

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**COLÉTERES FOLIARES EM *CLUSIA BURCHELLI* ENGL. E  
*CLUSIA CRIUVA* CAMBESS. SUBSP. *CRIUVA* (CLUSIACEAE)**

Autora: Roberta Silva Teixeira

Orientadora: Valdneá Casagrande Dalvi

RIO VERDE – GO

Agosto – 2020

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**COLÉTERES FOLIARES EM *CLUSIA BURCHELLI* ENGL. E  
*CLUSIA CRIUVA* CAMBESS. SUBSP. *CRIUVA* (CLUSIACEAE).**

Autora: Roberta Silva Teixeira

Orientadora: Valdnéa Casagrande

Dalvi

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em Biodiversidade e Conservação, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Conservação dos Recursos Naturais.

**RIO VERDE – GO**

**Agosto – 2020**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

TT266c Teixeira, Roberta Silva  
Coléteres foliares em *Clusia burchelli* Engl. e  
*Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* (Clusiaceae).  
/ Roberta Silva Teixeira; orientadora Valdneá  
Casagrande Dalvi; co-orientador Diego Ismael Rocha. -  
- Rio Verde, 2020.  
70 p.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e  
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio  
Verde, 2020.

1. *Clusia*. 2. Coléteres. 3. Guttiferae. 4.  
Secreção. I. Casagrande Dalvi, Valdneá, orient. II.  
Ismael Rocha, Diego, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 36/2020 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/DG-RV/CMPRV/IFGOIANO

COLÉTERES FOLIARES EM *CLUSIA BURCHELLI* ENGL. E *CLUSIA CRIUVA* CAMBESS. SUBSP. *CRIUVA*  
(CLUSIACEAE)

Autora: Roberta Silva Teixeira  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdneá Casagrande Dalvi

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos  
Recursos Naturais

APROVADO em 24 de agosto de 2020.

Prof. Dr. Vinicius Coelho Kuster  
Avaliador externo - UFJ / Jataí

Prof. Dr. Ítalo Antônio Cotta  
Coutinho  
Avaliador externo - UFCE / Pici

Prof. Dr. Valdneá Casagrande Dalvi  
Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Ítalo Antônio Cotta Coutinho, Ítalo Antônio Cotta Coutinho - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal do Ceará (07272636000131), em 25/08/2020 17:08:32.
- Vinícius Coelho Kuster, Vinícius Coelho Kuster - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Goiás (01567601000143), em 24/08/2020 16:02:26.
- Valdnea Casagrande Dalvi, COORDENADOR DE CURSO - FUC0001 - CCGRAD-RV, em 24/08/2020 14:23:23.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 12/08/2020. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 173539  
Código de Autenticação: 8a997eceeab



INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
Campus Rio Verde  
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970  
(64) 3620-5600

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES  
TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- Tese  Artigo Científico  
 Dissertação  Capítulo de Livro  
 Monografia – Especialização  Livro  
 TCC - Graduação  Trabalho Apresentado em Evento  
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: \_\_\_\_\_

Nome Completo do Autor: Roberta Silva Teixeira

Matrícula: 2018202310840077

Título do Trabalho: Coléteres foliares em *Clusia burchelli* Engl. e *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* (Clusiaceae).

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique:

---

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 26/10/2020

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e

que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;

3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 23/10/2020



Assinatura do

---

Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



---

Assinatura da orientadora



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 35/2020 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/DG-RV/CMPRV/IFGOIANO

## PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO

ATA Nº/46

### BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e quatro dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte, às 09h00min (nove horas), reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada por videoconferência, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **Roberta Silva Teixeira**, discente do Programa de PósGraduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal Goiano – Campus Rio

Verde. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valdneá Casagrande Dalvi, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida a autora para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação Biodiversidade e Conservação, e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRA EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**, na área de

concentração em Conservação dos Recursos Naturais, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGBio da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a



defesa perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60 (sessenta) dias** da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa dissertação em periódicos após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da Banca Examinadora.

Membros da Banca Examinadora

<b>Nome</b>	<b>Instituição</b>	<b>Situação no Programa</b>
Prof. <sup>a</sup> . Dr. <sup>a</sup> . Valdneá Casagrande Dalvi	IF Goiano – Campus Rio Verde	Presidente
Prof. Dr. vinicius Coelho Kuster	UFJ - Jataí	Membro externo

Prof. Dr. Ítalo Antônio Cotta Coutinho	UFCE - Pici	Membro externo
--	-------------	----------------

Documento assinado eletronicamente por:

- **Ítalo Antônio Cotta Coutinho**, Ítalo Antônio Cotta Coutinho - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal do Ceará (07272636000131), em 25/08/2020 17:07:35.
- **Vinícius Coelho Kuster**, Vinícius Coelho Kuster - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Goiás (01567601000143), em 24/08/2020 15:59:39.
- **Valdnea Casagrande Dalvi**, COORDENADOR DE CURSO - FUC0001 - CCGRAD-RV, em 24/08/2020 14:40:31.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 12/08/2020. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 173556  
Código de Autenticação: 0211e1ffd2



INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
Campus Rio Verde  
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970  
(64) 3620-5600

## **DEDICATÓRIA**

Esse trabalho é dedicado especialmente à minha mãe Iraci Meneses Silva, a minha irmã Viviane Meneses Teixeira e meu tio João Menez da Silva pelo apoio, conselhos e toda ajuda incondicional que sempre me deram em todos os momentos durante o período em que me dediquei ao mestrado.

A Alex Batista Moreira Rios que se tornou ainda mais que um amigo e sim um irmão de coração, sempre me dando ótimos conselhos, me ajudando com estadia em Rio Verde e transmitindo ensinamentos de sua experiência em escrita, os quais favoreceram meu desempenho para o término do meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por não me desamparar em nenhum momento ao longo dessa etapa de minha formação acadêmica, onde aprendi, vivi experiências e conheci pessoas fantásticas, que me fizeram, evoluir e amadurecer como ser humano e profissional.

As equipes do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Laboratório de Ecologia e Sistemática Vegetal – Herbário e Laboratório de química orgânica e experimental do Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, por todo o apoio logístico que me concederam e pela convivência que me trouxe muitos aprendizados. Agradeço especialmente a Valdeir Martins por toda sua ajuda em laboratório e sua amizade.

O coorientador Diego Ismael Rocha pelos ensinamentos e supervisão que foram essenciais para coletar dados e redigir minha dissertação.

Ao José Nascimento Júnior, taxonomista, que de muito bom grado me auxiliou na identificação e confirmação das espécies estudadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) financiamento código 001, pela bolsa concedida e bem aproveitada.

Aos meus colegas de turma, pela convivência, troca de experiências e companheirismo que foram muito importantes para fortalecer a determinação para cursar o mestrado.

A equipe do Núcleo de Microscopia (LabMic) da Universidade Federal de Goiás (UFG), campus Samambaia, Goiânia-GO por todo atendimento dado para que as imagens de microscopia eletrônica de varredura fossem obtidas.

E por último e não menos importante, minha orientadora Valdneá Casagrande Dalvi, por jamais ter hesitado em me atender, ensinar, estimular meu senso crítico e sempre acreditar no meu potencial em todos os momentos ao longo dessa jornada. Serei eternamente grata por nossa convivência produtiva, a amizade construída e pela excelente formação profissional que recebi. Pode ter a certeza de que você se tornou uma referência e um exemplo de docente, pesquisadora e ser humano para essa mestranda que sempre carregara seus ensinamentos ao longo da vida.

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Nascida no município de Acreúna – GO.

Graduada em Ciências Biológicas – modalidade licenciatura, pelo Instituto Federal de Ensino, Educação e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde.

Durante o período em que foi aluna do mestrado em Biodiversidade e Conservação no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, adquiriu formação e desenvolveu um projeto de pesquisa de anatomia vegetal com ênfase em estruturas secretoras.

## ÍNDICE

	Página
Resumo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Abstract .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	1
1	
1.1. A família Clusiaceae.....	11
1.2. O gênero <i>Clusia</i> .....	12
1.3. Coléteres.....	12
2. Referências.....	13

3. Objetivos.....	19
Capítulo I.....	20
Abstract.....	21
Acknowledgements.....	22
Compliance with ethical standards.....	22
Author contributions.....	22
Introduction.....	23
Material and methods.....	24
Results.....	26
Discussion.....	28
References.....	32
Capítulo II -.....	47
Resumo.....	48
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	50
Resultados.....	52
Discussão.....	55
Agradecimentos.....	60
Referências.....	60
Considerações finais.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Capítulo I.....	
Figure 1. Distribution of colleters in vegetative apex and leaves of <i>Clusia burchelli</i> ...	42
Figure 2. Ontogeny and structural characterisation of <i>Clusia burchelli</i> colleters.....	43
Figure 3 Histochemical characterisation of <i>Clusia burchelli</i> colleters.....	44
Figure 4. Ultrastructural characterisation of <i>Clusia burchelli</i> colleters.....	45
 Capítulo II.....	
Figura 1. Local de coleta e amostragem <i>Clusia criuva</i> Cambess. subsp. <i>criuva</i> .....	70
Figura 2. Coléteres em <i>Clusia criuva</i> Cambess. subsp. <i>criuva</i> .....	71
Figura 3. Seções anatômicas dos coléteres foliares de <i>Clusia criuva</i> Cambess. subsp. <i>criuva</i> coradas com Azul de Toluidina.....	72
Figura 4. Testes histoquímicos dos coléteres de <i>Clusia criuva</i> Cambess. subsp. <i>criuva</i> em três estágios de desenvolvimento foliar.....	73
RESUMO	

TEIXEIRA, ROBERTA SILVA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2020. **Coléteres foliares em *Clusia burchelli* Engl. e *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* (Clusiaceae)**. Orientadora: Valdneá Casagrande Dalvi. Coorientador: Diego Ismael Rocha.

Secreções de grande importância econômica e ecológica são amplamente estudadas em Clusiaceae, no entanto os relatos de estruturas secretoras conhecidas como coléteres, são escassos para o grupo. Assim, objetivamos caracterizar os coléteres foliares de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* e de *Clusia burchelli* Engl., identificar os compostos químicos produzidos em diferentes estágios de desenvolvimento foliar e identificar a morfologia dessas estruturas. Folhas em diferentes estágios de desenvolvimento (meristemas com primórdios foliares, folhas adultas e folhas senescentes) foram coletados e processadas segundo técnicas usuais para microscopia de luz, incluindo testes histoquímicos; microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (*Clusia burchelli*). Nas duas espécies os coléteres ocorrem na face adaxial das folhas, na região de inserção com o caule. São avascularizados, possuem um pedúnculo curto, uma cabeça multicelular formada por um eixo central de células parenquimáticas e uma epiderme secretora, sendo classificados como coléteres do tipo padrão. No entanto, a maioria dos coléteres de *Clusia burchelli* são alargados da base até o ápice enquanto outros apresentam formato de cone. Em *Clusia criuva* subsp. *criuva*, os coléteres possuem um formato lacrimiforme e uma constrição na porção apical. Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de polissacarídeos, pectinas, compostos fenólicos e alcaloides nos coléteres nos três estágios de desenvolvimento da folha em ambas as espécies. Proteínas foram evidenciadas na secreção e nas células da porção secretora de *Clusia criuva* subsp. *criuva*. Em *Clusia burchelli* foram encontrados ainda lipídios na secreção e gotas de óleo essencial no interior das células secretoras. A diferença na composição química da secreção pode estar relacionada com o ambiente onde as espécies ocorrem sendo *Clusia burchelli* endêmica do cerrado e *Clusia criuva* subsp. *criuva* ocorrente na Mata Atlântica ou pode ser características intrínsecas das espécies.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Clusia*, Coléteres, Guttiferae, Secreção.

**ABSTRACT**



TEIXEIRA, ROBERTA SILVA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2020. **Leaf colleters in *Clusia burchelli* Engl. and *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* (Clusiaceae).** Orientadora: Valdneá Casagrande Dalvi. Coorientador: Diego Ismael Rocha.

Secretions of great economic and ecological importance are widely studied in Clusiaceae, however reports of secretory structures known as colleters are scarce for the group. Thus, we aim to characterize the leaf colleters of *Clusia* created Cambess. subsp. *criuva* and *Clusia burchelli* Engl., to identify chemical compounds produced at different stages of leaf development and to identify the morphology of these structures. Leaves at different stages of development (meristems with leaf primordia, adult leaves and senescent leaves) were collected and processed according to usual techniques for light microscopy, including histochemical tests; scanning electron microscopy and transmission electron microscopy (*Clusia burchelli*). In both species, colleters occur on the adaxial surface of the leaves, in the region of insertion with the stem. They are avascularized, have a short peduncle, a multicellular head formed by a central axis of parenchymal cells and a secretory epidermis, being classified as standard type colleters. However, most *Clusia burchelli* colleters are extended from the base to the apex while others are cone-shaped. In *Clusia* he created subsp. *criuva*, the colleters have a lacrimiform shape and a constriction in the apical portion. Histochemical tests showed the presence of polysaccharides, pectins, phenolic compounds and alkaloids in the secretion of colleters in the three stages of leaf development in both species. Proteins were evidenced in the secretion and in the cells of the secretory portion of *Clusia* created subsp. *criuva*. *Clusia burchelli* also found lipids in the secretion and drops of essential oil inside the secretory cells. The difference in the chemical composition of the secretion may be related to the environment where the species occur, *Clusia burchelli* being endemic to the cerrado and *Clusia* creating subsp. occurring in the Atlantic Forest or may be intrinsic characteristics of the species.

KEY WORDS: *Clusia*, Colleters, Guttiferae, Secretion.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A família Clusiaceae

A família Clusiaceae Lindley, composta por 27 gêneros cerca de 1.000 espécies (Judd et al. 2009), é dividida em duas subfamílias: Clusioideae e Kielmeyeroideae (Stevens 2005). Clusiaceae apresenta distribuição cosmopolita, no entanto a maior diversidade nas regiões neotropicais (Kumar et al. 2013). No Brasil, as espécies estão distribuídas do Rio Grande do Sul ao Amazonas e são encontradas especialmente na Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado (Brittich 2010). O catálogo de plantas e fungos do Brasil descreve a presença de 10 gêneros de Clusiaceae, compreendendo 123 espécies, sendo que destas 43 são endêmicas. Entre os gêneros de maior ocorrência no Brasil estão os gêneros *Clusia* L. com 63 espécies e *Tovomitita* Planch. & Triana com 30 espécies (Forzza et al. 2010).

As espécies dessa família possuem hábitos bastante variados incluindo plantas arbóreas, epífitas, hemiepífitas ou, ocasionalmente lianas (Gustafsson 2000). Os caracteres vegetativos e florais possuem valor diagnóstico, principalmente em nível genérico e específico (Judd et al. 2009). Dentre as sinapomorfias da família destacam-se a produção de compostos químicos (por exemplo, xantonas, benzofenonas da classe dos compostos fenólicos e hidrocarbonetos, quinonas e proteínas) (Stevens 2001; Ruhfel et al. 2011).

Clusiaceae é conhecida pelo uso de látex da espécie *Clusia insignis* Mart. e de outras espécies dos gêneros *Moronobea* Aubl., *Platonia* Mart. e *Symphonia* L. para calafetar barcos, confeccionar máscaras, tochas entre outras utilizações (Steyermark et al. 1998). No entanto, o exsudato comumente denominado de látex foi recentemente identificado como resina (Alencar et al. 2020). Segundo esses autores, a resina pode variar muito em sua composição, entre espécies diferentes ou entre diferentes órgãos da mesma espécie, mas é sempre predominantemente terpênica. Assim, espécies de *Clusia* e alguns representantes do clado Clusióide não possuem látex mas sim ductos secretores resiníferos.

As resinas florais também merecem destaque na família. Brittich et al. (2010) relatam que as resinas, sendo assim classificadas pelo seu aspecto físico (óleo viscoso) e não químico, são conhecidas em duas famílias de angiospermas: Euphorbiaceae e Clusiaceae (espécies de *Clusia* L., *Clusiella* Planch. & Triana e uma espécie do gênero *Tovomitopsis* Planch. & Triana). Estruturas secretoras de resina são relatadas em flores de *Clusia*

*valeoroi* Standl. e em espécies de *Kielmeyera* Mart. & Zucc., não sendo especificado qual a natureza dessas estruturas (Gustafsson et al. 2007; Hochwallner and Weber 2006) bem como em folhas dos gêneros *Kielmeyera* Mart. & Zucc., *Vismia* Vand., *Hypericum* L., *Calophyllum* L., *Clusia* L., *Tovomitopsis* Planch. & Triana e *Garcinia* L. (Bittrich 2010).

Ecologicamente o “látex” protege a planta contra o ataque de microrganismos e a resina é usada pelas abelhas na construção de seus ninhos e protege também contra a invasão de microrganismos devido a ação bactericida de seus constituintes (Lokvam et al. 2000). Flores de ambos os sexos oferecem resina como recompensa (Lokvam et al. 2000).

## 1.2. O gênero *Clusia*

Um dos maiores gêneros da família é o gênero neotropical *Clusia*, que consiste em 300-400 espécies (Lüttge 2007) das quais 68 são encontradas no Brasil (Bittrich et al. 2015). As espécies do gênero ocorrem desde a América Central até o sul do Brasil (Gustafsson et al. 2007). No Brasil o gênero possui ampla ocorrência sendo sua ocorrência confirmada para todas as regiões brasileira (Flora do Brasil 2020), se destacando ainda por sua importância ecológica (nas formações de restinga), medicinal e ornamental (Judd et al. 2009).

*Clusia* apresenta uma grande importância para a medicina popular sendo frequentemente produzidas infusões a partir das partes aéreas (folhas e casca) as quais são usadas para o tratamento de problemas reumáticos, como purgativa e curar feridas (Corrêa 1984), para problemas estomacais (Silva 2010), anti-HIV e antifúngica (Machado 2002; Wu et al. 2014). Além disso têm sido investigados sua ação analgésica, antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante, antiparasitária, antitumoral, citotóxica, imunomoduladora e hipolipidêmica com resultados promissores na maioria dos casos (Camargo 2002; Ferreira 2012).

Dentre os princípios ativos relatados para o gênero destacam-se as benzofenonas poliisopreniladas, terpenoides, benzoquinonas, flavonoides (Andrade et al. 1998; Camargo 2002; Silva 2010; Anholetti et al. 2015) triterpenos, esteroides, ácidos tocotrienolídicos, bifenilas e xantonas (Camargo 2002; Ferreira 2012).

### 1.3. Coléteres

Além das glândulas de resina a presença de coléteres foi registrada para espécies da família Clusiaceae (Thomas 1991) principalmente para o gênero *Clusia* (Machado & Emmerich 1981; Thomas 1991; Bittrich 2010; Silva et al. 2019).

Coléteres são estruturas secretoras externas encontradas na superfície adaxial de órgãos reprodutivos e/ou vegetativos jovens de um grande número de famílias (Thomas 1991). Recentemente Vilhalva et al. (2016) relataram coléteres em órgãos subterrâneos de *Galianthe grandifolia* E.L. Cabral (Rubiaceae).

A palavra coléter vem do grego colla, “cola”, indicando a secreção pegajosa desta estrutura constituída unicamente por mucilagem (Fahn 1979; Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn 1979, 1990; Kronstedt & Robards 1991).

A função principal da secreção produzida por coléteres relaciona-se com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, sendo estes lubrificados e protegidos contra dessecação (Thomas 1991). A porção lipofílica atua como dissuasivo contra microrganismos (Demarco 2005); repelente de insetos, impedimento aos herbívoros (Smith 1963; Curtis & Lersten 1974); defesa contra patógenos, e como um notável agente antimicrobiano, inibindo a proliferação de fungos e atividade bacteriana (Castro & Demarco 2008; Calvo et al. 2010; Cardoso-Gustavson et al. 2014).

Observações relativas à duração funcional dos coléteres de *Clusia langsdorffii* reforçam a hipótese que essas estruturas oferecem proteção às folhas jovens, já que estão presentes apenas durante a fase em que as folhas em desenvolvimento são especialmente suscetíveis à desidratação (Paiva 2009). Mayer et al. (2011) defendem que o termo “coléter” é melhor utilizado como um conceito funcional, já que somente a composição e função do exsudato são pré-condições a sua caracterização. Além da função ecológica, a presença e o tipo de coléteres são importantes parâmetros taxonômicos e filogenéticos (Coutinho et al. 2015) dentre os quais destacam-se estudos com espécies de Apocynaceae (Thomas 1991; Demarco 2005), Aquifoliaceae (Thomas 1991; González and Tarragó 2009), Euphorbiaceae (Thomas 1991; Vitarelli et al. 2015), Gentianaceae (Thomas 1991; Renobales et al. 2001), Rubiaceae (Lester 1974; Thomas 1991) e Leguminosae (Coutinho et al. 2015; Silva et al. 2017) entre outras.

## 2. REFERÊNCIAS

Alencar AC, Tölke ED, Mayer JLS. 2020. New perspectives on secretory structures in *Clusia* (Clusiaceae – Clusiod clade): production of latex or resins? *Botany* 00: 1–12.

Andrade MR, Almeida EX, Conserva LM 1998. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. *Phytochemistry* 47: 1431-1433.

Anholeti MC, Paiva SR, Figueiredo MR, Kaplan MAC 2015. Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)* 87: 289-301.

Bittrich, V 2010. Clusiaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000089> [acessado em: Outubro 2019].

Bittrich V, Trad RJ, Cabral FN, Nascimento-Jr JE, Souza VC 2015. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB28292>>

Calvo TR, Demarco D, Santos FV, Moraes HP, Bauab TM, Varanda EA, Cólus IMS, Vilegas W 2010 Phenolic compounds in leaves of *Alchornea triplinervia*: anatomical localization, mutagenicity, and antibacterial activity. *Natural Product Communication* 5: 1225–1232.

Camargo DMS 2002. Avaliação do potencial mutagênico, genotóxico, estrogênico e modulação da expressão gênica pelo nemorosone, isolado da resina de *Clusia rosea*. Universidade Estadual Paulista.

Cardoso-Gustavson P, Campbell LM, Viveiros-Mazzoni S, Barros F 2014 Floral colleters in Pleurothallidinae (Epidendroideae: Orchidaceae). *American Journal of Botany* 101: 587–597.

Castro MM & Demarco D 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communication* 3: 1273–1284.

Corrêa MP 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, vol. 1. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília.

Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA 2015. New records of colleters in *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae S.L.): structural diversity, secretion, functional role, and taxonomic importance. *International Journal of Plant Sciences* 176: 72-85.

Curtis JD & Lersten NR 1974. Morphology, seasonal variation and function of resin glands on buds and leaves of *Populus deltoides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 61: 835-845.

Demarco D 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. and *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.). MSc Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fahn A 1990. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.

Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. London, Academic Press.

Ferreira RO, De Carvalho MG, Da Silva TMS 2012. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. *Quimica Nova* 35: 2271–2277.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB16871>>. Acesso em: 26 Set. 2019.

Forzza RC, Leitman PM, Costa A, Carvalho AA Jr, Peixoto AL, Walter BMT, Bicudo C, Zappi D, Costa DP, Lleras E, Martinelli G, Lima HC, Prado J, Stehmann JR, Baumgratz JFA, Pirani JR, Sylvestre LS, Maia LC, Lohmann LG, Paganucci L, Silveira M, Nadruz

M, Mamede MCH, Bastos MNC, Morim MP, Barbosa MR, Menezes M, Hopkins M, Secco R, Cavalcanti T, Souza VC 2010. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

González AM, JR Tarragó 2009. Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America. *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 197-210.

Gustafsson MHG 2000. Floral morphology and relationships of *Clusia grundlachii* with a discussion of floral organ identity and diversity in the genus *Clusia*. *International Journal of Plant Science* 161: 43–53.

Gustafsson MHG, Winter K, Bittrich V 2007. Diversity, Phylogeny and Classification of *Clusia*. In: U. Lüttge (ed.). *Clusia: A Woody Neotropical Genus Remarkable Plasticity and Diversity*. Ecological Studies. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. v. 194.

Hochwallner H and Weber A 2006. Flower development and anatomy of *Clusia valerioi*, a Central American species of Clusiaceae offering. *Flora* 201: 407-418.

Judd WS, Campbell EA, Kellogg CS, Stevens PF, Donoghue MJ 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. [Plant systematics: a phylogenetic approach]. Rodrigo B. Singer et al. (Trad.) 3a ed. Porto Alegre, Artmed.

Kronstedt E & Robards A 1991. Exocytosis in gland cells. In *Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants* (C. Hawea, J. Coleman & D. Evans, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.199-232.

Kumar S, Sharma S, Chattopadhyay SK 2013. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia*, p.86-125.

Lersten NR 1974. Morfologia e distribuição de coléteres e cristais em relação à taxonomia e simbiose bacteriana de nódulos foliares de *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973-981.

Lokvam J, Braddock JF, Reichardt PB, Clausen TP 2000. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry* 55: 29-34.

Lüttge U (ed.) 2007. *Clusia* – A woody Neotropical genus of remarkable plasticity and diversity. *Ecological studies*, vol. 194. Springer, New York.

Machado IC 2002. *Biologia da Polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, 527 p.

Machado MMP & Emmerich M 1981. Presença de coléteres em *Clusia lanceolata* Cambess. *Boletim do Museu nacional, Botânica* nº 59, 27 de março, Rio de Janeiro – Brasil.

Mayer JLS, P Cardoso-Gustavson, B Appezzato-Da-Glória 2011 Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* 206: 185-190.

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

Renobales G, De 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.

Ruhfel BR, Bittrich V, Bove CP, Gustafsson MH, Philbrick CT, Rutishauser R, Xi Z, Davis CC. 2011. Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany* 98: 306–325.

Silva KMM, Luna BN, Joffily A, Paiva SR, Barros CF 2019. Revealing the development of secretory structures in the leaves of *Clusia fluminensis* and *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). *Flora* 256: 69–78.



Silva MDS, IAC Coutinho, MN Araújo, RMSA Meira 2017 Colleters in *Chamaecrista* (L.) Moench sect. *Chamaecrista* e seita. *Caliciopsis* (LeguminosaeCaesalpinioideae): implicações de anatomia e taxonomia. *Acta Botanica Brasilica*, 31(3): 382-391. doi: 10.1590/0102-33062016abb0339

Silva FC 2010. Benzofenonas em Guttiferae e Perfil Fitoquímico dos Extratos Lipofílicos de *Clusia criuva*, *Clusia fluminensis* e *Hypericum carinatum*. Porto Alegre.

Smith RH 1963. Preferential attack by *Dendroctonus terebrans* on *Pinus elliottii*. *Journal of Economic Entomology* 56: 817-819.

Stevens PF 2005. Angiosperm Phylogeny Website. Version 6, May 2005. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Steyermark JA, Berry PE, Holst BK, Yatskievych K 1998. Flora of the Venezuelan Guayana, Volumen 4, pp. 799. Caesalpinaceae-Ericaceae. Missouri Botanical Garden, St. Louis, USA.

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

Vilhalva DAA, Cortelazzo AL, Gomes SM 2016. Morfo-anatomia do xilopódio do geoarbusto *Galianthe grandifolia* E.L. Cabral (Rubiaceae) e a ocorrência incomum de coléteres subterrâneos. *Jardim Botânico de Brasília* 10: 35-58.

Vitarelli NC, R Riina, MBR Caruzo, I Cordeiro, J Fuertes-Aguilar, RMSA Meira 2015 Foliar secretory structures in Crotonae (Euphorbiaceae): Diversity, anatomy, and evolutionary significance. *American Journal of Botany* 102: 833-847

Wu Shi-Biao, Long C, Kennelly EJ 2014. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. *Natural Product Reports* 31: 1158-1174.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Compreender a estrutura anatômica dos coléteres foliares de duas espécies de *Clusia* identificando as principais classes de metabólitos secretados e as variações na estrutura e composição da secreção ao longo do desenvolvimento foliar.

#### **3.2. Específicos**

- Caracterizar por meio de avaliações morfoanatômicas os coléteres foliares de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* e *Clusia burchelli* Engl.;
- Descrever a micromorfologia dos coléteres;
- Identificar através de testes histoquímicos a composição do exsudato de ambas as espécies;
- Identificar os mecanismos de síntese e liberação da secreção de *Clusia burchelli* Engl.e;
- Averiguar o desenvolvimento dessas estruturas secretoras bem como as possíveis mudanças na composição da secreção de acordo com o desenvolvimento foliar.

Capítulo I

**ORIGINAL ARTICLE**

Artigo submetido no periódico *Naturwissenschaften* (The Science of Nature)

**Leaf colleters in *Clusia burchellii* Engl.: Structural and ultrastructural features of a little-known secretory structure in Clusiaceae**

Roberta Silva Teixeira<sup>1</sup>; Diego Ismael Rocha<sup>2</sup>; Valdneá Casagrande Dalvi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano, *Campus* Rio Verde), Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, CEP 75901-970, Rio Verde, Goiás, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Jataí. BR 364, km 195, nº 3800 – Cidade Universitária, CEP 75801-615, Jataí, Goiás, Brazil.

**ORCID:** Teixeira RS (0000-0003-2902-6602); Rocha DI (0000-0001-6683-0961); Dalvi VC (0000-0002-9325-2025)

\*Corresponding author: valdnea.dalvi@ifgoiano.edu.br +55 65 99614-1679

**Abstract**

Clusiaceae species are known globally for the economic importance of their secretory structures; however, reports of colleters in the family are scarce. Therefore, in the present study, we characterised the leaf colleters in *Clusia burchellii* by investigating the nature of the major chemical substances of the secretions and the cellular aspects associated with the synthesis and release of the secretions. Meristem with leaf primordia and leaf samples at different developmental stages were collected, fixed in FAA (formalin, acetic acid, and 50% ethanol), and examined under light and electron microscopy. Histochemical tests were performed to determine the nature of the secreted substances. Colleters of the standard type occur at the base of the petiole, are sessile or short pedunculated, and originate from protoderm and ground meristem cells. During leaf development, young, active, and whitish colleters become brownish and inactive at late developmental stages. Alkaloids and phenolic compounds were common in central axis cells. Proteins were not observed in the secretions; however, a mixture of hydrophilic and lipophilic substances, which can prevent water loss under hot tropical climates, were found. Secretion accumulation was observed in the periplasmic region of the secretory cells and in the subcuticular spaces. Cuticular pores were present especially in the apical portion of the colleters. Our data illustrate variations in the amounts of secretions throughout the leaf developmental stages and revealed some cellular aspects of the secretion mechanisms in the leaf colleters of *C. burchellii*.

**Keywords:** Colleters, Clusiaceae, Guttiferae, Mucilage, Plant secretion, Ultrastructure  
**Declarations**

**Funding**

Partial financial support was received from Ministério da Ciência e Tecnologia/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPq 406824/2016-9)

**Conflicts of interest**

The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

**Ethics approval**

Not applicable

**Consent to participate**

Not applicable

**Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and material**

All data generated or analysed during this study are included in this published article

### **Code availability**

Not applicable

### **Authors' contributions**

VCD designed the research project; RST and VCD collected the samples; RST carried out the light microscopy and histochemical analyses; VCD and DIR performed the scanning and transmission microscopy analyses; RST and VCD wrote the paper; DIR revised the paper.

### **Acknowledgements**

We thank the LabMic (Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução) at the Federal University of Goiânia (Universidade Federal de Goiânia-UFG, campus Samambaia) for technical support, the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano, campus Rio Verde), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the Scholarship provided to R. S. Teixeira.

## **Introduction**

The term ‘colleter’ originates from the Greek word ‘*kolla*’ and was used for the first time by Hanstein (1848; Thomas 1991) to refer to the sticky substances secreted by the structure. The colleters may synthesize mucilage solely or a mixture of mucilage and resin (Fahn 1979; Thomas 1991), which has been interpreted as an adaptive strategy for protecting reproductive and vegetative meristems against desiccation (Fahn 1979; Thomas 1991; Mayer et al. 2011, 2013). In addition, it has been associated with symbiotic bacteria (Lersten 1974; Machado et al. 2015), where the secretion could act as a barrier against herbivores and pathogens (Miguel et al. 2006; Ribeiro et al. 2017), as well as facilitate gliding of surfaces over each other in the course of growth (Uphof 1962) or act as a lubricant during floral development (Leitão and Cortelazzo 2008).

According to some authors, the term ‘colleter’ is better used in a functional context, since only the chemical composition and function of the gland are considered in their characterization (Thomas 1991; Mayer et al. 2011, 2013; Ribeiro et al. 2017). Cardoso-Gustavson et al. (2014) also reported that the chemical composition of the exudate, morphology of the gland, its proximity to the developing organs, and secretory activity during the development of vegetative or floral organs must be taken into account when defining a gland as a colleter.

Collaters are widely distributed among the angiosperms and were reported in about 60 families by Thomas (1991); the types and positions of collaters have been demonstrated to be useful taxonomic characteristics in different plant clades (Lersten 1974; Rio et al. 2005; Simões et al. 2006; González and Tarragó 2009; Mayer et al. 2011; Silva et al. 2012; Coutinho et al. 2015; Lopes-Mattos et al. 2015; Vitarelli et al. 2015; Fernandes et al. 2016; Judkevich et al. 2017; Ribeiro et al. 2017; Silva et al. 2017; Feio et al. 2018; Silva et al. 2019). In recent decades, an increasing number of studies have reported collaters in different groups, including first recordings of the structure in Anacardiaceae (Lacchia et al. 2016), Aquifoliaceae (Gonzalez and Tarragó 2009), Celastraceae (Mercandantes-Simões and Paiva 2013), Lecythidaceae (Paiva 2012), in monocotyledons (Leitão and Cortelazzo 2008; Mayer et al. 2011), and even in Thelypteridaceae, a monilophyte (Oliveira et al. 2017).

In Clusiaceae, collaters were first reported by Thomas (1991), which opened path for morphofunctional description of Clusiaceae collaters and the identification of chemical characteristics of their secreted substances. To date, filiform collaters have been reported for *Garcinia brasiliensis* flowers (Leal et al. 2012) and lachrymiform collaters (cone shaped) for *Clusia fluminensis* and *Clusia lanceolata* leaf axes (Silva et al. 2019) and *Clusia grandiflora* petiole (Machado and Emmeric 1981; Bittrich 2003).

*Clusia burchellii* Engl. is endemic to the Brazilian Neotropical savanna (i.e., Cerrado *sensu lato*), especially in rocky fields (Bittrich et al. 2015). The rocky fields are characterised by rocky formations with altitudes often greater than 900 m; the soils are shallow with rapid drainage, acidic, low organic matter content, and nutrient-poor and originate from the decomposition of quartzite and arenite rocks (Ribeiro and Walter 2008). The rocky field environments experience dry and rainy seasons with daily temperature fluctuations, occasional fires events, constant winds, and intense solar radiation (Goodland and Ferri 1979; Ratter et al. 1997; Simon et al. 2009).

Despite the extensive recent studies on colleter, very few studies have explored correlations between the composition of the secretions and the plants' environments (Tresmondi et al. 2015, 2017; Faria et al. 2019). In the case of *C. burchellii*, the occurrence of colleter has not been reported or observed; however, the observation of copious secretions that cover the apical meristems and young leaves has led us to hypothesize that the species has colleter. Consequently, considering the biological importance of colleter and the relative scarce information on the secretory structure in Clusiaceae, the objective of the present study was to characterize the morphoanatomy of *C. burchellii* leaf colleter and to investigate the major chemical compounds in the secretions, as well as the cellular aspects associated with the synthesis and release of the secretions.

### **Material and methods Collection area and plant material sampling**

The Parque Estadual da Serra dos Pirineus is located within the municipalities of Pirenópolis, Cocalzinho de Goiás, and Corumbá de Goiás, in the state of Goiás, Brazil, with a maximum altitude of 1.385 m at Pico dos Pirineus. The vegetation includes several Cerrado phytophysognomies such as the Cerrado *sensu stricto*, clean field, dirty field, humid semideciduous forest, gallery forest, and rock field formations (Siqueira 2014).

Leaf samples were collected at three development stages (young, adult, and senescence) from three *C. burchellii* individuals in areas of rock fields near Pico dos Pirineus (15° 47' 15" S 48° 50' 16" W). Here, young leaves refer to the meristem with leaf primordia, adult leaves refer to the fully expanded leaves, and senescent leaves refer to those with typical brown colouring. Reproductive branches were herborised and placed at the HRV (Rio Verde Herbarium) at the Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde, Goiás, Brazil under accession numbers IFRV 607, IFRV 1070, IFRV 1071.

### **Light microscopy**

The collected samples were fixed in FAA (formalin, acetic acid, and 50% ethanol; 1:1:18 by volume) for 24 h (Johansen 1940) for histological characterisation or NBF (neutral buffered formalin) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) (Lillie 1965) for histochemical studies. Fresh material was also used for histochemical tests. After 24 hours, all fixed samples were stored in 70% ethylic alcohol, dehydrated in an ethanol series, and then embedded in (2-hydroxiethyl)-methacrylate (Historesin embedding kit,

Leica TM, Heidelberg, Germany). Transverse and longitudinal sections (7  $\mu\text{m}$ -thick) were obtained using a rotary microtome (Modelo 1508R Logen Scientific) using the lowprofile steel blades. The sections obtained from the material fixed in FAA were stained with toluidine blue (O'Brien and McCully 1964) and mounted on resin (Permount, Fisher Scientific, New Jersey, USA). The sections of the samples fixed in NBF were separated to perform the histochemical tests.

### **Histochemical tests**

The samples fixed in NBF and embedded in historesin were subjected to the following histochemical tests: Periodic acid Schiff (PAS) staining (MacManus 1948) for total polysaccharides; ruthenium red (Gregory and Baas 1989) staining for pectins/mucilage; Sudan III (Pearse 1985) staining for total lipids; xylydine Ponceau (O'Brien and McCully 1981) and Coomassie Brilliant Blue (Fisher 1968) staining for protein; ferric chloride staining for phenolic compounds (Johansen 1940); and the Wagner's reagent test (Furr and Mahlberg 1981) for alkaloids. The Nadi reagent test for essential oils and resins (Davis and Carde 1964) and neutral red test under fluorescence (Kirk 1970) for total lipids were carried out using hand-sectioned fresh material. Samples not treated with the reagents were also observed under light microscopy. All observations were made under a light microscope (model BX61, Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipped with an image capture system.

### **Scanning electron microscopy**

For scanning electron microscopy (SEM) examinations, leaf samples were fixed using Karnovsky's fixative (0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) (Karnovsky 1965) and dehydrated in acetone series to wash out the secretions, and critical-point dried (Bozzola and Russel 1992) using  $\text{CO}_2$  in Autosamdri® (model 815, A Series A). Subsequently, the samples were sputter-coated with gold using a Denton Vacuum, Desk V. Observation and image capture were performed using a scanning electron microscope (Jeol, JSM – 6610), equipped with Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) and NSS Spectral Imaging (Thermo scientific, USA).



## Transmission electron microscopy

For ultrastructure analysis, the materials were fixed for 24 h in Karnovsky's fixative (pH 7.2 in 0.1 M sodium phosphate buffer) (Karnovsky 1965) and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h. Dehydration was carried out in a progressively increasing acetone series and embedding was in Epon. Ultra-thin sections (70 nm) were contrasted with 2% uranyl acetate, 0.2% lead citrate, and analysed under a transmission electron microscope (JEOL, JEM 2100), equipped with EDS and operated at 80 kV.

## Results Colleter distribution

The colleters of *C. burchellii* occurred at the bases of petioles, facing up toward the adaxial surface (Fig. 1). The colleters were whitish when young, i.e., when present in the young leaves, with abundant, translucent, and sticky secretions (Fig. 1a, b). In the adult leaves, the colleters were yellowish with a brownish apex (Fig. 1c), and reduced secretions (Fig. 1d). In the senescent leaves, the colleters turned brownish (Fig. 1e), with minimal secretions (Fig. 1f).

## Ontogeny and colleter structure

The colleters of *C. burchellii* exhibited asynchronous development. Colleters at the initial developmental stages were fully differentiated, and senescent colleters were already present in leaf primordia (young leaves) (Fig. 2a-c).

The origin of the colleters involves protodermal and ground meristem activity (Fig. 2a). At the initial stages of development, intense cell division occurred in both meristem tissues (Fig. 2 a, b), in which all cells had a polygonal shape and typical meristem features such as dense cytoplasm and voluminous nucleus (Fig. 2a). Afterward, the ground meristem cells lengthened and initiated the formation of the colleter central axis (Fig. 2b), while the protodermis cells continued to divide and expand. The secretory phase only began after the fully expanded colleter stage, when it was possible to differentiate between palisade secretory epidermis and central axis cells (Fig. 2c, d).

The colleters were classified as standard type, although they were wide from the base to the tip (Fig. 2d, e) or had a dilated base and a tapered tip, similar to a cone shape (Fig. 2d, f). The colleters were not vascularised (Fig. 2g), generally sessile, or short

pedunculated (Fig. 2d-f). They had a secretory portion formed by an elongated parenchyma axis with upper layers of juxtaposed cells forming a palisade (Fig. 2d, g), all covered with an evident cuticle (Fig. 2h). Numerous pores were observed in the cuticle, especially in the apical portion of the colleters (Fig. 2i).

### **Histochemical analysis**

The colleters were yellowish, especially in the secretory cells (Fig. 3a), which intensified with progression of the leaf developmental stages. Polysaccharides were found in the secretory cells (Fig. 3b); however, the highest levels of accumulation of the secretion were observed at the initial stages of leaf development. Lipids were observed in the secretion (Fig. 3c), while drops of essential oil (bluish colouring) occurred in the inner layers of the palisade epidermal cells (Fig. 3d). Phenol compounds and alkaloids were found predominantly in the cells in the central axis (Fig. 3e, f) from the meristemic to the senescence stages of the leaves. Minor increases in the substances were observed with progression of the leaf developmental stages. There were no proteins in the secretions (Fig. 3g, h).

### **Ultrastructural organisation**

There were cytological differences between the epidermal and central axis cells of the colleters (Fig. 4). The secretory epidermal cells exhibited characteristics associated with high metabolic activity, with a high nucleus cytoplasm ratio, voluminous nuclei, conspicuous nucleoli, and dense cytoplasm rich in organelles (Fig. 4a). Mitochondria and Golgi apparatus were differentiated, and these were the major and most abundant organelles in the cells, in addition to free ribosomes (Fig. 4b). Small vacuoles with dense inclusions were also observed (Fig. 4c).

Unlike the secretory cells, the cells of the central axis of the colleter were in a vacuolisation process (Fig. 4d). The cells had large and numerous vacuoles filled completely with osmiophilic substances (Fig. 4d) and some organelles with mitochondria and chloroplasts (Fig. 4d, e). Plasmodesma were also observed, facilitating communication among adjacent cells (Fig. 4e).

During the secretion process, the epidermal cells presented dense cytoplasm, and hyalin was observed in the periplasmic regions of the secretory cells (Fig. 4f and g). In the cytoplasm, Golgi apparatus active in vesicle production and reticuli were present on

the periphery of the cells (Fig. 4h, i) and paramural bodies were observed in the periplasmic space (Fig. 4i)

The outer cell wall had three ultrastructurally distinct layers: a basal polysaccharide rich layer, a cuticular membrane subdivided into arborescent and reticulated layers, and a thin cuticle proper (Fig. 4j). Cuticle pores were observed on the surfaces of colleters, and they might be involved in secretion release mechanisms (Fig. 2 i).

## Discussion

Based on the structural and histochemical analyses, composition of the secretion, and location of the structures, the present study confirmed that the secretion observed in the field covering the meristems and young leaves of *C. burchellii* is produced by colleters.

The mixed origin of *C. burchellii* colleters, involving protoderm and fundamental meristem, has been reported widely for colleters in different taxa (Thomas 1991; Coelho et al. 2013; Muravnik et al. 2014; Judkevick et al. 2017) including other species of *Clusia* (Silva et al. 2019). Conversely, reports are increasingly emerging of colleters with exclusively protodermal origins (Mayer et al. 2011; Silva et al. 2012; Cardoso-Gustavson et al. 2014; Dalvi et al. 2014; Coutinho et al. 2015; Lacchia et al. 2016; Silva et al. 2017; Ballego-Campos and Paiva 2018; Almeida and Paiva 2019). The data confirm the ontogenetic differences, in contrast to literature that does not consider colleters as trichomes but as projections formed from epidermal and subepidermal tissues (Evert 2013). The phylogenetic implications of the two origins (mixed or simply protodermal) are not elucidated.

The *C. burchellii* colleters are anatomically classified as standard type colleters. Standard type colleters comprise of a secretory palisade epidermis covering a nonsecretory central axis, which may or may not be vascularised with xylem and phloem (Lersten 1974), and are the most common type of colleter reported in literature. According to Robbrecht (1988), standard colleters may be conical, cylindrical, round, or pad-like, with the first being the most common. Silva et al. (2019) classifies the colleters from *C. fluminensis* and *C. lanceolata* as lachrymiform colleters, a term proposed by González and Tarragó (2009). In the present case, we could conclude that the colleters in the three *Clusia* species are distinct, which could facilitate taxonomic work in the group.

However, the lachryform terminology adopted by Silva et al. (2019) is based on the shape of the colleter, which could be classified as a standard type colleter based on its anatomy (Lersten 1974). It reveals terminological confusion between type and shape of the colleter, especially in relation to the standard, reduced standard, and filiform colleter types. Herein, we propose that the colleter classification should be based on the sectioned material, as well as on surface analysis (SEM). Although they seem subtle, classification approaches that take only colleter shape into account could lead to inaccurate colleter type categorisation.

*C. burchellii* have colleters with no vascularisation. Two hypotheses have been proposed with regard to vascularisation in colleters. Thomas (1991) proposed that it is always connected to the organ to which it is attached. Conversely, Carlquist (1969) reviewed the evolutionary interpretations of floral structure and proposed that the vascular tissue bear a certain relationship with organ size. Data on vascularisation of colleters in Clusiaceae are still scarce, and the characterisation of the structures in other species of the family could enhance our understanding of the development and evolution of the structure in the group.

The shift in colour of the colleters from white or translucent to pale yellow at the base, and brownish at the tip to complete blackening, as observed in *C. burchellii*, has similarly been reported in different species, and is associated with the termination of secretory activity and the initiation of senescence (Thomas and Dave 1989a, b, 1990; Thomas 1991; Appezzato-da-Glória and Estelita 2000; Paiva 2009; Dalvi et al. 2014; Coutinho et al. 2015; Silva et. al 2017).

Different authors have associated the changing of colouring in colleters with phenolic compound production (Thomas and Dave 1990; Thomas 1991; Appezzato-daGlória and Estelita 2000). In *C. burchellii*, we observed increasing levels of accumulation of phenolic compounds and terpenoids in the cells of the central axis, which could corroborate the change in colour observed. According to Muravnik et al. (2014), phenols and terpenoids act as antibacterial, fungicidal, and insecticidal barriers.

Proteins were not observed in the secretions of the *C. burchellii* colleters; however, a mixture of hydrophilic (polysaccharides) and lipophilic (lipids) substances was found.

The species is found in rocky field areas where the climate is hot and dry in some periods of the year. According to Appezzato-da-Glória and Estelita (2000), the occurrence of colleters and the synthesis of highly hydrophilic polysaccharides can

prevent water loss under hot tropical climates, such as the Cerrado domain. The premise has been reinforced in studies comparing the components of secretions in Rubiaceae species growing in forests and savanna (Tresmondi et al. 2015, 2017). The authors reported differences in secretions, with hydrophilic secretions being predominant in forest species and lipophilic or mixed secretions being dominant in savanna species. According to the authors, the high proportions of Rubiaceae species from savannas with apices covered with colleters' lipid exudates could be in response to environmental conditions such as elevated temperatures, prolonged drought periods, and high rates of solar radiation. Conversely, Faria et al. (2019) did not observe differences in the compositions of the secretions of Salicaceae species between the cerrado and forest.

Overall, the presence of colleters represents an adaptive strategy, since the polysaccharide secretions seal the young leaves and protecting the meristem and buds against dehydration during dry periods, which is one of the primordial functions associated with the colleters (Fahn 1979; Thomas 1991). The lipid compounds may facilitate the prevention of water loss and fungal or microorganism infestation (Fahn 1979; Mayer et al. 2013). *Clusia* is a genus distributed in diverse ecosystems and the comparison of secretions under different environments could reveal the potential adaptive strategies of the species.

The ultrastructural analysis revealed differentiation between epidermal and axis colleter cells in *C. burchellii*, since they exhibited several cytological differences. Unlike in the axis cells, the cytological features observed in the epidermis, such as dense cytoplasm, prominent nuclei, a large number of mitochondria, and small vacuoles, may be interpreted as signs of high metabolic activity and the secretory activity carried out by the cells. Such features have also been reported in secretory tissues in colleters of other plant species (Coelho et al. 2013; Oliveira et al. 2017; Ballego-Campos and Paiva 2018; Almeida and Paiva 2019). The abundance of mitochondria and the low amount of starch and reserve compounds demonstrated the high energy demands of the secretion and release processes.

During the secretory process, the presence of the Golgi apparatus in epidermal cells, which participated in the production of dictyosomal vesicles, and their high number near the plasma membrane indicated the release of materials from the apoplast, and a granuloocrine secretion mechanism in the colleters (Fahn 1979, 2000). These observations, in addition to the accumulation of secretions observed in the periplasmic space of

epidermal cells and beneath the cuticle, are consistent with the secretion mechanism proposed by Paiva (2016), in which the pressure exerted by secretions accumulated in the periplasmic space facilitates the passage of secretions through the cell wall, followed by their release. Notably, the external periclinal cell walls of the colleters of *C. burchellii*, consisted of layers with apparently different arrangements and composition. The dynamic structure of the cell wall potentially facilitates, in part, the transport of the secretions.

Under SEM, pores were observed in the *C. burchellii* colleter cuticle. Speculations that secretion are released through pores or cuticle rupturing are common in literature (Souza 2014; Silva et al. 2017). Some authors contend that even when pores are not observed, the distension of the cuticle is an indication that the secretions are released via cuticle rupture (Mercandes-Simões and Paiva 2013; Silva et al. 2017). The cuticle rupture appears to be a consequence of mucilage expansion following hydration, as reported by several authors (Bower 1926; Gutterman et al. 1967; Oliveira et al. 2017). Other authors have reported that secretions are accumulated in periplasmic spaces or subcuticle spaces before being released to the exterior through the cell wall, without the breaking of the cuticle, which is permeable (Canaveze and Machado 2015). Here, we contend that the secretions were released through pores because cuticle rupture was not observed. However, the precise mechanism of secretion export remains unclear. Similarly, in *C. lanceolata*, ruptures were not observed in the cuticle, and the researchers suggested that more external layers of the cell wall are involved in the release of substances (Silva et al. 2019).

In summary, in the present study, we have described the morphoanatomical structure and cellular aspects associated with the secretion mechanisms of *C. burchellii* leaf colleters and explored the relationships between the nature of the secretions and the ecological environment. The results could enhance our understanding of the diversity and function of secretory structures in Clusiaceae, especially colleters, a gland that has been hardly reported in the family.

## References

- Almeida AL, Paiva EAS (2019) Colleters in *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): Anatomy and biology of the secretory process. *Flora* 258:151439. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151439>
- Appezato-Da-Glória B, Estelita MEM (2000) Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Rev Bras Bot* 23:113-120. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042000000200001>
- Ballego-Campos, I., Paiva, E.A.S., 2018a. Colleters in the vegetative axis of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae): anatomical, ultrastructural and functional aspects. *Aust J Bot* 66:379-387. <https://doi.org/10.1071/BT18095>.
- Bittrich V (2003) Clusiaceae. In: Wanderley MGL, GJ Shepherd, AM Giulietti, TS Melhem (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Vol. 3, pp 45–62.
- Bittrich V, Marinho L, Amorim A (2015) *Clusia heterocolorata* (Clusiaceae), a new species from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytotaxa* 220:83-88. <http://10.11646/phytotaxa.220.1.8>
- Bower FO (1926) The dermal appendages of the Ferns. *Ann Bot* 40:479-490. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a090030>
- Bozzola JJ, Russel LD (1992) *Electron Microscopy*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Canaveze Y, Machado SM (2015) Leaf colleters in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis, and cellular secretion. *BOT* 93:1-10. <http://dx.doi.org/10.1139/cjb-2014-0229> Cardoso-Gustavson P, Campbell

LM, Mazzoni-Viveiros SC, Barros F (2014) Floral colleters in *Pleurothallidinae* (Epidendroideae: Orchidaceae). *Am J Bot* 101:587-597. <http://doi:10.3732/ajb.1400012>

Carlquist S (1969) Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. *Phytomorphology* 19:332-362.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2012.08.005>

Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA (2015) New records of colleters in *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae S.L.): structural diversity, secretion, functional role, and taxonomic importance. *Int J Plant Sci* 176:72-85. <http://doi:10.1086/679016>

Dalvi VC, Meira RMSA, Francino DMT, Silva LC, Azevedo AA (2014) Anatomical characteristics as taxonomic tools for the species of *Curtia* and *Hockinia* (Saccifolieae--Gentianaceae Juss.). *Plant Syst Evol* 300:99-112. <http://doi:10.1007/s00606-013-0863-1>

Evert RF (2013) Meristemas, Células e Tecidos do Corpo da Planta: sua Estrutura, Função e Desenvolvimento. *Anatomia das Plantas de Esau*, tradução da Terceira Edição Americana. ed. São Paulo: Blucher, pp 225-263.

Fahn A (1979) *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press, London.

Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. *Adv Bot Res* 31:37-75. [doi:10.1016/S0065-2296\(00\)31006-0](http://doi:10.1016/S0065-2296(00)31006-0)



Faria DNS, Fernandes VF, Marquete R, Meira RMSA (2019) Morphology, anatomy, and exudates of stipular colleters in *Casearia* Jacq. (Salicaceae) across two tropical plant communities. *Int J Plant Sci* 180(2):000–000

Feio AC, Meira RMSA, Riina R (2018) Leaf anatomical features and their implications for the systematics of dragon's blood, *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae). *Bot J Linn Soc* 187:614-632. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy038>

Fernandes VF, Thadeo M, Dalvi VC, Marquete R, Meira RMSA (2016) Colleters in *Casearia* (Salicaceae): a new interpretation for the theoid teeth. *Bot J Linn Soc* 181:682-691. <https://doi.org/10.1111/boj.12432>

Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochem Cell Biol* 16:92-96. <https://doi.org/10.1007/BF00306214>

Furr M, Mahlberg PG (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J Nat Prod* 44:153-159. <https://doi.org/10.1021/np50014a002>

González AM, Tarragó JR (2009) Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America. *Bot J Linn Soc* 160:197-210. <http://doi:10.1111/j.1095-8339.2009.00969>

Goodland R, Ferri MG (1979) *Ecologia do Cerrado*. Editora da Universidade de São Paulo. Itatiaia. 193 p

Gregory M, Baas P (1989) A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Isr J Plant Sci* 38:125-174.

Gutterman YA, Whitzum M (1967) Seed dispersal and germination in *Blepharis persica* (Brum) Kunze. *Isr J Plant Sci* 213-234.

Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York.

Judkevich MD, Salas RM, González AM (2017) Colleters in american Spermaceae genera (Rubiaceae): morphoanatomical and evolutionary aspects. *Int J Plant Sci* 5:178-234. <http://doi:10.1086/691165>

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138.

Kirk JPW (1970) Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technol* 45:1-4. <http://doi:10.3109/10520297009063373>

Lacchia APS, Tölke EEAD, Demarco D, Carmello-Guerreiro SM (2016) Presumed domatia are actually extrafloral nectaries on leaves of *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Rodriguezia* 67:19-28. <https://doi.org/10.1590/21757860201667102>

Leal D, Malafaia C, Cesar R, Pimentel R, Santiago-Fernandes L, Dolores L, Lima H, Sá-Haiad B (2012) Floral structure of *Garcinia brasiliensis* in relation to flower biology and evolution. *Int J Plant Sci* 172:172-183. <http://doi.org/10.1007/s00606013-0833-7>

Leitão CAE, Cortelazzo AL (2008) Structural and histochemical characterization of the colleters of *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae). *Aust J Bot* 56:161-165. <http://doi:10.1071/bt07114>

Lersten NR (1974) Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *Am J Bot* 61:973-981.

Lillie RD (1965) *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd ed, pp 751.

Lopes-Mattos KLB, Otuki SAP, Azevedo AA, Pereira ZV, Meira RMSA (2015) Colleters in 10 species belonging to three tribes of Rubiaceae: morphoanatomical diversity and potential as useful characters for taxonomy. *Botany* 93:1-10 <http://doi.org/10.1139/cjb-2014-0212>

Machado MMP, Emmerich M (1981) Presença de coléteres em *Clusia lanceolata* Cambess. *Boletim do Museu Nacional. Botânica* nº 59, 27 de março, Rio de Janeiro – Brasil.

Machado SR, Paleari LM, Paiva EAS, Rodrigues TM (2015) Colleters on the inflorescence axis of *Croton glandulosus* (Euphorbiaceae): structural and functional characterization. *Int J Plant Sci* 176:86-93. <http://doi:10.1086/678469>

Mayer JLS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-Da-Glória B (2011) Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. *Flora* 206:185-190. <http://doi:10.1016/j.flora.2010.09.003>

Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Mazzafera P (2013) A functional role for the colleters of coffee flowers. *AoB Plants* 5:1-13. <http://doi:10.1093/aobpla/plt029>  
McManus JFA (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 23:99-108. <https://doi.org/10.3109/10520294809106232>

Miguel EC, Gomes VM, Oliveira MA, Cunha M (2006) Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biol* 8:715-722. <http://doi:10.1055/s-2006-924174>

Miguel EC, Pireda S, Barros CF, Zottich U, Gomes VM, Miguens FC, Cunha MD (2017) Outer cell wall structure and the secretion mechanism of colleters of *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae). *Acta Bot Bras* 31:411-419. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0420>

Muravnik LE, Kostina OV, Shavarda AL (2014) Development, structure and secretion compounds of stipule colleters in *Pentas lanceolata* (Rubiaceae). *S Afr J Bot* 93:27-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.007>

O'Brien TP, Feder N, Mccully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

O'Brien TP, Mccully ME (1981) *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphy Pty, Melbourne.

Oliveira CS, Salino A, Paiva EAS (2017) Colleters in *Thelypteridaceae*: Unveiling mucilage secretion and its probable role in ferns. *Flora* 228:65-70. <http://doi:10.1016/j.flora.2017.01.009>

Paiva EAS (2009) Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *C R Biol* 332:1078-1084. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.08.003>

Paiva EAS (2012) Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure, secretion and evidences for young leaf protection. *J Torrey Bot Soc* 139:1-8. <http://doi:10.3159/TORREY-D-11-00046.1>

Paiva EAS (2016) How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Ann Bot* 117:533-540. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw012>

Paiva EAS, Machado SR (2006) Colleters in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Braz J Bot* 66:301-308. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842006000200012>

Pearse AGE (1985) *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol II. Livingstone, Edinburgh.

Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1997) The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann Bot* 80: 223-230. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0469>

Ribeiro JC, Ferreira MJP, Demarco D (2017) Colleters in Asclepiadoideae (Apocynaceae): protection of meristems against desiccation and new functions assigned. *Int J Plant Sci* 178: 465-477. <http://doi:10.1086/692295>

Rio MCS, Kinoshita LS, Castro MM (2005) Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forstenia* G. Mey (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Rev Bras Bot* 28:713-726. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042005000400006>

Robbrecht E 1988 Tropical woody Rubiaceae. *Opera Bot Belg* 1:1-271.

Silva CJ, Barbosa LCA, Marques AE, Baracat-Pereira MC, Pinheiro AL, Meira RMSA (2012) Anatomical characterization of the foliar colleters in *Myrtoideae*

(Myrtaceae). Aust J Bot 60:707-717.

<https://doi.org/10.1590/010233062016abb0339>

Silva CJ, Ribeiro JPO, Meira RMSA (2019) New registers of colleters in species of Myrtaceae from Brazilian Cerrado. Rodriguésia 70:e02822017. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201970055>

Silva KMM, Luna BN, Joffily A, Paiva SR, Barros CF (2019) Revealing the development of secretory structures in the leaves of *Clusia fluminensis* and *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). Flora 256:69-78. <http://doi:10.1016/j.flora.2019.05.002>

Silva MDS, Coutinho IAC, Araújo MN, Meira RMSA (2017) Colleters in *Chamaecrista* (L.) Moench sect. *Chamaecrista* e seita. *Caliciopsis* (LeguminosaeCaesalpinioideae): implicações de anatomia e taxonomia. Acta Bot Bras 31:382-391. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0339>.

Simões AO, Castro MM, Kinoshita LS (2006) Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. Bot J Linn Soc 152:387-398. <http://doi:10.1111/j.1095-8339.2006.00572.x>

Simon T, Miloslav J, Mikanová O, Vach M (2009) The influence of tillage systems on soil organic matter and soil hydrophobicity. Soil Till Res 105:44-48.

Siqueira JC (2004) Pirenópolis: identidade territorial e biodiversidade. Loyola, Rio de Janeiro, pp 79.

Souza LA (2014) Estruturas secretoras em espécies de leguminosas da subtribo *Cassiinae* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassieae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, pp 101.

Thomas V (1991) Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Ann Bot* 68:287-305. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088256>

Thomas V, Dave Y (1989a) Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland., Apocynaceae). *Korean J Bot* 32:163-172.

Thomas V, Dave Y (1989b) Histochemistry and senescence of colleters of *Allamanda cathartica* Linn. (Apocynaceae). *Ann Bot* 64:201-203.

Thomas V, Dave Y (1990) Structure and necrosis of stipular colleters in *Mitragyna parvifolia* (Rubiaceae). *Bel J Bot* 123:67-72.

Tresmondi F, Canaveze Y, Guimarães E, Machado SR (2017) Colleters in Rubiaceae from forest and savanna: the link between secretion and environment. *Sci Nat (Naturwissenschaften)* 104:17. <http://doi:10.1007/s00114-017-1444-x>

Tresmondi F, Nogueira A, Guimarães E, Machado SR (2015) Morphology, secretion composition, and ecological aspects of stipular colleters in Rubiaceae species from tropical forest and savana. *Sci Nat (Naturwissenschaften)* 102:73. <http://doi:10.1007/s00114-015-1320-5>

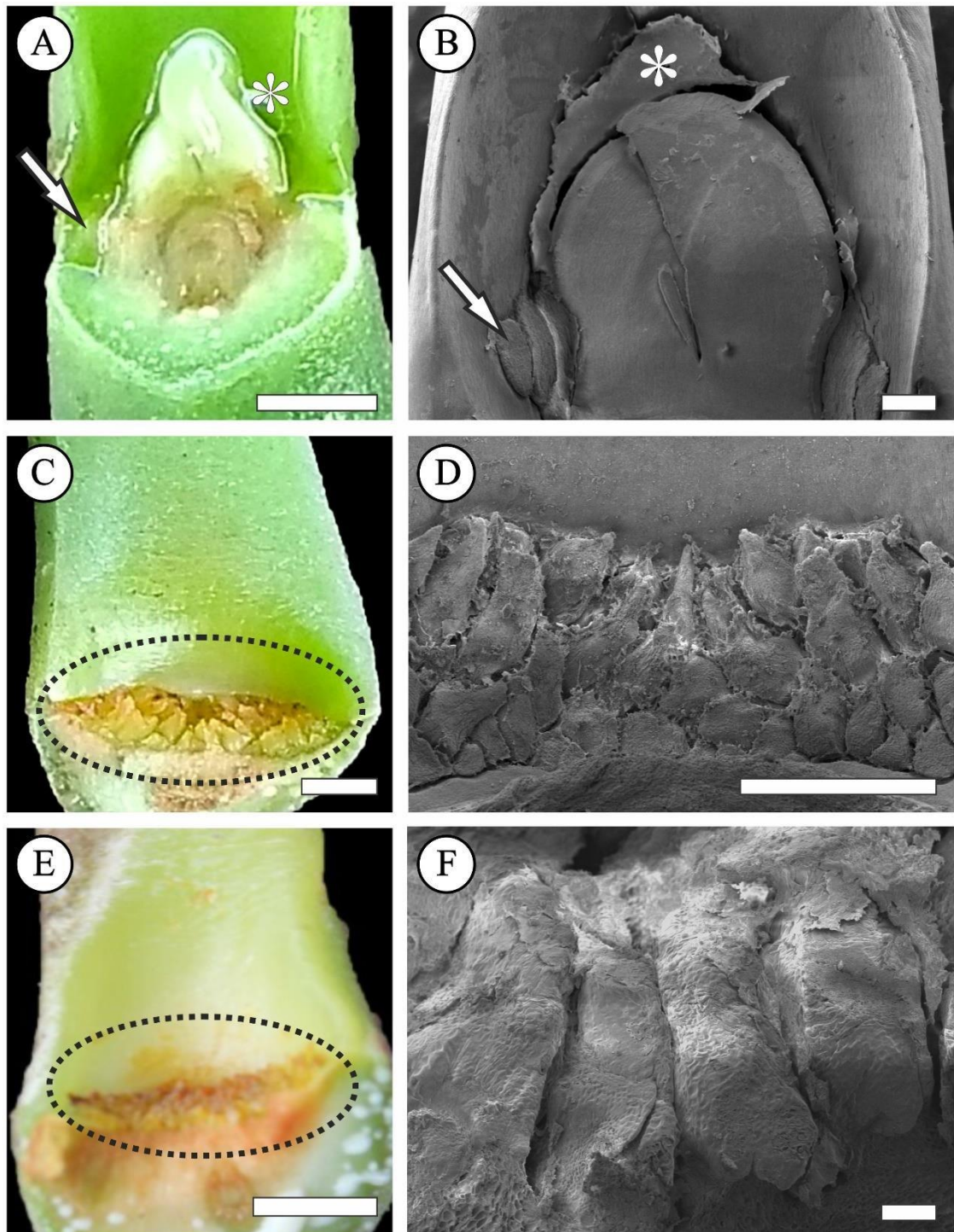
Uphof JCT (1962) Plant Hairs. In: W Zimmermann, PG Ozenda (Eds.) *Handbuch der pflanzenanatomie*.

Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuertes-Aguilar J, Meira RMSA (2015) Foliar secretory structures in *Crotoneae* (Euphorbiaceae): Diversity, anatomy, and evolutionary significance. *Am J Bot* 102:833-847. <http://doi:10.3732/ajb.1500017>

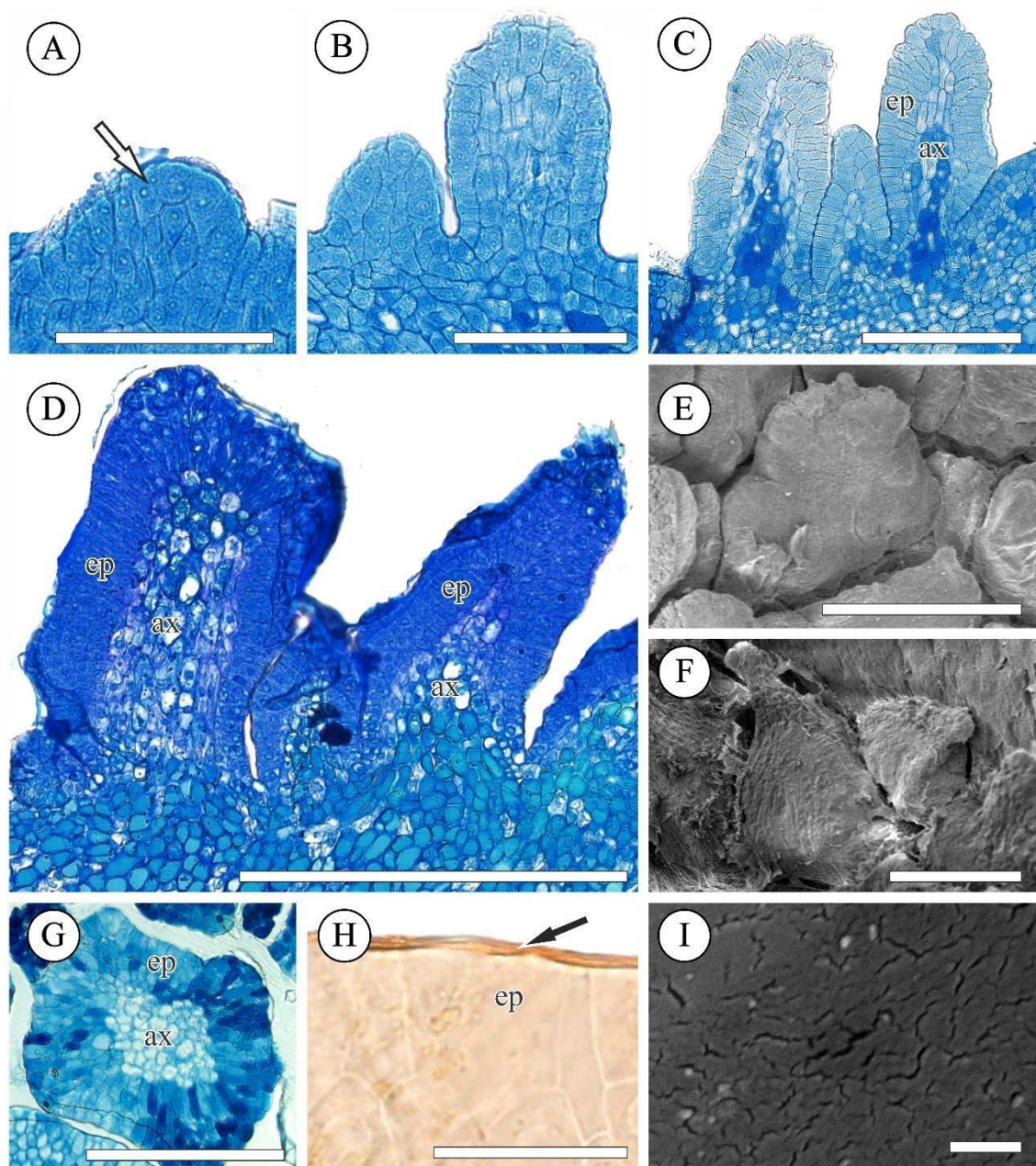




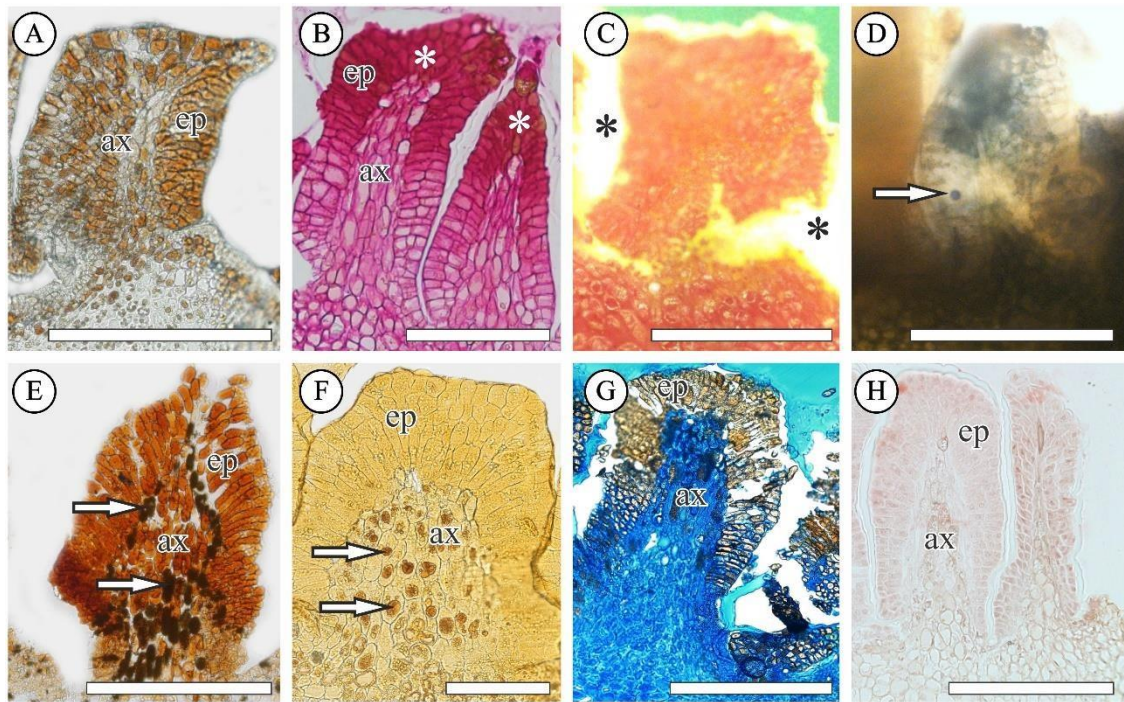
**Figure captions**



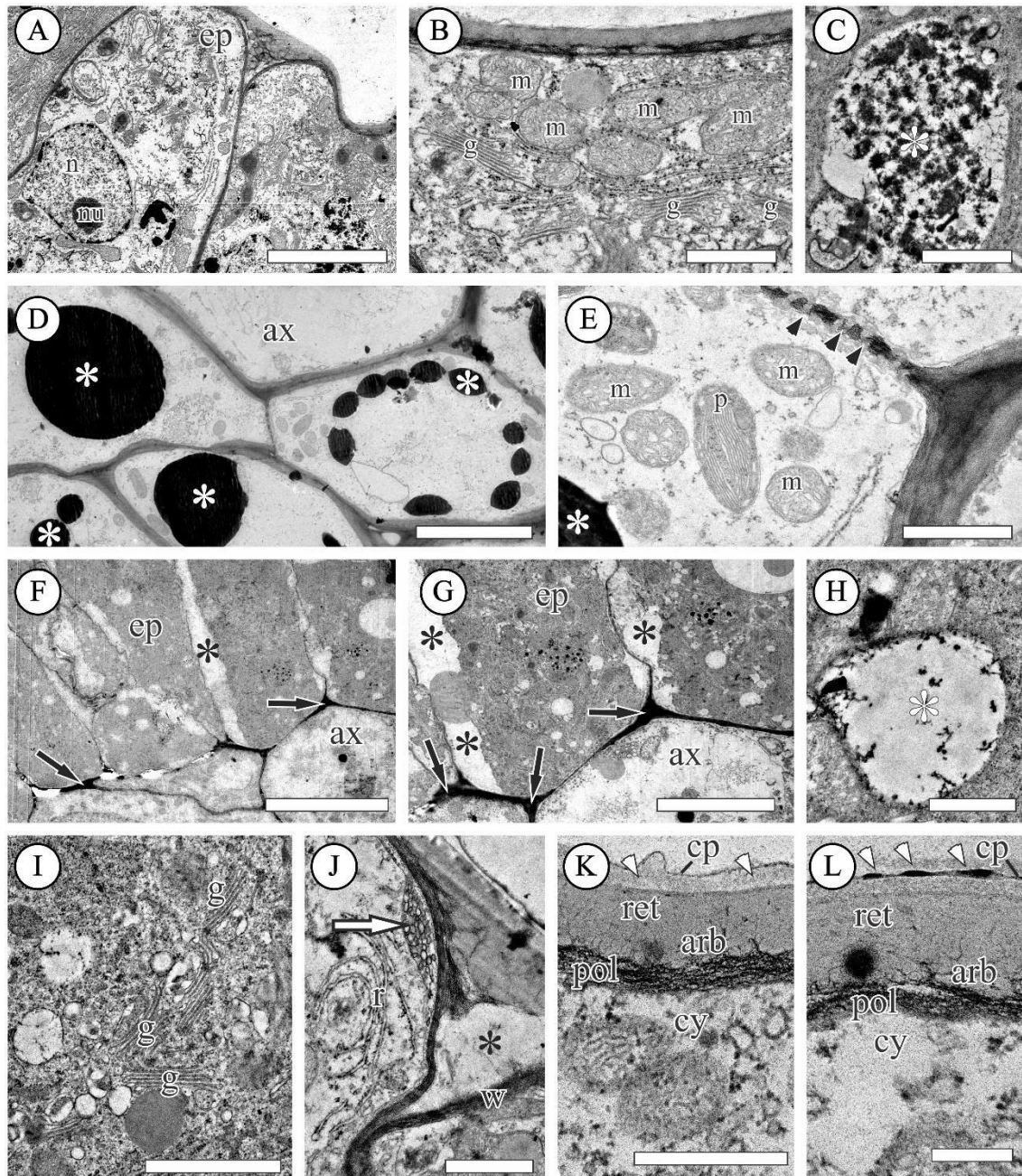
**Fig. 1** Distribution of colleters in vegetative apex and leaves of *Clusia burchelli* observed by photographs (a, c, e) and under scanning electron microscopy (b, d, f). Vegetative apex (a, b). Note the wet aspect of the vegetative apex showing the translucent and abundant secretion (asterisks) of the young colleters distributed at the base of the apex (arrow). Colleters located at the base (ellipse) of adult (c, d) and senescent leaves (e, f). Bars = a, c, e 10mm; b 200  $\mu$ m; d 500  $\mu$ m; f 100  $\mu$ m



**Fig. 2** Ontogeny and structural characterisation of *Clusia burchelli* colleters. Light (a-d, g, h) and scanning electron microscopy (e, f, i). Early stages of colleter development (a-c). Note the protoderm cells (white arrow) and the cells from the lower layers (a). Colleter at secretory phase, showing typical palisade epidermal cells (ep) with dense cytoplasm and the parenchyma central axis cells (ax) (d). Morphological variation of colleters (e, f). Cross section from the colleter, showing the multiple epidermis (ep) and the central axis (ax) (g). Histochemical test with Sudan III, showing cuticle of the colleter (black arrow) (h). Cuticular pores (i). Bars = a, b 50  $\mu\text{m}$ ; c, e, h 100  $\mu\text{m}$ ; d 500  $\mu\text{m}$ ; f, g 200  $\mu\text{m}$ ; i 2  $\mu\text{m}$



**Fig. 3** Histochemical characterisation of *Clusia burchelli* colleters. Longitudinal section of leaf colleters subjected to several histochemical reagents. Control (a). reaction with Periodic acid Schiff's reagent; total polysaccharides stain magenta (b), Lipid (asterisks) detected by Neutral red reagent (c). Essential oil (arrow) observed in secretory cells using Nadi reagent (d). Alkaloids (e) and phenolic compounds (f) stained brown in the central axis cells by Wagner's reagent and Ferric chloride tests, respectively. Negative reaction for proteins by Coomassie Brilliant Blue (g) and Xylidine Ponceau (h) tests. Abbreviations: ep epidermis; ax central axis cells. Bars = Bars = a, b, d, f, g, h 200  $\mu\text{m}$ ; c, e 500  $\mu\text{m}$



**Fig. 4** Ultrastructural characterisation of *Clusia burchelli* colleters. Epidermal cells (a-c) showing large nuclei (n) with a conspicuous nucleolus (nu) (a), dense cytoplasm with differentiated organelles (b) and small vacuoles with electron-dense matrix with a flocculent character (c). Central axis cells (d, e) showing large and numerous vacuoles with electron-dense matrices (d). Note the plasmodesma (arrowhead) distributed throughout cell wall (e). General view showing the cytological differences between epidermal cells (ep) and central axis cells (ax) during the secretory phase (f). Note the hyaline secretion deposited in the periplasmic space of secretory cells (asterisks) (f, g). Epidermal cells during the secretory phase (h-j). Note the abundance of Golgi apparatus (g) and vesicles (white arrow) forming the periplasmic space by depositing the secretion

(h, i). The outer cell wall with three distinct layers: a basal polysaccharide rich layer (pol); a cuticular membrane subdivided into arborescent (ar) and reticulated layers (ret); and a thin cuticle proper (cp) (j). Secretion deposition below the proper cuticle layer (j). Bars = a, d, g 5  $\mu\text{m}$ ; b, c, e, h, i 1  $\mu\text{m}$ ; f 10  $\mu\text{m}$ ; j 500 nm

## Capítulo II

**Artigo original****Da origem à senescência: variações na estrutura e na composição da secreção dos coléteres foliares de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* (Clusiaceae)**

Roberta Silva Teixeira<sup>1</sup> 0000-0003-2902-6602, Diego Ismael Rocha<sup>2</sup> 0000-0001-66830961, Valdneá Casagrande Dalvi<sup>1,\*</sup> 0000-0002-9325-2025

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano, Campus Rio Verde), Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, Caixa Postal 66, CEP 75901-970, Rio Verde, Goiás, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Jataí. BR 364, km 195, nº 3800 – Cidade Universitária, CEP 75801-615, Jataí, Goiás, Brazil.

\**Autor correspondente:* valdnea.dalvi@ifgoiano.edu.br

**Resumo**

Coléteres produzem uma secreção pegajosa constituída por mucilagem ou por uma mistura de substâncias hidrofílicas e lipofílicas com a função de proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento contra danos bióticos e abióticos. Em Clusiaceae essas estruturas são pouco estudadas. Essa pesquisa descreve a ontogenia dos coléteres foliares de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* e identifica variações na estrutura e na composição do exsudato em diferentes estágios de desenvolvimento foliar (primórdios foliares recobrando o meristema, folhas adultas e folhas senescentes). As amostras foram coletadas e processadas segundo técnicas usuais para microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Coléteres consistem em um eixo central não vascularizado, multicelular, parenquimatoso, recoberto por uma camada de epiderme secretora em paliçada. A secreção é liberada por rompimento da cutícula. Durante o desenvolvimento foliar mudanças na coloração, na estrutura e na abundância da secreção foram observadas. Assincronia no desenvolvimento foi perceptível nos primórdios foliares sendo observados desde coléteres em início de formação até coléteres em início de senescência. Nessa fase há abundância de secreção polissacarídica e proteica. Nas folhas adultas e senescentes há acúmulo de compostos fenólicos e alcaloides e ocorre degradação celular. As mudanças estruturais e na composição da secreção ao longo do desenvolvimento foliar enfatizam a função dos coléteres de proteção de meristemas e regiões em desenvolvimento.

**Palavras-chave:** Coléteres, *Clusia*, Histoquímica, Secreção.

## Introdução

Com a evolução das plantas terrestres diversas formas de proteção permitiram uma maior capacidade de competição e resistência às adversidades ambientais garantindo a sobrevivência das plantas em diversos ambientes (Paiva & Machado 2006, Paiva 2016; Máximo & Demarco 2018). Uma dessas estratégias é a defesa química através dos compostos produzidos pelas estruturas secretoras (Máximo & Demarco 2018).

Essas secreções, frequentemente relacionadas a defesa direta e indireta contra agentes bióticos e abióticos (Paiva 2016), podem ser soluções aquosas ricas em sais, aminoácidos e açúcares ou misturas com maior ou menor complexidade constituídas apenas por metabólitos primários ou por metabólitos primários e secundários (Ascensão 2007, Paiva 2016). Apesar de haver mistura na composição química, há predominância de um composto ou grupo de compostos, o que sugere especificidade na atividade das células secretoras (Paiva 2016).

Os coléteres são estruturas secretoras que produzem uma secreção composta predominantemente por mucilagem, ou uma mistura de mucilagem e terpenos e/ou resinas (Fahn 1979, Thomas 1991). Essa secreção, presente na superfície adaxial de órgãos vegetativos e reprodutivos, protege os meristemas e órgãos em desenvolvimento contra a dessecação (Thomas 1991), podendo agir como repelente de insetos (Smith 1963; Curtis and Lersten 1974), como um impedimento aos herbívoros e patógenos e como um notável agente antimicrobiano, inibindo a proliferação de fungos e atividade bacteriana (Castro and Demarco 2008; Calvo et al. 2010; Cardoso-Gustavson et al. 2014).

No entanto, devido à função primordial desempenhada (proteção de órgãos em desenvolvimento) os coléteres tem desenvolvimento precoce sendo comum sua diferenciação, ápice da atividade secretora e até mesmo sua senescência anteceder o completo desenvolvimento do órgão onde essa estrutura está inserida. Sendo assim, poucos trabalhos enfocam a estrutura dos coléteres ao longo do desenvolvimento foliar buscando entender as alterações estruturais e na composição da secreção em decorrência do processo de senescência dos coléteres.

Em Clusiaceae, família conhecida como Guttiferae (Judd et al. 2009), apesar das secreções de aparência leitosa serem comuns, os estudos envolvendo as secreções produzidas pelos coléteres são restritos a poucas espécies do gênero *Clusia* (Machado and



Emmerich 1981; Silva et al. 2019). *Clusia* é um dos maiores gêneros da família com 300400 espécies (Lüttge 2007) das quais 68 são encontradas no Brasil (Bittrich et al. 2015) distribuídas nos diferentes biomas (BFG 2015). Utilizamos *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva*, ocorrente em uma área de Mata Atlântica, como modelo para descrever as variações na estrutura e na composição química da secreção ao longo do desenvolvimento foliar.

### **Material e métodos Local de coleta e amostragem**

Amostras da base dos primórdios foliares envolvendo o meristema apical caulinar, base de folhas completamente expandidas e folhas senescentes de seis indivíduos de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* foram coletados no entorno do Parque Estadual da Pedra Azul, em Domingos Martins, no Espírito Santo (20° 24' S e 41° 01' W) (Fig. 1). O parque está inserido em uma área de Mata Atlântica abrangendo áreas de Floresta Ombrófila Densa Montana e Altimontana e Vegetação Rupestre (IEMA 2020) (Fig. 1). Os indivíduos de *Clusia* foram coletados à pleno sol, sobre afloramento rochoso, em uma região de transição de floresta para a área rupestre (Fig. 1). Ramos férteis foram herborizados e depositados no herbário do IF Goiano, campus Rio Verde (IFRV) sobre os números 1205, 1206 e 1207. A confirmação da identidade foi feita através de envio do material para especialista.

### **Estudos anatômicos (Microscopia de Luz)**

As amostras coletadas foram fixadas em campo em FAA (formalina, ácido acético glacial e álcool etílico 70%, 1:1:18, v/v) (Johansen 1940) para caracterização estrutural e em FNT (formalina neutra tamponada) para aplicação de testes histoquímicos. Após 48 horas, as amostras fixadas em FAA foram transferidas para álcool etílico 70% e as amostras em FNT passaram pelo processo de desidratação até sua estocagem em álcool etílico 70%.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica, incluídas resina do tipo metacrilato (Historesin, Leica) e seccionadas no plano transversal e longitudinal (7µm de espessura) em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Scientific) com utilização de aço descartáveis de baixo perfil. Os cortes obtidos do material fixado em FAA foram corados com azul de toluidina pH 4,8 (O'Brien et al. 1964) e as lâminas montadas com resina sintética (Permout). Os cortes das amostras previamente fixadas

em FNT foram submetidos aos testes histoquímicos incluindo: reação de PAS para polissacarídeos totais (Jensen 1962); vermelho de Rutênio (Johansen 1940) para pectinas; cloreto férrico (Johansen 1940) para compostos fenólicos gerais; reagente de Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcaloides; Sudan IV para lipídios totais (Pearse, 1985) e; Xylidine Ponceau (O'Brien and McCully 1981) para proteínas. Amostras não submetidas a testes histoquímicos ou corantes (branco) foram utilizadas para comparações. As lâminas montadas com resina sintética (Permount).

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio Olympus (modelo BX61) equipado com sistema de captura de imagens, câmera DP-72 e fluorescência, do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano, campus Rio Verde), Goiás, Brasil.

### **Estudos micromorfológicos (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV)**

Para caracterizar a micromorfologia dos coléteres as amostras foliares foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 48 horas e estocadas em álcool etílico 70%. A seguir as amostras foram desidratadas em série acetônica e levadas para secagem ao ponto crítico (Bozzola & Russel 1992), utilizando-se equipamento Autosamdri®, 815, Series A. Posteriormente, as amostras foram fixadas em stubs com fita adesiva dupla face e metalizadas no sistema para deposição de filmes de ouro, Denton Vacuum, Desk V. A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging no Laboratório de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiânia, campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil.

### **Resultados Variações na morfologia e na atividade secretora dos coléteres**

Os coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* estão localizados na face adaxial das folhas, na região de inserção com o caule (Fig. 2). Nos primórdios foliares, recobrando os meristemas observamos grande acúmulo de secreção (Fig. 2A-E) translúcida (Fig. 2A). Os coléteres são numerosos, diminutos, dispostos em duas ou três fileiras (Fig. 2E) e apresentam uma coloração esbranquiçada. Nessa fase do desenvolvimento foliar observamos assincronia no desenvolvimento dos coléteres (Fig. 2E) com intensa produção e liberação da secreção via rompimento cuticular na porção apical do coléter (Fig. 2C-D) e início da senescência constatada pelo colapamento das

células da porção apical (Fig. 2F). Nas folhas completamente expandidas os coléteres adquirem coloração amarelada com o ápice amarronzado (Fig. 2G) e uma redução na quantidade da secreção é observada (Fig. 2H). Na porção apical, uma constrição separa o ápice amarronzado no qual colapso e rompimentos celulares são comuns (Fig. 2I). Por fim, os coléteres adquirem coloração escura (Fig. 2J) coincidindo com a senescência das folhas. Nessa fase pouca ou nenhuma secreção é observada e os coléteres apresentam-se murchos (Fig. 2K).

### **Ontogenia e variações na histologia dos coléteres**

Os coléteres são formados precocemente durante o estágio inicial de desenvolvimento das folhas, protegendo assim o meristema (Fig. 3). No início do desenvolvimento algumas células do protoderme sofrem alongamento no sentido anticlinal (Fig. 3A) e sucessivas divisões resultam em uma projeção formada pela epiderme multisseriada (Fig. 3A). Concomitante, as células subepidérmicas sofrem divisão e formam o eixo central constituído de células parenquimáticas (Fig. 3A-B). As divisões se intensificam culminando na formação dos coléteres (Fig. 3B-C).

Os coléteres são sésseis com ápice truncado ou afilado (Fig. 3C) sendo avascularizados (Fig. 3C-D). Possuem uma cabeça multicelular formada por um eixo central de células parenquimáticas e uma epiderme secretora (Fig. 3B-D) revestida por uma cutícula espessa (Fig. 3B), sendo classificados como coléteres do tipo padrão. A epiderme secretora comumente apresenta mais que duas camadas de células justapostas colunares dispostas em paliçada. Ainda nos primórdios foliares é possível observar o início da senescência de alguns coléteres a qual é evidenciada pelo colapso das células da porção apical (Fig. 3C) comprovando a assincronia no desenvolvimento (Fig. 3D).

Nas folhas adultas a degradação das células da porção apical é acentuada (Fig. 3F) e há acúmulo de compostos fenólicos (Fig. 3G). Nas folhas senescentes a epiderme secretora da maioria dos coléteres apresenta-se completamente degradada com células colapsadas e/ou rompidas (Fig. 3H-I), no entanto, não há abscisão dos coléteres.

### **Caracterização histoquímica**

Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de polissacarídeos (Fig. 4A-C) na secreção dos coléteres nos três estádios de desenvolvimento da folha. No entanto, é

nítida a abundância de secreção extravasada pelos coléteres nos primórdios foliares (Fig. 4A). Nos coléteres das folhas adultas observamos acúmulo de secreção no espaço subcuticular (Fig. 4B). Nos coléteres das folhas senescentes, por sua vez, não há acúmulo de secreção nas células secretoras nem no espaço subcuticular visto que as células encontram-se degradadas (Fig. 4C).

Pectinas foram observadas na secreção extravasada pelos coléteres nos três estágios de desenvolvimento foliar (Fig. 4D-F). Há acúmulo desse composto no citoplasma das células secretoras (Fig. 4D) e no espaço subcuticular (Fig. 4E). Assim como no resultado para polissacarídeos totais, as células da porção secretora dos coléteres nas folhas senescentes não acumularam pectinas (Fig. 4F).

O citoplasma das células secretoras reagiu positivamente para proteínas apenas nos coléteres dos primórdios foliares (Fig. 4G-I). Presença de alcaloides, como conteúdo celular, foi registrada em todos os coléteres sendo restrita às células do eixo central nos primórdios foliares (Fig. 4J) se expandindo para as células secretoras nas folhas adultas (Fig. 4K) e senescentes (Fig. 4L). A maioria dos coléteres nos primórdios foliares não apresentaram compostos fenólicos embora em alguns tenha sido observado um pequeno acúmulo nas células da porção apical (Fig. 4M). Por outro lado, grande acúmulo de fenólicos foi constatado nas folhas adultas (Fig. 4N) e senescentes (Fig. 4O).

## **Discussão**

A função de proteção de meristemas é órgãos em desenvolvimento, atribuída aos coléteres, é consenso na literatura tanto que aspectos funcionais devem ser levados em consideração para definir uma glândula como coléter (Thomas 1991; Mayer et al. 2011, 2013; Cardoso-Gustavson et al. 2014; Ribeiro et al. 2017). Baseado nas análises morfológicas, anatômicas e histoquímicas confirmamos a presença de coléteres na base das folhas de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva*.

## **Variações na morfologia e na atividade secretora dos coléteres**

As mudanças de coloração observadas ao longo do desenvolvimento dos coléteres foram relatadas para outras espécies pertencentes a diferentes famílias incluindo Apocynaceae (Thomas & Dave 1989, Appezzato-da-Glória & Estelita 2000; Rio et al. 2002), Gentianaceae (Dalvi et al. 2014), Rubiaceae (Lersten 1974; Miguel et al. 2006; 2009; Vitarelli & Santos 2009; Klein et al. 2010; Pinheiro et al. 2019). Esses autores

geralmente associam as alterações na coloração com a produção de compostos fenólicos o que pode ser comprovado em *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* pois há produção de compostos fenólicos e alcaloides especialmente nas folhas adultas e senescentes.

A secreção visível em campo, embora presente nas folhas adultas e em pouca quantidade nas folhas senescentes, é resultado do acúmulo de secreção produzido nas folhas jovens visto que nesse estágio do desenvolvimento foliar os coléteres estão em senescentes, portanto inativos na produção de secreção. Embora diminutos podemos observar ainda em campo, que os coléteres não sofrem abscisão, estando presentes mesmo nas folhas em processo de senescência.

### **Ontogenia e variações na histologia dos coléteres**

Os coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* são originados da protoderme e do meristema fundamental sendo classificados como emergências. A assincronia no desenvolvimento nos primórdios foliares é comum sendo relatada para diversas espécies. Segundo Thomas (1991) coléteres se desenvolvem a partir da protoderme e de camadas subepidérmicas. González (1998) observou que um grupo de células protodérmicas apresenta aumento radial e divisão anticlinal e que algumas células subepidérmicas se dividem para formar uma protuberância. Sendo assim a divisão anticlinal origina a epiderme secretora e as células subepidérmicas dão origem ao eixo parênquimático do coléter.

Outros autores reportam que o mais comum são os coléteres serem formados apenas pela a protoderme a partir dessas divisões periclinais e anticlinais, sem haver o envolvimento do meristema fundamental (Paiva & Machado 2006; Paiva 2009; Rocha et al. 2011; Paiva & Martins 2011). Para o gênero *Clusia* a origem mista foi comprovada para os coléteres de *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. e *Clusia lanceolata* Cambess. (Machado & Emmerich 1981; Silva et al. 2019).

Os coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* são do tipo padrão avascularizados. Coléteres de tipo padrão são morfológicamente constituídos por um eixo central parenquimático cercado por uma camada de células epidérmicas secretoras em paliçada (Lester 1974). Esse mesmo tipo de coléter foi encontrado para *Clusia lanceolata* Cambess. (Machado & Emmerich 1981) e *Clusia burchelli* Engl. (capítulo 1). Por outro lado, coléteres do tipo padrão lacrimiforme - cilíndricos com uma base estreita e às vezes com um ápice afunilado – foram descritos para *Clusia fluminensis* Planch. & Triana e

*Clusia lanceolata* Cambess. (Machado & Emmerick 1981; Silva et al. 2019). No entanto, entendemos que o lacrimiforme se refere a forma do colétero o qual é do tipo padrão segundo (Lester 1974).

Os estudos sobre essas diferenças morfológicas dos coléteres podem ser importantes para oferecer contribuições para trabalhos de taxonomia e estabelecer relações filogenéticas dentro da família Clusiaceae. A importância taxonômica e filogenética dos coléteres é relatada para diferentes famílias incluindo Anacardiaceae (Lacchia et al. 2016), Apocynaceae (Thomas 1991; Demarco 2005; Canaveze & Machado 2015; Ribeiro et al. 2017), Aquifoliaceae (Thomas 1991; González & Tarragó 2009), Euphorbiaceae (Thomas 1991; Vitarelli et al. 2015; Almeida & Paiva 2019), Gentianaceae (Thomas 1991; Renobales et al. 2001), Leguminosae (Coutinho et al. 2015; Francino et al. 2015; Silva et al. 2017), Polygalaceae (Aguiar-Dias et al. 2015), Rubiaceae (Lersten 1974; Thomas 1991; Pinheiro et al. 2019), Rutaceae (Macedo et al. 2016) e Salicaceae (Fernandes et al. 2016) entre outras.

Ainda nos primórdios foliares observamos coléteres em início de senescência a qual é acentuada nas folhas adultas e senescentes. Uma das características comuns aos coléteres é apresentarem-se degenerados ou em processo de degeneração conforme o crescimento do órgão como noticiado para espécies de *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) (Barreiro & Machado 2007), *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae) (Rocha et al. 2011), *Tontelea micrantha* (Celastraceae) (Mercadantes-Simões & Paiva 2013), *Macrocarpaea obtusifolia* Mart. & Schult. (Gentianaceae) (Dalvi et al. 2013), *Chamaecrista* L. Moench (Leguminosae, Caesalpinioideae S.L.) (Coutinho et al. 2015), *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) (Pinheiro et al. 2019). Essa degeneração tem implicação com a fase secretora desses coléteres que se inicia-se nas regiões meristemáticas e órgãos jovens e se estende até o final da fase de expansão foliar (Mercadantes-Simões & Paiva 2013). Outras alterações como o enrugamento da cutícula, formação de uma constrição na base dos coléteres e rompimento celular indicam a senescência dos coléteres (Pinheiro et al. 2019).

Embora senescentes os coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* não sofrem abscisão. A abscisão é um processo natural e a consequência do processo de senescência (Fahn 1974; Leite 2012). Os coléteres que não sofrem abscisão, muitas vezes podem permanecer nos ramos após a abscisão das folhas, podendo essa permanência estar associada a um determinado papel ecológico por parte dessas estruturas (Leite 2012).

### **Caracterização histoquímica**

Mucilagens, pectinas, proteínas, compostos fenólicos e alcaloides foram encontrados nos coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva*. No entanto, há um predomínio de composto conforme o estágio de desenvolvimento foliar. Nas folhas em formação secreção abundante de natureza polissacarídica, péctica e proteica é constatada. A mucilagem é constituída principalmente por polímeros de polissacarídeos com alto peso molecular (Fahn 1988) e juntamente com a pectina pode atuar como absorvedores de água devido às suas propriedades higroscópicas (Hall et al. 1981, Nobel et al. 1992). Este resultado concorda com a função dos coléteres de produzir secreções que protegem os primórdios das folhas e as folhas jovens durante o seu desenvolvimento (Lersten, and Horner 1968; Lersten, 1974; Fahn, 1979) e/ou que promovem a lubrificação do meristema caulinar para minimizar o atrito dos tecidos da folha em desenvolvimento e para evitar a sua dessecação (Fahn, 1979; Thomas, 1991; Mayer et al., 2011, 2013; Silva et al., 2012). As proteínas, por sua vez, estão relacionadas com a defesa contra atividade fúngica e ataque de patógenos (Klein et al. 2004; Miguel et al. 2006) sendo comumente relatadas na secreção dos coléteres (Gonzalez & Tarragó 2009; Coelho et al. 2013; Dalvi et al. 2013; Lacchia et al. 2016; Pinheiro et al. 2019). Com a expansão foliar a secreção desses compostos em *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* cessa visto que há um alto gasto energético para produção de secreção que não tem mais funcionalidade nas folhas adultas e senescentes.

Por outro lado, nas folhas adultas e senescentes há produção intensificada de compostos fenólicos e alcaloides. Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas e atuam como inseticidas (Velten et al. 1998; Dewick 2002) o que poderia atuar em uma defesa contra herbivoria. Fenólicos também foram reportados para outras espécies de *Clusia* tanto secreção presente no meristema, quanto nas folhas adultas (Silva et al. 2019). Segundo Coelho et al. (2013) compostos fenólicos e lipídios são produtos finais do processo de senescência da secreção de coléteres mucilaginosos. Coelho et al. (2013) enfatizam que a degeneração das organelas e membranas dessas células secretoras, resultam no escurecimento do citoplasma, sendo isso posterior ao processo de senescência. Sendo assim, segundo Paiva (2009) conforme a atividade secretora progride, algumas organelas que eram menores em tamanho e exibiam compostos fenólicos parecem aumentar a produção desses compostos dentro dos

coléteres, quando esse caminha para a senescência o que mostra que de acordo com o desenvolvimento do coléter aumenta a produção de diferentes compostos.

Através da microscopia de varredura foram observados rompimentos da cutícula na porção apical dos coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* presentes nos primórdios foliares. Especulações de que a secreção dos coléteres seja liberada por poros ou rompimento da cutícula são comuns na literatura (Paiva & Machado 2006; Silva et al. 2017). Porém além do rompimento cuticular nessa espécie também foi observado uma ruptura total de células em estágios jovens, o que pode significar que a célula entra em lise para a saída da secreção.

Desta forma observamos que há diferenças na composição do exsudato e nas características estruturais dos coléteres ao longo do desenvolvimento foliar.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela bolsa de Mestrado (código 001) concedida à primeira autora; ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás - UFG, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil, pela assistência técnica e ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde por toda a assistência no desenvolvimento de todo o trabalho.

### **Referências**

Aguiar-Dias, A.C.A., Feio, A.C., Pastore, J.F.B. 2015. Development, structure and function of bracteal nectaries in *Caamembeca laureola* (A.St.Hil & Moq.) JFB Pastore (Polygalaceae). Brazilian Journal of Botany 38: 657- 667.

Almeida, L.A. & Paiva, E.A.S. 2019. Colleters in *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): Anatomy and biology of the secretory process. Flora 258.

Appezato-Da-Glória, B., & Estelita, M.E.M. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). Rev Bras Bot 23: 113-120.

Ascensão, L. 2007. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem Morfo-Anatômica.



In: Figueiredo A.C; Barroso, J.G; Pedro, LG. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. 3. ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa/Centro de Biotecnologia Vegetal.

Barreiro & Machado. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasil de Botânica*. 30: 387-399.

Bittrich, V., Trad, R.J., Cabral, F.N., Nascimento-Jr, J.E., Souza, V.C. 2015. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB28292>>

BFG - The Brazil Flora Group (2015) Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113.

Bozzola, J.J. & Russel, L.D. 1992. *Electron Microscopy*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Calvo, T.R., Demarco, D., Santos, F.V., Moraes, H.P., Bauab, T.M., Varanda, E.A., Cólus, I.M.S., Vilegas, W. 2010. Phenolic compounds in leaves of *Alchornea triplinervia*: anatomical localization, mutagenicity, and antibacterial activity. *Natural Product Communication* 5: 1225–1232.

Canaveze, Y. & Machado, S.R. 2015. Leaf colleter in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis, and cellular secretion. *Botany* 93: 1-10.

Cardoso-Gustavson, P., Campbell, L.M., Viveiros-Mazzoni, S., Barros, F. 2014 Floral colleters in Pleurothallidinae (Epidendroideae: Orchidaceae). *American Journal of Botany* 101:587–597.

Castro, M.M., & Demarco, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3: 1273-1284.

Coelho, V.P.M., Leite, J.P.V., Fietto, L.G., Ventrella, M.C. 2013. Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of the secretion. *Flora* 208: 579-590.

Coutinho, Í.A.C., Francino, D.M.T., Meira, R.M.S.A. 2015. New records of colleters in *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae S.L.): structural diversity, secretion, functional role, and taxonomic importance. *International Journal of Plant Sciences* 176: 72-85.

Curtis, J.D. & Lersten, N.R. 1974. Morphology, seasonal variation, and function of resin glands on buds and leaves of *populus deltoides* (Salicaceae). *Botany* 61: 835-845

Dalvi, V.C., Meira, R.M.S.A, Francino, D.M.T., Silva, L.C., Azevedo, A.A. 2013. Anatomical characteristics as taxonomic tools for the species of *Curtia* and *Hockinia* (Saccifolieae-Gentianaceae Juss.). *Plant Systematics and Evolution* 300: 99-112.

Demarco D. 2005. Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. and *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae s.l.). MSc Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Dewick, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach 2nd. Ed. Chinchester, John Wiley & Sons. 524 p.

Fahn, A. 1988. Plant anatomy. Pergamon Press, Oxford.

Fahn, A. 1974. Plant Anatomy. Segundo, Pergamon Press Oxford.

Fahn, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. London, Academic Press.

Fernandes, V.F., Thadeu, M., Dalvi, V.C., Marquete, R., Meira, R.M.S.A. 2016. Colleters in *Casearia* (Salicaceae): a new interpretation for the theoid teeth. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 682-691.

Francino, D.M.T., Coutinho, Í.A.C., Dalvi, V.C., Azevedo, A.A., Conceição, A.S., Meira, R.M.S.A. 2015. Anatomical interpretations of the taxonomy of *Chamaecrista* (L.) Moench sect. *Absus* (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 2087-2103.

González, A.M. & Tarragó, J.R. 2009. Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America. *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 197-210.

González, A.M. 1998. Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 215–228.

Hall, W.C. 1981. Biomass as an alternative fuel. Rockville: Government Institutes. 267p.  
HENNIPMAN, E. 1968. The mucilage secreting hairs on the young fronds of some leptosporangiate ferns. *Blumea* 16: 97-103.

IEMA. 2020. Acessado em: <https://iema.es.gov.br/PEPCV> 15 de outubro de 2020.

Jensen, W.A., 1962. *Botanical Histochemistry: Principles and Practice*. W. H. Freeman and Co, San Francisco.

Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc GrawHill, New York.

Judd, W.S; Campbell, C.S; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. [Plant systematics: a phylogenetic approach]. Rodrigo B.Singer et al. (Trad.) 3a Ed, Porto Alegre, Artmed.

Klein, D.E., Gomes, V.M., Silva-Neto, S.J., Cunha, M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733-740.

Klein, D.E., Oliveira, M.A., Cunha, M. 2010. of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 33: 425-436.

Lacchia, A.P.S., Tölke, E.E.A.D., Demarco, D., Carmello-Guerreiro, S.M. 2016. Presumed domatia are actually extrafloral nectaries on leaves of *Anacardium humile* (Anacardiaceae) *Rodriguesia* 67: 19-28.

Leite, R.G. 2012. Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae). Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília. 106p.

Lersten, N.R. 1974. Morphology and distribution of colleter and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973–981.

Lersten, N.R., & Horner, H.T.Jr. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55: 1089-1099.

Lüttge, U. (Ed.). 2007. *Clusia* – A woody Neotropical genus of remarkable plasticity and diversity. *Ecological studies*, vol. 194. Springer, New York.

Macedo, T.P., Cortez, P.A., Costa, L.C.B. 2016. First record of colleter in *Zanthoxylum* Linn. species (Rutaceae Juss., *Sapindales*): structural, functional and taxonomic considerations. *Flora* 224: 66-74.

Mayer, J.L.S., Cardoso-Gustavson, P., Appezzato-Da-Glória, B. 2011. Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* 206: 185-190.

Mayer, J.L.S., Carmello-Guerreiro, S.M., Mazzafera, P. 2013. A functional role for the colleters of coffee flowers. *AoB Plants* 5: 1-13.

Machado, M.M.P. & Emmerich, M. 1981. Presença de coléteres em *Clusia lanceolata* Cambess. *Boletim do Museu nacional, Botânica* nº 59, 27 de março, Rio de Janeiro – Brasil.

Maximo, E.P. & Demarco, D. 2018. Laticifers and Secretary Ducts: Similarities and Differences. Chapter 06, Ecosystem Services and Global Ecology.

Mercadante-Simões, M.O., & Paiva, E.A.S. 2013. Leaf colleters in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural aspects. *Comptes Rendus Biology* 336: 400-406.

Miguel, E.C, Gomes V.M, Oliveira, M.A, Cunha, M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. *Plant Biology* 8: 715-722.

Miguel, E.C., Moraes, D.G., Cunha, M. 2009. Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schldl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. *Acta botânica brasílica* 23: 1034-1039.

Nobel, P.S., Alm, D.M., Cavelier, J. 1992. Growth respiration, maintenance respiration and structural-carbon costs for roots of three desert succulents, *International Journal of Plant Sciences* 153:102-107.

O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59 (2): 368-373.

Paiva, E.A.S. & Machado, S.R. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* 66: 301-308.

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

Paiva, E.A.S. 2016. How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of Botany* 117: 533-540.

Paiva, E.A.S., & Luiza, C.M. 2011. Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany*, 59, 91–98.

Pearse, A.G.E. 1985. Histochemistry: theoretical and applied. Vol II. Livingstone, Edinburgh.

Pinheiro, S.K.P., Teófilo, F.B.S., Lima, A.K.M., Cordoba, B.V., Miguel, T.B.A.R., Miguel, E.C., 2019. Ontogenesis and secretion mechanism of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) colleters. *South African Journal of Botany* 121: 26–33.

Renobales, G., De 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.

Ribeiro, J.C., Ferreira, M.J.P., Demarco, D. 2017. Colleters in Asclepiadoideae (Apocynaceae): protection of meristems against desiccation and new functions assigned. *International Journal of Plant Sciences* 178:465–477.

Rio, M.C.S., Castro, M.M., Kinoshita, L. S. 2002. Distribuição e caracterização anatômica dos coléteres foliares de *Prestonia coalita* (Vell.) Woodson (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 339-349.

Rocha, J.F., Pimentel, R.R., Machado, S.R. 2011. Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. *Acta Botanica Brasilica* 25: 751-763.

Silva, C.J., Barbosa, L.C.D.A., Marques, A.E., Baracat-Pereira, M.C., Pinheiro, A.L., Meira, R.M. 2012. Anatomical characterisation of the foliar colleters in Myrtoideae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 60: 707-717.

Silva, M.D.S., Coutinho, Í.A.C.; Araújo, M.N., Meira, R.M.S. 2017. Colleters in *Chamaecrista* (L.). Moench sect. *Chamaecrista* e sect. *Caliciopsis*

(LeguminosaeCaesalpinioideae): implicações de anatomia e taxonomia. Acta Botanica Brasílica 31: 382-391.

Silva, K.M.M, Luna, B.N., Joffily, A., Paiva, S.R., Barros, C.F. 2019. Revealing the development of secretory structures in the leaves of *Clusia fluminensis* and *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). Flora 256: 69–78.

Smith, R.H. 1963. Preferential attack by *Dendroctonus terebrans* on *Pinus elliotti* Journal of Economic Entomology 56: 817-819.

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

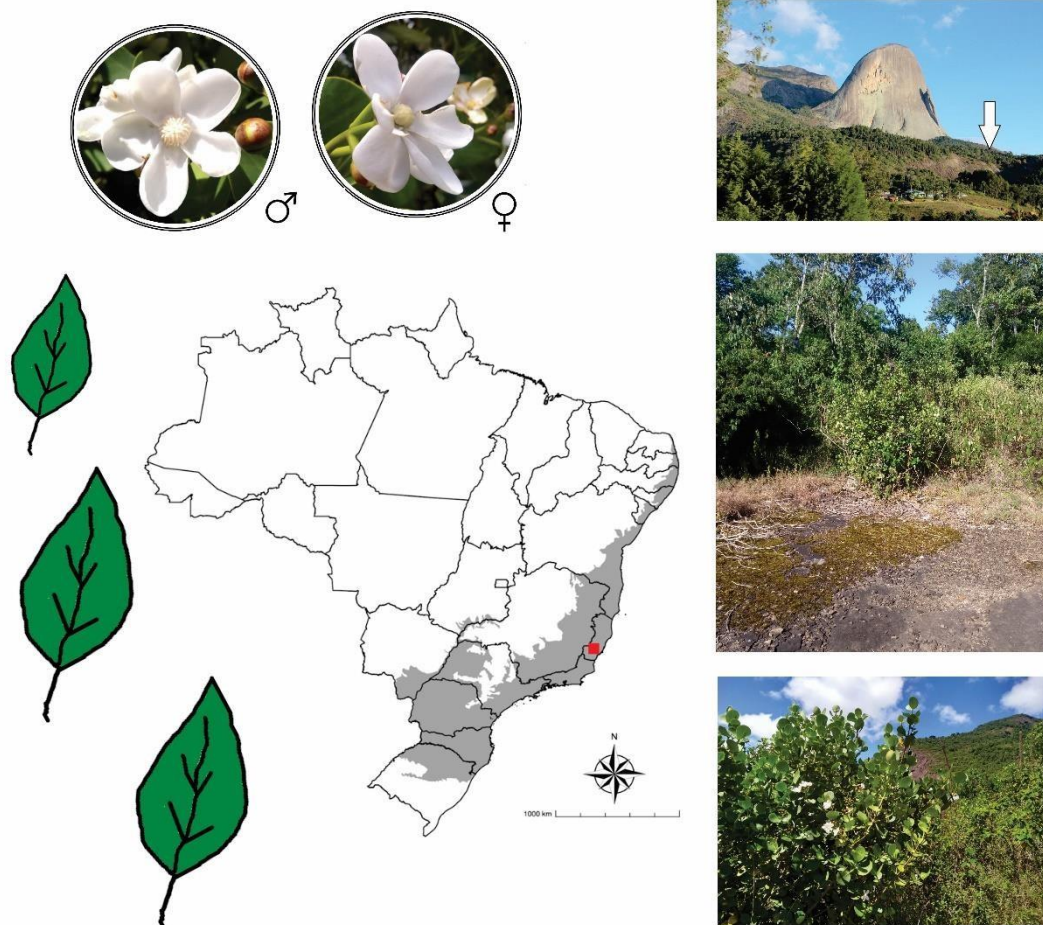
Thomas. V., & Dave, Y. 1989. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* mill. (*Nerium odorum* Soland, Apocynaceae). Korean J Bot 32: 163-172.

Velten, R., Erdelen, C., Gehling, M. et al. 1998. Tetrahedron, Letters. 39: 1737.

Vitarelli, N.C., & Santos, M. 2009. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). Acta botânica brasílica 23: 923-928.

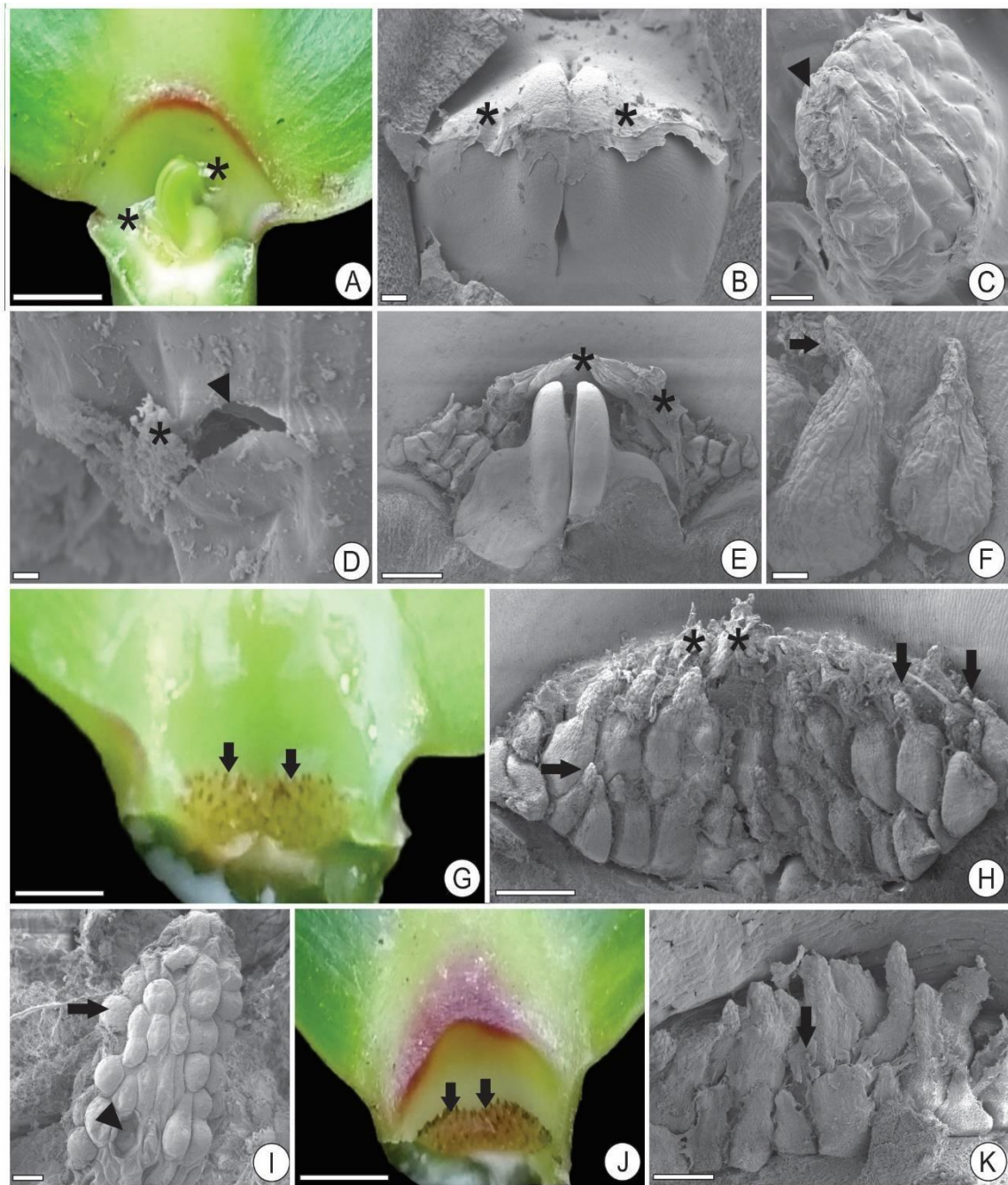
Vitarelli, N.C., Riina, R., Caruzo, M.B.R., Caruzo, Cordeiro, I., Fuertes-Aguilar, J., Meira, R.M.S.A. 2015. Foliar secretory structures in Crotonae (Euphorbiaceae): Diversity, anatomy, and evolutionary significance. American Journal of Botany 102: 833-847.

## Lista de figuras

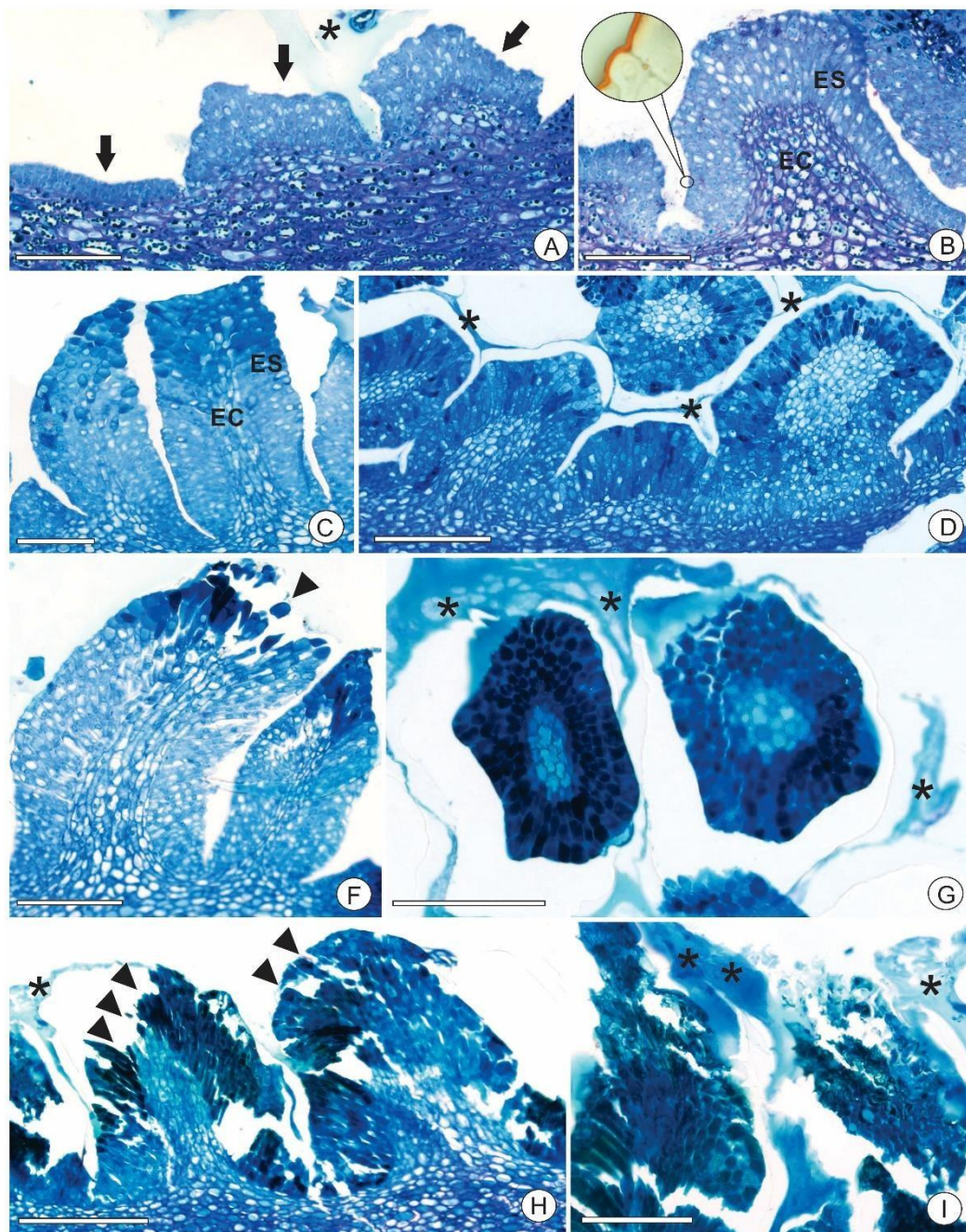


**Figura 1:** Local de coleta e amostragem *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva*. Indivíduos crescendo em área de afloramento rochoso no domínio da Mata Atlântica nos arredores do Parque Estadual da Pedra Azul, Domingos Martins, Espírito Santo. Folhas em diferentes estágios de desenvolvimento.

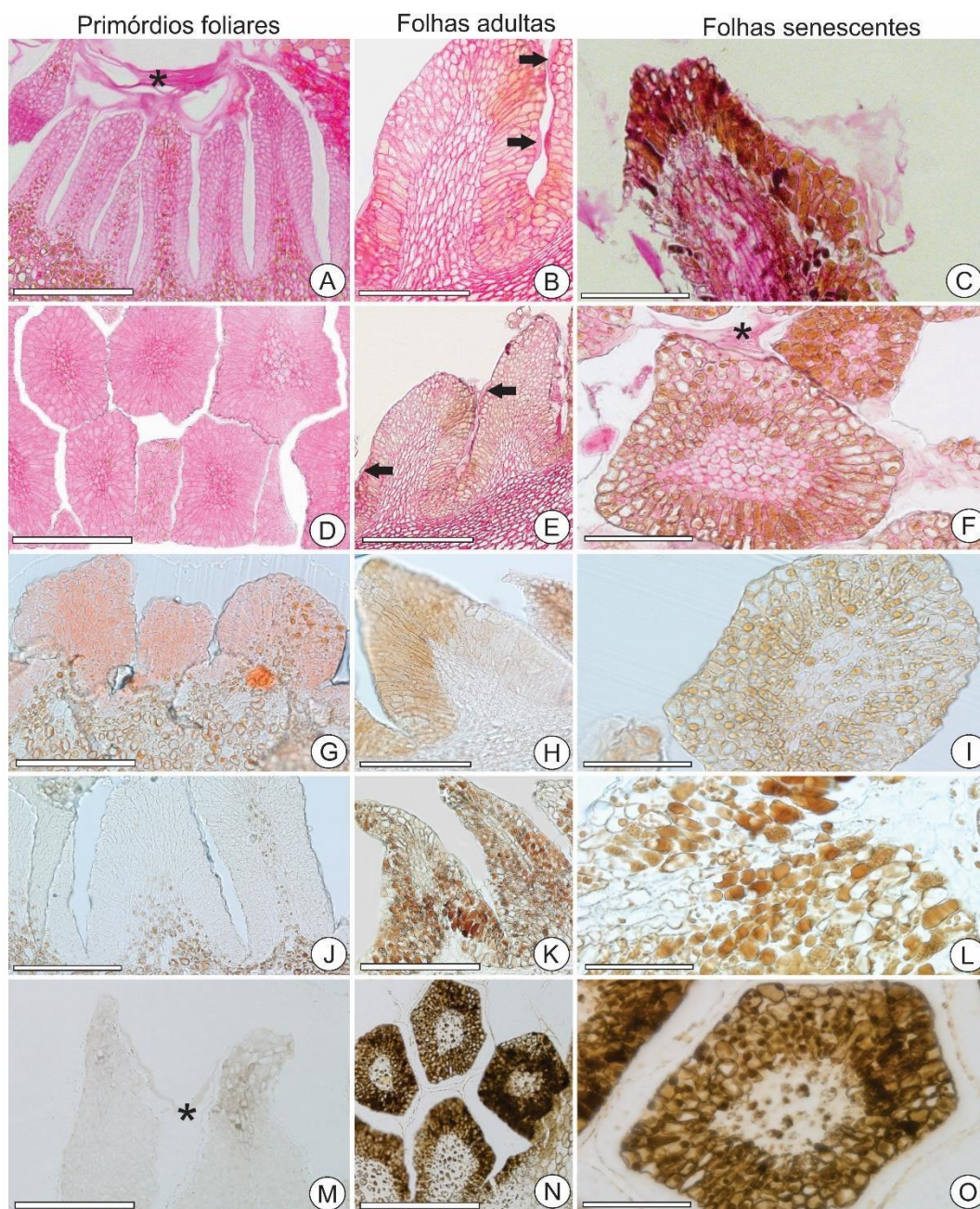




**Figura 2:** Coléteres em *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva*. A: Secreção recobrendo os primórdios foliares e meristema apical. B: Secreção recobrendo o meristema (microscopia eletrônica de varredura-MEV). C e D: Rompimento da cutícula (ponta da seta) e extravasamento da secreção. E: Localização dos coléteres junto ao meristema apical caulinar F: Porção apical do coléter com colabamento celular. G e H: Coléteres nas folhas adultas, foto em campo e MEV, respectivamente. I: Coléter apresentando rompimento celular. J e H: Coléteres nas folhas senescentes. Barras: A, G, J= 1mm; B, C, H= 200µm; D, F, K= 20 µm; I=50µm; E=500µm; \*secreção e →detalhes dos coléteres.



**Figura 3:** Seções anatômicas dos coléteres foliares de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* coradas com Azul de Toluidina. A-F: Coléteres nos primórdios foliares. G-H: Coléteres nas folhas senescentes. A: Formação dos coléteres à partir de células protodérmicas e subepidérmicas. B: Detalhe da cutícula corada com Sudan III. C: Coléteres totalmente formados evidenciando o eixo central e a epiderme secretora. D: Assincronia no desenvolvimento dos coléteres. E-F: Coléteres em início de senescência (ponta de seta). G-H: Degradação celular (ponta de seta) dos coléteres. H: Observa-se a secreção extravasada. Barras: A, B, D, F-H= 500µm; C, E= 200µm. \* = secreção. → desenvolvimento dos coléteres. ES = epiderme secretora e EC=eixo central.



**Figura 4:** Testes histoquímicos dos coléteres de *Clusia criuva* Cambess. subsp. *criuva* em três estágios de desenvolvimento foliar. A-C: Reação com PAS evidenciando a presença de polissacarídeos. D-F: Presença de pectina é confirmada a partir do teste vermelho de rutênio. G-I: Teste de Xylidine Ponceau, com resultado positivo para a presenças de proteínas apenas nos primórdios foliares. J-L: Teste de reagente de Wagner evidenciando a presença de alcaloides nas folhas adultas e senescentes. M-O: Teste de cloreto férrico demonstrando o aumento na quantidade de compostos fenólicos nos coléteres ao longo do desenvolvimento foliar. Barras: A, D, G, J e M = 500  $\mu$ m; B, E, H, K e N = 200  $\mu$ m; C, F, I, L e O = 100  $\mu$ m; \* = Secreção e  $\rightarrow$  = Acúmulo de secreção.

## Considerações finais

O gênero *Clusia* possui ampla distribuição no território brasileiro, sendo bastante utilizado como ornamental e também pela indústria farmacêutica, devido principalmente a sua secreção de natureza diversa. Descrevemos o desenvolvimento de coléteres foliares em espécies de *Clusia*, que são estruturas encontradas principalmente em órgãos jovens, pois produzem uma secreção rica em mucilagem que atua na proteção contra dessecação. Porém esses também podem produzir uma gama de outras substâncias. Diferenças morfológicas e anatômicas são comuns e possuem importância taxonômica e evolutiva. Coléteres em *Clusia* ocorrem na base do pecíolo, na região de inserção da folha com o caule. São considerados do tipo padrão e de origem mista. Morfologicamente os coléteres apresentaram uma diferença entre as espécies, sendo esses em *Clusia criuva*. subsp. *criuva* mais achatados e afunilados, apresentando um murchamento nas células da cabeça secretora do coléter. Em *Clusia burchelli*, por sua vez, os coléteres possuem uma morfologia diversificada, e podem ser longos e uniformes ou apresentar pontas afiladas, semelhantes a cones.

A secreção é translúcida é de natureza mucilagínosa, mas com uma composição heterogênea composta por polissacarídeos, pectinas, compostos fenólicos e alcaloides na secreção dos coléteres nos três estádios de desenvolvimento da folha em ambas as espécies. Proteínas foram evidenciadas na secreção e nas células da porção secretora de *Clusia criuva*. subsp. *criuva* e em *Clusia burchelli* o resultado foi negativo para proteínas na secreção. Em *Clusia burchelli* ainda observou-se lipídios na secreção e gotas de óleo essencial no interior das células secretoras.

Tais características podem ser úteis em trabalhos taxonômicos e filogenéticos envolvendo a família e o gênero *Clusia*.