RF, Eichhorn SE. 2006.** *Esau's plant anatomy; meristems, cells, and tissues of the plant body; their structure, function, and development*. A John Wiley & Sons, Inc.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc, London.

- Fleet RR, Young BL. 2000.** Facultative mutualism between imported fire ants (*Solenopsis invicta*) and a legume (*Senna occidentalis*). *The Southwestern Naturalist* **45**:289–298.
- Herendeen PS, Bruneau A, Lewis GP. 2003.** *Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data.* In *Advances in legume systematic*. Part 10 (Klitgaard BB, Bruneau, A, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** The American Cassiinae, a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002.** *Plant systematics, a phylogenetic approach.* Sinauer Associates, Sunderland.
- Keeler KH. 2009.** *World list of angiosperm species with extrafloral nectaries* <http://www.biosci.unl.edu/emertiti/keeler/extrafloral/worldlistfamilies.htm> acesso em 02/2009.
- Lavin M, Herendeen PS, Wojciechowki MF. 2005.** Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during tertiary. *Systematic Biology* **54**(4): 575-594.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. 2005.** *Legumes of the world.* Royal Botanic Gardens, Kew.
- Manzanilla V, Bruneau A. 2012.** Phylogeny reconstruction in the Caesalpinieae grade (Leguminosae) based on duplicated copies of the sucrose synthase gene and plastid markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**(1): 149-162.
- Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E. 2006a.** Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288–303.
- Marazzi B, Sanderson, MJ 2010.** Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectarines. *Evolution* **64**: 3570-3592.
- Maroni CM, Di Stasi LC, Machado SR. 2006.** *Plantas medicinais do cerrado de Botucatu.* Editora Unesp, São Paulo.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the Dicotyledons.* Clarendon Press, Oxford.
- Paiva EAS. 2009a.** Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Comptes Rendus Biologies* **332**: 1078–1084.
- Paiva EAS. 2009b.** Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* **104**: 937-944.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006.** Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) colleters. *Revista de Biologia Tropical* **54**(3): 943–950.

Schultz TR, McGlynn TP. 2000. *The interactions of ants with other organisms. In: Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity* (Agosti D, Majer JD, Alonso, LE, Schultz TR, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington.

Solereeder H. 1908. *Systematic Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.

Souza VC, Lorenzi H. 2005. *Botânica Sistemática*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

Teixeira SP, Machado SR. 2007. Glandular dots of *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae): distribution, structure and ultrastructure. *Journal of the Torrey Botanical Society* **134(1)**:136-144.

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

Capítulo I

Nectários extraflorais em espécies de *Senna* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae, Cassiinae): padrões morfológicos

Resumo

Senna é um gênero de plantas com grande número de espécies portadoras de nectários extraflorais (NEFs), apesar disto, a organização anatômica e ultraestrutural dos NEFs, bem como os aspectos ecológicos, são pouco conhecidos. O presente trabalho tem por objetivo analisar os nectários extraflorais em espécies de *Senna* do ponto de vista morfológico e estrutural, provendo subsídios para o entendimento de sua importância no gênero e para a filogenia do grupo. Para esta finalidade nectários extraflorais de folhas jovens, totalmente expandidas, de *S. hirsuta*, *S. martiana*, *S. macranthera*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis*, *S. pendula* e *S. pentagonia* foram coletados e processados para análises estruturais aos microscópios de luz e eletrônico de transmissão e varredura. Os nectários extraflorais das espécies analisadas podem ser classificados em dois grupos: elevados e inseridos nos tecidos do órgão que os portam. Os nectários elevados são conspícuos, abundantemente vascularizados e possuem camada limítrofe distinta. Os nectários inseridos nas estípulas de *S. martiana* são formados por células secretoras imersas no tecido da estípula, não são diretamente vascularizados, mas a vascularização das estípulas chega próximo ao tecido secretor, frequentemente se entremeando às células secretoras. A análise do padrão de vascularização dos NEFs dá suporte à teoria de que os nectários elevados são homólogos, com exceção dos nectários presentes na região terminal da raque, cujos dados obtidos indicam que eles não são homólogos aos demais. Os nectários da base do pecíolo de *S. hirsuta* apresentam características ultraestruturais concernentes com a literatura para nectários. O estudo morfológico dos nectários de espécies de *Senna* é de grande importância, não somente pelo valor dos NEFs para a taxonomia e inferências filogenéticas, mas principalmente pelo seu papel na dispersão e adaptação do gênero *Senna* aos diversos habitats.

Palavras-chave: homologia; nectários extraflorais; secreção; *Senna*

Abstract

Senna is a genera of plants with richer bearing species of extrafloral nectaries (EFNs), despite this, the anatomy and ultrastructural organization of EFNs, as well as the ecological aspects, are little known. This study aims to analyze the extrafloral nectaries in species of *Senna* morphologically and structurally, providing subsidies for knowledge of the genus significance and phylogeny. For this purpose extrafloral nectaries of young fully expanded leaves of *S. hirsuta*, *S. martiana*, *S. macranthera*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis*, *S. pendula* and *S. pentagonia* were collected and processed for histochemical studies and structural analyzes in optical microscope and transmission and scanning electron microscope. The extrafloral nectaries of the analyzed species could be classified in two groups: elevated and inserted in the organs tissues that carry them. The elevated nectaries are conspicuous, abundantly vascularized and have a distinct boundary layer. The nectaries present in stipules of *S. martiana* are formed by secretory cells scattered in the stipule tissues, are not directly vascularized, but the vascularization of the stipules arrives near to the secretory tissue, often interspersing in the secretory cells. The pattern of vascularization of EFN supports the theory that elevated nectaries are homologous, with the exception of nectaries present in the terminal region of the rachis, whose obtained data suggest that are not homologous to the other. The nectaries of *S. hirsuta* peciole base present concerning ultrastructural characteristics with literature for nectaries. The morphological study of nectaries of *Senna* species is of great importance not just because the value of EFNs for taxonomy and phylogenetic references, but mainly for that role in dispersion and adaptation of *Senna* genus to the diverse habitats.

Keywords: extrafloral nectaries; homology; secretion; *Senna*

Introdução

Senna Mill. é um dos maiores gêneros da subfamília Caesalpinioideae (Fabaceae) com cerca de 300-350 espécies (Marazzi & Sanderson, 2010). É caracterizado por folhas paripinadas com folíolos opostos; nectários extraflorais presentes ou ausentes, quando presentes sésseis ou estipitados, claviformes a elipsóides, com superfície secretora sempre convexa, localizados entre os pares de folíolos ou na base do pecíolo; e morfologia floral peculiar (Queiroz, 2009). *Senna* apresenta uma grande diversidade de hábitos, incluindo ervas, arbustos, arvoretas, árvores altas e cipós, distribuídos em diferentes habitats, climas e latitudes, especialmente nas Américas (Irwin & Barneby, 1982). Juntamente com *Cassia* s.s. e *Chamaecrista*, *Senna* compõe a subtribo Cassiinae.

Análises filogenéticas têm demonstrado que Cassiinae constitui um grupo bastante complexo, a divisão do gênero *Cassia* s.l. foi apoiada, entretanto há hipóteses divergentes quanto ao relacionamento dos três gêneros da subtribo. O estudos conduzidos por Bruneau *et al.* (2001, 2008) e Manzanilla & Bruneau (2012) apoiam *Cassia* como grupo irmão de *Senna* considerando *Chamaecrista* como um clado distinto. Outros trabalhos apoiam *Senna* como grupo irmão de *Chamaecrista* (Herendeen *et al.*, 2003).

Nectários extraflorais são estruturas secretoras de néctar presentes em órgãos vegetativos (Caspary, 1848). O néctar secretado por esta estrutura representa uma fonte de recurso alimentar que atrai diversas espécies de formigas que geralmente exibem comportamento agressivo contra herbívoros (Schultz & McGlynn, 2000). Em geral, o resultado dessa interação culmina em benefícios tanto para os visitantes quanto para a planta sendo considerado, portanto, um tipo de interação mutualística (Koptur, 1992; Heil & McKey, 2003).

Senna é um gênero de plantas com grande número de espécies portadoras de NEFs, estima-se que 89% das espécies que compõem este gênero apresentem estas estruturas (Marazzi & Sanderson, 2010). Apesar da presença de NEFs em um grande número de espécies de *Senna*, a organização anatômica e ultraestrutural dos NEFs, bem como aspectos ecológicos, são pouco conhecidos (Fleet & Young, 2000).

A variação da forma, número e localização dos NEFs em *Senna* tem sido utilizada em estudos taxonômicos (Irwin & Barneby, 1982; Marazzi *et al.*, 2006b), e sua distribuição dentro do gênero foi explorada recentemente num contexto filogenético molecular (Marazzi *et al.*, 2006a; Marazzi *et al.*, 2012).

Segundo Marazzi *et al.* (2006a) as linhagens de *Senna* que não possuem NEFs formam um clado mais basal e menos diversificado. Considerando as diferenças de tamanho dos clados, habitats ocupados, juntamente com o papel ecológico do mutualismo formiga-NEFs, Marazzi *et al.* (2006a) formularam a hipótese de que NEFs podem ter desempenhado um papel chave na evolução e na grande diversificação do gênero *Senna*.

Dentro desta perspectiva de grande importância dos nectários extraflorais para este gênero, o presente trabalho tem por objetivo analisar os NEFs em espécies de *Senna* do ponto de vista morfológico e estrutural, provendo subsídios para o entendimento de sua importância no gênero e para a filogenia.

Material e Métodos

Material vegetal

Exemplares de *S. alata*, *S. cernua*, *S. hirsuta*, *S. macranthera*, *S. martiana*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis* e *S. pendula* foram analisados sob estereomicroscópio. Observações da atividade secretora foram feitas em campo e sob estereomicroscópio. A identificação de açúcares (glicose) nos NEFs foi feita com auxílio de glicofita®.

Para estudos anatômicos e ultraestruturais as amostras foram obtidas de indivíduos cultivados no campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ramos férteis foram herborizados para deposição no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para fins de documentação e identificação.

Microscopia de luz

Para caracterização anatômica foram coletados NEFs de *S. hirsuta*, *S. macranthera*, *S. martiana*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis* e *S. pendula*, as amostras foram obtidas de folhas jovens totalmente expandidas. Os fragmentos contendo NEFs foram fixados em mistura de Karnovsky por 24 horas (Karnovsky, 1965), desidratados em série etílica, incluídos em resina sintética (2-hidroxi-etil)-metacrilato Leica®, conforme indicação do fabricante, seccionados (5µm) em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M40) nos planos transversal e longitudinal, corados com azul de toluidina 0,05%, pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964). As lâminas histológicas foram montadas com resina sintética Entellan®. A observação foi realizada em microscópio de luz com câmera acoplada (Leica ICC50 HD), obtendo-se imagens digitais (software Leica Application Suite LAS EZ).

Testes histoquímicos foram realizados para a detecção de lipídios totais, com Sudan Red (Brundrett *et al.*, 1991), em secções a mão livre do nectário fresco de *S. hirsuta*, *S. occidentalis*, *S. macranthera*, *S. pendula* e para a detecção de óleos essenciais e oleoresinas, com Reagente de Nadi (David & Carde, 1964) e lignina com floroglucinol ácido (Johansen, 1940) em secções do nectário de *S. hirsuta*.

Microscopia eletrônica de varredura

NEFs de *S. hirsuta*, *S. martiana*, *S. obtusifolia* e *S. occidentalis* foram fixados em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2), desidratados em série etílica e secos ao ponto crítico utilizando CO₂ (Robards, 1978). As amostras foram cobertas com ouro em metalizador e as imagens capturadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos de nectários extraflorais de *Senna hirsuta* foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2). Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão e desidratadas em série cetônica, para posterior inclusão em resina Spurr®, segundo protocolo modificado de Roland (1978). Secções semifinas foram obtidas em ultramicrótomo, montadas em lâminas para microscopia e coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964). Após seleção das áreas de interesse, mediante análise das secções semifinas, secções ultrafinas (60-90 nm) foram preparadas, as quais foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As secções escolhidas foram analisadas e obtidas imagens em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI a 80kV.

Ilustração do padrão de vascularização dos nectários

Diagramas ilustrando o padrão de vascularização dos nectários foram construídos a partir de lâminas com cortes sequenciais transversais dos NEFs na base do pecíolo de *S. occidentalis*, NEF entre o primeiro par de folíolos de *S. obtusifolia* e NEF terminal de *S. occidentalis*.

Resultados

Caracterização morfoanatômica

Com base em observação de campo, em indivíduos jovens das espécies *S. hirsuta* e *S. occidentalis*, nota-se que os primeiros eófilos apresentam nectários na raque, entre o primeiro par de folíolos, já as folhas que surgem posteriormente apresentam nectários na base do pecíolo, e não mais entre os folíolos. Estas variações ocorrem no mesmo indivíduo (Fig. 1).

Os NEFs das espécies de *Senna* que foram objeto de estudos anatômicos apresentam morfologia de globosa em *S. occidentalis* à falóide como em *S. hirsuta* (Fig. 2). Os NEFs estão localizados na base do pecíolo (*S. hirsuta* e *S. occidentalis*); na raque, entre o primeiro par de folíolos (*S. macranthera* e *S. obtusifolia*); na porção terminal da raque, na face abaxial das folhas (*S. cernua*, *S. occidentalis* e *S. hirsuta*) e, ainda, no lobo das estípulas (Fig. 2) (*S. martiana*, *S. alata*) apresentando coloração alaranjada.

Os NEFs da base do pecíolo, entre os pares de folíolos (raque) e o da região terminal da raque apresentam estrutura similar (Fig. 3A-F), são formados por células oriundas da protoderme, meristema fundamental e procâmbio. As células do tecido secretor apresentam núcleos volumosos e citoplasma denso e, em *S. hirsuta*, foi observada uma grande quantidade de gotículas de natureza lipídica dispersas no citoplasma, identificadas por meio de teste histoquímico como terpenóides. Internamente ao tecido secretor distingue-se de uma a três camadas de células com características distintas daquelas observadas no tecido secretor (Figs. 3B, 3D-F), estas são mais justapostas, vacuoladas, apresentam a parede celular mais espessa e lignificada. O NEF terminal apresenta estas mesmas características, mas somente a face adaxial é secretora e a camada limítrofe não é morfologicamente distinta (Figs. 3G). Estes NEFs são densamente vascularizados por xilema e floema, a vascularização chega até a camada de células que constitui a camada limítrofe (Figs. 3D, 3F).

O NEF dos lobos das estípulas de *S. martiana* apresenta forma (Figs. 2E-F) e organização anatômica (Fig. 3H-I) diferentes dos demais NEFs foliares. Não são individualizados, estando inseridos nos tecidos da estípula, frequentemente em longas faixas; não são diretamente vascularizados, mas a vascularização das estípulas chega próximo do tecido secretor e as vezes se entremeia às células secretoras; além disto a camada limítrofe é indistinta ou ausente. A epiderme dos NEFs estipulares apresenta cutícula espessa e estômatos sempre abertos na superfície secretora (Fig. 2F), o que não ocorre nos demais NEFs estudados (Figs. 2A-D).

Padrão de vascularização dos NEFs elevados

Os NEFs da base do pecíolo e entre os pares de folíolo (raque), apresentam o mesmo padrão de vascularização (Figs. 4 e 5). O pecíolo e a raque apresentam projeções vascularizadas por feixes acessórios, estes feixes acessórios participam da vascularização dos folíolos. Entretanto, na região imediatamente anterior ao nectário (base do pecíolo e da raque) estas projeções não estão presentes, há um cilindro vascular único (Figs. 4A e 5B). Parte da vascularização da região adaxial da raque e pecíolo emite traços que vão vascularizar os nectários, dividem, vascularizando todo o nectário até a região da camada limítrofe (Figs. 4B-D, 5C-D). Após os nectários, região mais apical do pecíolo e raque, as projeções se formam, sendo vascularizadas por feixes acessórios que se individualizam (Fig. 4E).

No nectário terminal, os traços são emitidos por feixes da região abaxial da raque, e não adaxial como nos NEFs exemplificados anteriormente. Os feixes acessórios se fundem aos demais feixes (Figs. 6A-B), formando um cilindro vascular único; a raque nesta região não tem projeções. Parte dos feixes da região adaxial e lateral esquerda, juntamente com o feixe acessório esquerdo vascularizam o folíolo da esquerda, parte adaxial e lateral direita, com feixe acessório da direita vascularizam o folíolo direito; e feixes da região abaxial vascularizam o NEF terminal (Figs. 6C-E). Como NEF se encontra na porção apical da raque, a vascularização se extingue nele.

*Caracterização ultraestrutural do NEF da base do pecíolo de *Senna hirsuta**

As células epidérmicas do NEF da base do pecíolo de *S. hirsuta* não apresentam diferenças significativas em relação àquelas das camadas subjacentes (Figs. 7A e B), que de modo geral apresentam citoplasma denso, núcleo volumoso e grande população de organelas, dentre elas, plastídios, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e dictiossomos (Figs. 7C-E). Os cloroplastos apresentam grãos de amido volumosos e inclusões osmiofílicas (Figs. 7C e 7E), as mitocôndrias são numerosas e apresentam cristas bem desenvolvidas (Fig. 7D). O aparelho de Golgi é conspicuo (Fig. 7D), dividido em diversos dictiossomos dos quais brotam vesículas. O retículo endoplasmático (Fig. 7D) é composto por uma rede tubular que permeia o citoplasma, estando frequentemente associado aos plasmodesmos (Fig. 7E). Também é frequente a presença de gotas lipídicas dispersas no citoplasma (Figs. 7B e 7E).

Espaços intercelulares são bem desenvolvidos (Figs. 8A-B), principalmente nas camadas de células subepidérmicas. Vacúolos repletos de conteúdo amorfo, possivelmente secreção, foram observados (Fig. 8C). O acúmulo deste tipo de material também pode ser encontrado nos espaços subcuticulares (Fig. 8D), formando uma bolsa (Fig. 2A), de onde extravasa para o meio externo.



Figura 1. Variação da posição dos nectários extraflorais em um indivíduo juvenil de *Senna occidentalis* (seta).

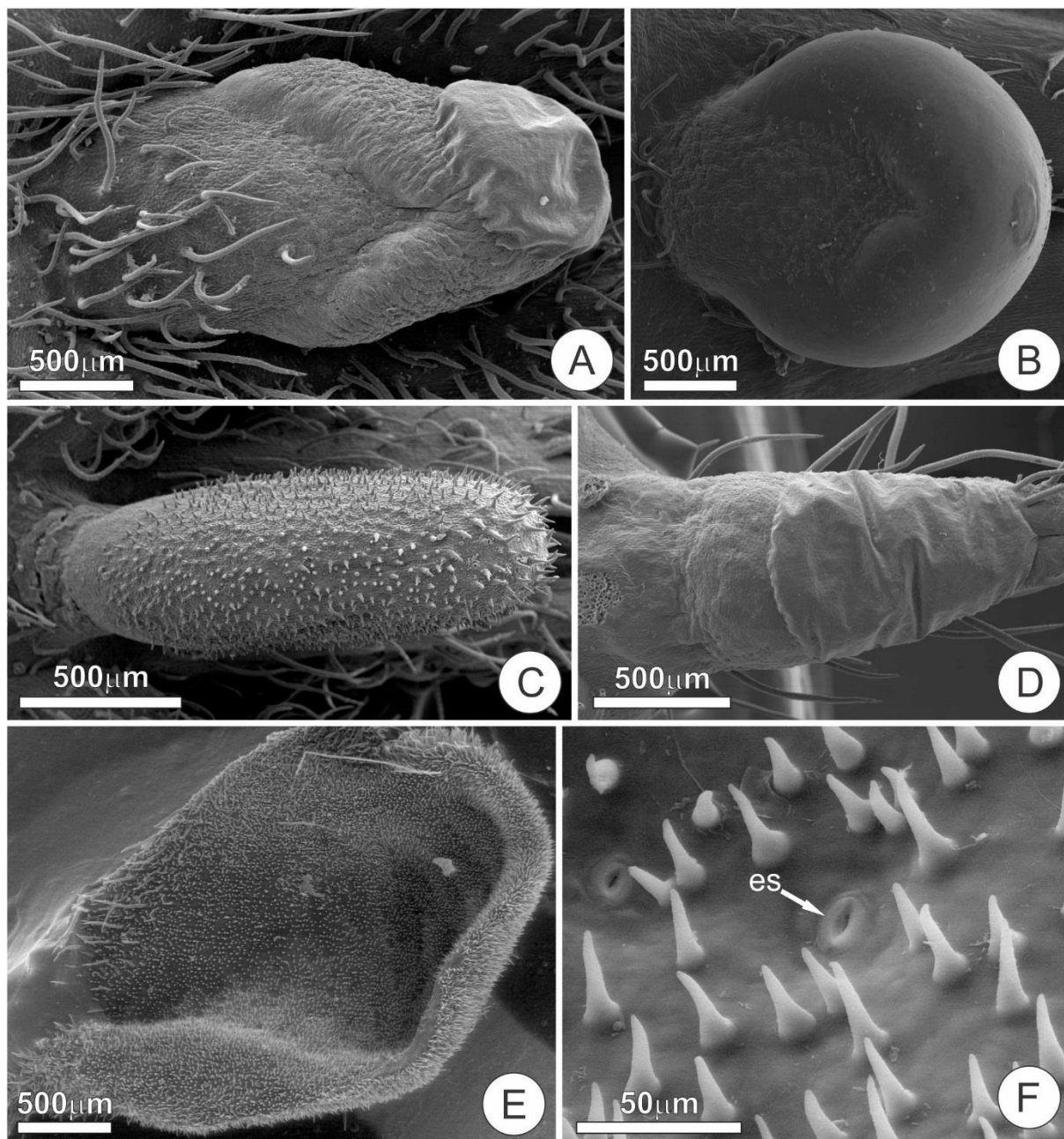


Figura 2. Nectários extraflorais em espécies de *Senna* **A.** Nectário extrafloral na base do pecíolo de *Senna hirsuta* com acúmulo de secreção no espaço subcuticular formando uma bolsa. **B.** Vista geral do nectário extrafloral da base do pecíolo de *Senna occidentalis*. **C.** Nectário extrafloral entre o primeiro par de folíolos (raque) de *Senna obtusifolia*. **D.** Nectário extrafloral na região apical da raque em *Senna hirsuta*. **E-F.** Nectário extrafloral no lobo da estípula de *Senna martiana*. **E.** Vista geral do nectário. **F.** Detalhe do estômato aberto do nectário extrafloral de *Senna martiana*. (es- estômato).

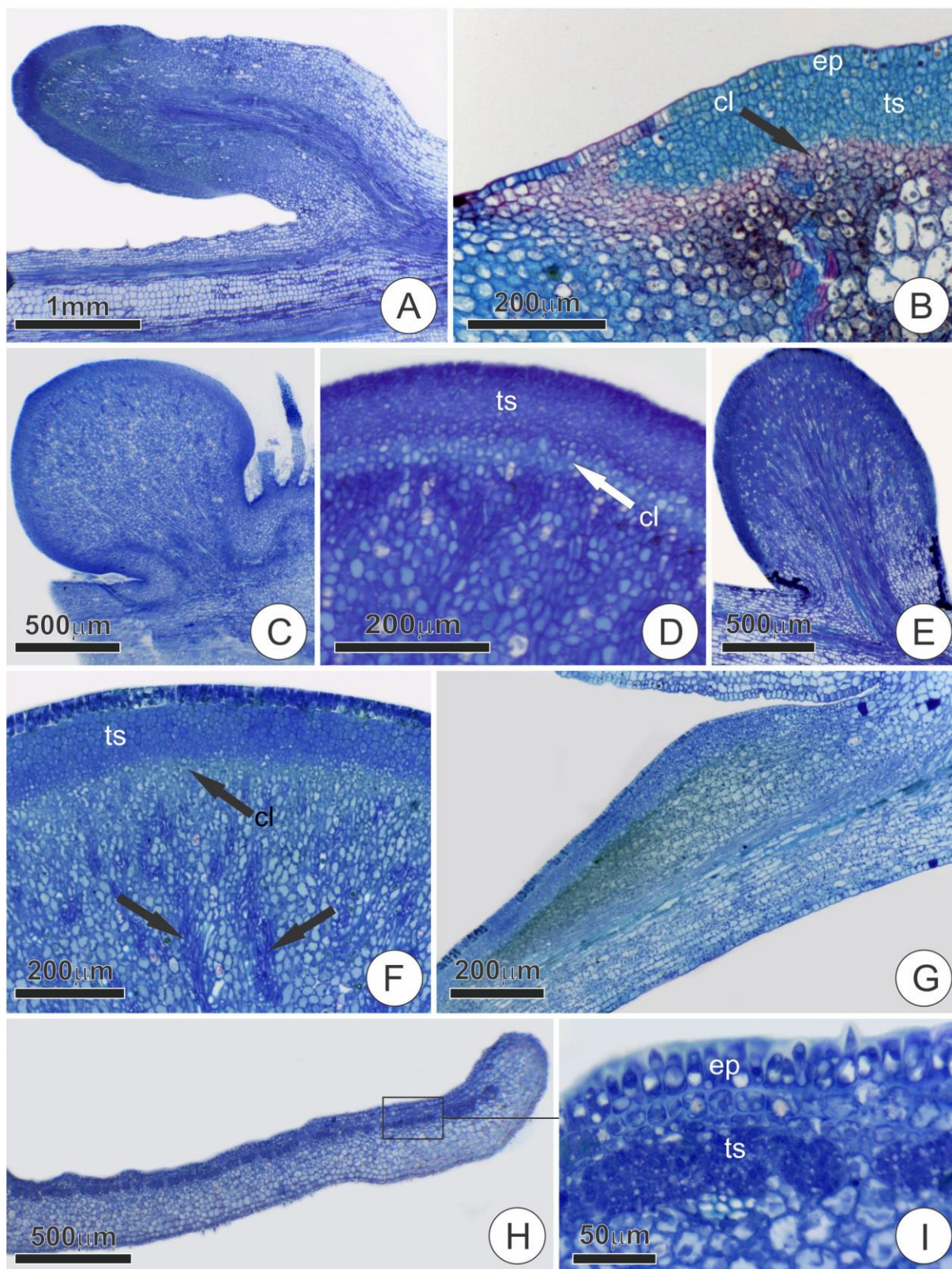


Figura 3. Variação morfológica dos nectários extraflorais de *Senna*. **A-B.** Nectário da base do pecíolo de *Senna hirsuta*. **C-D.** Nectário entre o primeiro par de folíolos em *Senna macranthera*. **E-F.** Nectário entre o primeiro par de folíolos em *Senna pendula*. **G.** Nectário extrafloral da região terminal da raque em *Senna occidentalis*. **H-I.** Nectário extrafloral do lobo da estípula de *Senna martiana*. **B.** Camada limítrofe corada de vermelho. **D e F.** Observar camada limítrofe e vascularização **I.** Detalhe da epiderme e tecidos subjacentes. (cl- camada limítrofe, ep- epiderme, ts- tecido secretor).

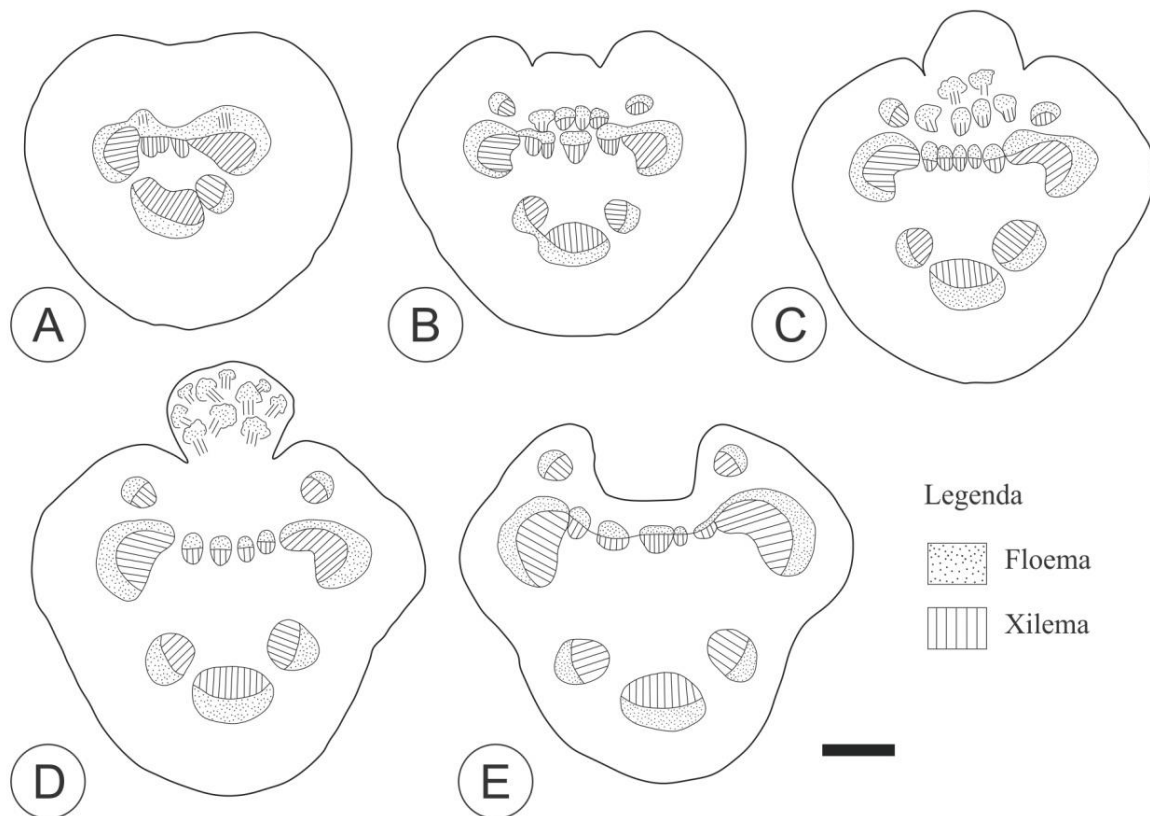


Figura 4. Diagrama da vascularização dos nectários extraflorais (NEF) na base do pecíolo de *Senna* (baseados em cortes transversais de *Senna occidentalis*). **A.** Base do pecíolo anterior ao NEF. **B-C.** Emissão de traços vasculares que irão vascularizar o NEF. **D.** NEF vascularizado e individualização dos feixes acessórios. **E.** Região do pecíolo posterior ao NEF com projeções vascularizadas pelos feixes acessórios. Barra 500 µm.

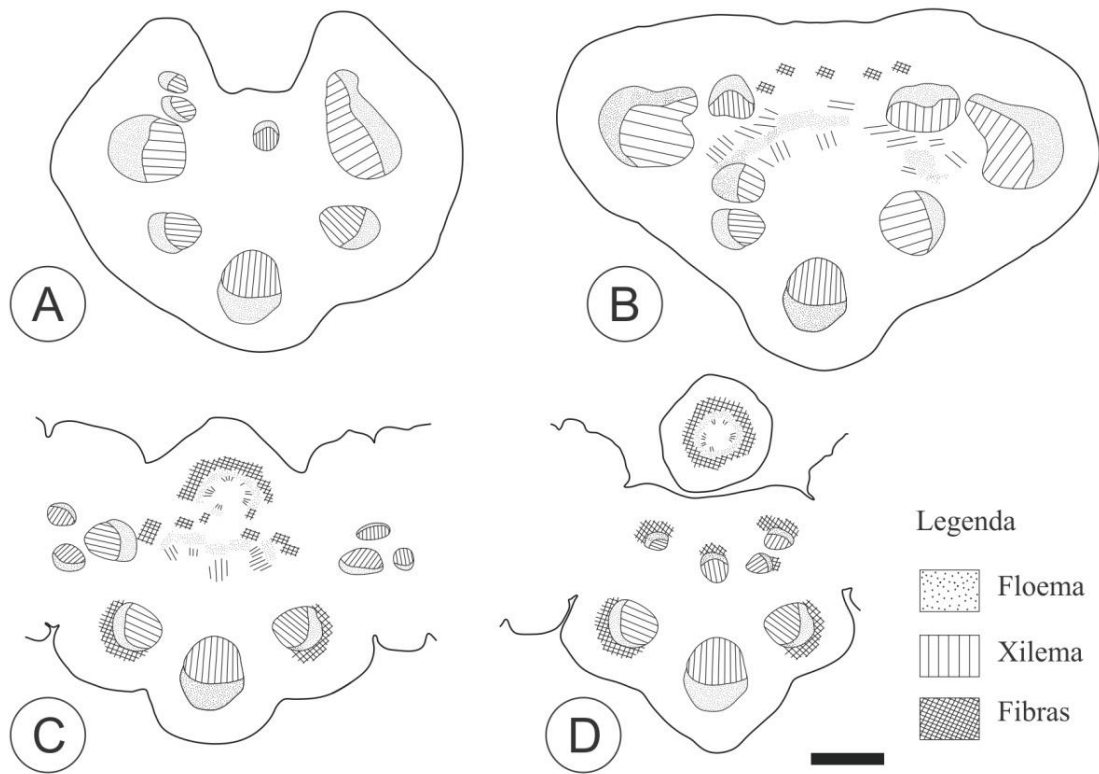


Figura 5. Diagrama da vascularização dos nectários extraflorais (NEF) entre pares de folíolo (raque) de *Senna* (baseados em cortes transversais de *Senna obtusifolia*). **A.** Raque anterior ao NEF. **B-C.** Emissão de traços vasculares que irão vascularizar o NEF. **D.** NEF vascularizado e reorganização do cilindro vascular. Barra 500 μm .

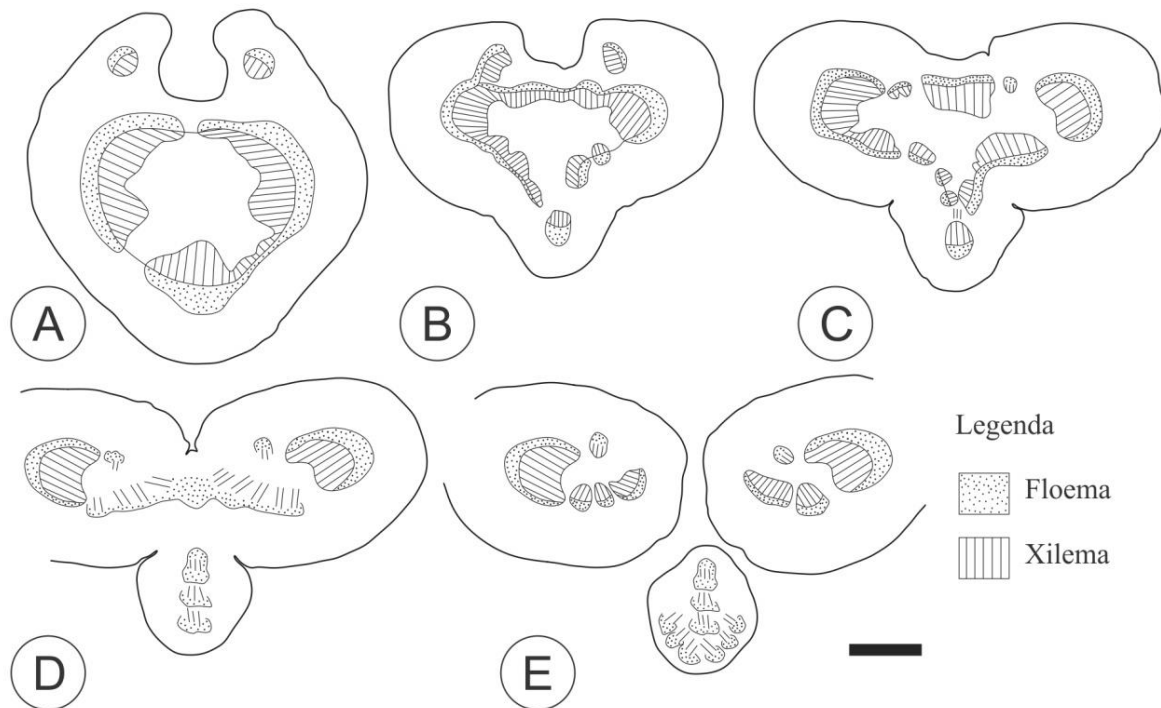


Figura 6. Diagrama da vascularização dos nectários extraflorais (NEF) apicais de *Senna* (baseados em cortes transversais de *Senna occidentalis*). **A.** Pecíolo anterior ao NEF com feixes acessórios e projeções individualizadas. **B-C.** Fusão dos feixes vasculares e emissão de traços que irão vascularizar o NEF e o último par de folíolos. **D.** Traços oriundos da região abaxial do cilindro vascularizando o NEF. **E.** NEF e folíolos vascularizados. Barra 500 µm.

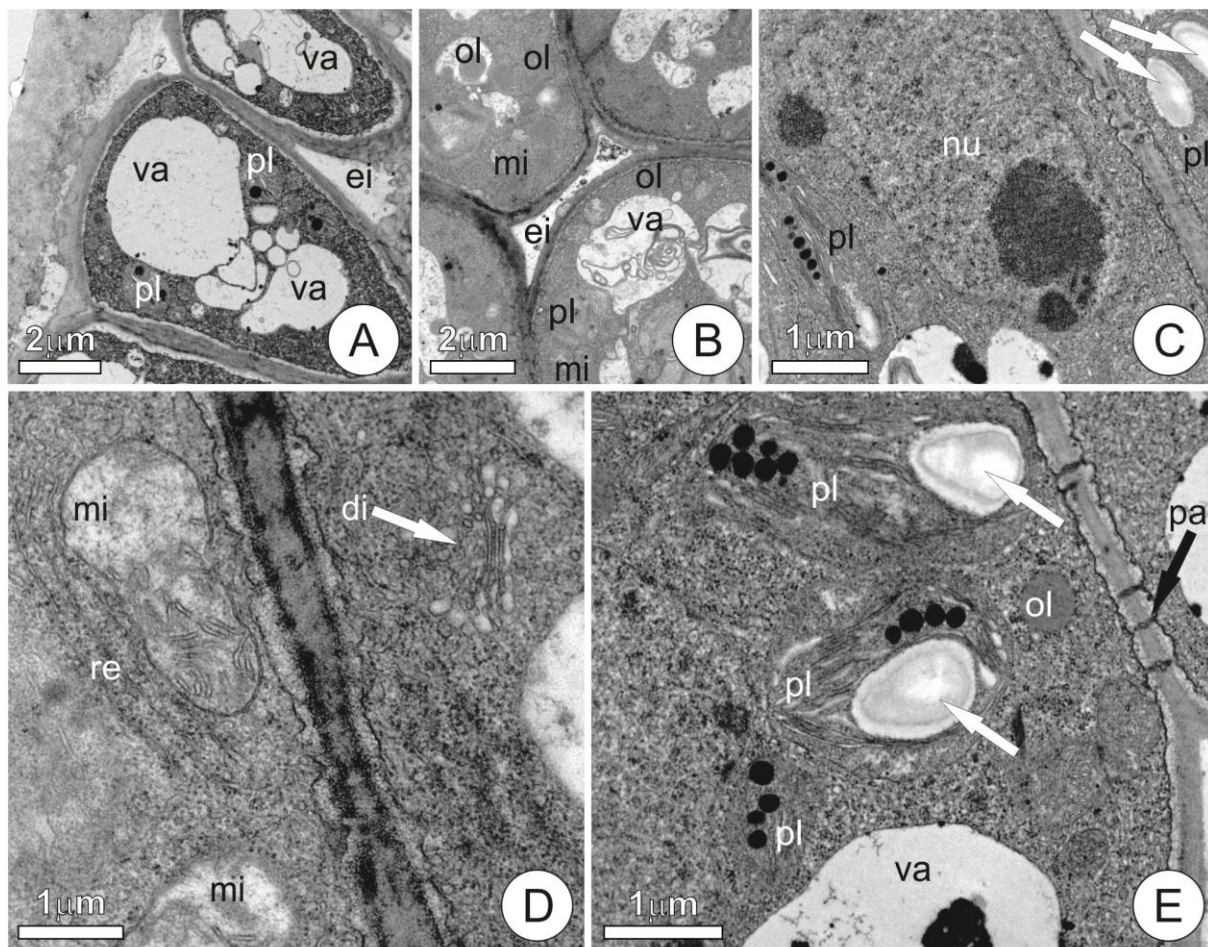


Figura 7. Ultraestrutura das células do nectário extrafloral da base do pecíolo de *Senna hirsuta*. **A.** Vista geral das células epidérmicas. **B-E.** Células do tecido secretor. **B.** Vista geral. **C.** Núcleo volumoso, citoplasma denso. **D.** Detalhe das mitocôndrias, retículo endoplasmático e dictiossomo. **E.** Plastídios com volumosos grãos de amido (seta branca) e plasmodesmos. (di- dictiossomo, ei- espaço intercelular, mi- mitocôndria, nu- núcleo, ol- óleo, pa- plasmodesmo, pl- plastídio , va- vacúolo).

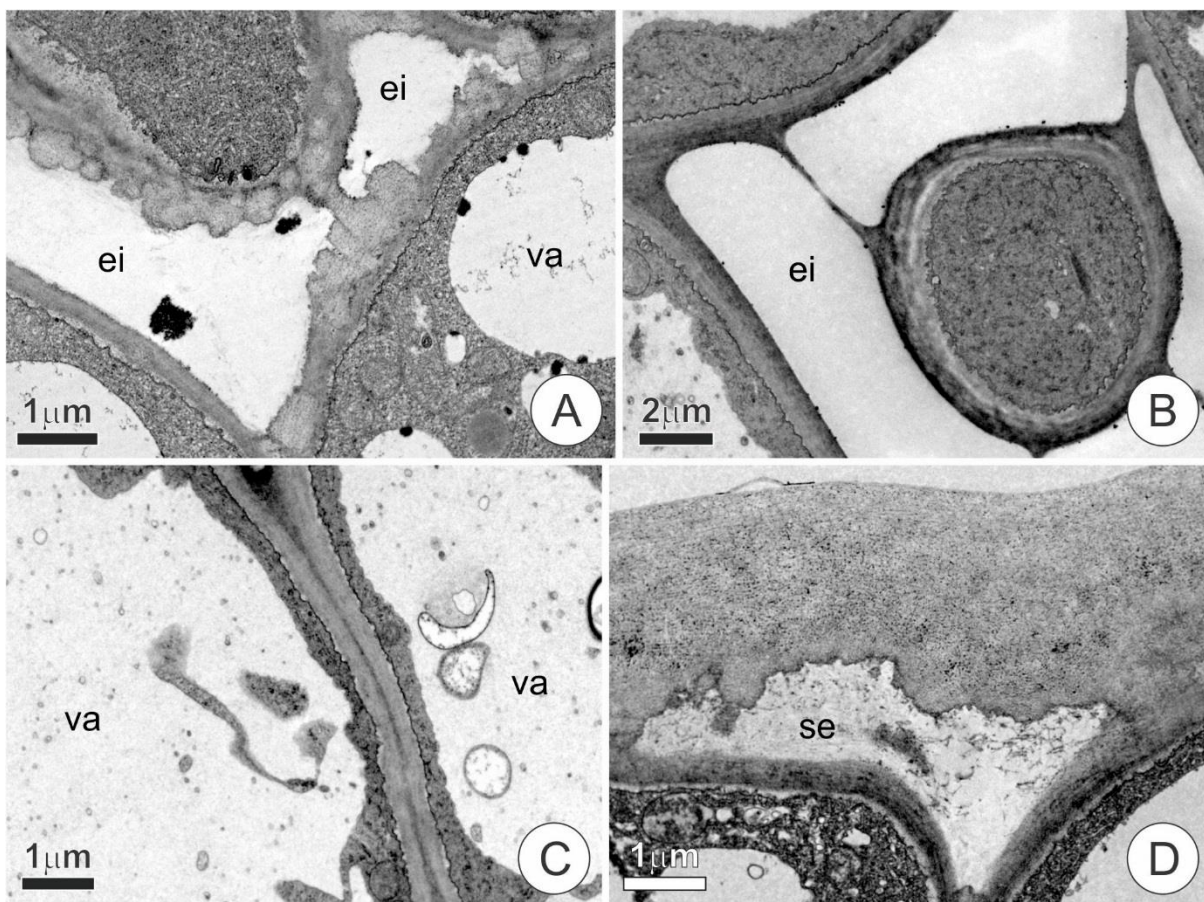


Figura 8. Ultraestrutura das células do nectário da base do pecíolo de *Senna hirsuta*. **A-B.** Formação de amplos espaços intercelulares. **C.** Secreção acumulada nos vacúolos. **D.** Acúmulo de secreção no espaço subcuticular de uma célula epidérmica. (ei- espaço intercelular, se- secreção, va- vacúolo).

Discussão

Caracterização morfoanatômica

Os NEFs em *Senna* são encontrados em diversas posições, podendo estar presentes nas folhas, ao longo do eixo da inflorescência, nas brácteas e sépalas. Embora já se tenham dados da presença dos NEFs em todas estas localizações, NEF terminal ainda não havia sido descrito, Irwin e Barneby (1982) o descreveram como um apêndice espessado e carnoso, mas não chegaram a constatar presença de secreção nem o caracterizaram como nectário.

O caráter plástico da localização dos nectários, evidenciado em *S. occidentalis*, que podem ocorrer entre o primeiro par de folíolos ou na base do pecíolo em indivíduos jovens, como observado em *S. occidentalis*, foi reportado por Marazzi *et al.* (2012) em *S. hirsuta*. Segundo estes autores, tal fato sugere que a mesma maquinaria genética é responsável pelo desenvolvimento dos nectários nas duas posições. No entanto, são necessários estudos acerca

da base genética do desenvolvimento dos nectários, até o momento somente é bem compreendido um gene necessário para o desenvolvimento de nectário floral (Baum *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). Ao que os dados indicam, esta mudança de posição dos NEFs, nas espécies que possuem nectário na base do pecíolo, durante o desenvolvimento da planta, pode ser mais comum do que se imagina.

Por meio da análise morfológica e anatômica podemos distinguir, nas espécies de *Senna* analisadas, dois tipos de nectários: elevados e inseridos nos tecidos do órgão que os portam. Os nectários elevados, embora ocupem posições diferentes na folha, apresentam o mesmo padrão anatômico e estão distribuídos ao longo do eixo foliar, seja no pecíolo ou na raque. Os nectários que observamos ocorrer no lobo da estípula são uma mistura de laminares com embebidos, pois o tecido secretor está inserido no tecido da estípula e, por vezes, disposto em faixas (lâminas); este tipo de nectário ocorre também em *S. alata*.

De acordo com a filogenia proposta por Marazzi *et al.* (2006a), existe um clado de *Senna* definido pela presença de nectários extraflorais, mas estes nectários são do tipo elevado, como os observados em *S. hirsuta*, *S. pendula*, *S. macranthera*, *S. occidentalis*. *S. obtusifolia*, analisadas neste estudo. No entanto, a presença de nectários extraflorais não se restringe a este clado, e foram recentemente encontrados também nectários nas espécies do clado II. Segundo Marazzi *et al.* (2012), nectários extraflorais dispersos nos tecidos de estípulas, brácteas, chamados por estes autores de nectários crípticos, ocorrem exclusivamente em espécies do clado II, e constitui uma sinapomorfia deste clado. Segundo a filogenia mais recente de *Senna* (Marazzi *et al.*, 2006a), estes dois tipos de nectários não são homólogos, tiveram origem independente. Esta informação é corroborada por este estudo anatômico dos nectários, que analisou o nectário estipular em *S. martiana* que compõe o clado II, juntamente com *S. alata*, que também possui NEF estipular. A denominação de nectários crípticos pode não ser a mais adequada, pois acreditamos que a maioria destes nectários não se situam em criptas. No entanto, são necessários mais estudos morfoanatômicos com as espécies que compõem o clado II, visando entender melhor estes nectários, sua morfologia e as relações de homologia.

As camadas de células subjacentes ao tecido secretor, observadas nos NEFs elevados, podem ser interpretadas como uma camada limítrofe, que impede o transporte apoplástico de substâncias, função análoga à da endoderme. Segundo Paiva & Machado (2006), o fato dos tecidos vasculares entrarem em contato com a camada limítrofe e se extinguirem nela, pode ser interpretado como indício da participação desta camada na transferência de materiais para o tecido secretor do NEF. A deposição de lignina nas paredes celulares das células da camada

limítrofe e a justaposição das mesmas, impedem o refluxo de néctar para os tecidos internos do nectário e direciona sua liberação para o meio externo. A presença de camada semelhante foi reportada para diversas estruturas secretoras externas (Lüttge 1971; Fahn 1988; McDade & Turner, 1997; Owen & Lennon, 1999; Fahn 2000; Paiva & Machado, 2006; Paiva *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2012).

Padrão de vascularização dos NEFs elevados

Os nectários extraflorais da base do pecíolo e entre os pares de folíolos, além de exibirem características morfológicas comuns, também mostram o mesmo padrão de vascularização. Do ponto de vista anatômico não há diferença entre eles, e segundo Marazzi *et al.* (2006a), os NEFs elevados são homólogos e tiveram origem única no gênero. A presença de nectários entre o primeiro par de folíolos em indivíduos jovens, enquanto no adulto ocorrem somente na base do pecíolo, também fornece fortes indícios da homologia entre estes nectários. Entretanto, os nectários foliares apicais até o momento não haviam sido analisados, a filogenia do gênero não traz dados sobre eles, e a despeito de sua morfologia similar aos demais NEFs elevados, o padrão de vascularização não é exatamente o mesmo. Os feixes que emitem traços para a vascularização destes nectários tem posição topográfica distinta dos demais, são feixes da região abaxial da raque, uma vez que os nectários apicais situam-se na face abaxial da folha. Além disso, eles ocorrem juntamente com os nectários na base do pecíolo em *S. cernua*, *S. hirsuta* e *S. occidentalis*, ferindo o critério de conjunção proposto por Patterson (1982). Desta forma, os dados deste presente trabalho indicam que nem todos os nectários elevados são homólogos.

Caracterização ultraestrutural do NEF da base do pecíolo de Senna hirsuta

A presença de núcleo proeminente, citoplasma denso, retículo endoplasmático bem desenvolvido, dictiossomos ativos, mitocôndrias abundantes nas células secretoras do NEF da base do pecíolo de *S. hirsuta*, já foi relatada anteriormente como típico de nectários, e são um indicativo de alta atividade metabólica (Stpiczynska *et al.*, 2005; Paiva, 2009).

Cloroplastos com sistemas de membranas bem desenvolvidos no interior das células do tecido glandular constituem indício de que o metabolismo fotossintético, juntamente com o floema, fornece carboidratos para a secreção de néctar, como sugerido para alguns nectários florais (Pacini *et al.*, 2003; Nepi, 2007). O aporte de fotoassimilados tanto proveniente da fotossíntese das células do tecido glandular quanto do floema, é uma característica de

nectários que produzem um volume relativamente grande de secreção. Segundo Frey-Wissling (1955), os tecidos vasculares são importantes para a manutenção de altas taxas de secreção.

O retículo endoplasmático liso pode ser relacionado tanto ao metabolismo de lipídios, quanto ao transporte de precursores do néctar, esta relação com o transporte de precursores de néctar foi descrita para uma série de nectários de diferentes espécies de plantas (Fahn, 1988; Stpiczynska *et al.*, 2005; Paiva, 2009; Paiva, 2011). Esta função é corroborada pela associação do retículo liso com plasmodesmos, como forte indício de transporte simplástico dos precursores do néctar, como sugerido por Fahn (1979).

A presença das gotas de óleo dispersas no citoplasma das células secretoras, originadas do retículo endoplasmático liso, pode estar relacionada com a defesa contra patógenos (Siqui *et al.*, 2000), uma vez que os óleos, como os terpenóides, podem exibir propriedades antifúngicas e antibacterianas (Bhavanani & Ballow, 1992).

Os amplos espaços intercelulares observados no tecido secretor, e espaços menores entre as células epidérmicas, permitem a formação vias por onde se dá o fluxo do néctar. A ocorrência de espaços intercelulares entre as células epidérmicas não é comumente observada, mas já foi relatada em nectários por Paiva & Machado (2006), Paiva *et al.* (2007) e Paiva (2011). O néctar acumulado no espaço subcuticular extravasa para o meio externo através de rupturas na cutícula. A liberação de néctar por meio de rupturas cuticulares parece ser uma forma comum de liberação de néctar, e já foi relatada por Durkee (1982), Elias (1983), Paiva & Machado (2006).

A análise dos padrões morfológicos dos nectários de espécies de *Senna* é de grande relevância, não somente devido ao valor dos nectários extraflorais como marcadores taxonômicos e filogenéticos mas, sobretudo, em decorrência da sua importância para a dispersão e adaptação do gênero aos diversos habitats, para as quais segundo Marazzi & Sanderson (2010), a presença dos NEFs foi fundamental.

Referências bibliográficas

Bhavanani SM, Ballow CH. 1992. New agents for Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 528-534.

Baum SF, Eshed Y, Bowman JL. 2001. The Arabidopsis nectary is an ABC-independent floral structure. *Development* **128**: 4657–4667.

- Brundrett M, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111–116.
- Bruneau A, Forest F, Herendeen PS, Klitgaard BB, Lewis GP. 2001.** Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* **26**: 487–514.
- Bruneau A, Mercuri M, Lewis GP, Herendeen PS. 2008.** Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Botany* **86**: 697-718.
- Caspary R. 1848.** De Nectariis. PhD Thesis. Bonn: Elverfeldae.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Azevedo AA, Meira RMSA. 2012.** Anatomy of the extrafloral nectaries in species of *Chamaecrista* section *Absus* subsection *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Flora* **207**: 427-435.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L' Academie des Sciencis Série D* **258**: 1338-1340.
- Durkee LT. 1982.** The floral and extrafloral nectaries of *Passiflora*. II - The extrafloral nectary. *American Journal of Botany* **69**(9): 1420-1428.
- Elias, T.S. 1983.** *Extrafloral nectaries: their structure and distribution*. In: The biology of nectaries (Bentley B, Elias T, eds.). Columbia University Press, New York.
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229–257.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc., London.
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229-257.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75.
- Fleet RR, Young BL. 2000.** Facultative mutualism between imported fire ants (*Solenopsis invicta*) and a legume (*Senna occidentalis*). *The Southwestern Naturalist* **45**:289–298.
- Frey-Wissling A. 1955.** The phloem supply to the nectaries. *Acta botanica neerlandica* **4**: 358–369.
- Heil M, McKey D. 2003.** Protective ant-plant interactions as a model system in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**: 425-453.
- Herendeen PS, Bruneau A, Lewis GP. 2003.** *Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data*. In Advances in legume systematic. Part 10 (Klitgaard BB, Bruneau, A, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** The American Cassiinae, a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.

- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- Koptur S. 1992.** *Extrafloral nectar-mediated interactions between insects and plants*. In *Insect-Plant Interactions* (Bernays E, ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Lee JY, Baum SF, Oh SH, Jiang CZ, Chen JC, Bowman JL. 2005.** Recruitment of CRABS CLAW to promote nectary development within the eudicot clade. *Development* **132**: 5021–5032.
- Lüttge U. 1971.** Structure and function of plant glands. *Annual Review of Plant Physiology* **22**: 23-44.
- Manzanilla V, Bruneau A. 2012.** Phylogeny reconstruction in the Caesalpinieae grade (Leguminosae) based on duplicated copies of the sucrose synthase gene and plastid markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**(1): 149-162
- Marazzi B, Conti E, Sanderson MJ, McMahon MM, Bronstein JL. 2012.** Diversity and evolution of a trait mediating ant–plant interactions: insights from extrafloral nectaries in *Senna* (Leguminosae). *Annals of Botany*. Advance access published October 26, 2012, doi:10.1093/aob/mcs226.
- Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E. 2006a.** Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288–303.
- Marazzi B, Fortunato R, Endress PK, Spichiger R. 2006b.** *Senna* (Cassiinae, Leguminosae) in Paraguay: synopsis, conservation, ecologic role and ethnobotany. *Candollea* **61**:315-329.
- Marazzi B, Sanderson, MJ 2010.** Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectaries. *Evolution* **64**: 3570-3592.
- McDade LA, Turner MD. 1997.** Structure and development of bracteal nectary glands in *Aphelandra* (Acanthaceae). *American Journal of Botany* **84**(1): 1-15.
- Nepi M. 2007.** *Nectary structure and ultrastructure*. In: *Nectaries and Nectar* (Nicolson SW, Nepi M, Pacini E, eds.). Springer, Dordrecht.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- Owen Jr. TP, Lennon KA. 1999.** Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *American Journal of Botany* **86**(10): 1382-1390.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003.** Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 7–21.

- Paiva EAS. 2009.** Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* **104**: 937–944.
- Paiva EAS. 2011.** Petaline nectaries in *Swietenia macrophylla* (Meliaceae): Distribution and structural aspects. *Flora* **206**: 484–490.
- Paiva EAS, Buono RA, Delgado, MN. 2007.** Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Flora* **202**: 455–461.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006.** Ontogênese, anatomia e ultra-estrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Acta Botanica Brasilica* **20**: 471–482.
- Patterson C. 1982.** *Morphological characters and homology*. In Problems in phylogenetics reconstruction (Joysey KA, Friday AE, eds.). Academic Press, London.
- Queiroz LP. 2009.** *Leguminosas da Caatinga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Robards AW. 1978.** *An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells*. In Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells (Hall JL, ed.). Elsevier, New York.
- Roland AM. 1978.** *General preparations and staining of thin sections*. In Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells (Hall JL, ed.). Elsevier, New York.
- Schultz TR, McGlynn TP. 2000.** *The interactions of ants with other organisms*. In: Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity (Agosti D, Majer JD, Alonso, LE, Schultz TR, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington.
- Siqui AC, Sampaio ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos MFS. 2000.** Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* **16**: 38-43.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749–756.

Capítulo II

Coléteres receptaculares em *Senna macranthera* (Fabaceae, Caesalpinioideae): análise estrutural e aspectos funcionais

Resumo

Coléteres são estruturas glandulares presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, que produzem secreção mucilaginosa e/ou resinosa e atuam na proteção contra dessecação durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Os registros de ocorrência de coléteres em Caesalpinioideae são poucos e recentes, o que parece resultar da dificuldade no reconhecimento destas estruturas. O presente trabalho tem por objetivos descrever a organização estrutural e ultraestrutural dos coléteres em receptáculos florais de *Senna macranthera*. Com esta finalidade, flores em vários estágios de desenvolvimento foram coletadas e processadas para estudos histoquímicos e análises estruturais aos microscópios de luz e eletrônico de transmissão e de varredura. Os coléteres registrados pela primeira vez em *Senna*, foram encontrados dispersos pelo receptáculo floral e apresentam desenvolvimento precoce, estando completamente desenvolvidos e em atividade secretora nos estágios finais da pré-antese. Suas células são justapostas e isodiamétricas, com parede celular delgada, citoplasma denso, núcleo volumoso e nucléolo evidente; a secreção dos coléteres é hialina, de aspecto pegajoso devido a presença de polissacarídeos ácidos em sua composição. Em *S. macranthera* os coléteres apresentam estrutura e dinâmica celular compatíveis com a síntese de polissacarídeos ácidos, como dictiossomas produzindo grande quantidade de vesículas, acúmulo de secreção de aspecto floculado no espaço periplasmático e subcuticular. A secreção, que se acumula no espaço subcuticular, promove a expansão do mesmo e o rompimento da cutícula, com liberação da secreção para o meio externo. Por ocasião da antese, a atividade secretora cessa e observa-se início de senescência dos coléteres. Como as flores de *S. macranthera* apresentam o perianto aberto desde as fases iniciais do desenvolvimento, ficando mais expostas à dessecação, a presença de secreção mucilaginosa proveniente dos coléteres é importante para a proteger os botões contra a perda excessiva de água.

Palavras-chave: coléteres; interação planta-ambiente; secreção; *Senna*

Abstract

Colleters are glandular structures present in vegetative and reproductive organs, which produces mucilaginous and/or resinous secretions and acts on the protection against desiccation during the first stages of development. Registers of colleters occurrence in Caesalpinioideae are few and recent, which seems to resulting of difficulty in recognizing that structures. The present work aims to make an unpublished register of colleters occurrence in *Senna macranthera* flower receptacle, describe that structural and ultrastructural organization, understand some functional aspects. With this goal, flowers in several stages of development were collected and processed for histochemical studies and structural analysis in optical microscope and transmission and scanning electron microscope. The colleters are located in flower receptacle basis and show an early development, been completely developed and in secretory activity at the final stages of pre-anthesis. Their cells are juxtaposed and isodiametric, with thin cell wall, dense cytoplasm, voluminous nucleus and evident nucleolus; the colleters secretion is hyaline, with sticky aspect due to the presence of acid polysaccharides in the composition. The colleters in *S. macranthera* presents structure and dynamics of cell compatible with acid polysaccharides synthesis, as dictyosomes producing large amounts of vesicles, accumulation of secretion with flaked appearance on the periplasmic and subcuticular space. The secretion that accumulates in the subcuticular space promotes the expansion of itself and the disruption of cuticle, with secretion release. On the occasion of anthesis, the secretion activity ceases and it is observed the beginning of colleters senescence. Whereby *S. macranthera* exhibits an open perianth since the incial phases of development, been more exposed to desiccation, the presence of mucilaginous secretion from the colleters seems important against excessive water loss.

Keywords: colleters; plant-environment interaction; secretion; *Senna*

Introdução

Fabaceae (Leguminosae) é considerada uma das três maiores famílias de Angiospermae, contendo 730 gêneros e 19.500 espécies de distribuição cosmopolita (Lewis, 2005), sendo no Brasil, encontrados cerca de 190 gêneros nativos e 2.100 espécies. Classicamente, a família é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae (Judd *et al.*, 2002).

Predominantemente tropical, a subfamília Caesalpinioideae compreende 161 gêneros e cerca de 3.000 espécies (Lewis, 2005); distribuída principalmente na América do Sul, África Tropical e Sudoeste da Ásia, sendo pouco representada na América do Norte e em outras áreas da região temperada (Cowan, 1981). Dentre os maiores gêneros de Caesalpinioideae destacam-se: *Bauhinia* L., *Chamaecrista* Moench., *Senna* Mill. e *Caesalpinia*.

Senna macranthera é uma espécie polimórfica de distribuição na sulamericana. Ocorre desde a Venezuela e Andes peruanos e equatorianos, até o sul do Brasil. Ocorre em diferentes tipos de habitats, desde borda de florestas pluviais até campos abertos. Apresenta flores relativamente grandes, com cerca de 5-6 cm de diâmetro e androceu fortemente heteromórfico, com os filetes dos 3 estames abaxiais bem mais longos do que os dos 4 estames medianos (Queiroz, 2009).

Evidências experimentais sugerem que estruturas secretoras conferem às plantas que as possuem capacidade de sobrevivência no seu ambiente, podendo estar relacionadas com as condições edáficas e climáticas, promovendo interação com população circunvizinha, proteção contra patógenos e herbívoros (Fahn, 1979). As estruturas secretoras podem estar presentes em diferentes regiões das plantas e sua morfologia é variável. Estudos indicam que a divergência na evolução destas estruturas pode ter originado mecanismos distintos de síntese e externalização do exsudado (Dickinson, 2000) e estas variações podem ser identificadas pela anatomia e ultraestrutura das células secretoras.

Em Caesalpinioideae estruturas secretoras são amplamente distribuídas, sendo citadas, dentre outras, células mucilaginosas, canais e cavidades secretoras (Solender, 1908). Entretanto, os registros da ocorrência de coléteres são recentes, sendo restritos à *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado, 2006a), embriões (De-Paula & Oliveira, 2007; De-Paula & Oliveira, 2012) e folhas de *Chamaecrista* (Coutinho *et al.*, 2013), e *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009). Mas, estima-se que a ocorrência de coléteres possa ser bastante ampla nesta subfamília (Paiva EAS, dados não publicados).

Coléteres são estruturas glandulares que produzem secreção mucilaginosa e/ou resinosa, podem estar presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, e desempenham, sobretudo, a função de proteção contra a dessecação durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos órgãos que os portam. Estas estruturas diferenciam-se nos órgãos ainda em formação, geralmente nas proximidades do ápice caulinar, e apresentam grande diversidade de forma, além de serem estruturalmente simples (Thomas, 1991). O presente trabalho tem por objetivo fazer o registro inédito da ocorrência de coléteres em receptáculos florais de *Senna macranthera* (Fabaceae, Caesalpinioideae), descrever a organização estrutural e ultraestrutural dos coléteres e fornecer elementos que permitam compreender alguns aspectos funcionais.

Material e Métodos

Material vegetal

As flores de *Senna macranthera* apresentam perianto aberto desde as fases iniciais do desenvolvimento, o que dificulta caracterizar as fases pré-antese e antese; assim, as flores foram consideradas em antese por ocasião da liberação do pólen.

Para estudos anatômicos e ultraestruturais as amostras foram obtidas em espécimes de *Senna macranthera* cultivados no campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ramos férteis foram herborizados para deposição no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para fins de documentação e identificação.

Para estudos estruturais e ultraestruturais procedeu-se a coleta de flores e botões florais em vários estágios de desenvolvimento, dos quais a região do receptáculo foi amostrada. Amostras do receptáculo, compreendidas entre a porção distal do pedicelo e a base das peças florais, foram fixadas e processadas como descrito a seguir.

Microscopia de luz

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica, incluídas em resina sintética (2-hidroxi-etil)-metacrilato Leica®, conforme indicação do fabricante, seccionadas (5µm) em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M40) nos planos transversal e longitudinal e os cortes corados com azul de toluidina 0,05%, pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964). As lâminas histológicas foram montadas com resina sintética

Entellan®. A observação foi realizada em microscópio de luz com câmera acoplada (Leica ICC50 HD), obtendo-se imagens digitais (software Leica Application Suite LAS EZ).

Testes histoquímicos foram realizados em seções obtidas a mão livre do receptáculo floral de flores frescas de *S. macranthera* para a detecção de polissacarídeos ácidos, com solução aquosa de vermelho de rutênio (Johansen, 1940); lipídios totais, com Sudan Red (Brundrett *et al.*, 1991) e amido, com lugol (Jensen, 1962). As lâminas foram montadas em água, observadas em microscópio de luz, obtidas imagens digitais (software Leica Application Suite LAS EZ).

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram fixadas em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2), desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico utilizando-se CO₂ segundo protocolo padrão (Robards, 1978). Os fragmentos foram cobertos com ouro em metalizador e a captura de imagens foi obtida em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram fixadas na solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2). Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão e desidratadas em série cetônica, para posterior inclusão em resina Spurr®, segundo protocolo modificado de Roland (1978). Secções semifinas foram obtidas em ultramicrotomo, montadas em lâminas para microscopia e coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964). Após seleção das áreas de interesse, mediante análise das secções semifinas, secções ultrafinas (60-90nm) foram preparadas, as quais foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As secções escolhidas foram analisadas e imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI a 80kV.

Resultados

Caracterização morfoanatômica

Os coléteres se localizam dispersos no receptáculo floral, são conspícuos, alongados e cilíndricos (Figs. 1A-D). Apresentam desenvolvimento precoce, estando completamente desenvolvidos e em atividade secretora na pré-antese. Os coléteres não são vascularizados e não há separação entre epitélio secretor e eixo central (Figs. 2A-C). As células dos coléteres

são justapostas e isodiamétricas, e as da região apical e mediana apresentam parede celular delgada, citoplasma denso, núcleo volumoso, nucléolo evidente e poucos e pequenos vacúolos. As células da região basal são menos densas e mais vacuoladas (Figs. 2A-C).

A secreção dos coléteres é hialina, de consistência pegajosa e apresentou resultado positivo no teste com vermelho de rutênio (Figs. 3A, C), evidenciando presença de polissacarídeos ácidos, o que nos permite caracterizá-la como mucilagem; os testes para detecção de lipídios e amido apresentaram resultados negativos. A secreção se acumula no espaço subcuticular (Fig. 3B), gerando uma crescente pressão que distende a cutícula, levando o seu rompimento e extravasamento da secreção para o meio externo (Fig. 3C).

Quando as flores estão em antese, os coléteres não estão mais em atividade secretora, cessando a produção de mucilagem. Os coléteres tornam-se castanhos, sendo que este processo inicia-se no ápice de cada coléter e progride para a região basal. Desta alteração de cor há progressão para retração do citoplasma das células e morte dos coléteres, os quais se tornam quebradiços e se desprendem do receptáculo, estando ausentes durante a formação dos frutos.

Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção

As células das regiões apical e mediana do coléter de *S. macranthera* apresentam núcleo conspícuo e citoplasma denso, no qual observou-se mitocôndrias, retículo endoplasmático liso, dictiossomos, plastídios e vacúolos como organelas predominantes (Figs. 4A-B). As mitocôndrias são numerosas e apresentam cristas bem desenvolvidas (Fig. 5A), enquanto os plastídios apresentam estroma denso com inclusões osmiofílicas e sistema de endomembranas pouco desenvolvido (Fig. 4A).

Os dictiossomos produzem grande quantidade de vesículas, que se fundem entre si, formando pequenos vacúolos (Fig. 4B), alguns destes se fundem com a membrana plasmática (Fig. 5A). Observou-se que a fusão de pequenos vacúolos dá origem a vacúolos maiores, os quais apresentam material floculado (Figs. 4A-B; 5A-D), característico de secreções que contém substâncias pécticas. O acúmulo deste tipo de material também pode ser observado nos espaços periplasmático e subcuticular (Figs. 5A-D). Os vacúolos maiores também se fundem, formando um grande vacúolo repleto de secreção (Figs. 5C-D). A expansão deste vacúolo permite a fusão com a membrana plasmática, o que leva à liberação da secreção para o espaço periplasmático (Figs. 5A, C), onde ela se acumula. Com a deposição da secreção no espaço periplasmático e pressão gerada pela expansão do protoplasto, a secreção atravessa a

parede celular e se difunde para os espaços intercelulares ou para o meio externo, ficando temporariamente acumulada no espaço subcuticular (Fig. 5B).

As células da região apical, mediana e basal dos coléteres não exibem diferenças significativas, indicando que as células mais basais também exibem características de células secretoras, contrastando com as células da região cortical do receptáculo, que apresenta citoplasma periférico, vacúolos grandes e poucas organelas (Fig. 5E).

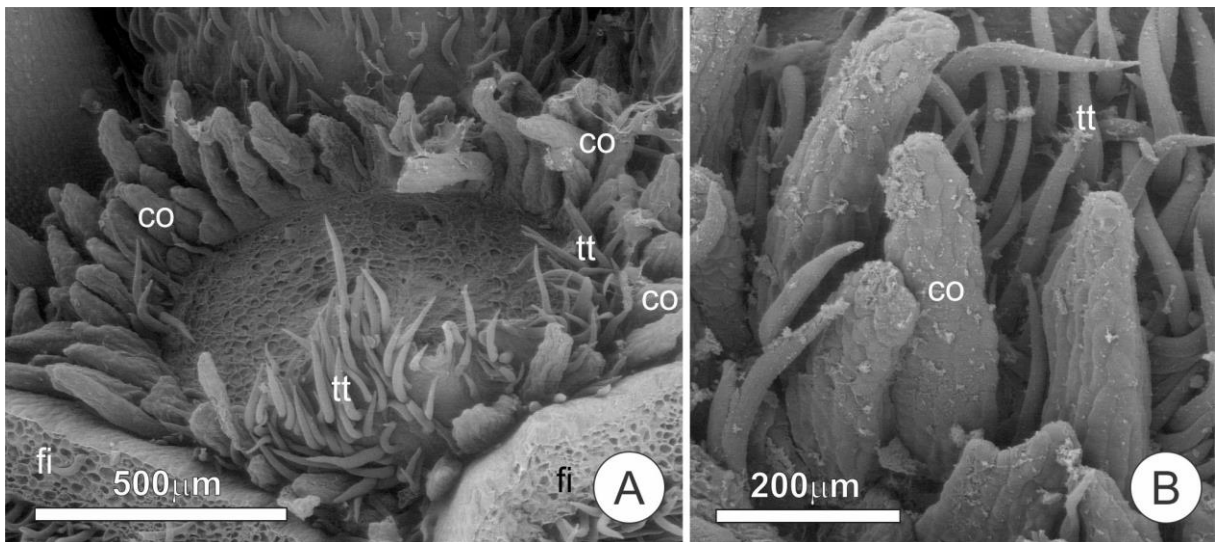


Figura 1. Distribuição dos coléteres receptaculares de *Senna macranthera*. **A.** Vista geral dos coléteres. **B.** Detalhe dos coléteres. **C e D.** Detalhe da parede periclinal externa das células do coléter. (co- coleter, tt- tricoma tector).

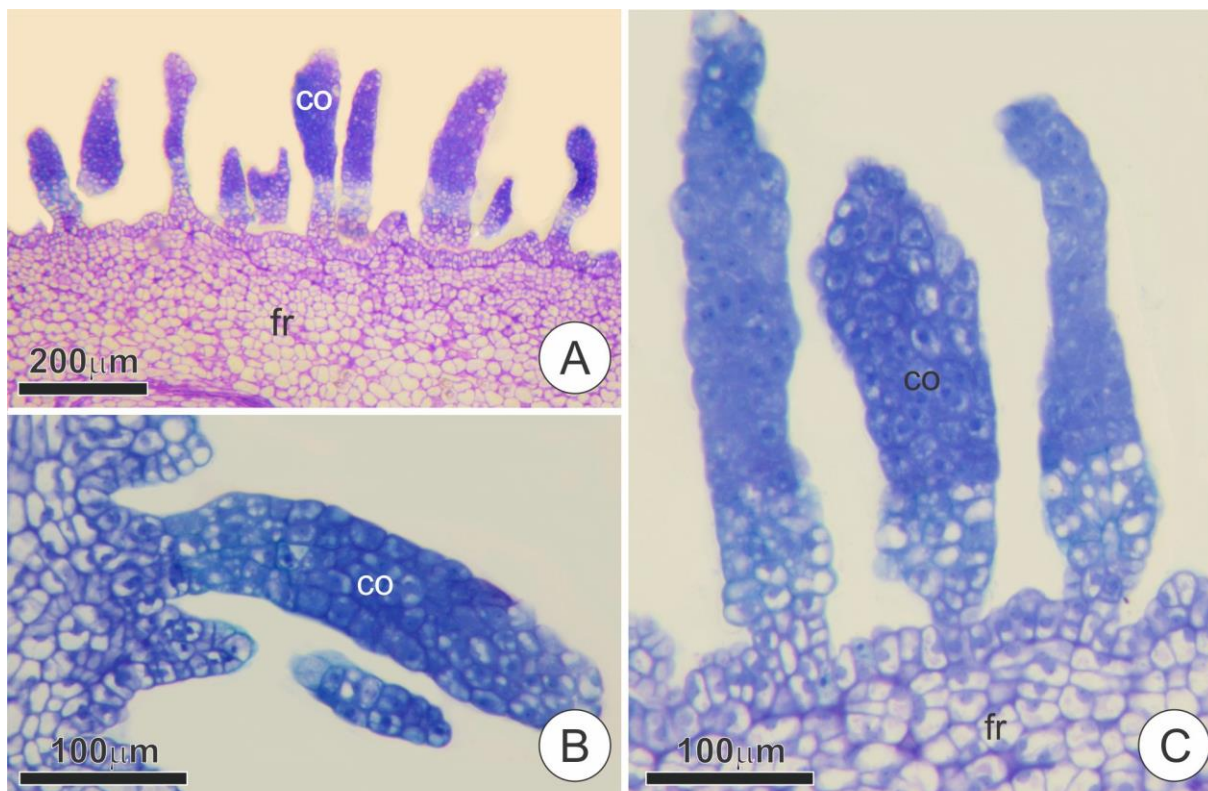


Figura 2. Caracterização anatômica dos coléteres de *Senna macranthera*. **A.** Vista geral dos coléteres no receptáculo floral. **B e C.** Coléteres longos, eretos, com células mais vacuoladas na região basal. (co- coléter, fr- receptáculo floral).

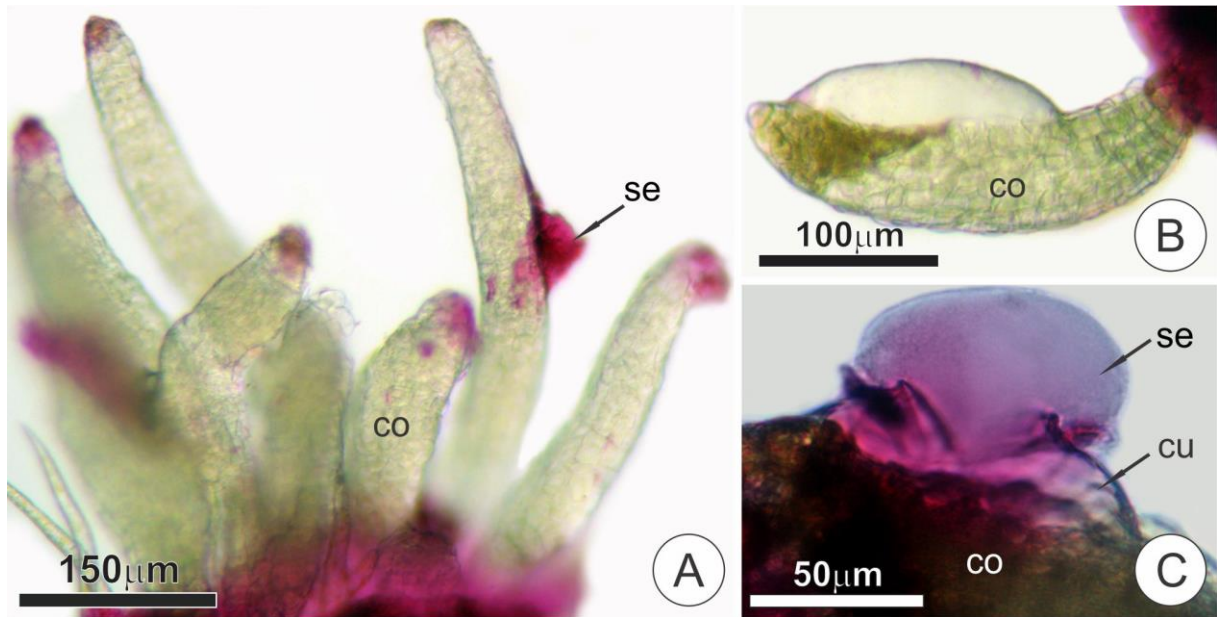


Figura 3. Teste histoquímico com vermelho de rutênio nos coléteres receptaculares de *Senna macranthera* (coloração rosa). **A.** Vista geral dos coléteres e presença de secreção corada. **B.** Secreção acumulada no espaço subcuticular causando distensão da cutícula. **C.** Extravasamento da secreção para o meio externo. (co- coléter, cu- cutícula, se- secreção).

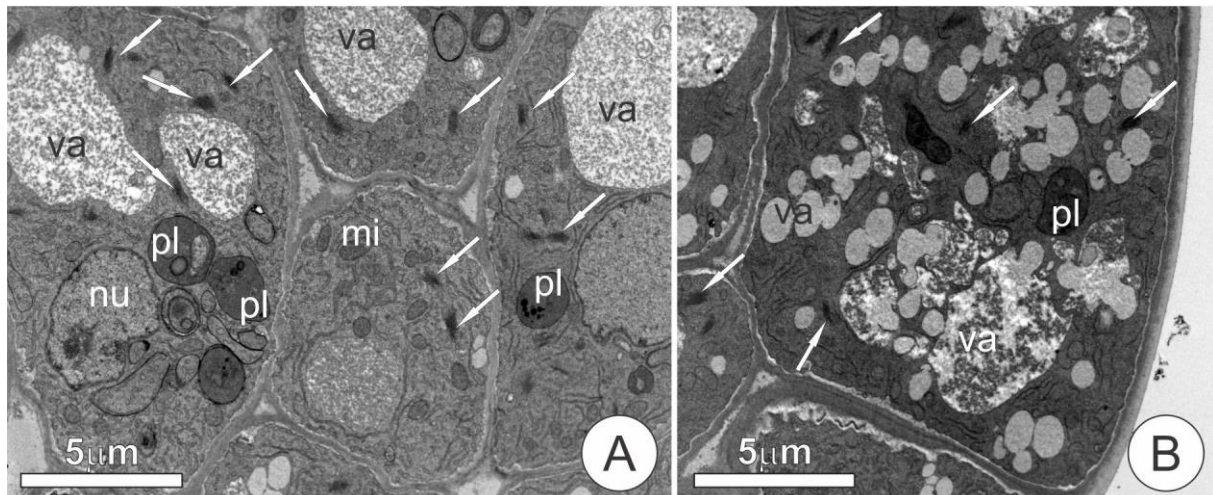


Figura 4. Ultraestrutura das células do coléter receptacular de *Senna macranthera* em fase secretora. **A.** Vista geral das células secretoras mostrando citoplasma denso, distribuição das organelas e a abundância de dictiossomos (seta). **B.** Fusão de vesículas e vacúolos contendo secreção de aspecto floculado, presença de dictiossomos (seta). (pl- plastídio, mi- mitocôndria, nu- núcleo, va- vacúolo).

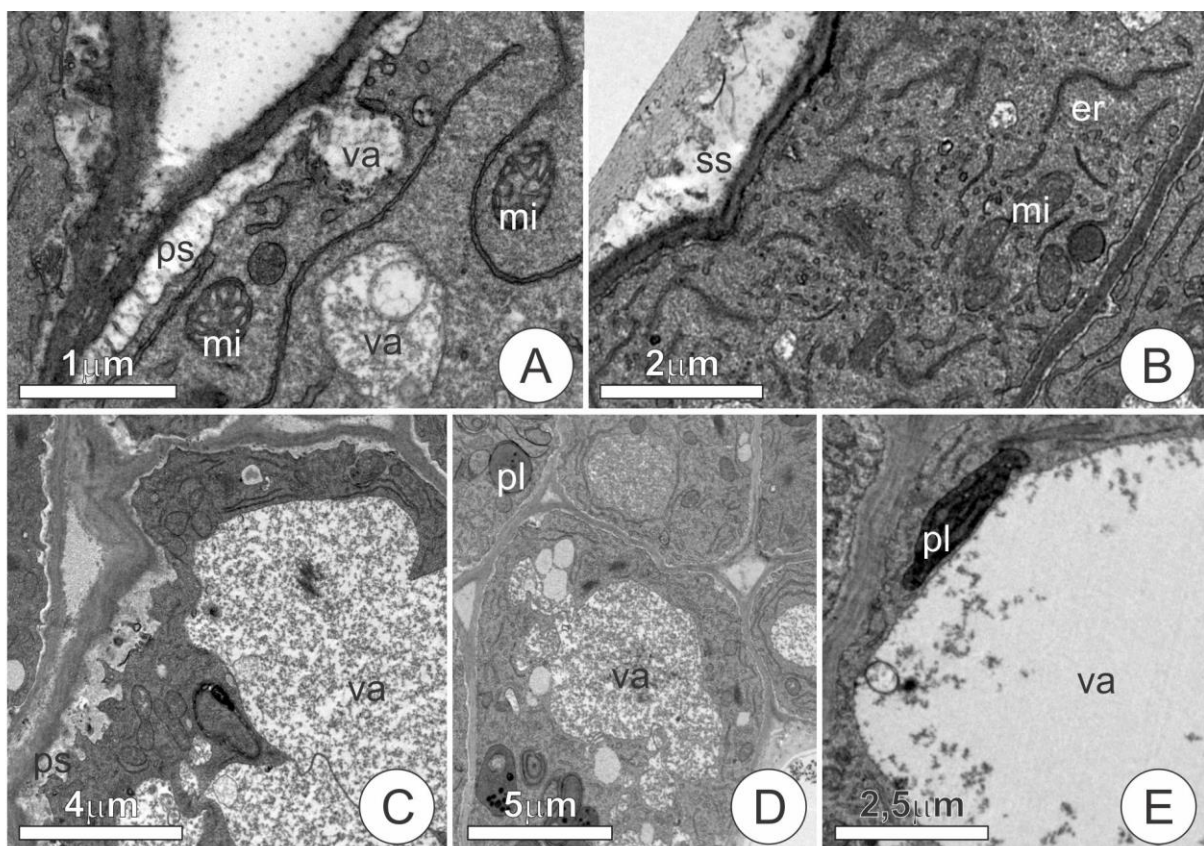


Figura 5. Fase final da secreção dos coléteres receptaculares de *Senna macranthera*. **A.** Fusão de um pequeno vacúolo com a membrana plasmática depositando seu conteúdo no espaço periplasmático. **B.** Secreção acumulada no espaço subcuticular. **C.** Grande vacúolo central contendo secreção acumulada no espaço periplasmático. **D.** Células da região basal do coléter apresentando aspecto de células secretoras. **E.** Célula cortical do receptáculo floral. (er- retículo endoplasmático, mi- mitocôndria, pl- plastídio, ps- espaço periplasmático, ss- espaço subcuticular, va- vacúolo).

Discussão

Estrutura e função

Embora os coléteres sejam conspícuos, podendo ser facilmente observados em estereomicroscópio e até mesmo a olho nu, ainda não foram descritos na literatura para *Senna*. Parece provável que a ausência de relatos destas estruturas nas descrições taxonômicas resulte da análise de material herborizado, onde a visualização dos coléteres é dificultada, e também por esta ser uma estrutura efêmera. O desenvolvimento precoce dos coléteres receptaculares de *S. macranthera* é um processo comum dentre as estruturas secretoras (Fahn, 1979) e o mesmo padrão já foi observado em vários grupos não relacionadas.

A ausência de divisão entre epitélio secretor e eixo central faz com que os coléteres de *S. macranthera* não se encaixem nos padrões morfológicos definidos por Lersten (1974a, b). Além disto, a homogeneidade no que se refere à composição celular destes coléteres constitui indícios de que estes sejam estruturas puramente epidérmicas, como reportado por Paiva & Machado (2006a) e Paiva (2009) para outras duas espécies de Fabaceae.

Como as flores de *S. macranthera* apresentam o perianto aberto desde as fases iniciais do desenvolvimento, ficando mais expostas à dessecação, a presença de secreção mucilaginosa proveniente dos coléteres parece ser uma estratégia importante na proteção contra a perda excessiva de água. Segundo Thomas (1991), proteção contra dessecação de órgãos em desenvolvimento é a função mais provável dos coléteres, e parece ser também a mais provável função dos coléteres receptaculares em *S. macranthera*. A proteção contra dessecação, conferida pela presença de coléteres em peças florais, foi reportada para flores de diferentes grupos taxonômicos (Martins *et al.*, 2010; Paiva & Martins, 2011; Machado *et al.*, 2012; Martins, 2012).

A possibilidade de que a secreção dos coléteres atue como recompensa nutricional para polinizadores parece pouco provável, pois durante a antese os coléteres estão senescentes. Além disto, a secreção, se presente, é pouco atrativa do ponto de vista nutritivo, por ser composta principalmente por polissacarídeos ácidos, não apresentando lipídios. É pouco provável, ainda, que a secreção auxilie na adesão de grãos de pólen no corpo dos polinizadores. Contribuem para refutar esta hipótese o pequeno volume de secreção e a ocorrência de *buzz pollination* na subtribo, que é definida pela ocorrência de caracteres florais interpretados como uma especialização para polinização por grandes abelhas (Irwin & Barneby, 1981, 1982; Marazzi *et al.*, 2006), onde por muitas vezes as abelhas nem chegam a pousar nas flores.

A mudança da coloração dos coléteres de *S. macranthera* para castanha é comumente observada em coléteres, e já foi relatada para diferentes espécies sendo relacionada com a interrupção da atividade secretora e início do processo de senescência (Thomas, 1991; Appezzato-da-Glória & Estelita, 2000; Barreiro & Machado, 2007; Miguel *et al.*, 2010; Tullii *et al.*, 2013). Esta mudança de cor deve-se, provavelmente, pela oxidação de substâncias fenólicas que se dá do ápice para a base do coléter, juntamente com a retração do citoplasma das células apicais. Estudos recentes indicam que o processo de senescência dos coléteres se dá por morte celular programada (ver Doorn & Woltering, 2005; Miguel *et al.*, 2010; Tullii *et al.*, 2013) e pode ser entendida como uma sequência de eventos controlados e organizados de destruição das células (Lockshin & Zakeri, 2004). Nos coléteres de *Alseis pickelii* (Rubiaceae) foi detectada a fragmentação do DNA como um dos primeiros eventos da morte celular programada (Tullii *et al.*, 2013).

Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção

As características ultraestruturais apresentadas pelas células dos coléteres de *S. macranthera*, como citoplasma denso, núcleo volumoso e número relativamente grande de mitocôndrias, estão de acordo com o descrito para células com alta atividade metabólica (Lüttge, 1971; Fahn, 1988), comuns em estruturas secretoras. A presença de grande número de dictiosomos nas células, que estão relacionados principalmente com a síntese de polissacarídeos (Lüttge, 1971), é característico de estruturas que produzem polissacarídeos não celulósicos na secreção, como coléteres, tal fato já foi observado por vários autores (Paiva, 2009; Miguel *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2012).

O transporte de precursores da secreção deve ocorrer célula a célula, por via simplástica através dos plasmodesmos, uma vez que os coléteres não apresentam vascularização. Coléteres não vascularizados são de ocorrência abrangente e já foram relatados para várias famílias de plantas como Apocynaceae (Appezzato-da-Glória & Estelita, 2000), Caryocaraceae (Paiva & Machado, 2006b), Rubiaceae (Vitarelli & Santos, 2009), Myrtaceae (da Silva *et al.*, 2012).

A fusão de vesículas do Golgi com a membrana plasmática, com a consequente liberação da secreção no espaço periplasmático, é evidência de secreção granulócina (Fahn, 1979), processo comum em coléteres, também observado nos coléteres de *Caryocar brasiliense* (Paiva & Machado, 2006b), *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009), *Ipomoea cairica* (Paiva & Martins, 2011), *Alibertia sessilis* (Machado *et al.*, 2012), *Tontelea micranta* (Mercadante-Simões & Paiva, 2013), *Bathysa cuspidata* (Coelho *et al.*, 2013).

O acúmulo de secreção de aspecto floculado no espaço periplasmático e subcuticular, como observado nas células secretoras dos coléteres de *S. macranthera*, é usual para estruturas secretoras de substâncias pécnicas em muitos táxons, especialmente quando estudado ao nível ultraestrutural (Klein *et al.*, 2004). Este padrão também foi observado nos coléteres de *Caryocar brasiliense* (Paiva & Machado, 2006b) e *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009), *Tontelea micranta* (Mercadante-Simões & Paiva, 2013).

A secreção acumulada no espaço subcuticular, que observamos ocorrer nos coléteres analisados, promove expansão da cutícula e parece provocar sua ruptura, liberando a secreção. Este modo liberação de secreção de coléteres já foi reportado por Thomas & Dave (1989), Paiva & Machado (2006b), Paiva & Martins (2011). A ausência de poros ou canais na cutícula sugere que a mesma se reestabelece, dando início a novo acúmulo de secreção no espaço subcuticular, seguindo-se novas rupturas, em processo cíclico durante toda a fase secretora.

A secreção mucilagínosa proveniente dos coléteres de *S. macranthera* parece ser importante na proteção contra a perda excessiva de água das peças florais, principalmente por esta espécie apresentar o perianto aberto desde as fases iniciais do desenvolvimento, deixando a flor mais expostas à dessecação.

Referências bibliográficas

- Appezato-da-Glória B, Estelita MEM. 2000.** Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **23**(2): 113–120.
- Barreiro DP, Machado SR. 2007.** Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **30**(3): 387–399.
- Brundrett M, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111–116.
- Coelho VPM, Leite JPV, Fietto LG, Ventrella MC. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of the secretion. *Flora* **208**: 579-590.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2013.** Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): new evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1709-1720.

- Cowan RS. 1981.** *Caesalpinioideae*. In Advances in Legume Systematics part 1 (Pohill RM, Raven PH, eds.). Royal Botanical Gardens, Kew.
- Da Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA. 2012.** Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **60**: 707-717.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2007.** Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biociências* **5(1)**: 348–350.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2012.** Seed ontogeny of *Chamaecrista* and its systematic implications in Cassiinae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **298(9)**: 1659-1669.
- Dickinson WC. 2000.** *Integrative plant anatomy*. Harcourt Academic Press, San Diego.
- Doorn WG, Woltering EJ. 2005.** Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* **10**:117-122.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc., London
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229–257.
- Irwin HS, Barneby RC. 1981.** *Tribe 2. Cassieae Bronn (1822)*. In Advances in Legume Systematics (Polhill RM, Raven PH, eds.). Crown Copyright, Kew.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** The American Cassiinae, a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry, principles and practice*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002.** *Plant systematics, a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- Klein DE, Gomes VM, Silva-Neto SJ, Cunha M. 2004.** The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* **94**: 733–740.
- Lersten NR. 1974a.** Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of Linnean Society* **69**: 125-136.
- Lersten NR. 1974b.** Morphology and distribution of colleters and crystals in relation of the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **61**: 973-981.

Lewis GP. 2005. *Tribe Cassieae*. In Legumes of the World (Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.

Lockshin RA, Zakeri Z. 2004. *When cells die II: A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*. Wiley-Liss, New York.

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

Machado SR, Barreiro DP, Rocha JF, Rodrigues TM. 2012. Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora* **207**: 868-877.

Martins FM. 2012. Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae–Apocynoideae–Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Brazilian Journal of Botany* **35(1)**: 59-69.

Martins FM, Kinoshita LS, Castro MM. 2010. Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violacea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. *Revista Brasileira de Botânica* **33(3)**: 489-500

Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E. 2006. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288–303.

Mercadante-Simões MO, Paiva EAS. 2013. Leaf colleters in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural aspects. *Comptes Rendus Biologies* **336(8)**: 400-406.

Miguel EC, Kein DE, Oliveira, MA, Da Cunha, M. 2010. Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **33(3)**: 425-436.

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

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

Paiva EAS, Machado SR. 2006a. Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) colleters. *Revista de Biologia Tropical* **54(3)**: 943–950.

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

Paiva EAS, Martins LC. 2011. Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany* **59**: 91–98.

Queiroz, LP. 2009. *Leguminosas da Caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana.

Robards AW. 1978. *An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells.* In *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells* (Hall JL, ed.). Elsevier, New York.

Roland AM. 1978. *General preparations and staining of thin sections.* In *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells.* Hall J.L. (ed.). Elsevier, New York.

Solereeder H. 1908. *Systematic Anatomy of Dicotyledons.* Clarendon Press, Oxford.

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

Thomas V, Dave Y. 1989. Histochemistry and senescence of colleters of *Alamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany* **64**: 201–203.

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

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

Capítulo III

Organização estrutural e mecanismo de secreção de tricomas glandulares no pericarpo de *Senna occidentalis* (Fabaceae, Caesalpinioideae): coléteres pericarpiais

Resumo

Senna occidentalis é uma espécie invasora em praticamente toda a América tropical e subtropical de ocorrência principalmente em áreas degradadas. Apresenta hábito subarbustivo e seus frutos são legumes típicos, plano-compressos de valvas papiráceas. Coléteres são estruturas secretoras presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, que produzem secreção mucilaginosa e/ou resinosa e atuam na proteção contra dessecação durante os estágios iniciais de desenvolvimento; apresentam estrutura e morfologia variáveis, podendo corresponder a emergências ou tricomas. Tricomas secretores foram descritos no ovário e fruto de *Senna occidentalis*, mas sem nenhuma menção à composição do secretado e tampouco à sua função. O presente trabalho objetiva relatar a ocorrência de coléteres pericarpiais em *Senna occidentalis* (Fabaceae, Caesalpinioideae), bem como descrever a sua organização estrutural e ultraestrutural, compreender o mecanismo de secreção e elucidar alguns aspectos funcionais. Amostras de frutos em vários estágios de desenvolvimento foram coletadas e processadas para análises estruturais aos microscópios de luz e eletrônico de transmissão e varredura. Os coléteres pericarpiais de *S. occidentalis* correspondem a tricomas que se localizam na depressão correspondente à região mediana das valvas dos frutos; são funcionais durante o período compreendido entre a antese e o início da maturação dos frutos, quando se tornam senescentes. Os coléteres apresentam pedúnculo multisseriado e cabeça secretora multicelular globosa, produzem secreção hialina, de aspecto viscoso, que forma um filme sobre o fruto. As características ultraestruturais observadas nas células secretoras dos coléteres são compatíveis com a síntese de polissacarídeos ácidos. A secreção dos coléteres se acumula nos espaços periplasmático e subcuticular, a partir do espaço subcuticular a secreção é liberada para o meio externo através de fissuras na cutícula. Os frutos de *S. occidentalis* são muito expostos na superfície da planta e são tenros durante toda a fase de desenvolvimento, o que os torna suscetíveis a dessecação. Deste modo, os coléteres desempenham um importante papel na proteção contra o excesso de transpiração, minimizando a desidratação dos frutos.

Palavras-chave: coléteres; fruto; interação planta-ambiente; secreção; *Senna*

Abstract

Senna occidentalis is an invasive species in practically all tropical and subtropical America, incident mainly in degraded areas. Exhibit habit subshrub and their fruits are typical legume, plan-compressed of papyraceous valves. Colleters are glandular structures present in vegetative and reproductive organs, which produce mucilaginous and/or resinous secretions and acts on the protection against desiccation during the first stages of development; show variable structure and morphology, may correspond an emergency or trichomes. Secretory trichomes have been described in *Senna occidentalis* ovaries and fruits, however with no mention to the secreted composition and either the function. This study reports the occurrence of pericarpiais colleters in *Senna occidentalis* (Fabaceae, Caesalpinioideae) and describe their structural and ultrastructural organization, understanding the mechanism of secretion and to elucidate some functional aspects. Fruit samples were collected in several stages of development and processed for structural analyzes in optical microscope and transmission and scanning electron microscope. The pericarpial colleters of *S. occidentalis* corresponds a trichomes that are located in depression correspondently to the median region of fruit valves; are functional during the period between anthesis and the beginning of fruit ripening, when they become senescent. The colleters exhibit a multigrade stalk and globular multicellular secretory head, produce hyaline secretion, with sticky aspect, which forms a film over the fruits. The ultrastructurals features observed in secretory cells of the colleters are compatible with acid polysaccharides synthesis. The colleters seretion accumulated in the subcuticular space promotes the expansion of itself and the disruption of cuticle, which secretion release for external environment. The de *S. occidentalis* fruits are very exposed in the plant superficies, tender for all development phase, with makes them susceptible to desiccation. Thus, the colleters play an important role in the protection against the excessive transpiration, avoiding fruits dehydration.

Keywords: colleters; fruit; plant-environment interaction; secretion; *Senna*

Introdução

Senna é um dos maiores gêneros da família Fabaceae (Caesalpinioideae), apresentando aproximadamente 350 espécies (Marazzi & Sanderson, 2010), com grande diversidade de hábitos, incluindo ervas, arbustos, arvoretas, árvores altas e lianas, colonizando com sucesso uma grande variedade de habitats em diferentes climas e latitudes (Marazzi *et al.*, 2006). *Senna occidentalis* é uma espécie invasora em praticamente toda a América tropical e subtropical (Irwin & Barneby, 1982), ocorrendo principalmente em áreas degradadas. Apresenta hábito subarborescente de crescimento rápido; os frutos são legumes de aproximadamente 10-12 cm de comprimento, plano-compressos de valvas papiráceas (Queiroz, 2009).

Estruturas secretoras diversas foram relatadas para a subfamília Caesalpinioideae, dentre elas, células mucilaginosas, canais e cavidades secretoras (Solleder, 1908). Coléteres foram estudados em *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado, 2006a), embriões (De-Paula & Oliveira, 2007; De-Paula & Oliveira, 2012) e folhas (Coutinho *et al.*, 2013) de *Chamaecrista* e em *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009), entretanto os registros de sua ocorrência são poucos e relativamente recentes. Estima-se que a abundância de coléteres em Caesalpinioideae seja bem maior e registros da presença de coléteres deverão ser ampliados com novos estudos com a subfamília.

Coléteres são estruturas glandulares que produzem secreção mucilaginosa e/ou resinosa, podem estar presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, e desempenham, sobretudo, a função de proteção contra dessecação durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Estas estruturas diferenciam-se nos órgãos ainda em formação, geralmente nas proximidades do ápice caulinar, e apresentam grande diversidade de forma, além de serem estruturalmente simples (Thomas, 1991).

Tricomas secretores são apêndices epidérmicos que se destacam pela ampla diversidade de tipos, tamanhos, formas, número de células, e localização. A natureza química da secreção produzida também é variável, desde mucilagem, enzimas digestivas em plantas carnívoras, compostos lipofílicos em diversas plantas ou ainda soluções salinas em espécies halófitas, sendo o produto de secreção diretamente relacionado à função desempenhada por estas estruturas (Fahn, 1979). Tricomas secretores foram descritos no ovário e fruto de *Senna occidentalis* (Patel *et al.*, 1976; Reddy & Shah, 1979), mas sem nenhuma menção à composição do secretado e tampouco à sua função.

Deve-se ressaltar que novos estudos podem representar um avanço na compreensão das relações bióticas e abióticas mediadas por estruturas secretoras em Fabaceae. O presente trabalho objetiva relatar a ocorrência de coléteres pericarpiais em *Senna occidentalis* (Fabaceae, Caesalpinioideae), bem como descrever a sua organização estrutural e ultraestrutural, compreender o mecanismo de secreção e elucidar alguns aspectos funcionais.

Material e Métodos

Material vegetal

Antes de se proceder a coleta do material para a análise estrutural e ultraestrutural, ovário de flores em antese e frutos de *Senna occidentalis*, com cerca de 10% de expansão, 30% de expansão, 50% de expansão e em maturação fisiológica foram analisados sob estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000-C).

Para estudos anatômicos e ultraestruturais as amostras foram obtidas de indivíduos de *S. occidentalis* cultivados no campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ramos férteis foram herborizados para deposição no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para fins de documentação e identificação. Para estudos estruturais e ultraestruturais foram coletados frutos jovens (com cerca de 30% de expansão).

Microscopia de luz

As amostras dos frutos de *S. occidentalis* foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica, incluídas em resina sintética (2-hidroxi-etil)-metacrilato Leica®, conforme indicação do fabricante, seccionadas (5µm) em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M40) no plano longitudinal, coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964). As lâminas histológicas foram montadas com resina sintética Entellan®. A observação foi realizada em microscópio de luz com câmera acoplada (Leica ICC50 HD), obtendo-se imagens digitais (software Leica Application Suite LAS EZ).

Testes histoquímicos foram realizados em seções obtidas a mão livre do fruto fresco para a detecção de polissacarídeos ácidos, com solução aquosa de vermelho de rutênio (Johansen, 1940) e lipídios totais, com Sudan Red (Brundrett *et al.*, 1991). As lâminas foram montadas em água e observadas em microscópio de luz (Leica ICC50 HD).

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram fixadas em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2), desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico utilizando-se CO₂ líquido (Robards, 1978). Os fragmentos foram cobertos com ouro em metalizador e as imagens capturadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos contendo tricomas glandulares foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,2). Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão e desidratadas em série cetônica, para posterior inclusão em resina Spurr®, segundo protocolo modificado de Roland (1978). Secções semifinas foram obtidas em ultramicrotomo, montadas em lâminas para microscopia e coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964). Após seleção das áreas de interesse, mediante análise das secções semifinas, secções ultrafinas (60-90 nm) foram preparadas, as quais foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As secções escolhidas foram analisadas e as imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI a 80kV

Resultados

Caracterização morfoanatômica

Tricomas glandulares foram observados no ovário de *S. occidentalis* e no fruto em todas as fases de desenvolvimento analisadas. Os frutos de *S. occidentalis* são legumes típicos e apresentam valvas plano-compressas nas quais observou-se a presença de tricomas glandulares, que ocorrem em meio a tricomas tectores não ramificados (Fig. 1). A região dorsal e a linha de sutura, na face ventral, são proeminentes, de modo a formar uma depressão correspondente à região mediana das valvas, local de maior densidade dos tricomas glandulares e dos tricomas tectores. Observou-se que os tricomas glandulares apresentam-se funcionais durante o período compreendido entre a antese e o início da maturação dos frutos, quando se tornam senescentes.

Os tricomas glandulares apresentam pedúnculo multisseriado e cabeça secretora multicelular globosa; observou-se que o pedúnculo se curva em direção à epiderme, o que torna os tricomas prostrados e alinhados com o eixo do fruto (Figs. 1C, 1D). Na região do pedúnculo as células apresentam citoplasma menos denso que as células da cabeça secretora.

A secreção dos tricomas é hialina, viscosa, bastante concentrada nas imediações dos tricomas, de onde se espalha formando um filme sobre o fruto. A secreção apresentou resultado positivo no teste com vermelho de rutênio, evidenciando presença de polissacarídeos ácidos e negativo para lipídios.

Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção

As células secretoras dos tricomas de *S. occidentalis* apresentam citoplasma denso, núcleo volumoso e grande população de organelas, dentre elas, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso, dictiossomos e plastídios (Figs. 2A-B). As mitocôndrias são numerosas e apresentam cristas bem desenvolvidas (Figs. 2A-B), enquanto os plastídios apresentam estroma denso e sistema de endomembranas pouco desenvolvido (Figs. 2A-B). O aparelho de Golgi é bem desenvolvido (Figs. 2A-B), composto por inúmeros dictiossomos onde numerosas vesículas são formadas. O retículo endoplasmático (Fig. 2C) é composto por uma rede tubular que permeia o citoplasma, frequentemente associado aos plasmodesmos (Fig. 2C). Algumas células apresentam capacidade de divisão celular, evidenciada pela formação da placa celular (Fig. 2D).

Tricomas em etapas distintas do processo secretor foram analisados, tornando possível demonstrar o fluxo da secreção desde o local de síntese até a liberação para o meio externo. Os dictiossomos produzem grande quantidade de vesículas (Figs. 4A-B), algumas destas vesículas se fundem com a membrana plasmática, o que parece contribuir para ampliar a sinuosidade desta (Fig. 3A).

Vacúolos com conteúdo floculado, característico de secreções que contém substâncias pécticas, podem ser observados em algumas células (Fig. 3C). O acúmulo deste tipo de material também pode ser encontrado nos espaços periplasmático e subcuticular (Figs. 3D-F). Em algumas células, o espaço periplasmático se distende pelo acúmulo deste material floculado, ocupando a maior parte da célula e comprimindo o protoplasto, que fica com um aspecto lobado (Figs. 3D-E). A contínua produção de secreção e expansão do espaço periplasmático geram uma pressão que força a secreção a atravessar a parede celular e se difundir para o espaço subcuticular, causando o deslocamento da cutícula e criando amplos espaços (Fig. 3F). Do espaço subcuticular a secreção ganha o meio externo por meio de fissuras e rupturas na cutícula (Fig. 3F).

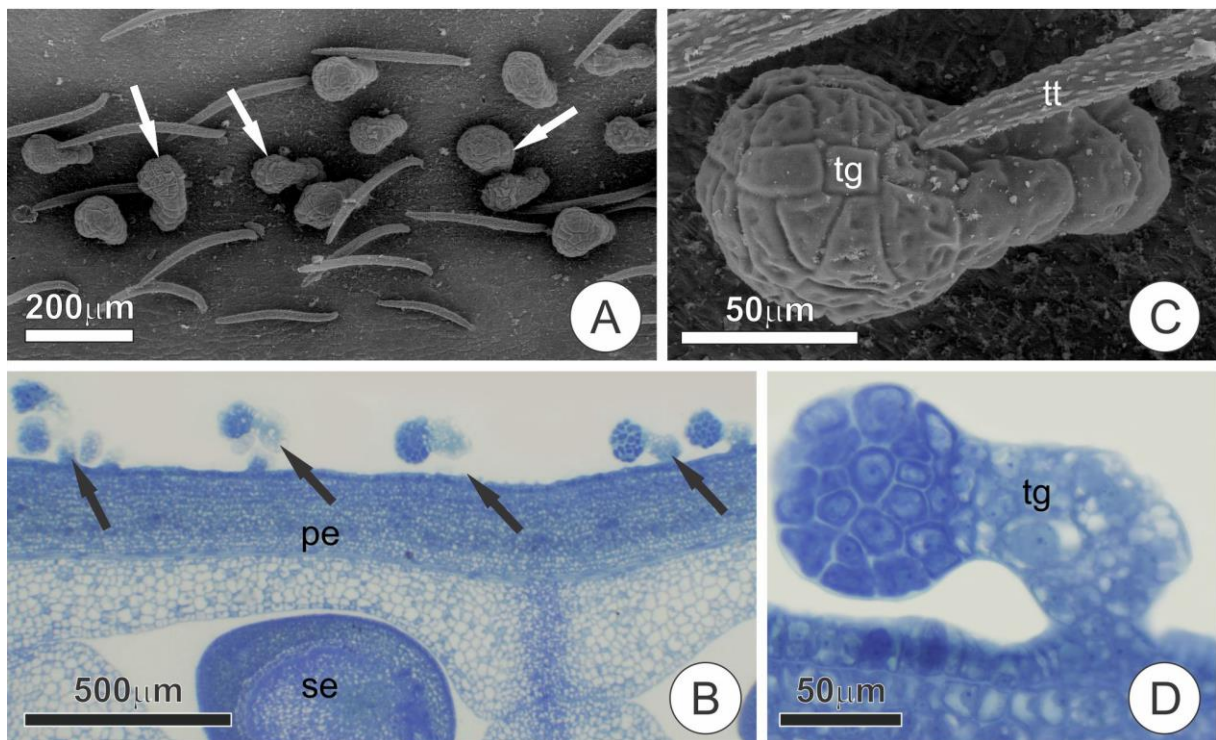


Figura 1. Distribuição e caracterização anatômica dos tricomas glandulares do pericarpo de *Senna occidentalis*. **A e B.** Visão geral (setas). **C e D.** Detalhe do triocoma glandular. (se-semente, tg- tricoma glandular, tt- tricoma tector).

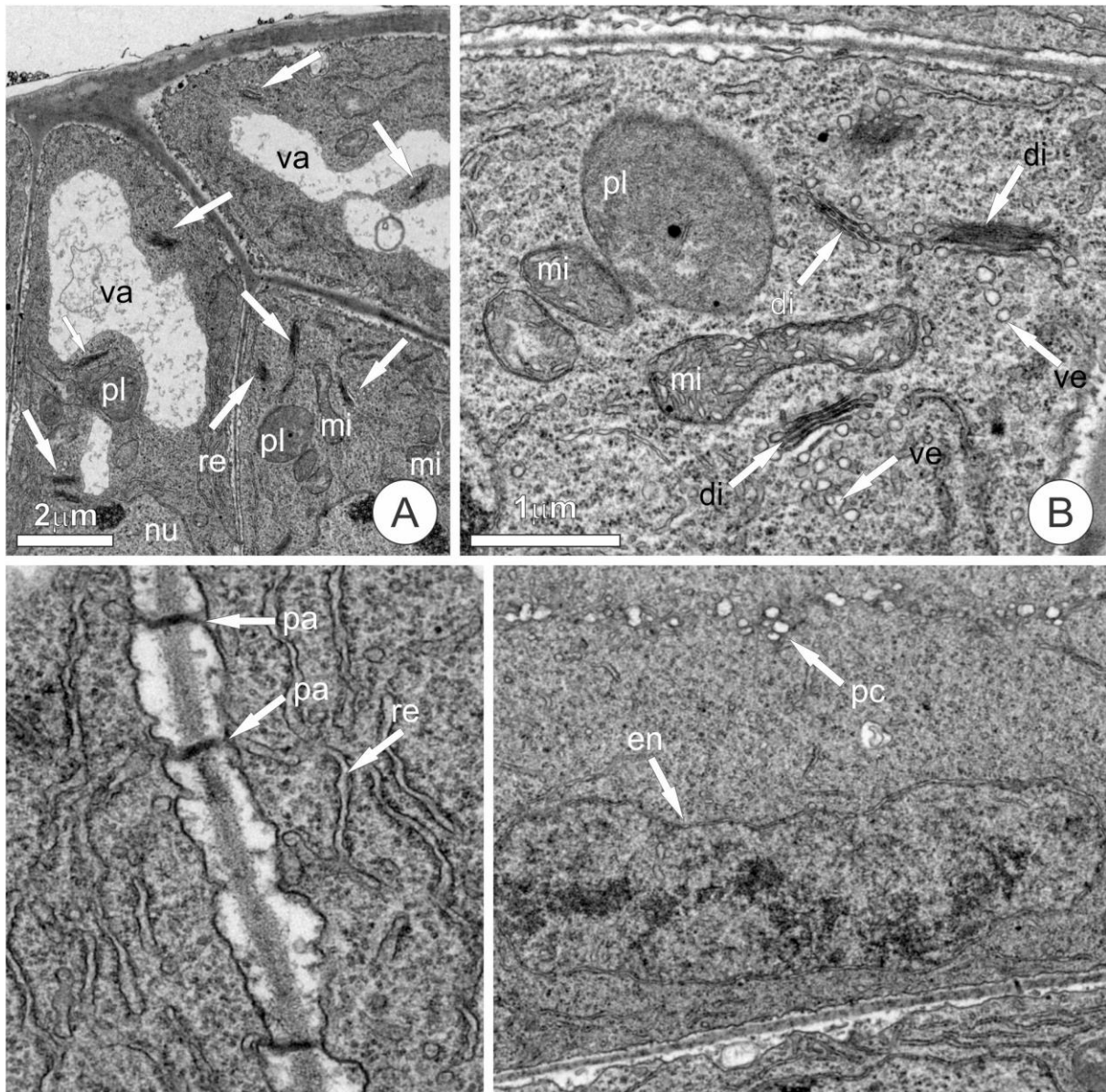


Figura 2. Ultraestrutura das células dos coléteres pericarpiais de *Senna occidentalis* em fase secretora. **A.** Vista geral das células secretoras mostrando citoplasma denso, distribuição das organelas e a abundância de dictiossomos (setas). **B.** Detalhe das mitocôndrias, plastídios e dictiossomos com grande produção de vesículas. **C.** Detalhe dos plasmodesmos. **D.** Formação da placa celular. (di- dictiossomo, en- envoltório nuclear, pa- plasmodesmos, pc- placa celular, pl- plastídio, mi- mitocôndria, nu- núcleo, re- retículo endoplasmático, va- vacúolo, ve- vesícula).

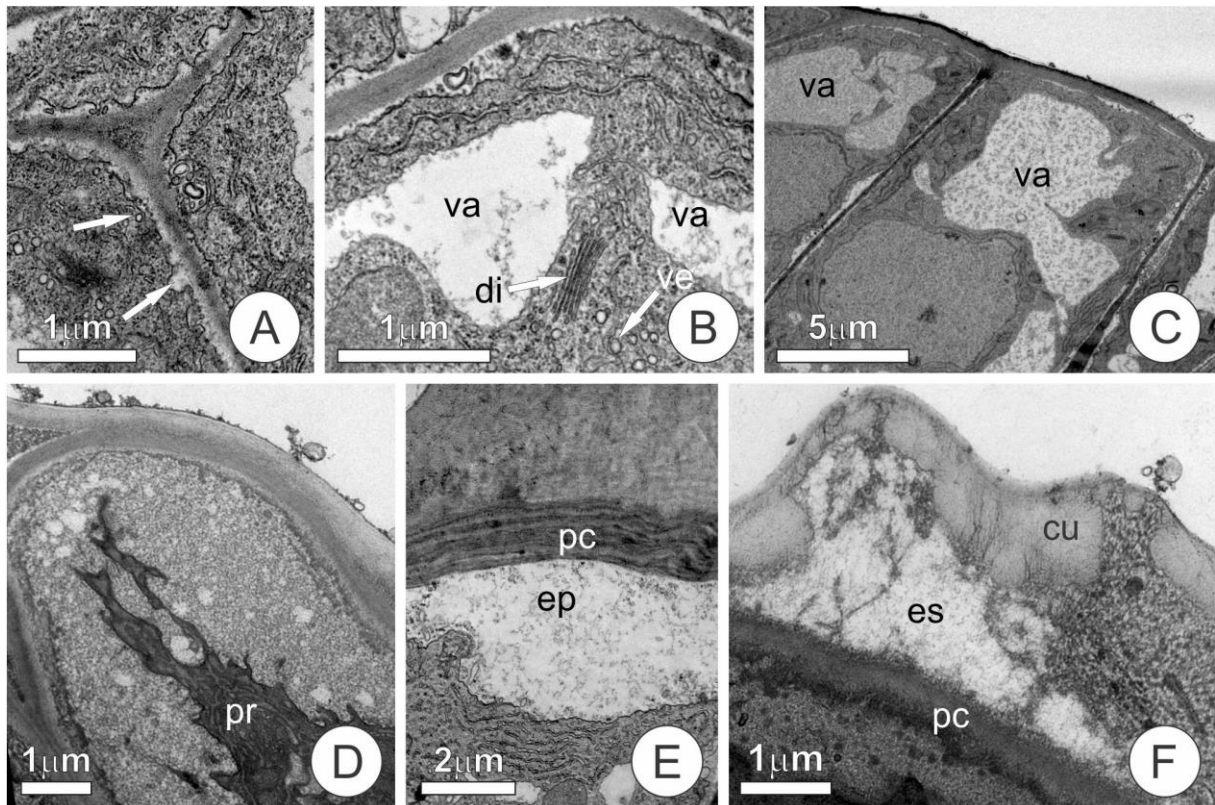


Figura 4. Mecanismo de secreção dos coléteres pericarpiais de *Senna occidentalis*. **A.** Fusão de vesículas do Golgi com a membrana plasmática depositando seu conteúdo no espaço periplasmático (seta). **B e C.** Material de aspecto floculado acumulado nos vacúolos. **D e E.** Acúmulo de secreção no espaço periplasmático, comprimindo o protoplasto da célula. **F.** Secreção acumulada no espaço subcuticular sendo liberada para o meio externo através de rupturas da cutícula. (cu- cutícula, di- dictiossomo, ep- espaço periplasmático, es- espaço subcuticular, pc- parede celular, pr- protoplasto, va- vacúolo, ve- vesícula).

Discussão

Organização estrutural e função

Patel *et al.* (1976) se referiram a dois tipos de tricomas secretores presentes no ovário e fruto de *S. occidentalis*, os quais denominaram de curto pedicelado e longo pedicelado. Dois tipos de tricomas foram também observados por Reddy & Shah (1979): um não glandular ramificado e outro glandular; sendo este clavado, de pedúnculo multisseriado e cabeça multicelular globosa. Parece provável que os tricomas descritos pelos autores citados constituam apenas fases distintas do desenvolvimento do mesmo tipo de tricoma secretor. Reddy & Shah (1979) relataram, ainda, que os tricomas secretores são encontrados somente no ovário, com o que discordamos, haja vista a inequívoca presença dos tricomas em todas as etapas de desenvolvimento do fruto. Sharangpani & Shirke (1996) citam a presença de

nectários em forma de taça nos ovários de *S. occidentalis*, mas estes nectários não foram observados em nenhuma das amostras analisadas no presente trabalho.

Embora os tricomas glandulares presentes nos frutos de *S. occidentalis* tenham sido relatados por Patel *et al.* (1976), não foi feita nenhuma menção à presença de secreção, entretanto no presente trabalho foi identificada a presença de secreção de natureza mucilaginosa. As mucilagens são constituídas principalmente por heteropolissacarídeos ácidos e/ou neutros (substância de caráter hidrofílico), proteínas, compostos fenólicos e apresentam ampla distribuição nos vegetais (Priolo De Lufrano & Caffini, 1981; Roshchina & Roshchina, 1993). Segundo Paiva (2009), a presença de secreção hidrofílica sobre a superfície de folhas jovens reduz a perda de água para o meio externo através da transpiração, e aparentemente ajuda na manutenção do nível de umidade ideal para o desenvolvimento das folhas; pensamento análogo pode ser feito em relação aos frutos de *S. occidentalis*, que são tenros e quase foliáceos durante toda a fase de expansão.

Em órgãos em desenvolvimento que não são fotossinteticamente autossuficientes, como os frutos de *S. occidentalis*, o transporte de água através do xilema não é eficiente (Nobel *et al.*, 1994), o que os torna particularmente vulneráveis à dessecação. Deste modo, a ocorrência de tricomas glandulares, com secreção mucilaginosa, pode ser de grande importância na proteção dos frutos contra a dessecação.

A natureza da secreção, bem como a presença dos tricomas glandulares em órgãos em estágios iniciais do desenvolvimento nos permite classificar os tricomas do fruto de *S. occidentalis* como coléteres. O uso do termo coléter tem variado de acordo com diferentes autores em decorrência dos critérios utilizados para definir estas estruturas secretoras, tais como morfologia, localização e natureza química da secreção (Leitão & Cortelazzo, 2008). Entretanto, as origens do termo "coléter" baseiam-se em caracteres funcionais em oposição aos caracteres puramente morfológicas, o termo foi cunhado por Hanstein em 1848 (ver Thomas 1991) em alusão à característica pegajosa da secreção produzida por esta estrutura. Tricomas secretores de mucilagem têm sido referidos na literatura como coléteres em várias famílias: Saxifragaceae (Decraene *et al.*, 1998), Gentianaceae (Renobales *et al.*, 2001), Orchidaceae (Leitão & Cortelazzo, 2008; Mayer *et al.*, 2011), Convolvulaceae, (Paiva & Martins, 2011), Moraceae (Machado *et al.*, 2013).

Organização ultraestrutural e mecanismo de secreção

As características ultraestruturais observadas nas células dos coléteres pericarpiais de *S. occidentalis*, como citoplasma denso, núcleo volumoso e grande número de mitocôndrias,

estão de acordo com o descrito para células com intensa atividade metabólica (Lüttge, 1971; Fahn, 1988), comuns em células com atividade secretora. O elevado número de dictiossomos e a quantidade de vesículas originadas deles indica um nível elevado de atividade destas organelas nos coléteres. Os dictiossomos estão relacionados principalmente à síntese de polissacarídeos (Lüttge, 1971), e sua abundância é usual em células de estrutura secretoras que produzem polissacarídeos não celulósicos na secreção, como ocorre nos coléteres (Paiva, 2009). A presença de retículo endoplasmático abundante e formando rede paralela à região periplasmática, pode indicar uma participação ativa desta organela no transporte e secreção do material produzido pelas células secretoras (Paiva & Martins, 2011), principalmente por estarem associados aos plasmodesmos, fornecendo evidência do transporte simplástico entre as células secretoras.

A fusão de vesículas provenientes dos dictiossomos com a membrana plasmática, com a conseqüente liberação da secreção no espaço periplasmático, é evidência de secreção granulócrica (Fahn, 1979), processo recorrente em coléteres, também observado nos coléteres de *Caryocar brasiliense* (Paiva & Machado, 2006b), *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009), *Ipomoea cairica* (Paiva & Martins, 2011), *Alibertia sessilis* (Machado *et al.*, 2012), *Tontelea micranta* (Mercadante-Simões & Paiva, 2013), *Bathysa cuspidata* (Coelho *et al.*, 2013) e *Senna macranthera* (Amelia-Souza & Paiva, dados não publicados).

A fusão das vesículas do Golgi umas com as outras, formando vacúolos contendo secreção de aspecto floculado, que por sua vez, se fundem com a membrana plasmática liberando o seu conteúdo no espaço periplasmático, num processo cíclico de formação de vacúolo e secreção, também foram observadas em coléteres de espécies não relacionadas como *Ipomoea cairica* (Paiva & Martins, 2011), *Alibertia sessilis* (Machado *et al.*, 2012), *Bathysa cuspidata* (Coelho *et al.*, 2013), *Tontelea micranta* (Mercadante-Simões & Paiva, 2013), indicando que este tipo de processo secretor é usual em coléteres, sendo eles tricomas ou emergências.

A liberação da secreção para o espaço periplasmático resulta na retração do protoplasto das células secretoras do coléter, gerando uma pressão que força a secreção a atravessar da parede celular, se acumulando no espaço subcuticular. A secreção acumulada no espaço subcuticular, promove a distensão da cutícula, vencendo esta última barreira, através de rupturas e fissuras extravasando para o meio externo. Este modo liberação de secreção já foi reportado em coléteres por Thomas & Dave (1989), Paiva & Machado (2006b), Paiva & Martins (2011), (Mercadante-Simões & Paiva, 2013).

Os frutos de *S. occidentalis* são muito expostos na superfície da planta, são tenros durante toda a fase de desenvolvimento e quase glabros, o que os torna suscetíveis a dessecação. Nestes frutos a secreção dos coléteres forma uma película sobre a superfície, protegendo-os da desidratação por meio da redução da transpiração cuticular, enquanto o fruto e as sementes se desenvolvem. Esta proteção contra o excesso de transpiração parece constituir um importante mecanismo de proteção, que ajuda a assegurar o desenvolvimento das sementes, peça fundamental na manutenção desta espécie, que tem um grande sucesso reprodutivo. Tricomas semelhantes também foram observados nos frutos de *Senna hirsuta* (Amélia-Souza, dados não publicados), o que sugere uma ocorrência mais ampla destes coléteres no gênero *Senna*.

Referências bibliográficas

- Brundrett M, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111–116.
- Coelho VPM, Leite JPV, Fietto LG, Ventrella MC. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of the secretion. *Flora* **208**: 579-590.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2013.** Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): new evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1709-1720.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2007.** Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biociências* **5(1)**: 348–350.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2012.** Seed ontogeny of *Chamaecrista* and its systematic implications in Cassiinae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **298(9)**: 1659-1669.
- Decraene LPR, Roels P, Smets EF, Backlund A. 1998.** The floral development and floral anatomy of *Chrysosplenium alternifolium*, an unusual member of the Saxifragaceae. *Journal of Plant Research* **111**: 573-580.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Academic Press Inc., London
- Fahn A. 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229–257.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** The American Cassiinae, a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.

- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- Leitão CAE, Cortelazzo, AL. 2008.** Structural and histochemical characterization of the collectors of *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany* **56**: 161-165.
- Lüttge U. 1971.** Structure and function of plant glands. *Annual Review of Plant Physiology* **22**: 23–44.
- Machado AFP, de Souza AM, Leitão CAE. 2013.** Secretory structures at syconia and flowers of *Ficus enormis* (Moraceae): A specialization at ostiolar bracts and the first report of inflorescence collectors. *Flora* **208**: 45-51.
- Machado SR, Barreiro DP, Rocha JF, Rodrigues TM. 2012.** Dendroid collectors on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora* **207**: 868-877.
- Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E. 2006.** Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288–303.
- Marazzi B, Sanderson, MJ 2010.** Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectaries. *Evolution* **64**: 3570-3592.
- Mayer JLS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-da-Glória B. 2011.** Collectors in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* **206**: 185–190.
- Mercadante-Simões MO, Paiva EAS. 2013.** Leaf collectors in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural aspects. *Comptes Rendus Biologies*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2013.06.007>.
- Nobel PS, Andrade JL, Wang N, North GB. 1994.** Water potentials for developing cladodes and fruits of a succulent plant including xylem-versus-phloem implications for water movements. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1801–1807.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- Paiva EAS. 2009.** Occurrence, structure and functional aspects of the collectors of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Comptes Rendus Biologies* **332**: 1078–1084.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006a.** Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) collectors. *Revista de Biologia Tropical* **54(3)**: 943–950.
- Paiva EAS, Machado SR. 2006b.** Collectors in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* **66**: 301–308.

- Paiva EAS, Martins LC. 2011.** Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany* **59**: 91–98.
- Patel BR, Patel ND, Dave, YS. 1976.** Pericarpial study in developing fruit of *Cassia occidentalis* L. *Flora* **165**: 215–222.
- Priolo De Lufrano NS, Caffini, NO. 1981.** Mucílagos foliares de *Chorisia* H.B.K. (Bombacaceae): análisis fitoquímico e enfoque quimiotaxonômico. *Phyton* **40**: 13-20.
- Queiroz, LP. 2009.** *Leguminosas da Caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Reddy PKR, Shah GL. 1979.** Observations on the structure and ontogeny of stomata and trichomas on developing and mature pericarps of *Cassia occidentalis* L. *Biologia Plantarum* **21(5)**: 321–327.
- Renobales G, Diego E, Urcelay B, López-Quintana A. 2001.** Secretory hairs in *Gentiana* and allied genera (Gentianaceae, subtribe Gentianinae) from the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* **136**: 119-129.
- Robards AW. 1978.** *An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells*. In *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Hall J.L. (ed.). Elsevier, New York.
- Roland AM. 1978.** *General preparations and staining of thin sections*. In *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Hall J.L. (ed.). Elsevier, New York.
- Roshchina VV, Roshchina VD. 1993.** *The excretory fuction of higher plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Sharangpani PR, Shirke DR. 1996.** Scanning electron microscopic studies on ovarian nectaries of *Cassia occidentalis* L. *Phytomorphology* **46(3)**: 277–281.
- Solereeder H. 1908.** *Systematic Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- Thomas V. 1991.** Review Article. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* **68**: 287–305.
- Thomas V, Dave Y. 1989.** Histochemistry and senescence of colleters of *Alamanda cathartica* (Apocynaceae). *Annals of Botany* **64**: 201–203.

Capítulo IV

Coléteres em embriões e plântulas de espécies de *Senna* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae, Cassiinae): análise estrutural

Resumo

Senna é um dos maiores gêneros da família Fabaceae, e juntamente com *Cassia* s.s. e *Chamaecrista* compõe a subtribo Cassiinae. Análises filogenéticas baseadas somente em dados moleculares tem se mostrado insuficientes para solucionar as relações entre os gêneros de Cassiinae. Deste modo, torna-se necessária a procura por informações a respeito de estruturas secretoras, de forma a complementar àquelas provenientes de dados moleculares. Coléteres são estruturas glandulares que produzem secreção de natureza mucilaginosa ou resinosa, e desempenham a função de proteção contra dessecação de órgãos em início de desenvolvimento. Com o objetivo de caracterizar anatômica e funcionalmente os coléteres presentes nos embriões e plântulas de *Senna hirsuta*, *S. macranthera*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis* e *S. pentagonia*, sementes foram coletadas, colocadas para germinar, e processadas segundo métodos usuais para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Os coléteres localizam-se nas axilas dos cotilédones, no ápice do eixo do embrião ou da plântula. Não foi observada a presença de vascularização nestas estruturas. Os coléteres estão presentes no embrião antes da desidratação da semente, na plântula durante o processo de germinação e em plântulas de até sete dias, quando se tornam senescentes. Durante a germinação da semente, os coléteres apresentam um pico de secreção após 24 horas que as sementes foram colocadas para germinar; a secreção, que possui natureza péctica, forma um filme cobrindo a região da plúmula e as laterais do eixo do embrião e plântula. A presença de coléteres em embriões pode constituir uma adaptação à germinação em condições adversas de umidade, uma vez que o caráter mucilaginoso da secreção propicia a retenção de água, mantendo o embrião úmido, facilitando sua germinação. Dada a presença destas estruturas também em *Chamaecrista*, estudos sobre a ocorrência dos coléteres em embriões de espécies de Cassiinae devem ser ampliados, incluindo *Cassia*, para que possam ser avaliados tanto os aspectos fisiológicos e ecológicos da germinação das sementes, quanto o possível emprego deste caráter em análises filogenéticas.

Palavras-chave: coléter; desenvolvimento; embrião; germinação; mucilagem; *Senna*

Abstract

Senna is one of the largest genera of family Fabaceae, and along with *Cassia s. s.* and *Chamaecrista* composes the subtribe Cassiinae. Phylogenetic analyzes based only on molecular data has proved insufficient to resolve relationships among genera of Cassiinae. Thus, becomes necessary search for information about secretory structures to complement those from molecular data. Colleters are glandular structures present in vegetative and reproductive organs, which produce mucilaginous or resinous secretions and acts on the protection against desiccation during the first stages of development. With the aim to characterize anatomically and functionally the colleters present in embryos and seedlings of *Senna hirsuta*, *S. macranthera*, *S. obtusifolia*, *S. occidentalis* and *S. pentagonia*, seeds were collected, germinated, and processed according to usual methods for optical microscope and scanning electron microscope. The colleters are located in the axils of the cotyledons, in apex of the axis of the embryo and/or seedling. No presence of vascularization was observed in these. The colleters are present in the embryo prior to dehydration seed, seedling during germination process and until and in seedling seven days after the procedure, when become senescent. During the seed germination, the colleters present a secretion peak after 24 hours which seeds were put to germinate; the secretion which has a pectic nature, form a film covering the plumule region and the embryo and seedling axis sides. The presence of colleters in embryos could constitute an adaptation to the germination in adverse conditions of humidity, since the mucilaginous feature of secretion provides water retention, keeping the embryo moist, facilitating their germination. Given the presence of these structures also in *Chamaecrista*, studies about colleters occurrence in embryos of Cassiinae species should be increased, including *Cassia*, so that it could be valued both physiologic and ecologic aspects of seeds germination and the potencial use that character in phylogenetic analyzes.

Keywords: colleter; development; embryo; mucilage; seed germination; *Senna*

Introdução

Fabaceae (Leguminosae) é uma das três maiores famílias de Angiospermae, contendo 730 gêneros e 19.500 espécies de distribuição cosmopolita (Lewis *et al.*, 2005), sendo no Brasil, encontrados cerca de 190 gêneros nativos e 2.100 espécies. A família é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae (Judd *et al.*, 2002).

A subfamília Caesalpinioideae é predominantemente tropical, e compreende 161 gêneros e cerca de 3.000 espécies (Lewis *et al.*, 2005) e de acordo com Breteler (1995), subdivide-se em cinco tribos: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae, Detarieae e Macrolobieae. A tribo Cassieae inclui cinco subtribos: Cassiinae, Ceratoniinae, Dialiinae, Duparquetiinae e Labicheinae (Irwin & Barneby, 1981). Cassiinae é a segunda maior subtribo de Cassieae, apresentando três gêneros resultantes da divisão de *Cassia lato sensu*: *Cassia stricto sensu*, *Senna* e *Chamaecrista*.

Senna é um dos maiores gêneros da família Fabaceae, apresentando cerca de 350 espécies (Marazzi & Sanderson, 2010) de distribuição circuntropical, ocorrentes em maior número nas Américas e pouco frequente na Ásia e Oceania. Possui uma grande diversidade de hábitos, incluindo ervas, arbustos, arvoretas, árvores altas e lianas (Marazzi *et al.*, 2006a).

Análises filogenéticas baseadas somente em dados moleculares tem se mostrado insuficientes para solucionar as relações entre os gêneros de Cassiinae, enquanto informações estruturais a respeito dos órgãos reprodutivos das espécies de Fabaceae vêm sendo utilizadas com sucesso para esta finalidade (Gunn, 1984; Lima, 1989; De-Paula & Oliveira, 2012). Desta forma, é cada vez maior a procura por informações a respeito dos frutos, sementes e plântulas de espécies de Fabaceae, de forma a complementar aquelas provenientes de órgãos vegetativos e dados moleculares. Dentre os autores que ressaltam a importância de estudos básicos, incluindo características morfológicas dos embriões, destaca-se Gunn (1984), que analisou a morfologia de frutos e sementes de diversos gêneros de Mimosoideae.

De forma semelhante aos órgãos reprodutivos, as estruturas secretoras têm sido utilizadas na sistemática. Em *Senna*, por exemplo, a variação da forma, número e localização de nectários extraflorais foram utilizados em estudos taxonômicos (Irwin & Barneby, 1982; Marazzi *et al.*, 2006b), e sua distribuição, dentro do gênero, tem sido recentemente explorada num contexto filogenético molecular (Marazzi *et al.* 2006a). Entretanto, não foram encontrados estudos envolvendo coléteres em Fabaceae com aplicação taxonômica.

Coléteres são estruturas glandulares que produzem secreção mucilaginosa e/ou resinosa, podem estar presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos e desempenham, sobretudo, a função de proteção contra a dessecação de órgãos em início de desenvolvimento. Estas estruturas diferenciam-se nos órgãos ainda em formação, geralmente nas proximidades do ápice caulinar e apresentam grande diversidade de forma, além de serem estruturalmente simples (Thomas, 1991). O presente trabalho tem por objetivos relatar a ocorrência de coléteres em embriões de espécies de *Senna* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae, Cassiinae), descrever a sua organização estrutural, elucidar alguns aspectos funcionais e fornecer dados que possam ser úteis na melhor compreensão das relações entre os gêneros da subtribo.

Material e Métodos

Material vegetal

As amostras foram obtidas de indivíduos de *Senna hirsuta*, *Senna macranthera*, *Senna obtusifolia*, *Senna occidentalis* e *Senna pentagonia* cultivados no campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ramos férteis foram herborizados para deposição no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para fins de documentação e identificação.

Microscopia de luz

Para análise anatômica, amostras de 30 sementes maduras de *Senna hirsuta*, *Senna macranthera* e *Senna pentagonia* foram embebidas em água destilada por 24 horas. A análise do desenvolvimento dos coléteres, foi realizada em 10 sementes de *Senna hirsuta*, *Senna obtusifolia* e *Senna occidentalis* coletadas no ponto de maturação fisiológica e em 35 sementes maduras escarificadas com lixa d'água e colocadas para germinar em caixas *gerbox* com vermiculita. As sementes foram mantidas em temperatura ambiente, e umedecidas com água destilada. A cada 24 horas, durante sete dias, um lote de 5 sementes ou sementes germinadas ou plântulas foram coletadas e fixadas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram a protrusão da raiz primária, e plântula a estrutura pós-seminal até a completa expansão do primeiro eofilo. A fixação das amostras foi realizada em solução de Karnovsky por 24 horas (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica, incluídas em resina sintética (2-hidroxi-etil)-metacrilato Leica®, conforme indicação do fabricante e seccionadas (5µm) no plano longitudinal em micrótomo rotativo (Zeiss Hyrax M40), coradas com solução

aquosa de vermelho de rutênio (Johansen, 1940), ou solução aquosa de vermelho de rutênio e azul de toluidina 0,05%, pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964). As lâminas histológicas foram montadas com resina sintética Entellan®. A documentação fotográfica foi realizada em microscópio de luz com câmera acoplada (Leica ICC50 HD), obtendo-se imagens digitais (software Leica Application Suite LAS EZ).

Testes histoquímicos foram realizados para a detecção de polissacarídeos ácidos, com solução aquosa de vermelho de rutênio foram (Johansen, 1940). As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Leica ICC50 HD).

Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de sementes germinadas de *Senna macranthera*, *Senna occidentalis* e plântulas de *Senna hirsuta* foram fixadas em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2), desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico utilizando CO₂ segundo protocolo padrão (Robards, 1978). Os fragmentos contendo os coléteres foram cobertos com ouro em metalizador e a captura de imagens foi obtida em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

Resultados

Caracterização morfoanatômica

Nos embriões, os coléteres localizam-se nas axilas dos cotilédones, lateralmente à plúmula, no ápice do eixo embrionário e nas plântulas também são observados no nó cotiledonar (Figs. 1 e 2). Em *S. hirsuta* os coléteres têm formato alongado, como pode ser observado na plântula (Fig. 1A), nas demais espécies são claviformes, com a base mais larga que o ápice (Figs. 1C-D). Os coléteres apresentam epiderme com células justapostas (Fig. 1B) e são preenchidos por células uniformes, de citoplasma denso e paredes celulares delgadas. (Figs. 3B). Não foram observados elementos vasculares nos coléteres.

Os coléteres estão presentes no embrião mesmo antes da maturação da semente, neste estágio é possível observar uma pequena quantidade de secreção (Fig. 3A). A secreção observada possui aspecto viscoso, apresentando resultado positivo no teste com vermelho de rutênio, evidenciando a presença de polissacarídeos ácidos, característico de mucilagens.

Durante o processo de germinação da semente, os coléteres também se encontram presentes e ativos, apresentando um pico de secreção em sementes recém germinadas,

aproximadamente 24 horas após as sementes terem sido colocadas para germinar, período em que observamos um filme de secreção cobrindo a região da apical e as laterais do eixo da plântula (Fig. 3C).

Os coléteres do nó cotiledonar apresentam-se secretores mesmo após a germinação da semente, que ocorre de 24 a 36 horas, quando a plântula começa a se desenvolver. A presença de secreção foi observada até o 4º dia (Fig. 3D), e após o 7º dia os coléteres do nó cotiledonar estão senescentes e a secreção passa a ser produzida por coléteres do nó posterior, o primeiro nó eofilar (Fig. 3E).

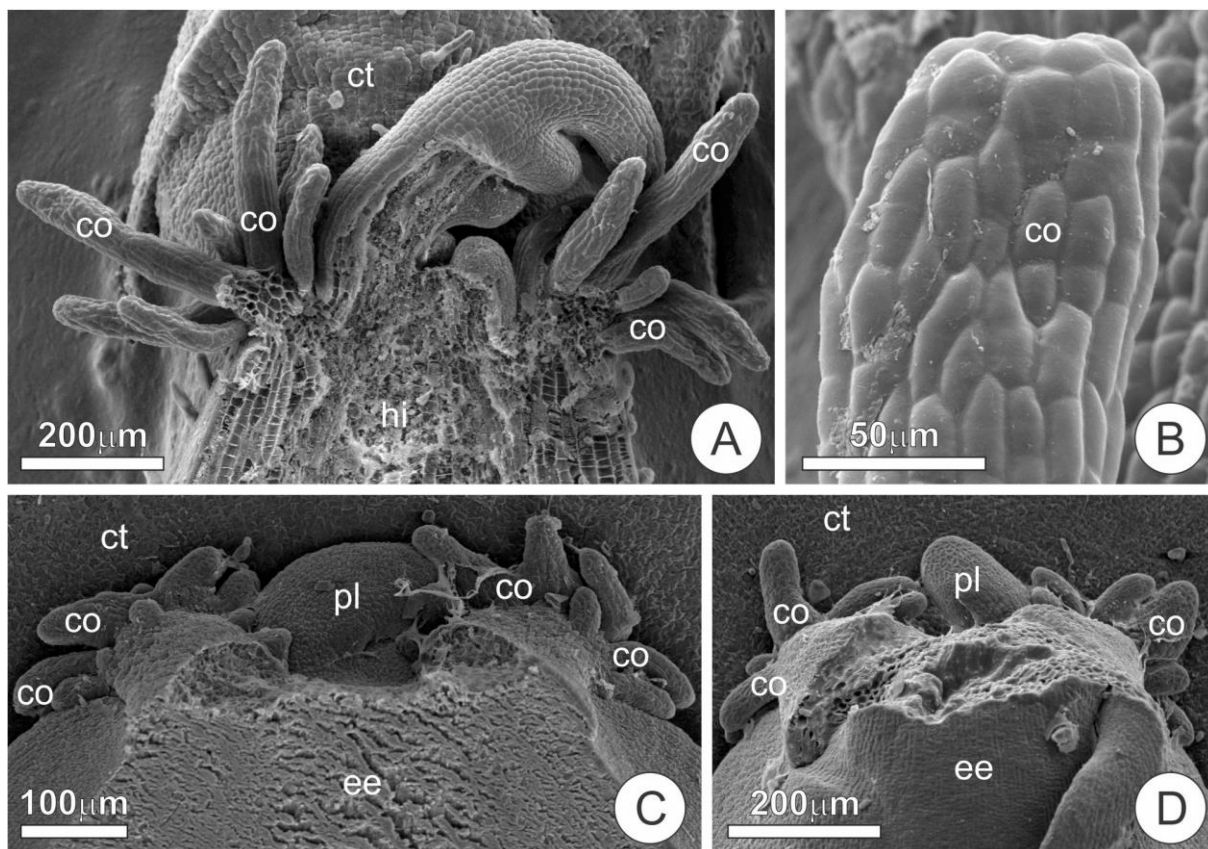


Figura 1. Coléteres em embriões e plântula de espécies de *Senna*. **A.** Coléteres na plântula de *Senna hirsuta*. **B.** Detalhe do coléter em plântula de *Senna hirsuta*. **C.** Coléteres em embrião *Senna macranthera*. **D.** Coléteres em embrião *Senna occidentalis*. (co- coléter, ct- cotilédone, ee- eixo embrionário, hi- hipocótilo, pl- plúmula).

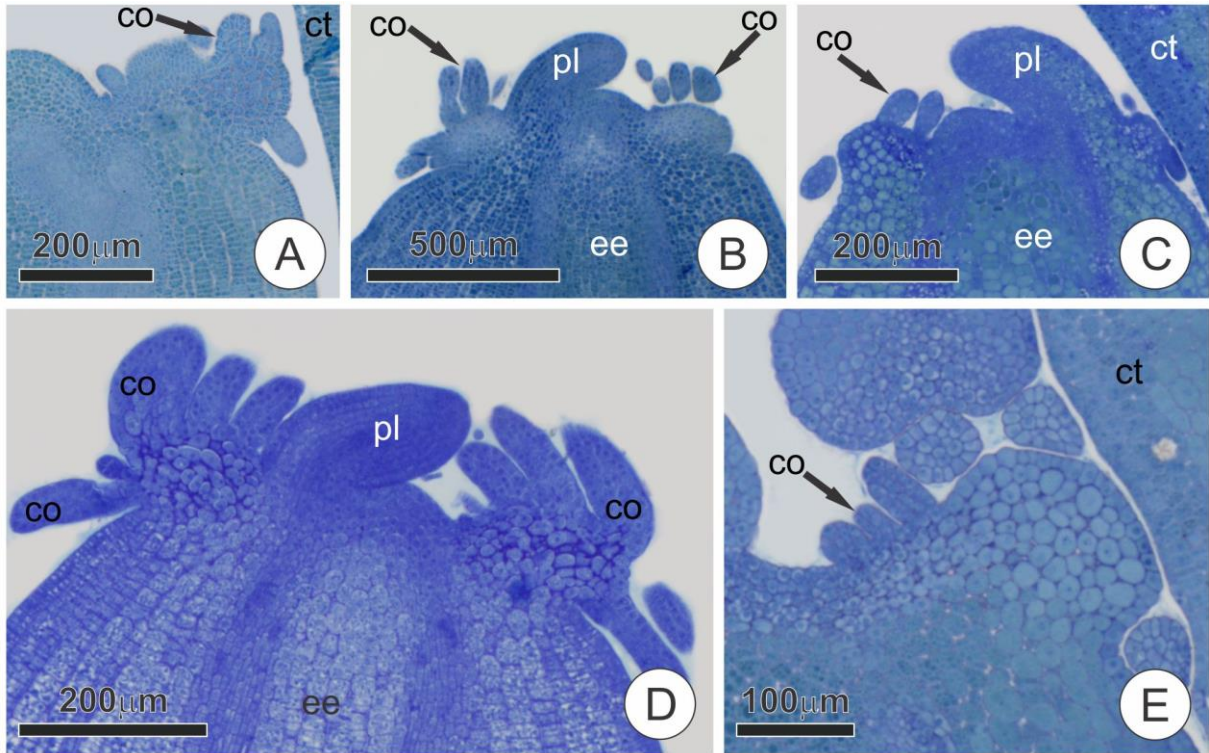


Figura 2. Coléteres em embriões de espécies de *Senna* localizados nas axilas dos cotilédones. **A.** *Senna hirsuta*. **B.** *Senna macranthera*. **C.** *Senna obtusifolia*. **D.** *Senna occidentalis*. **E.** *Senna pentagonia*. (co- coléter, ct- cotilédone, ee- eixo embrionário, pl- plúmula).

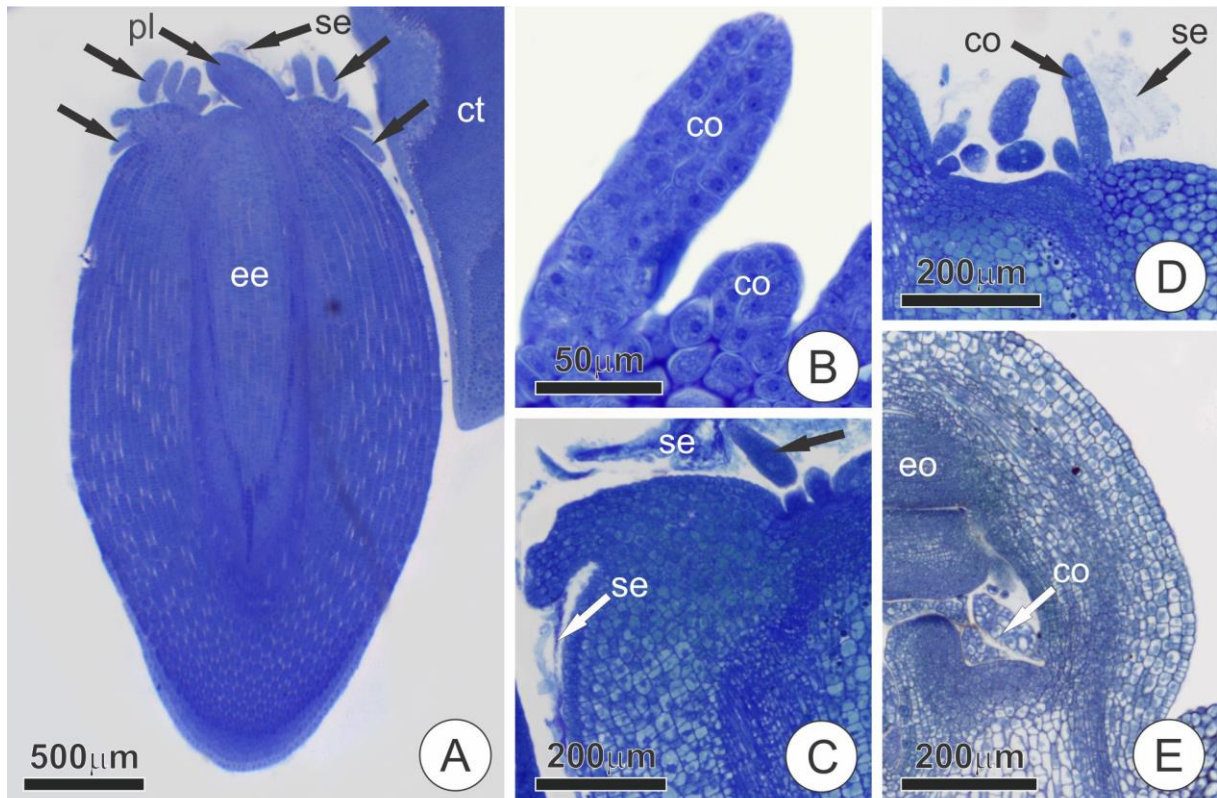


Figura 3. Desenvolvimento dos coléteres do embrião e plântula de *Senna obtusifolia*. **A.** Embrião proveniente da semente desenvolvida antes da desidratação. **B.** Detalhe do coléter. **C.** Coléter (seta) na plântula em sementes recém germinadas, observar o filme de secreção cobrindo o ápice do embrião e sua lateral. **D.** Coléter na plântula de 4 dias, ainda exibindo produção de secreção. **E.** Coléter no eofilo em desenvolvimento na plântula de 7 dias. (co- coléter, ct- cotilédone, ee- eixo embrionário, pl- plúmula, se- secreção).

Discussão

Caracterização morfoanatômica

Os coléteres presentes nos embriões e plântulas das espécies de *Senna* estudadas, não se encaixam nos padrões morfológicos definidos por Lersten (1974a, b), por não apresentarem distinção entre epitélio secretor e eixo central. Além disto, a homogeneidade no que se refere à composição celular destes coléteres constitui indícios de que estes sejam estruturas puramente epidérmicas, como reportado por Paiva & Machado (2006a) e Paiva (2009) para outras duas espécies de Fabaceae. Como os coléteres não são vascularizados, sugere-se que a condução dos elementos precursores da secreção seja feita de célula-a-célula por via simplástica. Coléteres não vascularizados são comuns e já foram estudados em várias famílias de plantas como Apocynaceae (Apezzato-da-Glória & Estelita, 2000), Caryocaraceae (Paiva & Machado, 2006b), Rubiaceae (Vitarelli & Santos, 2009), Myrtaceae (da Silva *et al.*, 2012).

A secreção dos coléteres é composta por mucilagem, que são constituídas principalmente por heteropolissacarídeos ácidos e/ou neutros (substância de caráter hidrofílico), proteínas e compostos fenólicos, de ampla distribuição nos vegetais (Priolo De Lufrano & Caffini, 1981; Roshchina & Roshchina, 1993).

Segundo Paiva (2009), a secreção dos coléteres exibe capacidade de sofrer ciclos sucessivos de hidratação e desidratação; esta é uma característica importante, já que a secreção dos coléteres dos embriões está presente antes da semente entrar em processo de desidratação, desidratando junto com a semente que completa seu ciclo de maturação, ficando pronta para a dispersão. Na presença de condições favoráveis à germinação, a semente reidrata, assim como a secreção eliminada pelos coléteres embrionários, que envolve a plúmula. A secreção continua sendo produzida pelos coléteres do eixo cotiledonar durante todo o processo de germinação e desenvolvimento da plântula até o sétimo dia. Esta secreção aparentemente ajuda a manter o nível de umidade adequado para a germinação da semente e estabelecimento da plântula.

A presença de coléteres na axila cotiledonar dos embriões de *Senna* parece constituir uma adaptação à germinação em condições adversas de umidade, uma vez que o caráter hidrofílico da secreção propicia a retenção de água, mantendo o embrião úmido, facilitando sua germinação. A presença dos coléteres no nó cotiledonar em plântulas de até sete dias, mantém o ápice da plântula úmido durante o período mais suscetível à desidratação. Trabalhos envolvendo aspectos fisiológicos e ecológicos da germinação dessas sementes devem ser conduzidos no futuro, no sentido ampliar o estudo dos coléteres.

Aspectos taxonômicos

Os registros da ocorrência de coléteres em Caesalpinioideae são relativamente recentes, e restritos à *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado, 2006a), *Chamaecrista* (De-Paula & Oliveira, 2007; De-Paula & Oliveira, 2012; Coutinho *et al.*, 2013), e *Copaifera langsdorffii* (Paiva, 2009). Mas, estima-se sua ocorrência possa ser bem mais ampla nesta subfamília (Amélia-Souza & Paiva, dados não publicados), o que é corroborado pelos resultados aqui apresentados. Para as sementes, este é o segundo gênero em que se registra a presença de coléteres, sendo o primeiro, *Chamaecrista* (De-Paula & Oliveira, 2007; De-Paula & Oliveira, 2012), da mesma subtribo de *Senna*.

O valor taxonômico das características do embrião tem sido destacado por diversos autores (Polhil *et al.*, 1981; Kirkbride Jr. *et al.*, 1994; Oliveira, 1999, De-Paula & Oliveira,

2012), mesmo considerando apenas os aspectos morfológicos. No entanto, dados anatômicos ainda são escassos para os embriões da maioria das espécies de plantas.

Segundo Thomas (1991), a presença e distribuição dos coléteres possui valor taxonômico indiscutível e pode acrescentar importantes informações, tanto para trabalhos taxonômicos e filogenéticos, quanto para ecológicos.

Apesar de *Cassia s.s.*, *Chamaecrista* e *Senna* apresentarem muitas características morfológicas em comum, como folhas usualmente paripinadas com folíolos opostos, inflorescências racemosas, flores hermafroditas, anteras basifixas (Irwin & Barneby 1982), e as análises filogenéticas indicarem que Cassiinae é um grupo monofilético (Lewis *et al.*, 2005), o relacionamento entre os três gêneros ainda não está claro (Doyle *et al.*, 2000; Kajita *et al.*, 2001; Marazzi *et al.*, 2006a). Neste contexto, a análise da presença dos coléteres em embriões e plântulas podem fornecer informações úteis para o estabelecimento das relações entre os gêneros de Cassiinae, uma vez que os coléteres foram observados em *Chamaecrista* e *Senna*, deve-se agora investigar se os mesmos estão presentes também em *Cassia*.

Referências bibliográficas

- Appezato-da-Glória B, Estelita MEM. 2000.** Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **23**(2): 113–120.
- Breteler FJ. 1995.** *The boundary between Amherstieae and Detarieae (Caesalpinioideae)*. In *Advances in Legume Systematics, part 7* (Crisp MD, Doyle JJ, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2013.** Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): new evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1709–1720.
- Da Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA. 2012.** Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **60**: 707-717.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2007.** Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biociências* **5**(1): 348–350.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2012.** Seed ontogeny of *Chamaecrista* and its systematic implications in Cassiinae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **298**(9): 1659-1669.

- Doyle JJ, Chappill JA, Bailey CD, Kajita T. 2000.** *Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data.* In *Advances in Legume Systematics*, part 9 (Herendeen PS, Bruneau A, eds.). Kew Publishing, Kew.
- Gunn CR. 1984.** Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae). *Technical Bulletin* **1681**:1-194.
- Irwin HS, Barneby RC. 1981.** *Tribe 2. Cassieae Bronn (1822).* In *Advances in Legume Systematics* part 1 (Polhill RM, Raven PH, eds.). Kew Publishing, Kew.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** The American Cassiinae, a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique.* McGraw-Hill Book Company, New York.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002.** *Plant systematics, a phylogenetic approach.* Sinauer Associates, Sunderland.
- Kajita T, Ohashi H, Tateishi Y, Bailey CD, Doyle JJ. 2001.** *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany* **26**:515–536.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- Kirkbride Jr. JH, Gunn CR, Ritchie CA. 1994.** *Seed and fruit phylogenies of Caesalpinioideae and Mimosoideae (Fabaceae) and their tribes.* In *Advances in Legume Systematics* (Ferguson IK, Tucker SC, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lersten NR. 1974a.** Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of Linnean Society* **69**: 125-136.
- Lersten NR. 1974b.** Morphology and distribution of colleters and crystals in relation of the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **61**: 973-981.
- Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M. 2005.** *The legumes of the world.* Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lima HC. 1989.** Tribo Dalbergieae (Leguminosae Papilionoideae) - morfologia dos frutos, sementes e plântulas e sua aplicação na sistemática. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* **30**:1-42.
- Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E. 2006a.** Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288–303.

Marazzi B, Fortunato R, Endress PK & Spichiger R. 2006b. *Senna* (Cassiinae, Leguminosae) in Paraguay: synopsis, conservation, ecologic role and ethnobotany. *Candollea* **61**:315-329.

Marazzi B, Sanderson, MJ 2010. Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectarines. *Evolution* **64**: 3570-3592.

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

Oliveira DMT. 1999. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. *Revista Brasileira de Botânica* **22**: 413-427.

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

Paiva EAS, Machado SR. 2006a. Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) colleters. *Revista de Biologia Tropical* **54(3)**: 943–950.

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

Polhill RM, Raven PH, Stirton CH. 1981. *Evolution and systematics of the Leguminosae*. In: *Advances in Legume Systematics* (Polhill RM, Raven PH, eds.). Crown Copyright, Kew.

Priolo De Lufrano NS, Caffini, NO. 1981. Mucílagos foliares de *Chorisia* H.B.K. (Bombacaceae): análisis fitoquímico e enfoque quimiotaxonômico. *Phyton* **40**: 13-20.

Robards AW. 1978. *An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells*. In *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells* (Hall JL, ed.). Elsevier, New York.

Roshchina VV, Roshchina VD. 1993. *The excretory fuction of higher plants*. Springer-Verlag, Berlin.

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

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

Capítulo V

Coléteres florais em Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae): relevância taxonômica

Resumo

Estruturas secretoras tem se mostrado bons marcadores taxonômicos, sendo empregadas também em análises filogenéticas. Apesar dos registros de presença de coléteres em Caesalpinioideae serem recentes, a ocorrência destes parece ser bastante ampla, o que somada a diferentes padrões de distribuição, pode conferir a estas estruturas relevância taxonômica e filogenética. Assim, o presente trabalho tem por objetivos fazer o registro inédito da ocorrência de coléteres em flores de espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae) e analisar a distribuição dos coléteres à luz das análises filogenéticas do grupo. Flores e botões florais foram coletados e analisados sob estereomicroscópio, e flores/botões de alguns táxons foram processados para estudos estruturais ao microscópio eletrônico de varredura. No gênero *Cassia*, os coléteres estão presentes em *Cassia* sp. e *C. fistula*, na base das sépalas, e em *C. javanica*, na base das pétalas. Já em *Chamaecrista*, os coléteres foram observados nas seções *Apoucouita*, *Caliciopses*, *Chamaecrista* e *Xerocalyx*, e estão ausentes nas seções *Absus* e *Grimaldia*; porém as espécies destas duas seções apresentam tricomas glandulares nas sépalas, que não ocorrem nas demais espécies. Em *Senna*, os coléteres florais foram observados em todas as espécies analisadas, tendo uma distribuição única na subtribo Cassiinae: dispersos pelo receptáculo floral. Devido a presença dos coléteres florais em um relevante número de espécies de Cassiinae, os mesmos podem ser utilizados, juntamente com outros dados morfológicos e moleculares, como caracteres auxiliares na interpretação do relacionamento dos gêneros *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista* na subtribo Cassiinae

Palavras-chave: Cassiinae; coléteres; distribuição; Fabaceae; filogenia

Abstract

Secretory structures has shown good taxonomic markers, and is also used in phylogenetic analyzes. Despite reports the presence of colleters in Caesalpinioideae are recent, their occurrence appears to be quite broad, which added different distribution patterns, gives these structures taxonomic and phylogenetic relevance. Thus, this study aims to make the unprecedented occurrence record of these structures in specie flowers of subtribe Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae) and analyze the colleters distribution in Cassiinae in the light of phylogenetic analysis of the group. Flowers and flower buds were collected and analyzed under stereophotograph microscope, and flowers/buds of some taxa were processed for the structural scanning electron microscope studies. In the genus *Cassia*, colleters are present in *Cassia* sp. and *C. fistula* on the sepals base, and *C. javanica* on the petals base. Already in *Chamaecrista*, colleters were observed in sections *Apoucouita*, *Caliciopses*, *Chamaecrista* and *Xerocalyx*, and are absent in the sections *Absus* and *Grimaldia*, but the species of these two sections have glandular trichomes on the sepals, which do not occur in other species. In *Senna*, floral colleters were observed in all species, with a single distribution in the subtribe Cassiinae: scattered throughout the floral receptacle. Due to the floral colleters presence in a relevant number of Cassiinae species, they can be used together with other morphological and molecular data, such as character assist in interpreting the relationship of the genera *Cassia*, *Senna* and *Chamaecrista* in subtribe Cassiinae.

Keywords: Cassiinae; colleters; distribution; Fabaceae; phylogeny

Introdução

Fabaceae é a terceira maior família das Angiospermas, apresentado aproximadamente 730 gêneros e 19.500 espécies de distribuição cosmopolita (Lewis, 2005). A família é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae (Judd *et al.*, 2002). Das três subfamílias, Caesalpinioideae é tida como grupo ancestral dentre as leguminosas, possuindo as tribos Cassieae, Cercideae e Caesalpinieae que se diferenciaram próximo ao Cretáceo (Polhill *et al.*, 1981). Com os estudos moleculares recentes, Cercideae foi separada da subfamília, sendo considerada o grupo mais ancestral das leguminosas (Lavin *et al.*, 2005).

A tribo Cassieae inclui cinco subtribos, Cassiinae, Ceratoniinae, Dialiinae, Duparquetiinae e Labicheinae (Irwin & Barneby, 1981). Cassiinae é a segunda maior subtribo de Cassieae, apresentando três gêneros resultantes da divisão de *Cassia lato sensu*: *Cassia stricto sensu*, *Senna* e *Chamaecrista*.

A subtribo Cassiinae é definida por caracteres florais que podem ser interpretados como especializações para polinização por abelhas de grande porte (*buzz polination*), como anteras poricidas e em muitos casos enantiostilia (Irwin & Barneby, 1981, 1982; Marazzi *et al.*, 2006).

O gênero *Cassia s.s.* apresenta aproximadamente 30 espécies de distribuição circuntropical (América, África, Madagascar, Ásia, Malásia e Austrália). *Senna* compreende cerca de 350 espécies (Marazzi & Sanderson, 2010), também de distribuição circuntropical, em maior número nas Américas, muito pouco frequente na Ásia e Oceania (Lewis, 2005); *Chamaecrista* possui aproximadamente 330 espécies, principalmente neotropicais, centradas especialmente no leste do Brasil (Lewis, 2005).

Estruturas secretoras podem constituir bons marcadores taxonômicos (ver Solereder, 1908) e têm sido empregadas com este propósito em diversos grupos taxonômicos, com destaque para as Fabaceae (Irwin & Barneby, 1982; Marazzi *et al.*, 2006; 2012). Segundo Thomas (1991) a presença e distribuição dos coléteres possui valor taxonômico indiscutível e pode acrescentar importantes informações, tanto para trabalhos taxonômicos e filogenéticos, quanto para ecológicos, como podemos observar em Myrtaceae (da Silva *et al.*, 2012). Coléteres são estruturas glandulares que produzem secreção mucilagínosa e/ou resinosa, podem estar presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, e desempenham, sobretudo, a função de proteção contra dessecação durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Thomas, 1991).

Assim, considerando o potencial dos coléteres como marcadores taxonômicos e sua possível relevância nos estudos filogenéticos, o presente trabalho tem por objetivo fazer o registro inédito da ocorrência destas estruturas em flores de espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae). Pretende-se, ainda, analisar a distribuição dos coléteres em Cassiinae à luz das análises filogenéticas do grupo.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram coletados botões florais (pré-antese) e flores em antese de 6 (seis) espécies de *Cassia*, 75 (setenta e cinco) de *Chamaecrista* e 58 (cinquenta e oito) de *Senna*, totalizando 139 (cento e trinta e nove) espécies da subtribo Cassiinae (Tabela 1). Também foram coletados botões florais dos táxons *Caesalpinia decapetala*, *C. echinata*, *Libidibia ferrea*, *Poincianella bracteosa*, *P. gardneriana*, que aparecem compondo um grupo irmão de Cassiinae em filogenias recentes (Bruneau *et al.*, 2008; Manzanila & Bruneau, 2012), e dos táxons *Melanoxylon brauna* e *Vouacapoua americana* que aparecem no mesmo clado das espécies de Cassiinae (Tabela 1). Grande parte das espécies foi amostrada de material herborizado (Tabela 2, em anexo). As espécies analisadas *in vivo* foram obtidas de cultivo no campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ou coletadas em campo. Ramos férteis das espécies analisadas foram herborizados para a deposição no Herbário BHCB do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para fins de documentação e identificação.

Botões florais e flores em antese, de todas as espécies em estudo, foram analisados em estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000-C) para detectar a presença de coléteres, descrever o padrão de distribuição e a quantificação dos coléteres. A quantificação foi realizada por meio de contagem do número de coléteres, em cinco flores/botões, de pelo menos dois indivíduos, o número final foi obtido através de média simples. Para a análise das amostras obtidas em material herborizado empregou-se o método de reversão da herborização proposto por Smith & Smith (1942).

Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos de flores contendo coléteres de *Cassia javanica*, *Cassia* sp., *Chamaecrista cinerascens*, *Senna obtusifolia* e *S. pentagonia* foram preparados para observação em microscopia eletrônica de varredura. A análise da micromorfologia de superfície foi realizada

a partir do material fixado em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2). Após desidratação em série etílica, o material foi desidratado ao ponto crítico utilizando CO₂ segundo protocolo padrão (Robards, 1978). Os fragmentos foram cobertos com ouro em metalizador e a captura de imagens foi obtida em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

Resultados

A presença de coléteres foi observada em indivíduos dos três gêneros que compõem a subtribo Cassiinae. A distribuição dos coléteres foi distinta em cada um dos gêneros (Tabela 1; Fig. 1).

Nas espécies de *Cassia* analisadas, os coléteres foram observados em *C. fistula*, *C. javanica* e *Cassia* sp. Em *C. fistula* e *Cassia* sp. nas quais estas estruturas estão localizadas na base das sépalas, são alongadas e escassas (Figs.1C-D), já em *C. javanica* os coléteres se encontram na base das pétalas e apresentam forma peculiar dentro do grupo de estudo, sendo filiformes com uma cabeça secretora globosa (Figs. 1E-F).

Nas espécies de *Chamaecrista*, a posição dos coléteres apresentou variação interespecífica, podendo ocorrer na base das sépalas, na base das pétalas, na base das sépalas e pétalas ou, ainda, na base das brácteas (Tabela 1). Os coléteres em *Chamaecrista* são alongados (Figs. 1A-B) e pouco numerosos, podendo ser escassos como em *C. cinerascens* (Figs. 1A-B) e *C. unijuga*, a pouco numerosos como em *C. eitenorum* var. *eitenorum* e *C. ramosa* var. *parvifoliola*. As espécies da seção *Absus* não apresentaram coléteres, a exceção de uma única espécie, *C. jacobinea*. Do mesmo modo, a seção *Grimaldia* não apresentou espécies com coléteres, e ao contrário destas, as seções *Apoucouita*, *Chamaecrista*, *Caliciopsis* e *Xerocalyx* todas as espécies analisadas apresentaram coléteres. Entretanto, nas espécies de *Chamaecrista* em que não foram observados coléteres, tricomas glandulares estão distribuídos na superfície abaxial das sépalas (Tabela 1). As espécies da seção *Xerocalyx* foram as únicas que apresentaram coléteres na base das brácteas.

Todas as espécies de *Senna* observadas apresentaram coléteres. Neste gênero os coléteres se distribuem na base das sépalas, base das sépalas e pétalas ou por todo o receptáculo floral. Os coléteres são mais curtos e curvos que os aqueles observados em *Cassia* e *Chamaecrista* (Figs. 1G-H), variando o número entre as espécies (Tabela 1.). O gênero *Senna* foi o único que apresentou espécies com coléteres abundantes.

Nas espécies *Caesalpinia decapetala*, *C. echinata*, *Libidibia ferrea*, *Poincianella bracteosa*, *P. gardneriana*, *Melanoxylon brauna*, e *Vouacapoua americana*, os coléteres não foram observados.

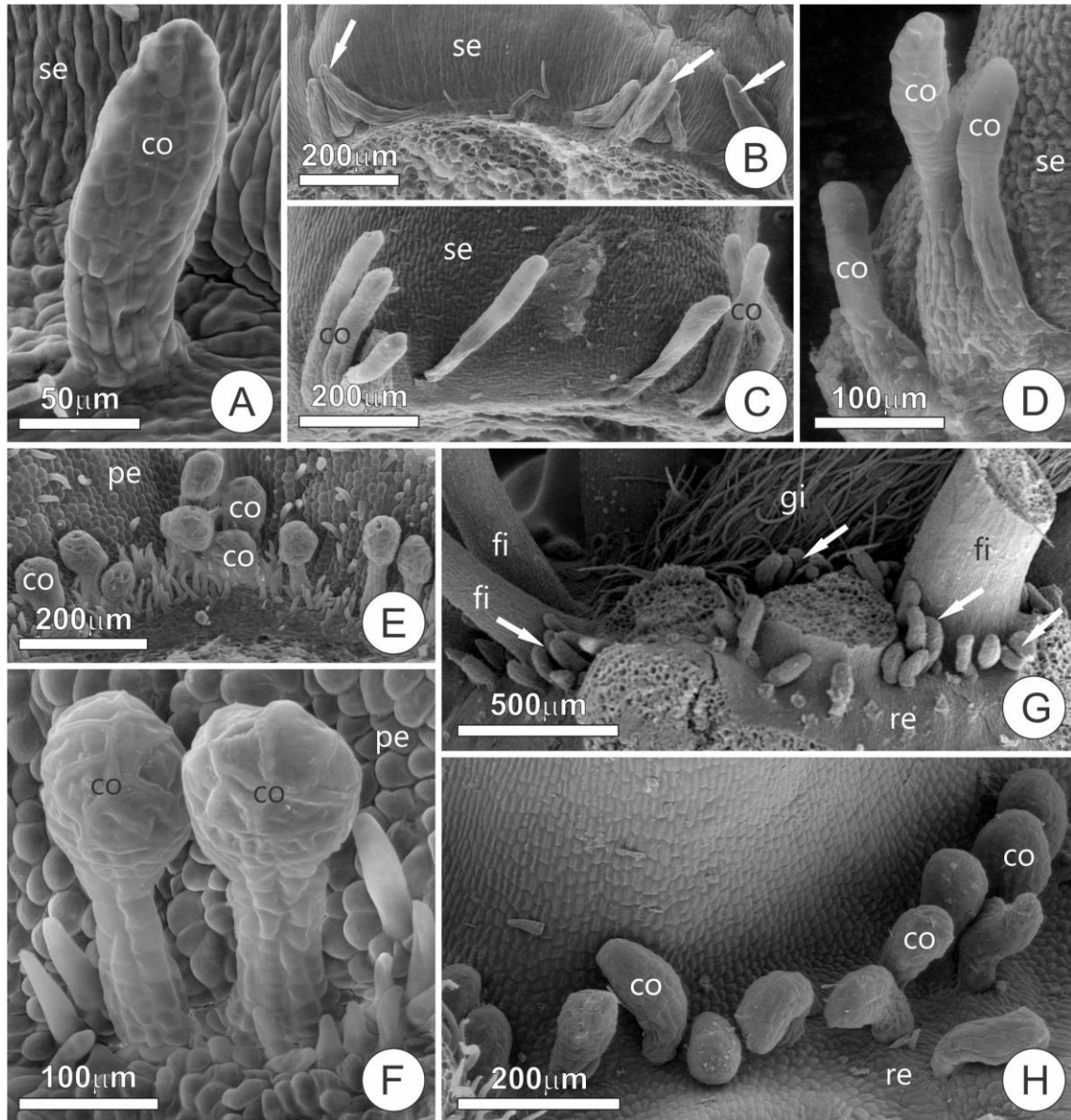


Figura 1. Distribuição e morfologia dos coléteres florais em Cassiinae. **A-B.** *Chamaecrista cinerascens*. **C-D.** *Cassia* sp. **E-F.** *Cassia javanica*. **G.** *Senna obtusifolia*. **H.** *Senna pentagonia*. (co- coléter, fi- filete, gi- gineceu, pe- pétala, re- receptáculo, se- sépala, seta branca- coléteres).

Tabela 1. Distribuição dos coléteres nas espécies da subtribo Cassiinae

Espécie	Seção	Presença de coléteres	Distribuição dos coléteres	Presença de tricomas glandulares na sépala
<i>Cassia ferruginea</i>	-	-	-	-
<i>Ca. Fistula*</i>	-	+	Base das sépalas	-
<i>Ca. grandis*</i>	-	-	-	-
<i>Ca. javanica*</i>	-	+	Base das pétalas	-
<i>Ca. leptophylla</i>	-	-	-	-
<i>Ca. sp.</i>	-	+	Base das sépalas	-
<i>Chamaecrista acosmiifolia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. andromedea</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. astrochiton</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. botryoides</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. campestris</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. cathartica</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. catharticoides</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. cavalcantina</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. cipoana</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. cotinifolia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. crommyotricha</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. cytisoides</i>	<i>Absus</i>	-	-	-
<i>C. dalbergiifolia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. debilis</i>	<i>Absus</i>	-	-	-
<i>C. dentata</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. fagonioides</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. filicifolia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. geminata</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. hedyaroides</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. hispidula</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. incurvata</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. itambana</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. jacobinea</i>	<i>Absus</i>	+	Base das sépalas	+
<i>C. multipennis</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. neesiana</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. nummulariifolia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. obtecta</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. oligosperma</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. orbiculata</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. philippi</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. punctata</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. secunda</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. semaphora</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. setosa</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. stillifera</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. thephrosifolia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. trachycarpa</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. urophyllidia</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. ursina</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. zygothylloides</i>	<i>Absus</i>	-	-	+
<i>C. aspleniifolia</i>	<i>Apoucouita</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. bahiae</i>	<i>Apoucouita</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. duartei</i>	<i>Apoucouita</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. eitenorum</i> var. <i>regana</i>	<i>Apoucouita</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. ensiformis</i>	<i>Apoucouita</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. onusta</i>	<i>Apoucouita</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. polystachya</i>	<i>Apoucouita</i>	+	Base das sépalas e pétalas	-
<i>C. subpeltata</i>	<i>Apoucouita</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. calycioides</i>	<i>Caliciopsis</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. duckeana</i>	<i>Caliciopsis</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. aristata</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-

<i>C. basifolia</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. choriophylla</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. flexuosa</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. lagotois</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. mucronata</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. nictitans</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. olesiphylla</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. pascuorum</i>	<i>Chamaecrista</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. pilosa</i>	<i>Chamaecrista</i>	++	Base das sépalas	-
<i>C. potentilla</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. repens</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. rorimae</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. rotundata</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. rotundifolia</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. serpens</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. simpliflora</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. tragacanthoides</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. venulosa</i>	<i>Chamaecrista</i>	+	Base das sépalas	-
<i>C. absus</i> var. <i>absus</i>	<i>Grimaldia</i>	-	-	+
<i>C. absus</i> var. <i>meononandra</i>	<i>Grimaldia</i>	-	-	+
<i>C. desvauxii</i> var. <i>gramínea</i>	<i>Xerocalyx</i>	++	Base das brácteas	-
<i>C. diphylla</i>	<i>Xerocalyx</i>	++	Base das brácteas	-
<i>C. ramosa</i> var. <i>parvifoliola</i>	<i>Xerocalyx</i>	++	Base das brácteas	-
<hr/>				
<i>Senna acutisejala</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. affinis</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. angulata</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. appendiculata</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. araucarietorum</i>	<i>Chamaefistula</i>	+	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. cana</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. cernua</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. chrysocarpa</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. corifolia</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Base das pétalas, Face adaxial das pétalas e distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. corymbosa</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. gardneri</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. georgica</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. guatemalensis</i> var. <i>hidalgensis</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. harleyi</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. hayesiana</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. hilariana</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. hirsuta</i> *	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. latifolia</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. lechriosperma</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. macranthera</i> *	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. neglecta</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. obtusifolia</i> *	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. occidentalis</i> *	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. organensis</i>	<i>Chamaefistula</i>	+	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. pendula</i> *	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. pentagonia</i> *	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. pilifera</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. pinheiroi</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. reniformis</i> *	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. rizzini</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. rugosa</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. siamea</i> *	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. silvestris</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. splendida</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. tapajozensis</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. tenuifolia</i>	<i>Chamaefistula</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. uniflora</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. velutina</i>	<i>Chamaefistula</i>	+++	Base das pétalas, Face adaxial	-

<i>S. paradictyon</i>	<i>Paradictyon</i>	+	das pétalas e distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. acuruensis</i>	var. <i>Peiranisia caatingae</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. aphylla</i>	<i>Peiranisia</i>	+++	Base das sépalas	-
<i>S. aristeguietae</i>	<i>Peiranisia</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. atomaria</i>	<i>Peiranisia</i>	+	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. aversiflora</i>	<i>Peiranisia</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. chloroclada</i>	<i>Peiranisia</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. formosa</i>	<i>Peiranisia</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. mollissima</i>	<i>Peiranisia</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. multijuga*</i>	<i>Peiranisia</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. pallida</i>	var. <i>Peiranisia brachyrrhachis</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. pallida</i> var. <i>delgadoana</i>	<i>Peiranisia</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. rostrata</i>	<i>Peiranisia</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. spectabilis</i>	<i>Peiranisia</i>	+	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. trachypus</i>	<i>Peiranisia</i>	++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. martiana*</i>	<i>Senna</i>	+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. bracteosa</i>		+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. catinae</i>		++	Base das sépalas e pétalas	-
<i>S. cearensis</i>		+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<i>S. phebadenia</i>		+++	Distribuídos pelo receptáculo	-
<hr/>				
<i>Caesalpinia decapetala</i>		-	-	-
<i>C. echinata</i>		-	-	-
<hr/>				
<i>Libidibia ferrea</i>		-	-	-
<hr/>				
<i>Melanoxylon brauna</i>		-	-	-
<hr/>				
<i>Poincianella bracteosa</i>		-	-	-
<i>P. bracteosa</i>		-	-	-
<hr/>				
<i>Vouacoupa americana</i>		-	-	-

*Material analisado *in vivo*

(-) coléteres ausentes

(+) coléteres escassos (1-50)

(++) coléteres pouco numerosos (51-150)

(+++) coléteres numerosos (>151)

Discussão

Subtribo Cassiinae

O presente estudo relata pela primeira vez a presença de coléteres florais em espécies dos três gêneros que compõe a subtribo Cassiinae. Os dados da presença de coléteres em Cassiinae eram restritos aos embriões (De-Paula & Oliveira, 2007; De-Paula & Oliveira, 2012) e folhas de *Chamaecrista* (Coutinho *et al.*, 2013). Os dados obtidos neste trabalho indicam que ocorrência de coléteres em Cassiinae é bastante ampla.

Os estudos filogenéticos com marcadores moleculares (*rbcL*) mostraram que Cassiinae é monofilética (Kajita *et al.*, 2001), por outro lado, análises baseadas em marcadores moleculares plastidiais (*trnL-F*) e dados morfológicos não sustentaram a monofilia da subtribo, mostrando que há hipóteses conflitantes quanto ao relacionamento dos três gêneros

(Doyle *et al.*, 2000; Bruneau *et al.*, 2001; Herendeen *et al.*, 2003). Alguns estudos apoiam *Cassia* como grupo irmão de *Senna* e esse clado não relacionado com *Chamaecrista* (Bruneau *et al.*, 2001; 2008; Marazzi *et al.*, 2006). Outros apoiam *Senna* como grupo irmão de *Chamaecrista* mas não relacionado a *Cassia* (Herendeen *et al.*, 2003).

Nas análises realizadas por Bruneau *et al.* (2008) o gênero *Senna* ocorre como irmã do monofilético gênero *Cassia* e este grupo é irmão do monoespecífico gênero brasileiro *Melanoxylon*. *Chamaecrista* aparece como irmão do gênero *Batesia* e *Vouacapoua* fazendo parte do clado. No entanto, nas análises realizadas neste trabalho, não foram observados coléteres florais em *Melanoxylon*, tampouco em *Vouacapoua americana* e não foi possível amostrar o gênero *Batesia*.

Nos trabalhos de Bruneau *et al.*, (2008) e Manzanilla & Bruneau (2012), o grupo das Cassiinea aparece como irmão do grupo das *Caesalpinia*, por esta razão as espécies *Caesalpinia decapetala*, *C. echinata*, *Libidibia ferrea*, *Poincianella bracteosa*, *P. gardneriana* foram amostradas, mas os coléteres florais não foram observados.

Chamaecrista

Irwin & Barneby (1982) dividiram o gênero *Chamaecrista* em seis seções, considerando, sobretudo, a combinação de caracteres florais e a presença ou ausência de nectários extraflorais e tricomas glandulares pegajosos. Tricomas glandulares com secreção pegajosa em *Chamaecrista* estão restritos à seção *Absus* subseção *Absus* (ca. 169 espécies) e à seção *Grimaldia* (*C. absus* (L.) H.S. Irwin & Barneby).

Estes tricomas glandulares apresentam uma estrutura muito conservada, com uma base dilatada, bulbosa, que continua em um tubo que exsuda secreção pegajosa. Uma característica interessante associada com a presença destes tricomas glandulares é que eles estão fortemente correlacionados com ausência de nectários extraflorais (NEFs) (Irwin & Barneby, 1978). Coléteres florais não foram encontrados na seção monoespecífica *Grimaldia*, tampouco na seção *Absus*, com exceção da espécie *C. jacobinea*. As espécies analisadas destas seções apresentam estes tricomas glandulares distribuídos na superfície abaxial das sépalas, que não são encontradas nas espécies das outras seções (*Apoucouita*, *Caliciopses*, *Chamaecrista* e *Xerocalyx*), que possuem coléteres. Há indícios, portanto, de que em *Absus* subseção *Absus* e *Grimaldia* estratégias adaptativas diferentes foram selecionadas, como a presença de tricomas glandulares em detrimento de coléteres e NEFs.

Outro dado interessante é que a presença de coléteres na base das brácteas foi observada somente nas espécies de *Chamaecrista* da seção *Xerocalyx*, seção que é apoiada como monofilética no estudo realizado por Conceição *et al.* (2009).

Senna

As estruturas secretoras tem se mostrado de grande importância na taxonomia e sistemática filogenética, como podemos observar em *Senna* com relação aos NEFs. Neste trabalho reforçamos a importância das estruturas secretoras, relatando a presença de coléteres florais em todas as 58 espécies de *Senna* amostradas.

Os coléteres florais em *Senna* apresentam uma distribuição única no gênero, dispersos pelo receptáculo floral, esta distribuição não ocorre em *Cassia* e *Chamaecrista*

Apesar da incerteza quanto ao posicionamento dos gêneros *Cassia s. s.*, *Chamaecrista* e *Senna* nas análises filogenéticas, estes gêneros apresentam muitas características morfológicas em comum, por exemplo, folhas geralmente paripinadas com folíolos opostos, inflorescência racemosa, flores hermafroditas com cinco sépalas imbricadas e cinco pétalas, com a pétala vexilar quase sempre interior, anteras usualmente basifixas, poricidas (Irwin & Barneby, 1982), e a presença de coléteres florais nos três gêneros e a ausência em *Melanoxylon* e *Vouacapoua* é mais uma característica morfológica que corrobora a monofilia de Cassiinae e constituem uma sinapomorfia para este clado.

Referências Bibliográficas

- Bruneau A, Forest F, Herendeen PS, Klitgaard BB, Lewis GP. 2001.** Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* **26**: 487–514.
- Bruneau A, Mercuri M, Lewis GP, Herendeen PS. 2008.** Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Botany* **86**: 697-718.
- Conceição AS, Queiroz LP, Lewis GP, Andrade MJG, Almeida PRM, Schnadelbach AS, Van den Berg C. 2009.** Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. *Taxon* **58(4)**: 1168–1180.
- Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2013.** Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): new evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1709-1720.
- Da Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA. 2012.** Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **60**: 707-717.
- De-paula OC, Oliveira DMT. 2007.** Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biociências* **5(1)**: 348–350.
- De-Paula OC, Oliveira DMT. 2012.** Seed ontogeny of *Chamaecrista* and its systematic implications in Cassiinae (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **298(9)**: 1659-1669.
- Doyle JJ, Chappil JA, Bailey CD, Kajita T. 2000.** *Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data.* In Advances in legume systematics. Part 9 (Herendeen PS, Bruneau A, eds.). Crown Copyright, Kew.
- Herendeen PS, Bruneau A, Lewis GP. 2003.** *Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data.* In Advances in legume systematic. Part 10 (Klitgaard BB, Bruneau A, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Irwin HS, Barneby RC. 1978.** Monographic studies in *Cassia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) III. Sections *Absus* and *Grimaldia*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **30**: 1–277.
- Irwin HS, Barneby RC. 1981.** *Tribe 2. Cassieae Bronn (1822).* In Advances in legume systematics (Polhill, RM, Raven PH, eds.). Crown Copyright, Kew.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** The American Cassiinae, a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002.** *Plant systematics, a phylogenetic approach.* Sinauer Associates, Sunderland.

- Kajita T, Ohashi H, Tateishi Y, Bailey CD, Doyle JJ. 2001.** *RbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany* **26**: 515–536.
- Lavin M; Herendeen PS, Wojciechowki MF. 2005.** Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during tertiary. *Systematic Biology* **54(4)**: 575-594.
- Lewis GP. 2005.** *Tribe Cassieae*. In Legumes of the World (G. Lewis, B. Schrire, B. Mackinder & M. Lock, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Manzanilla V, Bruneau A. 2012.** Phylogeny reconstruction in the Caesalpinieae grade (Leguminosae) based on duplicated copies of the sucrose synthase gene and plastid markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65(1)**: 149-162.
- Marazzi B, Conti E, Sanderson MJ, McMahon MM, Bronstein JL. 2012.** Diversity and evolution of a trait mediating ant–plant interactions: insights from extrafloral nectaries in *Senna* (Leguminosae). *Annals of Botany*. Advance access published October 26, 2012, doi:10.1093/aob/mcs226
- Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E. 2006.** Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288–303.
- Marazzi B, Sanderson, MJ 2010.** Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectaries. *Evolution* **64**: 3570-3592.
- Polhill RM, Raven PH, Stirton CH. 1981.** *Evolution and systematics of the Leguminosae*. In Advances in legume systematics. Part 1 (Polhill RM, Raven PH, eds.). Royal Botanical Gardens, Kew.
- Robards AW. 1978.** *An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells*. In Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells (Hall JL, ed.). Elsevier, New York.
- Smith FH, Smith EC. 1942.** Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. *American Journal of Botany* **29**: 464–471.
- Solereider H. 1908.** *Systematic Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford.
- Thomas V. 1991.** Review Article. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* **68**: 287–305.

Anexo

Tabela 2. Material analisado proveniente de exsiccatas.

Espécie; coletor; data.

Caesalpinia L.: *C. decapetala* (Roth) Alston; Queiroz, L.P. 2859; 12/06/1991. *C. echinata* Lam.; Miranda, L.A.P. 76; 25/05/2002. *Cassia* L.: *C. ferruginea* (Schrad.) Schrader ex DC.; Mendonça, C.V. & Borba, E.L. 310; 30/10/94. *C. leptophylla* Vogel; Queiroz, L.P. 11038; 20/12/05. *Chamaecrista* Moench: *C. absus* var. *absus* (L.) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. & Nascimento, N.S. 3555; 22/08/93. *C. absus* var. *meononandra* (Irwin & Barneby) Irwin & Barneby; Simon, M.F. 815 *et al.*; 31/08/06. *C. acosmiifolia* (Mart.) H.S. Irwin & Barneby, Lombardi, J.A. 1331 & Salino, A.; 23/05/97. *C. andromedeia* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Mota, R.C. 2109; 13/09/02. *C. aristata* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, *et al.* 67980; 18/07/98. *C. aspleniifolia* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Cardoso, D. 2407 *et al.*; 04/02/09. *C. astrochiton* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Viana, P.L. *et al.* 1149; 30/10/03. *C. bahiae* (H.S. Irwin) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 68571; 17/10/98. *C. basifolia* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Tameirão Neto, E. 2327; 23/02/97. *C. botryoides* Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis; Harley, R.M. 27055 & Taylor, N.; 01/12/88. *C. calycioides* (DC. ex Collad.) Greene; *C. campestris* H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. 10536 *et al.*; 21/04/05. *C. cathartica* (Mart.) H.S. Irwin & Barneby; Teixeira, W.A. s/n°; 13/09/93. *C. catharticoides* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 559; 01/07/94. *C. cavalcantina* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. 10265 *et al.*; 13/04/05. *C. choriophylla* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 25158; 05/07/01. *C. cipoana* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Mota, N.F.O. 1531 *et al.*; 27/04/10. *C. cotinifolia* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 3979; 09/03. *C. crommyotricha* (Harms) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 70680; 08/05/00. *C. cytisoides* (DC. ex Collad.) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 26334; 18/07/01. *C. dalbergiifolia* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 70178; 19/02/00. *C. debilis* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 3443; 17/11/99. *C. dentata* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 25193; 05/07/01. *C. desvauxii* var. *graminea* H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. & Nascimento, N.S. 3474; 20/08/93. *C. diphylla* (L.) Greene; Oliveira, L.B. s/n° *et al.*; 04/09/08. *C. duartei* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Guedes, M.L. 7367 *et al.*; 04/12/? *C. duckeana* (P. Bezerra & Afr. Fernandes) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, R.T. 962; 24/10/06. *C. eitenorum* var. *regana* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Funch, R. 614; 06/02/05. *C. ensiformis* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby; Nunes, E. & Castro, A.J. s/n°; 01/06/79. *C. fagonioides* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Mota, R.C. 724; 01/04/00. *C. flexuosa* (L.) Greene; Lombardi, J.A. 4264; 14/02/01. *C. filicifolia* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 25599; 10/07/01. *C. geminata* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 25557; 10/07/01. *C. hedysaroides* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Isaias, R.M.S. *et al.* s/n°; 08/10/02. *C. hispidula* (Vahl) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, R.T. 738; 16/06/02. *C. incurvata* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Rodrigues, G.W. 11; 13/07/94. *C. itambana* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Oliveira, R.C. 114; 05/12/92. *C. jacobinea* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Lopes, K.B. 8; 30/05/2010. *C. lagotois* H.S. Irwin & Barneby; Lucca, M. 91; 13/09/92. *C. mucronata* (Spreng.) H.S. Irwin & Barneby; Mota, R.C. 517 & Viana, L.; 07/09/00. *C. multipennis* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 28537; 27/02/02. *C. neesiana* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 68091; 23/07/98. *C. nictitans* (L.) Moench; Souza, V.C. 29681 *et al.*; 09/03/94. *C. nummulariifolia* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 70690; 08/05/00. *C. oblecta* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Costa, L.V. s/n°; 20/01/98. *C. olesiphylla* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Isaias, R.M.S. s/n° *et al.*; 08/10/02. *C. oligosperma* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Mendes Magalhães 1382; 28/01/42. *C. onusta* H.S. Irwin & Barneby; Lima, D.P. 12721; 08/11/71. *C. orbiculata* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Ratter, J.A. *et al.* s/n°, 05/08/98. *C. pascuorum* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. 14831 *et al.*; 28/05/10. *C. philippi* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 22747; 18/05/99. *C. pilosa* (L.) Greene; Silva, G.P. *et al.* 2753; 09/09/94. *C. polystachya* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Almeida, S. & Cordeiro, M. 611; 19/10/91. *C. potentilla* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Fernandes, G.W. 12; 13/07/94. *C. punctata* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Ribas, O.S. 850 & Da Silva Pereira, L.B.; 27/10/95. *C. ramosa* var. *parvifoliola* (H.S. Irwin) H.S. Irwin & Barneby; Genev, W. 952; 25/03/92. *C. repens* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 61772; 12/02/95. *C. roraimae* (Benth.) Gleason; Tameirão Neto, E. 4769 & Vidal,

C.; 31/01/10. *C. rotundata* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Almeida, T.E. 847 *et al.*; 29/07/08. *C. rotundifolia* (Pers.) Greene; Mendes, M.S. 405; 08/08. *C. secunda* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby. Maielo-Silva, L. 32 & Pena, F.S.R.; 11/08. *C. semaphora* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Stehman 2356 & Franceschinelli, E.; 11/07/98. *C. serpens* (L.) Greene; Dutra, E.A. 03; 12/05/94. *C. setosa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 836; 05/07/95. *C. simplifacta* H.S. Irwin & Barneby; Souza, V.C. *et al.* 25443; 08/07/01. *C. stillifera* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 71026; 15/05/91. *C. subpeltata* (Rizzini) H.S. Irwin & Barneby; Martins, P. & Nunes, E.; 15/12/79. *C. thephrosifolia* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 68015; 18/07/98. *C. trachycarpa* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Mello Barreto 11120; 08/11/1940. *C. tragacanthoides* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Fernandes, G.W. s/nº; 10/08/99. *C. urophyllidia* (H.S. Irwin & Barneby) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 68034; 18/07/98. *C. ursina* (Mart. ex Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 2963; 11/06/99. *C. venulosa* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Fernandes, G.W. 05; 17/09/94. *C. zygothylloides* (Taub.) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 2138 & Temponi, L.G.; 15/02/98. *Libidibia* (DC.) Schltdl.: *L. ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz; Lemos, L. *et al.* 6376; 22/03/2002. *Melanoxylon* Schott in K. Sprengel: *M. brauna* Schott; Rodrigues, J.G. *et al.* 41; 29/03/2009. *Poincianella* Britton & Rose: *P. bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz; Rodrigues, J. *et al.*; 05/03/2009. *P. gardneriana* (Benth.) L.P. Queiroz; Queiroz, L.P. *et al.* 14794; 25/05/2010. *Senna* Mill.: *S. acuruensis* (Benth.) Irwin & Barneby; Mendes, M.S. 427 *et al.*; 04/08. *S. acutisepala* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Gasson, P. *et al.* 6098; 06/03/97. *S. affinis* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Mendonça, C.V. *et al.* 251; 18/03/94. *S. angulata* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Silva, A.F. 121 *et al.*; 18/05/01. *S. aphylla* (Cav.) H.S. Irwin & Barneby; Seijo, G. & Demeteris, M. 1090; 18/09/97. *S. appendiculata* (Vogel) Wiersema; Cardoso, D. 2480 & Machado, M.C.; 05/04/2009. *S. araucarietorum* H.S. Irwin & Barneby; Medri, C. *et al.* 590; 28/03/98. *S. aristeguietae* H.S. Irwin & Barneby; Jardim, J.G. 3364 *et al.*; 01/04/01. *S. atomaria* (L.) H.S. Irwin & Barneby; Misael, E.C. 4516; 18/04/01. *S. aversiflora* (Herb.) H.S. Irwin & Barneby; Hatschbach, G. *et al.* 65826; 16/01/97. *S. bracteosa* D. Cardoso & L.P. Queiroz; Cardoso, D. 2052 Bastos, A.M.; 09/06/07. *S. cana* (Nees & Mart.) H.S. Irwin & Barneby; Tourinho, R. *et al.* 27; 06/05/02. *S. catingae* (Harms) L.P. Queiroz; Silva-Castro, M.M. 930 *et al.*; 19/12/04. *S. cearensis* Afr. Fern.; Alencar, M.E. 159-688; 10/03/94. *S. cernua* (Balb.) H.S. Irwin & Barneby; Martines, R.B. 01; 24/03/01. *S. chloroclada* (Harms) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. *et al.* 1351; 18/12/07. *S. chrysocharpa* (Desv.) H.S. Irwin & Barneby; Martins, P & Nunes, E. s/nº; 08/12/79. *S. corifolia* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Souza, D.T. 188 *et al.*; 07/07/07. *S. corymbosa* (Lam.) H.S. Irwin & Barneby; Ritter, M.R. 1377; 05/04/01. *S. formosa* H.S. Irwin & Barneby; Santos, F.S. 483 & Dos Santos, M.F.; 29/12/84. *S. gardneri* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Nunes, T.S. 551 *et al.*; 16/06/01. *S. georgica* H.S. Irwin & Barneby; Edilberto, Otilio & Goret s/nº; 09/10/07. *S. guatemalensis* var. *hidalgensis* H.S. Irwin & Barneby; Téllez, O.V. 7183; 24/09/83. *S. harleyi* H.S. Irwin & Barneby; Harley, R.M. 54041 & Giulietti, A.M.; 14/06/00. *S. hayesiana* (Britton & Rose) H.S. Irwin & Barneby; Álvarez, D. 3430 & Jiménez, C.J.; 30/01/03. *S. hilariana* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Flores, A. & Rodrigues, R.S. 439; 29/12/00. *S. latifolia* (G. Mey.) H.S. Irwin & Barneby; Vidal, C.V. 672; 09/07/09. *S. lechriosperma* H.S. Irwin & Barneby; Araújo, F.S. 1382; 25/03/02. *S. mollissima* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby; Mendoza, M. 3782; 24/08/07. *S. neglecta* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Ribas, O.S. 481 & Cordeiro, J.; 25/01/93. *S. organensis* (Glaz. ex Harms) H.S. Irwin & Barneby; Kummuraw, R. 3366 *et al.*; 21/01/94. *S. pallida* var. *brachyrrhachis* H.S. Irwin & Barneby; Reyes-Garcia, A. 5742 & Gómez, D.; 03/12/02. *S. pallida* var. *delgadoana* H.S. Irwin & Barneby; Salinas, A.D.; 25/11/05. *S. paradictyon* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Silva, J.M. & Barbosa, E. 5383; 19/11/06. *S. phebadenia* H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. & Nascimento, N.S. 3793; 21/12/93. *S. pilifera* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Queiroz, L.P. 12600 & Machado, M.C.; 20/11/06. *S. pinheiroi* H.S. Irwin & Barneby; Popovkin, A.V. 862; 27/04/11. *S. rizzini* H.S. Irwin & Barneby; Lopes, M.M.M. 1413 & Da Silva Júnior, M.M.M.; 25/06/07. *S. rostrata* (Mart.) H.S. Irwin & Barneby; BHCB 38755. *S. rugosa* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby; Silva, V s/nº; 24/02/99. *S. silvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby; Mota, R.C. 522 & Viana, L.; 05/12/00. *S. spectabilis* (DC.) H.S. Irwin & Barneby; Lombardi, J.A. 2212 & Temponi, L.G.; 16/02/98. *S. splendida* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Lacerda, A.V. 479 & Barbosa, F.M.; 22/06/05. *S. uniflora* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby; Conceição, A.A. 1130 & Marazzi, B.; 11/03/04. *S. tapajozensis* (Ducke) H.S. Irwin & Barneby; Sobral, M. *et al.* 9889; 07/05. *S. tenuifolia* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Sousa, G. 368; 11/02/99. *S. trachypus* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby; Souza, M.M. & Andarade-Filho, J.B.; 05/06/97. *S. velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby; Viana, L.C. s/nº & Maciel, G.M.; 11/05. *Vouacapoua* Aubl.: *V. americana* Aubl.; Silva, N.T. *et al.* 11452; 13/03/1968.

Considerações finais

A tribo Cassieae foi reestruturada na década de 1980, quando se deu a proposição da subtribo Cassiinae que inclui os gêneros: *Cassia stricto sensu*, *Senna* e *Chamaecrista*. Cassiinae é um grupo problemático quanto ao relacionamento filogenético de suas espécies, e as análises filogenéticas têm sido, até o momento, insuficientes para estabelecer inequivocamente as relações entre *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*.

Neste contexto, as estruturas secretoras despontam como importantes caracteres a serem analisados em trabalhos com aplicação taxonômica, complementando os dados provenientes de análises moleculares. Os resultados obtidos neste estudo são promissores, e abrem espaço para futuros trabalhos com estruturas secretoras em Cassiinae, principalmente coléteres, que apresentam uma ampla ocorrência nesta subtribo; apesar dos poucos registros da presença desta estrutura em Caesalpinioideae.

Embora os NEFs tenham grande representatividade e importância para o gênero, não existem análises estruturais dos NEFs de espécies de *Senna*, neste trabalho abordamos este aspecto dos NEFs, conseguindo separá-los em dois grupos morfológicos: elevados e embebidos. Para complementar este estudo morfológico ainda é necessário ampliarmos as análises com as espécies do clado II. Duas espécies deste clado foram analisadas, estas possuem NEFs embutidos nos tecidos das estípulas, entretanto observações realizadas em campo sugerem que podem existir NEFs embebidos em outros órgãos além das folhas.

A presença de coléteres tem se mostrado de grande importância em *Senna*, atuando na proteção contra dessecação de flores e frutos em desenvolvimento, na facilitação da germinação de sementes e estabelecimento das plântulas de várias espécies do gênero. Coléteres pericarpiais foram encontrados em duas espécies, *S. occidentalis* e *S. hirsuta*, mas devido ao grande tamanho do gênero, este número pode ser mais representativo.

A presença de coléteres em embriões já foi descrita anteriormente para o gênero *Chamaecrista*, neste trabalho, descrevemos a ocorrência destas estruturas em embriões e plântulas de *Senna*; devemos agora expandir os estudos para o gênero *Cassia*, para analisar a representatividade dos coléteres em Cassiinae e sua possível utilização em análises filogenéticas

Em suma, a presença de coléteres é ampla em Cassiinae, desta forma, estas estruturas podem ter desempenhado papel importante na adaptação dos gêneros que compõem a subtribo Cassiinae, principalmente *Senna* e *Chamaecrista*, (onde a amostragem foi maior), aos diversos habitats. Os dados sobre a presença, distribuição e morfologia dos coléteres podem

ser utilizados como marcadores taxonômicos e caracteres úteis para a filogenia do grupo, tal como os NEFs foram utilizados em *Senna*.

