

Micromorfologia e Anatomia Foliar de Espécies de Rubiaceae do Parque Nacional de Itatiaia-RJ

Camilla Ribeiro Alexandrino, Tarsila Maria da Silva Moraes, Maura Da Cunha

Setor de Biologia Vegetal, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual,
Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

RESUMO

Aspectos da micromorfologia e da anatomia foliar de *Galium hypocarpium*, *Guettarda viburnoides* e *Posoqueria latifolia* (Rubiaceae) do Parque Nacional do Itatiaia-RJ foram analisados por microscopia óptica e eletrônica de varredura, com o objetivo de fornecer subsídios para a taxonomia da família, bem como auxiliar na compreensão da relação dos caracteres com o ambiente de Floresta Atlântica. As espécies observadas apresentam superfície adaxial sem ornamentações cuticulares e fino filme de cera. A superfície abaxial de *G. hypocarpium* apresenta cutícula estriada enquanto *P. latifolia* apresenta ornamentações cuticulares apenas nos estômatos. Tricomas tectores são observados em ambas as superfícies, exceto em *P. latifolia*. *G. viburnoides*, que possui superfície abaxial coberta por tricomas unisseriados contendo cristais prismáticos. Células secretoras com conteúdo lipídico são observadas na epiderme abaxial de *G. hypocarpium*. As espécies estudadas são hipostomáticas com estômatos do tipo paracítico e sistema vascular em feixes do tipo colateral envolvidos por uma bainha parenquimática; esta se prolonga até a epiderme adaxial, em *G. viburnoides*. As espécies estudadas mostram, em sua maioria, aspectos anatômicos mesomórficos, de acordo com as condições ambientais encontradas na Floresta Atlântica e ainda mecanismos de defesa diversos, como tricomas tectores e estruturas secretoras, correlatos ao ambiente em que vivem.

Palavras-chave: Mata Atlântica, morfoanatomia, Rubiaceae.

Micromorphology and Leaf Anatomy of Rubiaceae Species from Itatiaia National Park, State of Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Aspects of leaf anatomy and micromorphology of *Galium hypocarpium*, *Guettarda viburnoides* and *Posoqueria latifolia* (Rubiaceae) were analyzed through light microscopy and scanning electron microscopy in order to provide support for the family taxonomy and to assist in the understanding of the relationship between the environmental features of the Atlantic Forest. The tested species showed ornamented cuticle and thin film of wax adaxial surface. *G. hypocarpium* abaxial surface presented striated cuticle, while *P. latifolia* cuticular ornamentation was present only in the stomata. Trichomes were observed in both surfaces, except for *P. latifolia* and *G. viburnoides*, which presented abaxial surfaces covered with uniseriate trichomes containing prismatic crystals. The studied species are hypostomatic with paracytic stomata and collateral vascular system surrounded by parenchymatic bundle sheath cells; except for *G. viburnoides*, whose bundle sheath extends to the adaxial epidermis face. Secretory cells with lipid content were observed in the abaxial epidermis of *G. hypocarpium*. The species showed mostly mesomorphic anatomy, several defense mechanisms such as trichomes, and secretory structures related to the environment of the Atlantic Forest.

Keywords: Atlantic Forest, morphoanatomy, Rubiaceae.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica da América do Sul, apesar de muito fragmentada, possui uma enorme importância social e ambiental. Sua conservação e sua recuperação é um grande desafio para os especialistas, pois o conhecimento de sua diversidade biológica é ainda bastante incompleto e fragmentado (Quinet et al., 2000).

A família Rubiaceae Juss. é bastante representativa na Floresta Atlântica, com cerca de 660 gêneros e 11.150 espécies (Robbrecht & Manen, 2006). Estudos que utilizam marcadores moleculares têm proposto uma divisão da família em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. A posição e a definição das tribos dentro das subfamílias têm sido alteradas (Rova et al., 2002; Delprete & Cortés, 2004).

Metcalf & Chalk (1985) mencionam a importância do estudo anatômico como fonte de dados para a identificação e a classificação das plantas. Estudos anatômicos e micromorfológicos em folhas vêm sendo desenvolvidos em diversos trabalhos, indicando importantes características capazes de separar táxon, bem como características estruturais relacionadas ao ambiente em que vivem (Fontenelle et al., 1994; Bredenkamp & van Wyk, 2000; Kong, 2001; Moraes 2009; Moraes et al., 2011b). Dentre os estudos realizados com as Rubiaceae, além dos trabalhos de Solereder (1908) e Metcalf & Chalk (1950), destacam-se os estudos de Accorsi (1947) sobre os estômatos e as características micromorfológicas e anatômicas em várias espécies da família (Vieira et al., 1992; Gomes et al., 1995; Vieira & Gomes, 1995; Da Cunha & Vieira, 1997; Mantovani & Vieira, 1997; Mantovani et al., 1995; Leo et al., 1997; Barros et al., 1997; Vieira et al., 2001; Moraes, 2005; Moraes et al., 2009; Moraes et al., 2011a, 2011b; Arruda et al., 2010).

Com o objetivo de fornecer subsídios para a taxonomia da família Rubiaceae e respectivos gêneros, bem como auxiliar na compreensão da relação destes caracteres com o ambiente da Floresta Atlântica, este trabalho busca caracterizar os aspectos micromorfológicos e anatômicos da lâmina foliar de *Galium hypocarpium*, *Guettarda viburnoides* e

Posoqueria latifolia, através da microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material botânico

Folhas maduras foram coletadas no Parque Nacional do Itatiaia- RJ, sob licença do SISBIO número 13575-1. Esse Parque está localizado no sudoeste do Estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22° 19' e 22° 45' S e as longitudes 44° 45' e 44° 50' O. Gr., com altitudes entre 700 e 2.787 m sobre o mar (msm).

2.2. Microscopia óptica

Fragmentos de folhas maduras foram fixados por 2 horas à temperatura ambiente em uma solução contendo glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2 (Moraes et al., 2009). A seguir, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por uma hora em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Após lavagem no mesmo tampão, seguiu-se uma série de desidratação cetônica, seguida de infiltração, que substituiu gradualmente a acetona dos cortes por resina epoxi (Epon 812)*. As amostras em resina epoxi pura foram colocadas em fôrmas e levadas à estufa a 60 °C por 48 horas para polimerização. Em seguida, foram obtidos cortes semifinos, entre 0,60 e 0,70 µm de espessura, com o auxílio de faca de vidro em ultramicrotomo (Reichert ultracuts). Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% por 1 minuto (O'Brien et al., 1965). As lâminas foram seladas com Entelan* e observadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS). As imagens foram obtidas através do microscópio Axioplan acoplado à câmera Cannon Power Shot A640.

2.3. Dissociação epidérmica

Para analisar a epiderme em vista frontal, foi feita a dissociação de acordo com Macedo et al. (2005). Fragmentos foliares foram fervidos em ácido nítrico 10% por 20 minutos. Antes da dissociação epidérmica, os fragmentos das folhas da espécie

Posoqueria latifolia foram raspados com o intuito de retirar a grande quantidade de tricomas presentes na superfície abaxial e melhorar a visualização. Após a dissociação das epidermes, as mesmas foram lavadas em água destilada, coradas com safranina 1%, Sudan III e IV 1% à temperatura ambiente (Sass, 1951). As lâminas foram seladas com glicerina 50% e observadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan ZEISS). As imagens foram obtidas através do microscópio Axioplan acoplado à câmera Cannon Power Shot A640.

2.4. Histoquímica

Reagentes específicos foram usados para corar cortes, feitos à mão livre, do material fresco. Para verificar a presença de lipídio, os cortes obtidos foram mantidos em etanol 50%, submetidos à Sudan III (Sass, 1951) e, em seguida, à solução de Sudan IV (Gerlach, 1984) durante 20 a 30 minutos. Os cortes foram lavados em etanol 80% e depois colocados em lâminas e lamínulas com glicerina 50%. Para identificação de compostos fenólicos, os cortes foram submetidos à solução de cloreto férrico (FeCl_3) 10% (Johansen, 1940) durante 2 minutos, lavados com água e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina 50%. A natureza química dos cristais de oxalato foi confirmada, através da insolubilidade em ácido acético e da solubilidade em ácido clorídrico (McClean & Cook, 1958).

2.5. Microscopia eletrônica de varredura

Após as etapas de fixação e desidratação, conforme descritas, as amostras foram submetidas ao ponto crítico. Após substituir toda a acetona por CO_2 líquido com o auxílio do aparelho Bal-tec Critical Point Dryer CPD 030, os fragmentos foram afixados com fita adesiva de carbono em suportes próprios e cobertos com uma fina camada de ouro de 20 nm (Bal-tec Sputer Coater SCD 050). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura DSEM- ZEISS 962, em diferentes acelerações de voltagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das técnicas de microscopia óptica e eletrônica de varredura, foram analisadas

características da lâmina foliar, como: presença/ausência de domácias; relevo cuticular da superfície da epiderme; arquitetura da parede periclinal externa, traçado da parede anticlinal epidérmica; tipo e localização de estômatos e tricomas; organização do mesofilo; presença/ausência e tipo de idioblastos; conteúdo das estruturas secretoras; bainha do feixe vascular e a presença/ausência de extensão de bainha, e tipo de sistema vascular. Dentre as características comuns à família, destaca-se a presença de lâmina foliar dorsiventral, hipostomática, com estômatos do tipo paracítico chamados de rubioides (Solereder, 1908; Accorsi, 1947; Metcalfe & Chalk, 1950; Bahaddur et al., 1971).

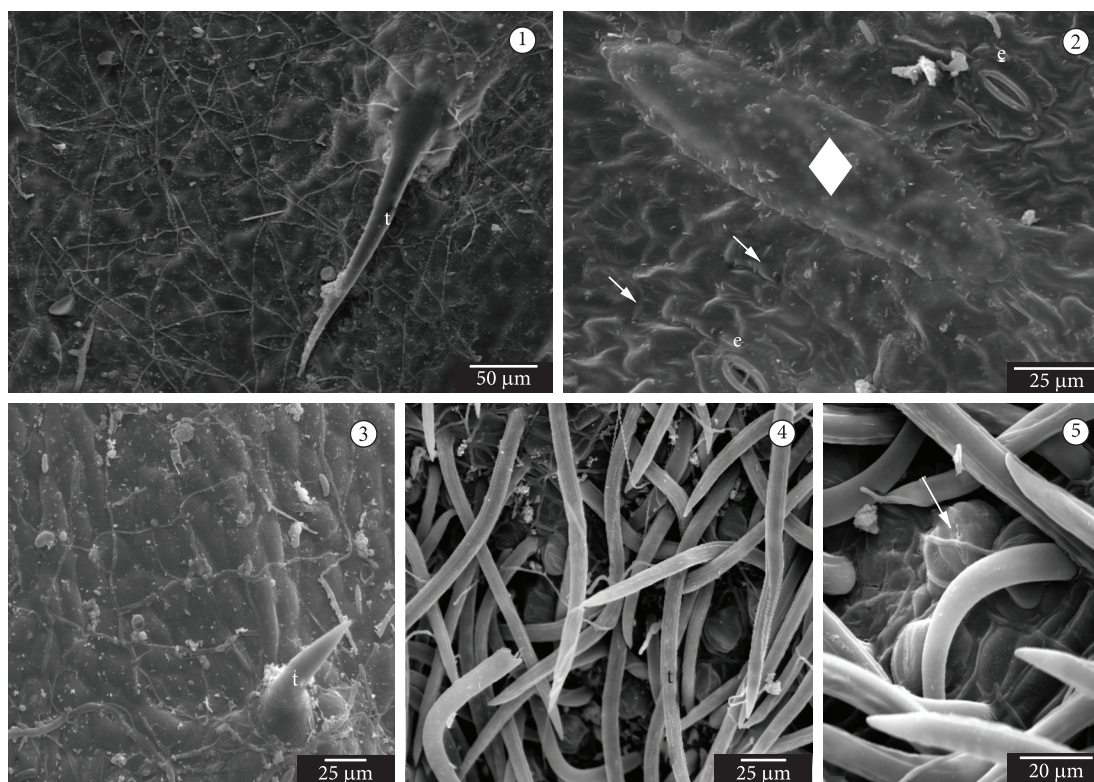
A análise da superfície da lâmina foliar de *Galium hypocarpium* em microscopia eletrônica de varredura mostrou a superfície adaxial lisa sem ornamentação cuticular (Figura 1). A superfície abaxial apresenta ornamentações cuticulares estriadas (Figura 2), inclusive nas células estomáticas. Ambas as superfícies são cobertas por um fino filme de cera epicuticular (Figuras 1 e 2). Em *Guettarda viburnoides*, as superfícies adaxial (Figura 3) e abaxial (Figuras 4 e 5) da lâmina foliar apresentaram-se lisas e cobertas por um fino filme de cera epicuticular, de acordo com a classificação de Barthlott et al. (1998). *Posoqueria latifolia* revelou a ausência de ornamentações cuticulares na superfície adaxial e a presença de cera epicuticular do tipo camada lisa (Figura 6). Observou-se a superfície abaxial com ornamentações cuticulares intensas em forma de estrias em paralelo na lâmina foliar e desenhos circulares envoltos nos estômatos (Figura 7). O aspecto cuticular ornamentado (Metcalfe & Chalk, 1988) e a deposição de cera (Esau, 1974; Cutter, 1986; Fahn, 1990) são caracteres diagnósticos importantes. Moraes (2005) e Moraes et al. (2009) utilizaram a ornamentação cuticular para segregação de espécies dos gêneros *Simira* e *Bathysa* (Rubiaceae). A cutícula espessa e/ou mais organizada pode funcionar como um repelente de água, auxiliando na secagem mais rápida da folha (Smith & McClean, 1989), e como defesa contra a herbivoria. Considerando-se que as espécies estudadas são plantas de interior de mata, os dados reforçam esta característica em correlação com o ambiente úmido e sombreado.

Nas espécies em estudo, foi observado um fino filme de cera epicuticular, exceto em *Posoqueria*

latifolia, em que foi notada cera do tipo camada lisa. A presença de cera epicuticular somente em algumas regiões de *Posoqueria latifolia* pode ser explicada pela alta incidência de fungo. Segundo Martin (1964) e Juniper & Jeffrey (1983), folhas com alta incidência de fungos podem ter a cera epicuticular dissolvida, já que estes organismos secretam enzimas para tal fim. A cera é um componente hidrofóbico e uma de suas funções está relacionada ao controle da evaporação. A forma da cera epicuticular – não sua espessura – pode também ser um diagnóstico de segregação de espécies.

Os tricomas tectores de *Galium hypocarpium* são unicelulares e foram observados ao longo de toda a lâmina foliar, inclusive sobre a nervura principal e o bordo, em ambas as superfícies (Figuras 1 e 9).

A presença de tricomas tectores unicelulares em *Guettarda viburnoides* foi observada em ambas as superfícies (Figuras 3 a 5). A superfície abaxial mostrou uma densidade de tricomas mais elevada do que a superfície adaxial (Figuras 4 e 5). Os tricomas observados na superfície abaxial são maiores em comprimento quando comparados àqueles da superfície adaxial (Figuras 3 e 4); porém, não foi feita contagem da densidade e do comprimento desta estrutura para revelar se este número era significativo. Tricomas tectores densamente distribuídos em folhas e caules podem servir como uma barreira mecânica contra temperaturas extremas, alta intensidade luminosa e perda excessiva de água (Werker, 2000). Presença de tricomas tectores unisseriados também foi observada por Salatino et al. (1986), para *Tocoyena*



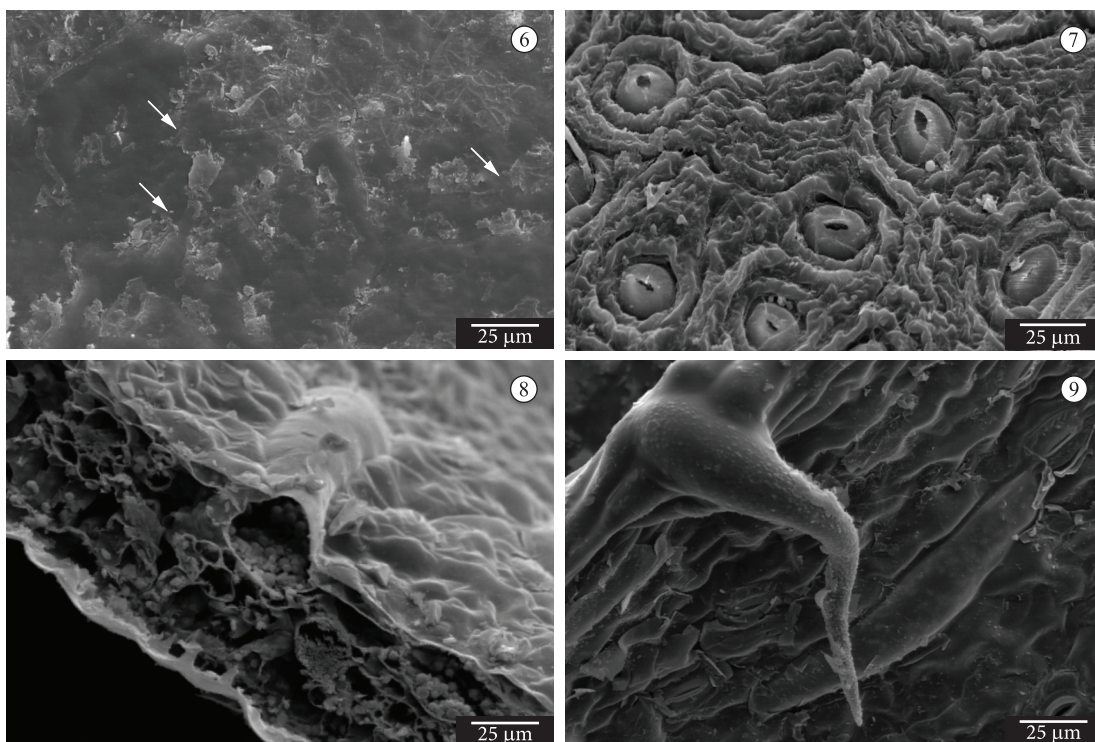
Figuras 1-5. Microscopia Eletrônica de Varredura (1-2) *Galium hypocarpium* (1) Superfície adaxial sem ornamentações cuticulares e com filme de cera. (t) tricomas tectores. (2) Superfície abaxial com cutícula levemente estriada (setas) e fino filme de cera. (losângulo) célula secretora. (e) Estômatos paracíticos. (3-5) *Guettarda viburnoides* (3) Superfície adaxial lisa mostrando presença de tricomas tectores (t). (4) Superfície abaxial com grande quantidade de tricomas (t). (5) Detalhe dos estômatos (seta) acima do nível das células epidérmicas.

Figures 1-5. Scanning Electron Microscopy (1-2) *Galium hypocarpium* (1) Surface unornamented adaxial cuticular wax and film. (t) trichomes. (2) abaxial surface with lightly striated cuticle (arrows) and thin film of wax. (diamond) Secretory cell. (e) paracytic stomata. (3-5) *Guettarda viburnoides* (3) smooth surface showing the presence of adaxial trichomes (t). (4) abaxial surface covered with large amounts of uniseriate trichomes (t). (5) Detail of stomata (arrow) above the level of epidermal.

formosa, e por Nascimento et al. (1996), para *Bathysa stipulata*. Entretanto, em muitas plantas, os tricomas aumentam a transpiração, porque ampliam a superfície de evaporação (Jonhson, 1975). Kuniyoshi (1993) cita que presença ou ausência de tricomas podem ser caracteres importantes para a taxonomia. Os tricomas encontrados em *G. viburnoides* apresentam cristais em seu interior (Figura 24), que podem estar relacionados com mecanismos de defesa contra herbivoria. Células do mesofilo de *G. viburnoides* e os tricomas apresentaram compostos fenólicos em seu interior (Figura 24), o que pode estar relacionado com a proteção do órgão à radiação UV-B (Liakoura et al., 1997). Segundo Taiz & Zeiger (1998), além do suporte mecânico, os compostos fenólicos podem proporcionar à planta proteção contra a herbivoria e a patogenicidade, além de possuir atividade alelopática. Em *Posoqueria latifolia*, não foram observados tricomas

(Figuras 6 e 7). Arruda et al. (2010) relataram que a presença de tricomas nesta espécie é rara.

Células secretoras foram encontradas na superfície abaxial de *Galium hypocarpium*; apresentam formato ovalado e em maiores dimensões se comparadas às demais células epidérmicas (Figuras 8, 10-13). Na família Rubiaceae, as primeiras citações sobre estas células foram para espécies de *Rubia*, *Anthospermum* e *Nenax* (Solereeder, 1908). Holm (1907), ao perceber a presença desses idioblastos em *Galium pilosum*, *G. circaezans* e *G. latifolium*, os descreve como grandes células resiníferas ou secretoras, presentes na face abaxial das folhas. Em estudos comparando espécies dos gêneros *Galium* e *Relbunium*, foi observada presença de idioblastos ou células secretoras na porção apical e dispersas na superfície abaxial das folhas e estípulas (De Toni, 2005). A presença e a distribuição de células secretoras foram utilizadas com a finalidade de auxiliar na taxonomia

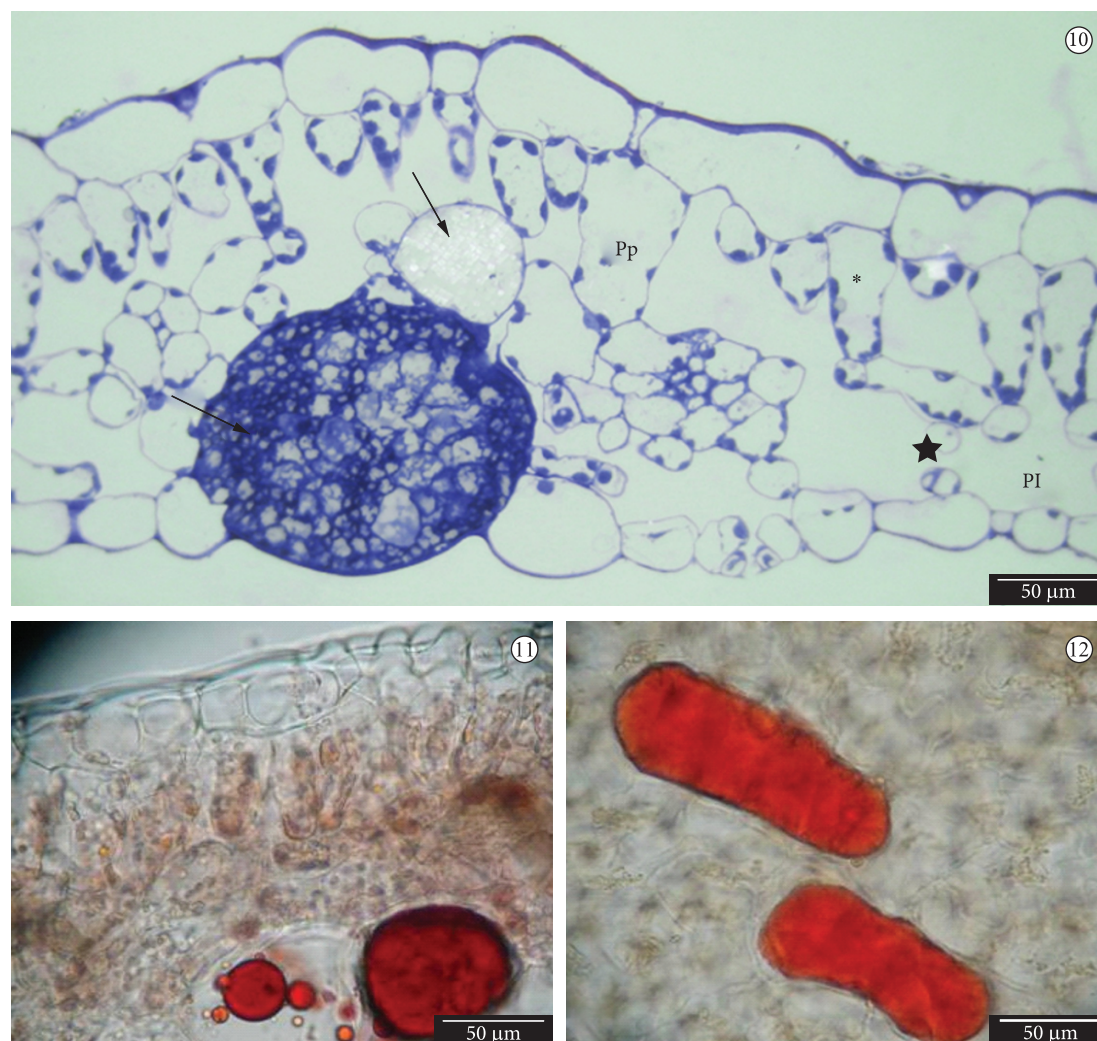


Figuras 6-9. (6-7) *Posoqueria latifolia*. (6) Superfície adaxial com cera epicuticular do tipo camada lisa (setas). (7) Superfície abaxial apresentando ornamentações cuticulares em forma de estrias e desenhos circulares envolvendo os estômatos. (8-9) *Galium hypocarpium* (8) Detalhe da célula secretora. (9) Detalhe do tricoma tector no bordo foliar.
Figures 6-9. (6-7) *Posoqueria latifolia* (6) adaxial surface with epicuticular wax-type smooth layer (arrows). (7) abaxial surface showing cuticular ornamentation in the form of grooves and circular designs involving stomata. (8-9) *Galium hypocarpium* (8) Detail showing the secretory cell. (9) Detail of trichomes leaves the board.

de *Galium* (Dempster, 1978) e *Relbunium* (Mariath, 1979). No entanto, De Toni (2005) não considera a presença destas células como um caráter relevante para a segregação dos gêneros. Dempster (1978) afirmou que, além da proteção contra o frio, as células secretoras têm a função de proteger os tecidos da folha contra altas taxas de evaporação e herbivoria.

Nas três espécies, os estômatos foram observados apenas na superfície abaxial, caracterizando a lâmina

foliar como hipoestomática (Figuras 5, 7, 10, 13, 18 e 26). Estômatos paracíticos, distribuídos apenas na face abaxial, foram descritos por Solereder (1908) como sendo o tipo de estômato mais comum para a família Rubiaceae, chamado então de rubioides. Folhas hipoestomáticas são comuns em espécies das florestas pluviais e estacionais tropicais, e tal fato pode representar uma proteção das fendas estomáticas contra pequenos musgos e fungos comuns nesse ambiente (Coutinho, 1962). A presença de estômatos



Figuras 10-12. Microscopia óptica de *Galium hipocarpium*. (10) Corte transversal da lâmina foliar com epiderme unisseriada, uma camada de parênquima paliçádico (Pp) e 3-5 de lacunoso (PI). Presença de célula secretora (estrela) na epiderme abaxial e idioblasto contendo feixes de ráfides no mesofilo (asterisco). (11) Corte transversal mostrando células marcadas com Sudan III, indicando presença de lipídeos. (12) Células secretoras marcadas com Sudan III.

Figures 10-12. Light Microscopy of *Galium hipocarpium*. (10) Cross section of leaf blade with uniseriate epidermis, a layer of palisade (Pp) and 3-5 of spongy (PI). Presence of secretory cell (star) and in the abaxial idioblasts containing bundles of raphides in the mesophyll (asterisk). (11) Cross section showing cells stained with Sudan III indicated the presence of lipids. (12) secreting cells stained with Sudan III.

restritos à face abaxial pode estar relacionada com a intensa iluminação e a deficiência de água do meio, como sugerido por Fahn (1990). Em *Guettarda viburnoides*, os estômatos encontrados estão projetados acima do nível da superfície celular, característica que sugere que há excesso de umidade na superfície adaxial desta espécie, provavelmente provocada pela grande quantidade de tricomas.

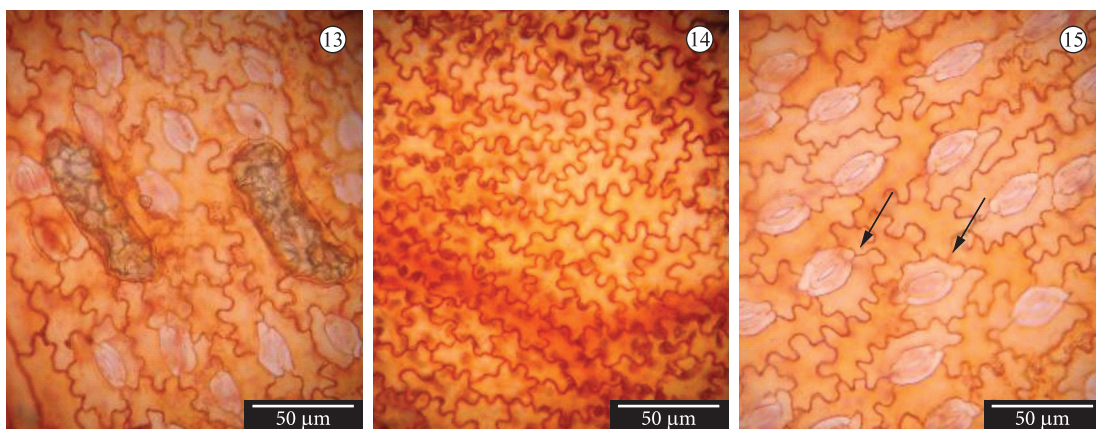
Em cortes transversais da lâmina foliar, *Galium hypocarpium* mostrou que a epiderme é formada por uma única camada de células tabulares cobertas por uma delgada cutícula. Entre as células da epiderme na face abaxial, foram observadas as células secretoras (Figuras 10 e 11). Essas células se projetam para o interior do mesofilo ocupando, às vezes, toda a espessura do parênquima lacunoso. A parede periclinal externa de ambas as faces apresenta formato convexo (Figura 10).

Em vista frontal, tanto a epiderme em face adaxial quanto a abaxial apresentam células com parede anticlinal de sinuosidade acentuada (Figuras 14 e 15). *Guettarda viburnoides* apresentou epiderme formada por uma única camada de células tabulares cobertas por uma cutícula de espessura mediana (Figuras 16 e 17). A parede periclinal externa da epiderme em faces adaxial e abaxial apresenta formato convexo (Figura 16). As células anticlinalas externas da superfície adaxial se mostram levemente sinuosas (Figura 19). As paredes anticlinalas externas da superfície abaxial não puderam ser observadas

por causa da grande quantidade de tricomas presentes nesta região, mesmo com a retirada de boa parte destes.

Em *Posoqueria latifolia*, foi observado que a epiderme é constituída por uma única camada e células com formas tabulares recobertas por uma cutícula espessa (Figuras 20 e 21). A parede periclinal externa mostra-se plana convexa em ambas as faces (Figura 20). Em vista frontal, tanto a epiderme em face adaxial quanto aquela em face abaxial apresentam células com parede anticlinal levemente sinuosa a reta (Figuras 22 e 23). Em microscopia eletrônica de transmissão, o corte transversal da parede periclinal externa mostra a organização em cutícula propriamente dita (Cpd), camada cuticular (Cc) e camada polissacarídica (Cp). Foram observados microrganismos sobre a parede periclinal externa (Figura 27 e 28).

Com relação às características estruturais da epiderme, a parede anticlinal das células epidérmicas das folhas de *Galium hypocarpium* apresenta, em ambas as faces, contorno bastante sinuoso. Wylie (1943) ressalta que a sinuosidade parietal aumenta a área de contato lateral entre as células epidérmicas. Isanogle (1944) relatou que as folhas de sombra apresentam paredes anticlinalas sinuosas, porém Vieira et al. (1992) observaram células epidérmicas com contorno reto em plantas de sombra de *Psychotria nuda* e *P. leiocarpa*. Vieira (1988) observou em *Tocoyena bullata*, planta de sol, paredes



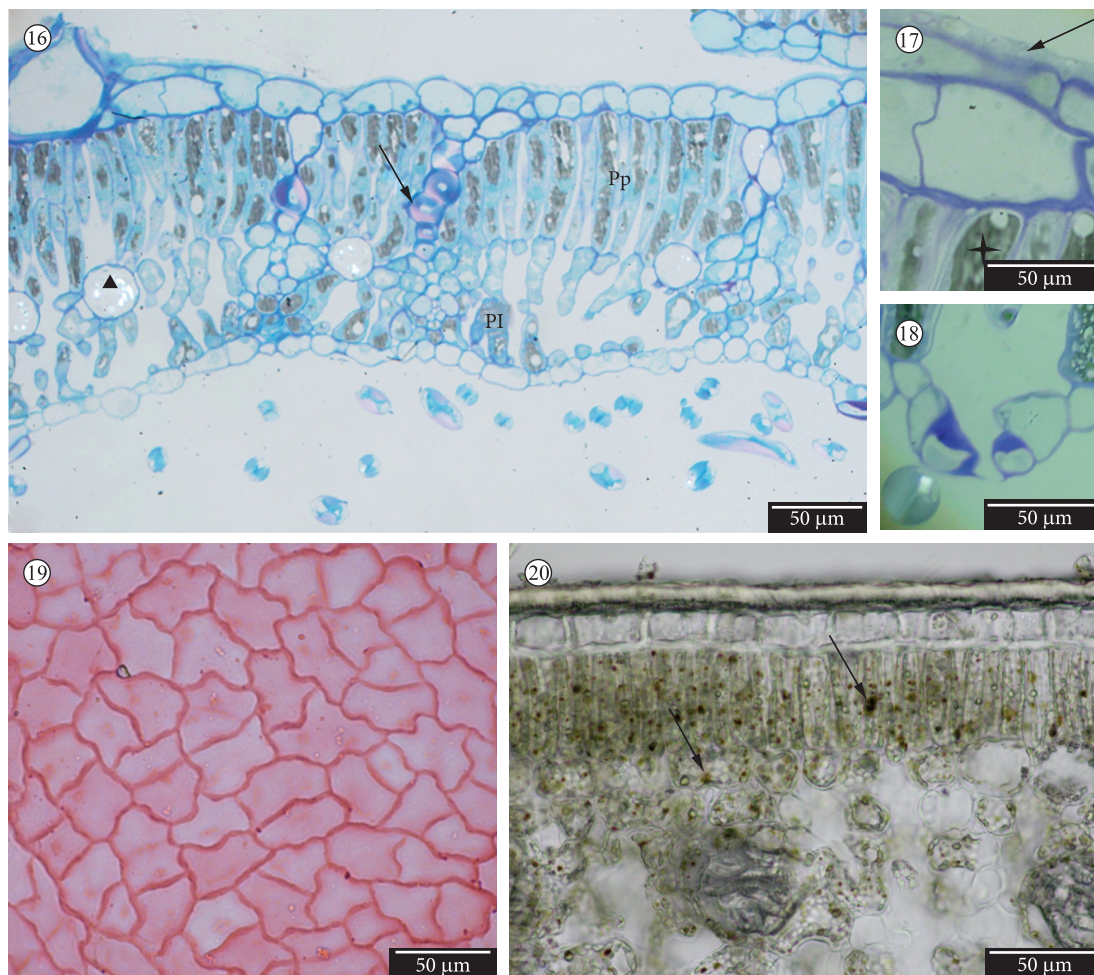
Figuras 13-15. (13-15) Dissociação epidérmica. (13) Presença de células secretoras na epiderme abaxial. (14) Face adaxial da epiderme com parede anticlinal sinuosa. (15) Face abaxial, com estômatos paracíticos (setas).

Figures 13-15. (13-15) Epidermal Dissociation (13) Presence of secretory cells in the lower epidermis. (14) adaxial epidermis with sinuous anticlinal walls. (15) abaxial epidermis with paracytic (arrows).

anticlinais da face abaxial com contorno sinuoso. Em geral, em plantas de sol e de ambientes xéricos, as células epidérmicas, especialmente as da face adaxial, apresentam contorno reto; nas plantas de sombra, a ocorrência de células com contorno sinuoso, em ambas as faces da folha, é mais comumente observada (Wilkinson, 1979). Assim, acredita-se que outros fatores, além da luz, possam influenciar a

expressão deste caráter. Sugere-se que a sinuosidade possa ser um caráter genético e a maior ou menor sinuosidade seja influenciada pelo ambiente.

Em corte transversal da lâmina foliar, as três espécies apresentaram organização dorsiventral do mesofilo. Em *G. hypocarpium*, o parênquima paliçádico apresenta-se junto à epiderme em face adaxial e é constituído por uma camada de células



Figuras 16-20. Microscopia óptica (16-19) Corte transversal da lâmina foliar de *G. viburnoides*. (16) Epiderme unisseriada, 1-2 camadas de parênquima paliçádico (Pp) e 2-4 de lacunoso (Pl); idioblastos contendo feixes de ráfides (triângulo); extensão de bainha (seta). (17) Epiderme em face adaxial mostrando detalhe da cutícula (seta). Compostos fenólicos nas células parenquimáticas (estrela de quatro pontas). (18) Detalhe do estômato. (19) Dissociação epidérmica, epiderme em face adaxial de *G. viburnoides*. (20) Corte transversal da lâmina foliar de *P. latifolia* e presença de compostos fenólicos no mesofilo, evidenciada pela coloração castanho através da marcação com cloreto férrico (seta).

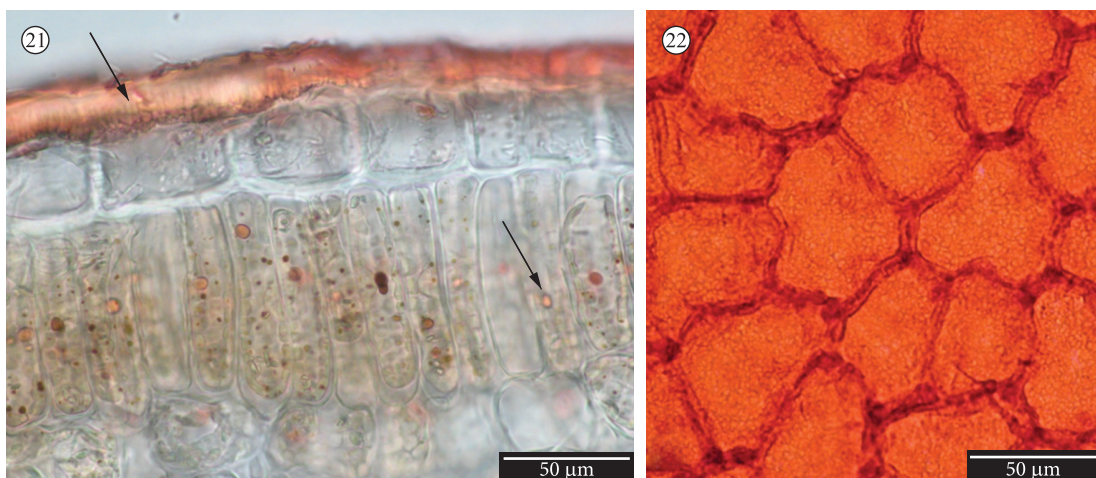
Figures 16-20. Light Microscopy (16-21) Cross section leaf blade of *G. viburnoides*. (16) Cross section of leaf blade with uniseriate epidermis, 1-2 layers of palisade (Pp) and 2-4 of spongy (Pl); idioblasts containing bundles of raphides (asterisk); sheath extensions (seta). (17) adaxial epidermis showing detail of the cuticle (arrow). Phenolic compounds in parenchymal cells (four-pointed star). (18) Detail of stomata. (19) Dissociation of the epidermis, adaxial epidermis of *G. viburnoides*. (20) Cross section of leaf of *P. latifolia* and Presence of phenolic compounds in the mesophyll, as evidenced by the brown color (arrow).

(Figura 10). O parênquima lacunoso, próximo à epiderme em face abaxial, é constituído por células com formas e disposição irregulares, gerando espaços celulares de dimensões variadas. O número de camadas celulares no parênquima lacunoso varia de três a cinco (Figura 10). Em *Guettarda viburnoides*, o parênquima paliçádico está junto à epiderme adaxial e é constituído por uma a duas camadas de células. O parênquima lacunoso está localizado próximo à epiderme em face abaxial e é constituído por duas a quatro camadas celulares (Figura 16). Em *Posoqueria latifolia*, o parênquima paliçádico é formado por um a dois estratos de células junto à epiderme adaxial (Figura 21). O parênquima lacunoso é formado por nove a dez camadas de células, que apresentam formato e disposição irregulares (Figura 20). O mesofilo do tipo dorsiventral corresponde ao padrão característico para a família Rubiaceae (Metcalf & Chalk, 1950). Wylie (1951), Jackson (1967) e Costa (1989), em seus estudos sobre a influência da luz na estrutura foliar, afirmaram que o número de estratos de parênquima paliçádico é maior nas folhas de sol do que nas de sombra. Vieira (1988) menciona parênquima paliçádico pluriestratificado para folhas de sol de *Tocoyena bullata*. Parênquima paliçádico uniestratificado é uma característica típica de folhas de sombra, de acordo com os autores

supracitados. Cabe ressaltar a importância de estudos anatômicos para verificar se é real a influência destas características na adaptação das espécies.

Idioblastos cristalíferos com cristais do tipo feixes de ráfide foram encontrados no mesofilo de *G. hypocarpium* (Figura 10), de *G. viburnoides* (Figura 16) e no mesofilo de *Posoqueria latifolia* (Arruda et al., 2010). Nos tricomas da epiderme abaxial de *G. viburnoides*, foi notada a presença de cristais prismáticos (Figuras 24 e 25). Os cristais de oxalato de cálcio foram evidenciados através da visualização da dissolução do cristal pelo ácido clorídrico e da insolubilidade pelo ácido acético. Numerosos idioblastos contendo ráfides são referidos também por Lersten (1974) e Morretes (1980) para espécies de Rubiaceae. Tais idioblastos, contendo cristais de oxalato de cálcio, podem estar envolvidos com a defesa da planta contra a herbivoria e também funcionarem como forma de manutenção dos nutrientes, como reserva de cálcio ou oxalato para a planta (Volk et al., 2002).

A presença de substâncias lipídicas em *G. hypocarpium* foi evidenciada nas células secretoras pela coloração vermelha obtida através dos reagentes Sudan III e Sudan IV (Figuras 11 e 12). A presença de compostos fenólicos nas células



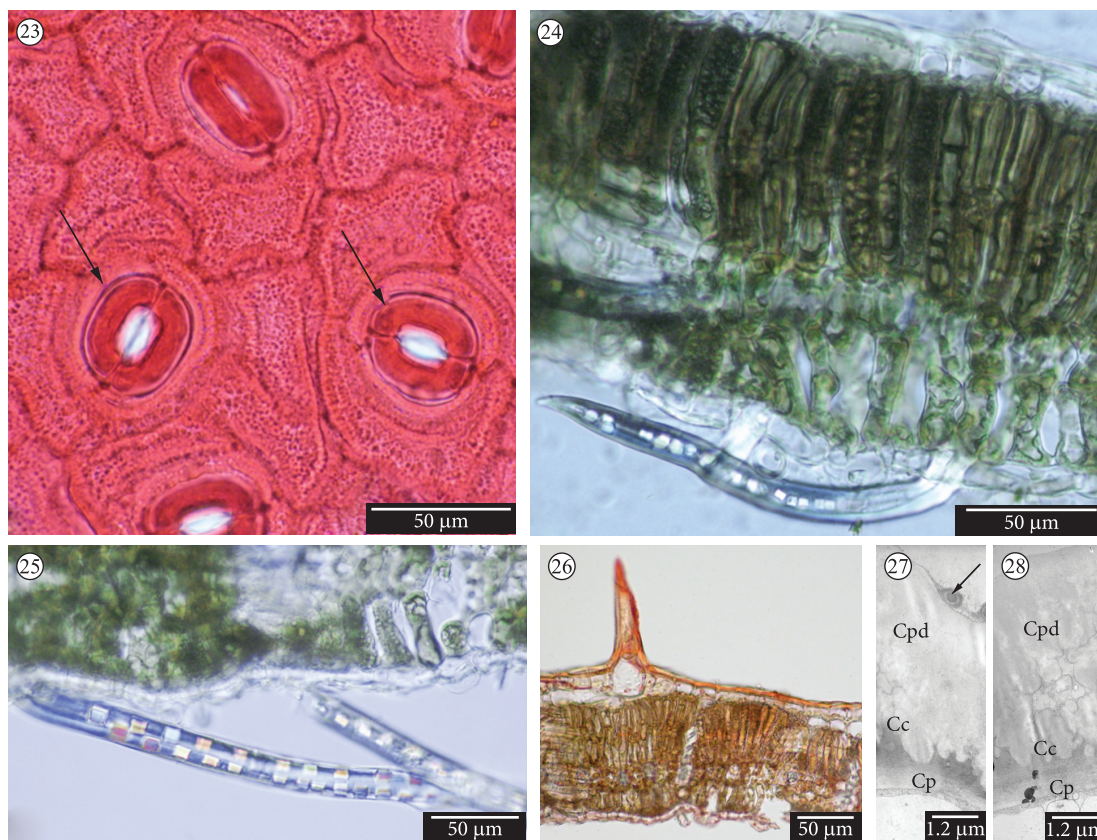
Figuras 21-22. (21) Corte transversal da lâmina foliar de *P. latifolia*, e presença de lipídeos na cutícula e no mesofilo, evidenciada pela coloração avermelhada através da marcação com Sudan III (seta). (22) Dissociação epidérmica, epiderme em face adaxial de *P. latifolia* com parede anticlinal levemente sinuosa.

Figures 21-22. (21) Cross section of leaf of *P. latifolia* and presence of lipids in the cuticle and in the mesophyll, as evidenced by the reddish color by staining with Sudan III (arrow). (22) Separation of the epidermis, adaxial epidermis of *P. latifolia* with slightly sinuous anticlinal wall.

do mesófilo de *G. viburnoides* foi evidenciada pela coloração castanho escuro obtida através do teste histoquímico com cloreto férrico 10% (Figura 24). Os testes histoquímicos com Sudan III em *G. viburnoides* mostraram a presença de lipídeos na cutícula da epiderme e nas células do mesófilo através da coloração vermelha observada nestas regiões (Figura 26). Os testes histoquímicos com Sudan III em *P. latifolia* revelaram a presença de lipídeos na cutícula na epiderme e nas células do mesófilo através da coloração vermelha observada

nestas regiões (Figura 21). A presença de pequena quantidade de compostos fenólicos nas células do mesófilo foi detectada pela coloração castanho escuro, revelada através do uso do cloreto férrico 10% (Figura 20).

A presença de metabólitos especiais tem sido utilizada como marcador taxonômico em diversos níveis de hierarquia (Harborne & Tuner, 1984). Os compostos fenólicos têm sido detectados e considerados como uma característica de valor taxonômico para a família Rubiaceae (Solereider,



Figuras 23-28. Microscopia óptica (23) Dissociação epidérmica de *P. latifolia*, epiderme em face abaxial mostrando parede anticlinal levemente sinuosa e estômatos paracíticos (setas). (24-25) Corte transversal de *G. viburnoides*. (24) Presença de compostos fenólicos pela coloração castanho evidenciada com cloreto férrico e tricoma (t) com cristais prismáticos. (25) Detalhe do tricoma com cristais prismáticos. (26) Presença de lipídeos na cutícula e no mesófilo evidenciados pelo Sudan III. 27 e 28. Microscopia eletrônica de transmissão de *Posoqueria latifolia*. (27) Corte transversal mostrando a organização da parede periclinal externa em cutícula propriamente dita (Cpd), camada cuticular (Cc) e camada polissacarídica (Cp). (28) Microrganismos sobre a parede periclinal externa (seta).

Figures 23-28. Light microscopy (23) Dissociation of epidermal *P. latifolia*, abaxial epidermis showing sinuous and slightly anticlinal wall paracytic stomata (arrows). (24-25) Cross section of *G. viburnoides* (24) Presence of phenolic compounds evidenced by the brown color with ferric chloride and trichomes (t) with prismatic crystals. (25) Detail of trichomes with prismatic crystals. (26) Presence of lipids in the cuticle and mesophyll evidenced by Sudan III. 27 and 28. Transmission electron microscopy of *Posoqueria latifolia*. (27) Cross section showing the organization of the outer periclinal wall in cuticle proper (Cpd), cuticular layer (Cc) and polysaccharide layer (Cp). (28) Microorganisms on the outer periclinal wall (arrow).

1908; Metcalfe & Chalk, 1979). Robbrecht (1988) cita a ocorrência e a distribuição de substâncias marrons, provavelmente taninos, nas lâminas foliares, ovários e frutos de Rubiaceae. Estudos fitoquímicos são necessários para determinar a estrutura química dos metabólitos especiais, verificando assim serem característicos ou não dos respectivos gêneros.

No sistema vascular da lâmina foliar de *G. hypocarpium* e *G. viburnoides*, observam-se feixes do tipo colateral envolvidos por uma bainha parenquimática. Em *G. viburnoides*, as bainhas se prolongam até a epiderme adaxial formando extensões de bainha que são formadas por células esclerificadas (Figura 16). O sistema vascular da lâmina foliar da família Rubiaceae geralmente é constituído por feixes do tipo colateral, como descrito em *Tocoyena bullata* (Vieira, 1988), espécies de *Bathysa* (Nascimento et al., 1996; Gomes et al., 2000; Moraes, 2005), *Psychotria* (Da Cunha & Vieira, 1997; Vieira et al., 1992; Gomes et al., 1995; Moraes et al., 2011b) e *Rudgea* (Leo et al., 1997; Mantovani et al., 1995; Moraes et al., 2011a). Segundo (Esau, 1974), as bainhas envolvem as terminações vasculares de modo que floema e xilema não fiquem expostos ao ar contido nos espaços intercelulares.

Apenas a espécie *G. viburnoides* apresentou extensões de bainha. Van der Merwe et al. (1994) acreditam que as extensões da bainha dos feixes vasculares desempenhem importante papel na distribuição de água pelo mesófilo e ofereçam sustentação e proteção aos tecidos vasculares. Dickison (2000) menciona que as células da bainha estão envolvidas no transporte à curta distância entre os feixes e o mesófilo, e que estas extensões proveem um suporte mecânico adicional para a lâmina foliar (Moraes, 2005). A presença de extensões de bainha em *G. viburnoides* pode ser uma característica taxonômica do gênero; no entanto, é necessária a observação anatômica de outras espécies do gênero.

Alguns dos caracteres anatômicos foram encontrados em todas as espécies estudadas e são comuns na família Rubiaceae, como folhas hipoestomáticas com estômatos paracíticos, mesófilo dorsiventral e feixes vasculares colaterais. No entanto, como características diagnósticas entre as espécies estudadas, observaram-se: célula secretora para *G. hypocarpium*; extensão de bainha do feixe

vascular e tricomas tectores com cristais prismáticos em *G. Viburnoides*, e ausência de tricomas tectores em *P. Latifolia*.

4. CONCLUSÕES

As espécies de *G. hypocarpium*, *G. viburnoides* e *P. latifolia* estudadas mostraram, em sua maioria, aspectos anatômicos mesomórficos, estando de acordo com as condições ambientais encontradas na Floresta Atlântica; mostraram, ainda, mecanismos de defesa diversos, como tricomas, estruturas secretoras, idioblastos fenólicos e espessura de parede periclinal externa, correlatos ao ambiente em que vivem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro; aos técnicos do LBCT / CBB / UENF BF Ribeiro e GA Moraes; ao Dr. S. J. da Silva Neto, pela identificação e pelo auxílio na coleta dos indivíduos.

STATUS DE SUBMISSÃO

Recebido: 07/07/2011

Aceito em: 30/08/2011

Resumo publicado online: 15/09/2011

Artigo completo publicado: 30/09/2011

AUTOR(ES) PARA CORRESPONDÊNCIA

Maura Da Cunha

Setor de Biologia Vegetal,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual,
Centro de Biociências e Biotecnologia,
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro – UENF,
Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602,
Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil
e-mail: maurauenf@gmail.com

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Accorsi WR. Ocorrência das células anexas dos estômatos na família Rubiaceae. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* 1947; 4:421-436.
- Arruda RCO, Gomes DMS, Azevedo AC, Magalhães ML, Gomes M. Leaf anatomy and micromorphology of six *Posoqueria* Aublet species (Rubiaceae). *Rodriguésia* 2010; 61(3):505-518.
- Bahaddur B, rajagopal T, Ramayya N. Studies on the structural and development variation and distribution of stomata in the Rubiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 1971; 64:295-310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1971.tb02149.x>
- Barros CF, Callado CH, Da Cunha M, Costa CG, Pugialli HRL, Marquete O et al. Anatomia ecológica e micromorfologia foliar de espécies de floresta Montana na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: Lima HC, Guedes-Bruni RR, editors. *Serra de Macaé de Cima: florística e conservação em Mata Atlântica*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 1997. p. 275-296.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 1998; 126:227-236. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x>
- Bredenkamp CL, van Wyk AE. The epidermis in *Passarina* (Thymelaeaceae): structure, function and taxonomic significance. *Bothalia* 2000; 30:69-86.
- Costa CG. Morfologia e anatomia dos órgãos vegetativos em desenvolvimento de *Marcgravia polyanta* [tese]. São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo; 1989. 106 p.
- Coutinho LM. Contribuição ao conhecimento da mata pluvial tropical. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Botânica* 1962; 18:1-219.
- Cutter EG. *Anatomia Vegetal Parte II: Órgãos-Experimentos e Interpretação*. São Paulo: Ed. Roca; 1986. 335 p.
- Da Cunha M, Vieira RC. Anatomia foliar de *Psychotria velloziana* Benth. (Rubiaceae). *Rodriguésia* 1997; 45-49:39-50.
- De Toni KLG. Análises morfológicas e moleculares dos gêneros *Galium* L. e *Relbunium* (Endl.) Hook. f. (*Rubieae* - *Rubiaceae*) no Estado do Rio Grande do Sul - Brasil [tese] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005. 59 p.
- Delprete PG, Cortés BR. A phylogenetic study of the tribe Sipaneeae (Rubiaceae, Ixoroideae), using trnL-F and ITS sequence data. *Taxon* 2004; 53(2):347-356. <http://dx.doi.org/10.2307/4135613>
- Dempster LT. The genus *Galium* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. *University of California Publications in Botany* 1978; 73:1-33.
- Dickison WC. *Integrative plant anatomy*. San Diego: Harcourt Academic Press; 2000. 533 p.
- Esau K. *Anatomia das plantas com sementes*. Tradução de Berta lange de Morretes. São Paulo: EdUSP; 1974. 231 p.
- Fahn A. *Plant Anatomy*. Oxford: Pergamon Press; 1990. 558 p.
- Fontenelle GB, Costa CG, Machado RD. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 1994; 115:111-13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1994.tb00426.x>
- Gerlach D. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1984. 311 p.
- Gomes DMS, Mantovani A, Vieira RC. Anatomia foliar de *Psychotria ternuinerives* Müll. Arg. e *Psychotria stenocalix* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 1995; 38:15-33.
- Gomes DMS, Arruda RCO, Gomes M, Vieira RC. Anatomia foliar de *Bathysa gymnocarpa* K. Schum., *B. mendonçaei* K. Schum., *B. cuspidata* (St. Hil.) Hook. F. e *B. australis* (St. Hil.) Hook. F. (Rubiaceae) da Mata Atlântica, RJ, Brasil. *Leandra* 2000; 15:59-72.
- Harborne JB, Turner BL. *Plant chemosystematics*. London: Academic Press; 1984.
- Holm, T. Rubiaceae: Anatomical studies of North American representatives of *Cephalanthus*, *Oldenlandia*, *Houstonia*, *Mitchella*, *Diodia*, and *Galium*. *Botanical Gazette* 1907; 43:153-189. <http://dx.doi.org/10.1086/329140>
- Isanogle IT. Effect of controlled shading upon the development of leaf structure in two deciduous tree species. *Ecology* 1944; 25:409-413. <http://dx.doi.org/10.2307/1932015>
- Jackson LWR. Effect of shade on leaf structure of deciduous tree species. *Ecology* 1967; 48:498-499. <http://dx.doi.org/10.2307/1932686>
- Johansen D. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.; 1940. 52 p.

- Jonhson HB. Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review* 1975; 41:233-258. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02860838>
- Juniper BEE, Jeffrey CE. *Plant Surfaces*. London: Edward Arnold; 1983.
- Kong H. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2001; 136:279-294. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2001.tb00573.x>
- Kuniyoshi YS. *Aspectos morfo-anatômicos do caule, raiz e folha de Tabebuia cassinoides (Lam.) DC. (Bignoniaceae) em diferentes fases sucessionais no litoral do Paraná* [tese] Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1993. 130 p.
- Leo RRT, Mantovani A, Vieira RC. Anatomia foliar de *Rudgea ovalis* Müll. Arg. e *R. tinguana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Leandra* 1997; 12:33-44.
- Lersten NR. Morphology and distribution of colleter and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 1974; 61(9):973-981. <http://dx.doi.org/10.2307/2441988>
- Liakoura V, Stefanou M, Manetas Y, Cholevas C, Karabourniotis G. Trichome density and its UV-b protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environmental and Experimental Botany* 1997; 38:223-229. [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(97\)00005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(97)00005-1)
- Macedo EG, Santos Filho BG, Potiguara RCV, Santos DSB. Anatomia e arquitetura foliar de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) espécie da várzea amazônica. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Ciências Naturais* 2005; 1(1):19-43.
- Mantovani A, Vieira RC. Leaf surface of two understory shrubs *Rudgea decipiens* Müll. Arg. and *R. macrophylla* Benth. (Rubiaceae). *Rodriguésia* 1997; 45-49:7-13.
- Mantovani A, Gomes M, Gomes DMS, Vieira RC. Anatomia foliar de *Rudgea decipiens* Müll. Arg. and *R. macrophylla* Benth. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasílica* 1995; 9:247-261. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33061995000200005>
- Mariath, J.E.A. *Morfologia e anatomia de Relbunium hypocarpium (L.) Hemsl. E Relbunium hirtum (Lam.) K. Schum. (Rubiaceae - Rubiaceae) do Morro do Santana, Porto Alegre, RS, Brasil*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre:134p. 1979.
- Martin JT. Role of cuticle in the defense against plant disease. *Revista Phytopathology* 1964; 2:81-100. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.02.090164.000501>
- Mclean RC, Cook WRL. *Plant Science Formulae*. London: Macmillan & Company Ltd; 1958.
- Metcalf CR, Chalk L. *Anatomy of Dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press; 1950. v. 2, 1500 p.
- Metcalf CR, Chalk L. *Anatomy of Dicotyledons*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1979. v. 1, 276 p.
- Metcalf CR, Chalk L. *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press; 1985. v. 2, 297 p.
- Metcalf CR, Chalk L. *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon, 1988. v. 1.
- Moraes TMS. *Aspectos anatômicos e ultraestruturais da lâmina foliar de espécies de Simira e Bathysa (Rubiaceae) da floresta Atlântica do estado do Rio de Janeiro* [tese]. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense; 2005. 75 p.
- Moraes TMS, Barros CF, Silva Neto SJ, Gomes VM, Da Cunha M. Leaf blade anatomy and ultrastructure of six *Simira* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rain Forest, Brazil. *Biocell* 2009; 33:155-165.
- Moraes TMS, Barros CF, Kawashima CG, Miguens FC, Da Cunha M. Domatia and leaf blade structure of *Rudgea eugenioides* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 2011a; 9(1):25-32.
- Moraes TMS, Rabelo GR, Alexandrino CR, Silva Neto SJ, Da Cunha M. Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Botanica Brasílica* 2011b; 25:168-177. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062011000100021>
- Morretes BL. *Contribuição ao conhecimento da anatomia ecológica de plantas de Cerrado de Emas - SP e da Caatinga Amazônica do km 62 da rodovia BR 171* [tese] São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo; 1980. 276 p.
- Nascimento MVO, Gomes DMS, Vieira RC. Anatomia foliar de *Bathysa stipulata* (Vell.) Presl. (Rubiaceae). *Revista UNIMAR* 1996; 18:387-401.
- O'Brien TP, Feder N, McCully M. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 1965; 59(2):368-73. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01248568>
- Quinet A, Callado HC, Barros CF, Lima HC, Braga JM, Lima MPM et al. *Mata Atlântica, 500 anos*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2000. [CD-ROM].
- Robbrecht E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica Meise* 1988; 271 p.
- Robbrecht E, Manen J. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on rbcL, rps16, trnL-trnF and atpB-rbcL data. A new classification in two subfamilies, Cinchonodeae

- and Rubioideae. *Systematics and Geography of Plants* 2006; 76:85-146.
- Rova JHE, Delprete PG, Anderson L, Albert VA. A trnL-F CPDNA sequence study of Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of Rubiaceae. *American Journal of Botany* 2002; 89:145-159. PMID:21669722. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.89.1.145>
- Salatino A, Montenegro G, Salatino MLF. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 1986; 9(2):117-124.
- Sass JE. *Botanical microtechnique*. 2nd ed. Ames: The Iowa State College Press; 1951. 391 p.
- Smith WK, McClean TM. Adaptive relationship between leaf water repellency, stomatal distribution, and gas exchange. *American Journal of Botany* 1989; 76:465-469. <http://dx.doi.org/10.2307/2444617>
- Solereder H. *Systematic anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press; 1908. 1182 p.
- Taiz L, Zeiger E. *Plant physiology*. 2nd ed. Massachusetts: Publishers Sinauer Associates, Inc.; 1998. p. 1-717.
- Van der Merwe AM, van der Walt JJA, Marais EM. Anatomical adaptations in the leaves of selected fynbos species. *South African Journal of Botany* 1994; 60(2):99-107.
- Vieira RC. *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae). Anatomia foliar. *Rodriguésia* 1986-88; 38-40:33-39.
- Vieira RC, Gomes DMS, Ferraz CL. Anatomia foliar de *Psychotria nuda* Wawra e *Psychotria leiocarpa* Mart. (Rubiaceae). *Hoehnea* 1992; 19(1-2):185-195.
- Vieira RC, Gomes DMS. Superfície da lâmina foliar de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra, *P. leiocarpa* Cham. & Schltdl., *P. stenocalix* Müll. Arg. e *P. tenuinervis* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 1995; 9:263-270. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33061995000200006>
- Vieira RC, Delprete PG, Leitão GG, Leitão SG. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 2001; 88:2151-2156. PMID:21669647. <http://dx.doi.org/10.2307/3558376>
- Volk GM, Lynch-Holm VJ, Kostman TA, Goss LJ, Franceschi VR. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biology* 2002; 4:34-45. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2002-20434>
- Werker E. Trichome diversity and development. In: Hallahan DL, Gray JC, editors. *Plant Trichomes*. London: Academic Press; 2000. Advances in Botanical Research, n. 31, p. 1-30.
- Wilkinson HP. The plant surface. In: Metcalfe CR, Chalk L, editors. *Anatomy of the Dicotyledons: Systematic Anatomy of the leaf and stem*. Oxford: Clarendon Press; 1979. v. 1. p. 97-165.
- Wylie RB. The role of epidermis in the foliar organization and its relations to the minor venation. *American Journal of Botany* 1943; 30:273-280. <http://dx.doi.org/10.2307/2437454>
- Wylie RB. Principles of foliar organization shown by sunshade leaves from ten species of deciduous dicotyledons trees. *American Journal of Botany* 1951; 38:355-361. <http://dx.doi.org/10.2307/2437823>