

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**SIMILARIDADE ESTRUTURAL *VERSUS* DIFERENTES
COMPOSIÇÕES DO SECRETADO EM COLÉTERES DE
ESPÉCIES CONGENÉRICAS: O CASO *PREPUSA* SSP.
(GENTIANACEAE)**

Autora: Daiane Moreira Dourado

Orientadora: Dra. Valdneá Casagrande Dalvi

RIO VERDE – GO

Maio – 2021

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**SIMILARIDADE ESTRUTURAL *VERSUS* DIFERENTES COMPOSIÇÕES
DO SECRETADO EM COLÉTERES DE ESPÉCIES CONGENÉRICAS: O
CASO *PREPUSA* SSP. (GENTIANACEAE)**

Autora: Daiane Moreira Dourado

Orientadora: Dra. Valdneá 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 em Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO

Maio – 2021

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

DD739s DOURADO, DAIANE MOREIRA
SIMILARIDADE ESTRUTURAL VERSUS DIFERENTES
COMPOSIÇÕES DO SECRETADO EM COLÉTERES DE ESPÉCIES
CONGÊNERICAS: O CASO PREPUSA SSP. (GENTIANACEAE) /
DAIANE MOREIRA DOURADO; orientadora Valdneá
Casagrande Dalvi; co-orientadora Diego Ismael
Rocha . -- Rio Verde, 2021.
44 p.

Tese (Doutorado em MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2021.

1. Anatomia. 2. coléter. 3. Mata Atlântica. 4.
secreção. I. Dalvi, Valdneá Casagrande , orient. II.
Rocha , Diego Ismael , co-orient. III. Título.

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

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO



Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano
Sistema Integrado de Bibliotecas

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: Daiane Moreira Dourado
Matrícula: 2019102310840025

Título do Trabalho: Similaridade estrutural versus diferentes composições do secretado em coléteres de espécies congêneras: o caso *Prepusa* ssp. (Gentianaceae)

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 28/07/2021

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 incluídos 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;
- 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, Goiás, 27/07/2021
Local Data

Daiane Moreira Dourado

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Daiane Moreira Dourado

Assinatura do(a) orientador(a)

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO



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

Documentos 66/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

SIMILARIDADE ESTRUTURAL VERSUS DIFERENTES COMPOSIÇÕES DO SECRETADO EM COLÉTERES
DE ESPÉCIES CONGENÉRICAS: O CASO *PREPUSA* SSP. (GENTIANACEAE)

Autora: Daiane Moreira Dourado
Orientadora: Profª. Drª. Valdneá Casagrande Dalvi

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

APROVADO em 27 de maio de 2021.

Profª. Drª. Dayana Maria
Teodoro Francino
Avaliadora externa -
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri

Profª. Drª. Marina Neves Delgado
Avaliadora externa - IFB /
Planaltina

Profª. Drª. Valdneá Casagrande Dalvi
Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Marina Neves Delgado, Marina Neves Delgado - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (10651417000500), em 10/06/2021 17:17:29.
- Dayana Maria Teodoro Francino, Dayana Maria Teodoro Francino - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (10651417000500), em 09/06/2021 15:37:43.
- Valdneá Casagrande Dalvi, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/05/2021 18:08:45.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 26/05/2021. 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: 272760
Código de Autenticação: 4b5027d343



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

A Deus, por ser essencial na minha vida;

"Caíam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita: tu não serás atingido. Porém, verás com teus próprios olhos, contemplarás o castigo dos pecadores, porque o Senhor é teu refúgio. Escolheste, por asilo, o Altíssimo. Nenhum mal te atingirá, nenhum flagelo chegará à tua tenda, porque aos seus anjos ele mandou que te guardem em todos os teus caminhos."

Ao meu filho José Vitor Dourado de Souza;

À minha mãe Celma M. Martins e ao meu pai Edimilson F. Dourado;

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que me manteve firme durante toda a minha vida.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação pela oportunidade de estudar nesta incrível instituição. À CAPES pela concessão da bolsa.

Agradeço imensamente a minha orientadora Dr^a Valdneá Casagrande Dalvi pela dedicação, orientação, paciência e pelo conhecimento adquirido durante essa jornada. Obrigada por não desistir de mim, mesmo com os tantos contratemplos. Que possamos compartilhar muitos momentos alegres juntas e muito café.

Ao coorientador Dr. Diego Ismael Rocha e ao professor Dr. Vinícius Coelho Kuster pelas contribuições enriquecedoras no meu trabalho.

Aos meus pais, pois sem eles nada seria possível. Me apoiaram durante todo o percurso, desde a graduação sempre me dando força para dar continuidade aos estudos. Obrigada por tudo, amo vocês.

Ao meu amado filho José Vitor, agradeço e me desculpo pelos momentos em que me ausentei para estudar, sempre pensando no melhor para nós.

À minha família, tios, tias, primos e primas, amigos e amigas, alguns perto, outros longe, mas sempre presentes em meu coração e pensamentos.

A todos os docentes pela oportunidade e qualidade de estudos que tive no decorrer do mestrado PPGBio.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, coordenado pelo professor Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, pelo suporte e parceria na execução desta pesquisa.

Agradeço também as minhas caras colegas Roberta e Jailma pelo auxílio durante a nossa excursão em campo em Teresópolis, não foi fácil, mas sobrevivemos. A Robertica em especial por estar sempre à disposição para dar dicas sobre as técnicas de laboratório. A Lara e Maycon pelos cortes maravilhosos em meus bloquinhos e por sempre estar dando força. Ao Valdeir por me socorrer nos momentos de desespero com o Corel Draw.

Às colegas de egresso do mestrado Eliane e Sabrina, obrigada pelo apoio prestado durante este processo. Também agradeço aos demais colegas de sala e amigos (a) que fiz entre os integrantes de todos os PPGs.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

MUITO OBRIGADA

BIOGRAFIA DO AUTOR

DAIANE MOREIRA DOURADO, filha de Celma Moreira Martins e Edimilson Francisco Dourado, nascida em 15 de março de 1992, na cidade de Sobradinho no Distrito Federal. Em fevereiro de 2010, ingressou no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde, graduando-se no ano de 2016. Em março de 2019, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação Biodiversidade e Conservação na mesma instituição, sob a orientação do Professora Valdneá Casagrande Dalvi.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	ix
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 A família Gentianaceae.....	3
1.2 O gênero Prepusa.....	4
1.3 Coléteres.....	4
1.4 Referências bibliográficas.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. CAPÍTULO I.....	9
Resumo.....	10
3.1 Introdução.....	11
3.2 Material e Métodos.....	14
3.3 Resultados.....	17
3.4 Discussão.....	19
Agradecimentos.....	24
3.5 Referências.....	25

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1: Tamanho e composição do secretado dos coléteres foliares de três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	44
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Capítulo I.....	
Figura 1. Habitat e aspectos morfológicos das três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	37
Figura 2. Mapa de distribuição geográfica evidenciando o endemismo das três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae)	38
Figura 3. Coléteres foliares em três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae) observados em estereomicroscópio e em microscopia eletrônica de varredura.....	39
Figura 4. Caracterização anatômica dos coléteres foliares de três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	40
Figura 5. Esquema ilustrativo representando a composição da secreção dos coléteres foliares de três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	41
Figura 6. Testes histoquímicos evidenciando a composição da secreção dos coléteres foliares de três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	42
Figura 7. Análise de cluster, comparando o tamanho dos coléteres nas três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	43
Figura 8. Tamanho dos coléteres foliares das três espécies de <i>Prepusa</i> (Gentianaceae).....	44

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Sigla	Significado
dp	Desvio padrão
m	Meristema
mm	Milímetro
pf	Primórdio foliar
μm	Micrômetro

RESUMO

DOURADO, DAIANE MOREIRA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, maio de 2021. **Similaridade estrutural versus diferentes composições do secretado em coléteres de espécies congênicas: o caso *Prepusa* ssp. (Gentianaceae).** Orientadora: Dra. Valdneá Casagrande Dalvi. Coorientador: Dr. Diego Ismael Rocha.

Os coléteres produzem uma secreção hidrolífica e/ou lipofílica associada à proteção dos meristemas e órgãos em desenvolvimento. Devido ao endemismo restrito das espécies de *Prepusa* (Gentianaceae) a áreas montanhosas do Brasil e a comum ocorrência de coléteres na família objetivamos caracterizar a estrutura e composição da secreção dos coléteres foliares de *P. connata* e *P. hookeriana*, ocorrentes no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), e *P. viridiflora* coletada no Parque Estadual Pedra Azul (PEPAZ), ambas áreas de afloramentos rochosos associados à Mata Atlântica. Folhas em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas, fixadas e processadas seguindo técnicas usuais de microscopia de luz, incluindo testes histoquímicos, e microscopia eletrônica de varredura. Os coléteres, nas três espécies, ocorrem na base das folhas e possuem desenvolvimento assíncrono. Possuem um pedúnculo curto e uma porção secretora composta por células homogêneas revestida por uma cutícula delgada, estrutura semelhante ao reportado para as demais espécies de Gentianaceae. Variações no tamanho dos coléteres podem ser observadas. A secreção é composta predominantemente por polissacarídeos e proteínas. No entanto, lipídios estão presentes em *P. hookeriana* e *P. connata* o que pode estar associado ao fato das espécies, no PARNASO, ocuparem maiores altitudes. Alcaloides foram evidenciados em folhas adultas e/ou senescentes de *P. hookeriana* e *P. viridiflora* e; compostos fenólicos relacionados à senescência da estrutura foram observados para as três espécies. A abundância de secreção polissacarídica confere proteção contra a desidratação visto que os afloramentos rochosos em altitude apresentam características xéricas em detrimento dos fortes ventos, alta irradiação e solos rasos ou inexistentes. Nossos estudos evidenciam alterações na composição da secreção de acordo com o gradiente altitudinal alcançado pelas espécies.

Palavras-chave: **Anatomia, coléter, Mata Atlântica, secreção**

ABSTRACT

DOURADO, DAIANE MOREIRA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, May of 2021. **Structural similarity versus different compositions of the secreted in colleters of congeneric species: the case *Prepusa* ssp. (Gentianaceae).** Advisor: Dra. Valdneá Casagrande Dalvi. Co-Advisor: Dr. Diego Ismael Rocha.

Colleters produce a hydrolific and/or lipophilic secretion associated with the protection of meristems and developing organs. Due to the restricted endemism of *Prepusa* species (Gentianaceae) to mountainous areas of Brazil and the common occurrence of colleters in the family, we aimed to characterize the structure and composition of the secretion of *P. connata* and *P. hookeriana* leaf colleters, occurring in the Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), and *P. viridiflora* collected in Parque Estadual Pedra Azul (PEPAZ), both areas of rocky outcrops associated with the Atlantic Forest. Leaves at different stages of development were collected, fixed and processed following usual light microscopy techniques, including histochemical tests, and scanning electron microscopy. The colleters, in all three species, occur at the base of the leaves and have asynchronous development. They have a short peduncle and a secretory portion composed of homogeneous cells covered by a thin cuticle, a structure similar to that reported for other Gentianaceae species. Variations in the size of colleters can be observed. The secretion is predominantly composed of polysaccharides and proteins. However, lipids are present in *P. hookeriana* and *P. connata*, which may be associated with the fact that species in PARNASO occupy higher altitudes. Alkaloids were evidenced in adult and/or senescent leaves of *P. hookeriana* and *P. viridiflora* e; phenolic compounds related to structure senescence were observed for the three species. The abundance of polysaccharide secretion provides protection against dehydration since rocky outcrops at altitude have xeric characteristics at the expense of strong winds, high radiation and shallow or non-existent soils. Our studies show changes in secretion composition according to the altitudinal gradient reached by the species.

Keyword: **Anatomy, colleter, Atlantic Forest, secretion**

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Gentianaceae

A família Gentianaceae pertence à ordem Gentianales juntamente com Apocynaceae, Rubiaceae, Loganiaceae e Gelseminaceae (Judd et al., 2009). É considerada a terceira maior família da ordem, com aproximadamente 1750 espécies, as quais apresentam distribuição cosmopolita sendo a maior parte das espécies concentradas nas regiões temperadas (Sousa & Lorenzi, 2008; Stevens, 2001). No entanto, a América Central e do Sul engloba a maior diversidade em relação ao número de gêneros (Albert & Struwe, 2002). No Brasil, a família está representada por 31 gêneros e 123 espécies, sendo 56 endêmicas ocorrendo em diversas formações vegetais incluindo as áreas montanhosas como os campos de altitude e campos rupestres (Flora do Brasil, 2020).

A maioria das espécies de Gentianaceae é herbácea ocorrendo também representantes arbóreos, arbustivos, trepadeiras além de espécies saprófitas (Calió et al., 2008; Flora do Brasil, 2020). Além da diversidade de habitats e hábitos as espécies de Gentianaceae apresentam uma grande diversidade morfológica incluindo plantas com folhas simples, glabras, com filotaxia oposta; ausência de estípulas e de látex; presença de coléteres na base das folhas e sépalas; inflorescências terminais ou axilares; flores bissexuais, actinomorfas, raramente zigomorfas; corola com prefloração contorta; estames epipétalos; ovário súpero, bicarpelar, com glândulas ou disco nectarífero na base e placentação parietal; ausência de estigma subdividido; frutos frequentemente secos, podendo ocorrer frutos carnosos ou coriáceos; ausência de alcaloides e presença de secoiridoides e xantonas (Struwe et al., 2002; Calió et al., 2009; Judd et al., 2009).

A família inclui as tribos Chironieae, Exaceae, Gentianeae, Helieae, Potalieae, Saccifolieae e Voyrieae (Stevens, 2001). Helieae é exclusivamente neotropical e constituída por 20 gêneros e cerca de 51 espécies (Calió et al., 2017). As espécies dessa tribo são diversas em termos de ecologia e padrões de distribuição geográfica, podendo ser encontradas em uma ampla variedade de habitats tropicais úmidos a semi-secos que vão desde os campos da Venezuela ao Andes e os campos arborizados da Guiana e Brasil (Calió et al., 2017). O grupo apresenta taxonomia complexa e controversa com difícil delimitação das espécies e dos gêneros (Weaver, 1972; Struwe & Albert, 1998; Struwe et al., 2002). No Brasil, a maioria dos gêneros da tribo Helieae possui distribuição geográfica restrita a áreas montanhosas, como os campos rupestres e campos de altitude ou às savanas amazônicas (Flora do Brasil, 2020). *Prepusa* destaca-se como um desses gêneros cujas espécies apresentam ocorrência restrita a algumas localidades montanhosas na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Calió et al., 2008).

1.2 O gênero *Prepusa*

O gênero *Prepusa* pertence à tribo Helieae sendo representado por 6 espécies, predominantemente herbáceas, endêmicas de habitats montanos brasileiros (Calió et al. 2008). Três espécies, sendo elas *Prepusa alata* Porto & Brade, *Prepusa connata* Gardner e *Prepusa hookeriana* Gardner, são registradas apenas para o Rio de Janeiro em áreas de campo de altitude da Mata Atlântica (Calió et al., 2008; Flora do Brasil, 2020). Duas outras, *Prepusa dibotrya* Fraga, A.P. Fontana & L. Kollmann e *Prepusa viridiflora* Brade ocorrem em vegetação de altitude em áreas de Mata Atlântica, no Espírito Santo, também em área de Mata Atlântica. Por fim, *Prepusa montana* Mart., única espécie com porte arbustivo até pequenas árvores, ocorre na Bahia nos biomas caatinga e em áreas de campo rupestre dentro do cerrado (Calió et al., 2008; Flora do Brasil, 2020).

Segundo o Centro Nacional de Conservação da Flora (ANCFLOA) a espécie *Prepusa montana* está incluída na categoria de ameaça e é considerada vulnerável, já as espécies *Prepusa hookeriana* e *Prepusa viridiflora* estão na categoria de espécies em perigo para a lista de extinção (Martinelli et al., 2018).

1.3 Coléteres

Coléteres compreendem glândulas encontradas na superfície adaxial de órgãos reprodutivos e/ou vegetativos jovens as quais secretam mucilagem ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas e desta forma estão relacionadas com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, lubrificando e protegendo contra dessecação e/ou contra o ataque de herbívoros e patógenos (Fahn, 1979; Thomas, 1991).

Além da função ecológica, a presença e o tipo de coléteres são importantes parâmetros taxonômicos e filogenéticos (Lersten, 1974; Thomas, 1991; Simões et al., 2006; Coutinho et al., 2015). Os coléteres são comuns nas Angiospermas, estando presentes em cerca de 60 famílias (Thomas, 1991), no entanto, estudos recentes reportam essas estruturas em outros grupos incluindo Monocotiledôneas (Leitão & Cortelazzo, 2008; Mayer et al., 2011) e Monilófitas (Oliveira et al., 2017).

Embora representem uma das sinapomorfias da ordem Gentianales (Judd et al., 2009), estudos estruturais em famílias pouco abordadas, como Gentianaceae, podem revelar novos padrões tanto estruturais como de secreção. Os coléteres foram descritos anatomicamente, em Gentianaceae, para espécies de *Calolisianthus* (Delgado, 2008; Delgado et al., 2011; Zanotti, 2018; Dalvi et al., 2020), *Macrocarpaea* (Dalvi et al. 2014)

e *Prepusa* (Gonçalves et al., 2021) pertencentes a tribo Helieae; espécies de *Curtia* e *Hockinia* (Dalvi et al., 2013) pertencentes a tribo Saccifolieae e para os gêneros *Gentiana*, *Gentianella*, *Gentianopsis*, *Comastoma* e *Swertia* (Renobales et al., 2001), incluídos na tribo Gentianeae. Nesses grupos, incluindo *Prepusa montana*, os coléteres possuem uma porção secretora com células homogêneas, são avascularizados e pedunculados sendo a exceção registrada em *Macrocarpaea obtusifolia*. Nessa espécie os coléteres foliares são do tipo padrão com um eixo central de células parenquimáticas recoberto por uma epiderme em paliçada e um pedúnculo que varia de curto a longo (Dalvi et al., 2014).

1.4 Referências bibliográficas

ALBERT, V.A. & STRUWE, L. 2002. Gentianaceae in context. In: Struwe, L. & Albert, V.A. (Eds.). **Gentianaceae - Systematics and Natural History**. Cambridge: Cambridge University Press. 1-20.

CALIÓ, M.F.; PIRANI, J.R.; STRUWE, L. 2008. Morphology-based phylogeny and revision of *Prepusa* and *Senaea* (Gentianaceae: Helieae) - rare endemics from eastern Brazil. **Kew Bulletin**. 63 (2): 169-191.

CALIÓ, M.F; LEPIS, K.B; PIRANI, J.R., STRUWE, L. 2017. Phylogeny of Helieae (Gentianaceae): resolving taxonomic chaos in a Neotropical clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 106: 192-208.

COUTINHO, Í.A.C.; D.M.T. FRANCINO; 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.

DALVI, V.C.; CARDINELLI, L.S.; MEIRA, R.M.S.A.; AZEVEDO, A.A. 2014. Foliar colleters in *Macrocarpaea obtusifolia* (Gentianaceae): anatomy, ontogeny, and secretion. **Botany**. 92(1): 59–67.

DALVI, V.C.; de FARIA, G.S, AZEVEDO, A.A. 2020. Calycinal secretory structures in *Calolisianthus pedunculatus* (Cham. & Schldl) Gilg (Gentianaceae): anatomy, histochemistry, and functional aspects. **Protoplasma**. 257 (1): 275-284.

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(1): 99–112.

DELGADO, M.N 2008. Caracterização morfo-anatômica de espécies de Gentianaceae ocorrentes em áreas de cerrado e de campo rupestre em Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 840p.

DELGADO, M.; AZEVEDO, A.A; SILVA, L.C.; VALENTE, G.E.; KASUYA, M.C.M. 2011. Comparative anatomy of *Calolisianthus* species (Gentianaceae – Helieae) from Brazil: taxonomic aspects. **Edinburgh Journal of Botany**. 68(1): 139–155.

FAHN, A. 1979. Secretory Tissues in Plants. **London: Academic Press**. 302p.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB117>>. Acesso em: 26 Mar. 2020.

GONÇALVES, J.R.; ROCHA, D.I.; DOS SANTOS, L.S.; DALVI, V.C. 2021. The short but useful life of *Prepusa montana* Mart. (Gentianaceae Juss.) leaf colleters-anatomical, micromorphological, and ultrastructural aspects. **Protoplasma**. May 3.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F. 2009. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3^a ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 563p.

LEITÃO, C.A.E.; CORTELAZZO, A.L., 2008. Structural and histochemical characterization of the colleters of *Rodriguezia venusta* (Orchidaceae). **Australian Journal of Botany**. 56: 161–165.

LERSTEN, N.R. 1974. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 69:125–136.

MAYER, J.L.S., CARDOSO-GUSTAVSON, P., APPEZZATO-DA-GLORIA, B., 2011. Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. **Flora**. 206: 185–190.

MARTINELLI, G., MARTINS, E., MORAES, M., LOYOLA, R., AMARO, R. (Orgs.), 2018. **Livro Vermelho da Flora Endêmica do Estado do Rio de Janeiro**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Rio de Janeiro. 456 p.

OLIVEIRA, C.S., SALINO, A., PAIVA, E.A.S., 2017. Colleters in Thelypteridaceae: unveiling mucilage secretion and its probable role in ferns. **Flora**. 228, 65.

RENOBALES, G., DIEGO, E., URCELAY, B., LÓPEZ-QUINTANA, A. 2001. Secretary hairs in *Gentiana* and allied genera (Gentianaceae, subtribe Gentianinae) from the Iberian Peninsula. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 136(1): 119–129.

SIMÕES, A.O.; CASTRO, M.; KINOSHITA, L.S. 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 152: 387-398.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2008. **Botânica Sistemática**. 2ª ed. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum. 640p.

STEVENS, P.F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. 25 de novembro de 2020.

STRUWE, L.; ALBERT, V.A. 1998. *Lisianthus* (Gentianaceae), its probable homonym *Lisyanthus*, and priority of *Helia* over *Irlbachia* as its substitute. **Harvard Papers in Botany**. 3: 63-71.

STRUWE, L.; KADEREIT, J.W.; KLACKENBERG, J.; NILSSON, S.; THIV, M.; VON-HAGEN, K.B.; ALBERT, V.A. 2002. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. In: Struwe, L. & Albert, V.A. (Eds.). **Gentianaceae: Systematics and Natural History**. Cambridge: Cambridge University Press. 21-309.

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

WEAVER, R.E. 1972. A revision of the Neotropical genus *Lisianthus* (Gentianaceae). **Journal of the Arnolds Arboretum** 53: 76-100.

ZANOTTI, A. 2018. Estruturas secretoras em *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schldl.) Gilg. (Gentianaceae): ontogenia e biologia da secreção. **Dissertação** (Mestrado em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerias, 62p.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a estrutura anatômica e a composição da secreção dos coléteres foliares de três espécies de *Prepusa* Mart. (Helieae – Gentianaceae) ocorrentes em áreas de afloramentos rochosos associados à Mata Atlântica, no Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever as variações anatômicas dos coléteres ao longo do desenvolvimento foliar incluindo coléteres presentes nos primórdios foliares, nas folhas adultas e

nas folhas senescentes de *Prepusa connata*, *Prepusa hookeriana* e *Prepusa viridiflora*.

- Proceder análises histoquímicas visando identificar a composição da secreção produzida pelos coléteres ao longo do desenvolvimento foliar.
- Caracterizar a micromorfologia dos coléteres foliares das três espécies de *Prepusa* com o intuito de afirmar os processos de liberação da secreção.
- Correlacionar possíveis variações na composição da secreção com fatores ambientais.

3. CAPÍTULO I

(Artigo formatado nas normas da revista *Flora*)

Similaridade estrutural *versus* diferentes composições do secretado em coléteres de espécies congênicas: o caso *Prepusa* ssp. (Gentianaceae)

Daiane Moreira Dourado¹, Diego Ismael Rocha², Vinícius Coelho Kuster³, Valdneá Casagrande Dalvi^{1,*}

¹Instituto 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, Brasil.

²Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

³Universidade Federal de Jataí. BR 364, km 195, nº 3800 – Cidade Universitária, CEP 75801-615, Jataí, Goiás, Brasil.

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

Resumo

Os coléteres produzem uma secreção hidrolífica e/ou lipofílica associada à proteção dos meristemas e órgãos em desenvolvimento. Devido ao endemismo restrito das espécies de *Prepusa* a áreas montanhosas do Brasil e a ocorrência de coléteres em Gentianaceae objetivamos caracterizar a estrutura e composição da secreção dos coléteres foliares de *P. connata*, *P. hookeriana* e *P. viridiflora* coletadas em áreas de afloramentos rochosos, associados à Mata Atlântica. Folhas em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas, fixadas e processadas seguindo técnicas usuais para microscopias de luz, incluindo testes histoquímicos, e microscopia eletrônica de varredura. Os coléteres ocorrem na base das folhas e possuem desenvolvimento assíncrono. Possuem um pedúnculo curto e uma porção secretora composta por células homogêneas revestida por uma cutícula delgada, estrutura similar a reportada para as demais espécies de Gentianaceae. A secreção é composta predominantemente por polissacarídeos e

proteínas. A abundância de mucilagem confere proteção contra a desidratação visto que, os afloramentos rochosos em áreas de altitude apresentam características xéricas em detrimento dos fortes ventos, alta irradiação e solos rasos ou inexistentes. No entanto, lipídios foram encontrados apenas em *P. hookeriana* e *P. connata* espécies coletadas em altitudes mais elevadas, próximas a 2.000 metros. O maior tamanho dos coléteres de *P. viridiflora* poderia explicar um investimento na produção de polissacarídeos em detrimento do menor tamanho dos coléteres de *P. connata* e *P. hookeriana*, espécies com maior complexidade química na secreção. A presença de alcaloides e fenólicos, especialmente nos estágios de senescência foliar, foi observada em *P. hookeriana* e *P. viridiflora* e estão relacionados com a senescência dos coléteres. Nossos estudos evidenciam alterações na composição da secreção de acordo com o gradiente altitudinal alcançado pelas espécies.

Palavras-chave: **Anatomia, coléter, Mata Atlântica, secreção**

3.1 Introdução

A Mata Atlântica é reconhecida internacionalmente por sua elevada diversidade biológica e alto endemismo (Myers et al., 2000; Metzger, 2009). Abrange de forma descontínua a costa leste brasileira sendo formada por floresta pluvial costeira, floresta semidecídua (Morellato & Haddad, 2000) e floresta de Araucaria e enclaves de florestas de brejo no nordeste brasileiro (Oliveira-Filho & Fontes, 2000) além de tipos vegetacionais mais abertos, circunvizinhos às suas formações florestais (Scarano, 2009). É considerada um dos biomas mais ameaçados do planeta por se encontrar em uma das regiões mais densamente povoadas do mundo (Metzger, 2009). Tal fato é comprovado pela baixa porcentagem de remanescentes que atualmente cobre sua área original, sendo apenas 7,5% (Myers et al., 2000). Por ter elevada riqueza, elevado número de espécies endêmicas e por já ter sido destruída em sua grande totalidade, além de continuar fortemente ameaçada pelas atividades humanas, a Mata Atlântica é categorizada como um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade (Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2004).

Este bioma apresenta um perfil altimétrico bastante acentuado, no qual os ambientes de montanha, denominados de floresta alto-montana ou ainda floresta nebulosa (Veloso et al., 1991; Assis et al., 2007; Magnago et al., 2007), recebem um aporte adicional de umidade (Hamilton et al., 1995). Acima do limite de ocorrência das florestas, e por vezes, entremeando-as, ocorrem os campos de altitude e/ou afloramentos rochosos (Assis et al., 2007; Magnago et al., 2007), uma formação vegetacional de fisionomia campestre e subarborescente (Fernandes et al., 2007; Mocoichinski & Scheer, 2008), geralmente formada por gramíneas e arbustos, com elevado número de espécies exclusivas (Safford, 1999a).

As plantas que se estabelecem sobre os afloramentos crescem diretamente sobre a rocha exposta, ou seja, onde os solos são raros ou ausentes (França et al., 1997) ou em ilhas de vegetação (Meirelles et al., 1999) ficando expostas a variações extremas de temperatura, baixa umidade relativa do ar e alta insolação (Murphy et al., 1970). Desse modo, os afloramentos rochosos são ambientes xéricos e a vegetação apresenta um conjunto de estratégias adaptativas correlacionadas com a tolerância à dessecação (Porembski et al., 2000; Porembski & Barthlott, 2000; Benites et al., 2007). Portanto, nestes ambientes, os fatores limitantes incluem geada, seca, solo raso ou ausente e irradiação alta de luz (Safford, 1999a, b).

No caso dos afloramentos rochosos em campos de altitude além das características acima citadas a vegetação sofre influência da altitude a qual ocasiona gradientes de temperatura, diminuição da pressão atmosférica, aumento da radiação solar, aceleração das massas de ar, maior nebulosidade e aumento das chuvas (Oliveira Filho & Fontes, 2000). Essas variações nas condições ambientais podem ser definidas como filtros ambientais, a partir dos quais, condições abióticas e bióticas impedem a ocorrência de determinadas espécies, permitindo que apenas as que têm atributos adequados persistam sob certos conjuntos de condições e ambientes (Keddy, 1992; Díaz et al., 1998; Wilson, 1999), ocasionando elevadas taxas de endemismo nesses locais (Thomaz, 1996; Kohler et al., 2010; Kraft et al., 2015).

Dentre as espécies endêmicas da Mata Atlântica, especificamente as que crescem sobre afloramentos rochosos, destacam-se as espécies de *Prepusa* pertencentes à família Gentianaceae, Gentianales (Judd et al., 2009). Das seis espécies do gênero, cinco (*Prepusa alata* Porto & Brade, *Prepusa connata* Gardner, *Prepusa dibotrya* Fraga, A.P. Fontana & L.Kollmann, *Prepusa hookeriana* Gardner e *Prepusa viridiflora* Brade) são herbáceas, heliófitas e endêmicas de áreas montanhosas incluindo os campos de altitude

e afloramentos rochosos nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, Brasil (Calió et al., 2008; Flora do Brasil, 2020).

Como estratégia para tolerar à dessecação nesses ambientes os coléteres, comuns na família Gentianaceae, poderiam garantir a formação dos brotos e o estabelecimento das espécies de *Prepusa*. Coléteres são glândulas comumente encontradas na superfície adaxial de órgãos reprodutivos e/ou vegetativos jovens, os quais secretam mucilagem ou uma mistura de mucilagem e substâncias lipofílicas (Fahn, 1979; Thomas, 1991). Essa secreção está relacionada com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento, lubrificando e protegendo contra dessecação e/ou contra o ataque de herbívoros e patógenos (Fahn, 1979; Thomas, 1991).

Os coléteres são amplamente difundidos entre as Angiospermas (Thomas, 1991) sendo também reportadas em Gimnospermas (Celedon et al., 2020) e em Monilófitas (Oliveira et al., 2017). Em Gentianales, estudos estruturais dos coléteres se concentram principalmente nas famílias Apocynaceae (Apezzato-da-Glória and Estelita, 2000; Simões et al., 2006; Martins, 2012; Canaveze and Machado, 2015; Ribeiro et al., 2017) e Rubiaceae (Mayer et al., 2013; Tresmondi et al., 2015, 2017; Miguel et al., 2017; Judkevich et al., 2017; Pinheiro et al., 2019). Para Gentianaceae, coléteres foram descritos anatomicamente para espécies de *Calolisianthus* (Delgado, 2008; Delgado et al., 2011; Zanotti, 2018; Dalvi et al., 2020), *Curtia* e *Hockinia montana* (Dalvi et al., 2014a), *Macrocarpaea obtusifolia* (Dalvi et al., 2014b), *Prepusa montana* (Gonçalves et al., 2021), *Swertia* (Nemomissa, 1997) e para espécies de *Gentiana*, *Gentianella*, *Gentianopsis*, *Comastoma* e *Swertia* (Renobales et al., 2001). Nessas famílias e em outros grupos, as características estruturais de coléteres, bem como, a ocorrência e distribuição dessas glândulas no corpo vegetal tem se mostrado úteis na delimitação de grupos taxonômicos ou até mesmo no reconhecimento de espécies sendo de grande valia em abordagens taxonômicas e filogenéticas.

Correlações sobre a composição da secreção produzida pelos coléteres com o ambiente ou com a sazonalidade são escassos na literatura e mostram que a secreção pode ou não mudar de acordo com o ambiente (Tresmondi et al., 2015, 2017; Santos de Faria et al., 2019; Costa et al., 2020). Segundo Langenheim (1994), fatores abióticos como intensidade luminosa e condições de umidade podem afetar a quantidade total de resina produzida pelas estruturas secretoras externas.

Selecionamos três espécies herbáceas de *Prepusa* (*P. connata*, *P. hookeriana*, *P. viridiflora*), crescendo sobre afloramentos rochosos associados à Mata Atlântica para

investigar a estrutura anatômica e a composição da secreção dos coléteres foliares. Por serem espécies congênicas e estarem distribuídas em ambientes similares, esperamos encontrar coléteres com similaridades na estrutura e na composição do secretado.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Áreas de coleta – Excursões ao campo foram realizadas em áreas de afloramentos rochosos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) e no Parque Estadual da Pedra Azul (PEPAZ) (Fig. 1).

O Parque Estadual Pedra Azul (PEPAZ) está localizado no extremo Sul do estado do Espírito Santo, no município de Domingos Martins, com uma pequena parcela de seu território inserida no município de Vargem Alta. Localiza-se entre as coordenadas geográficas 20°23'32"- 20°29'24"S e 40°00'25"- 40°59'29"W, com altitudes que variam de 1.200 a 1.910 m. O Parque está inserido no Bioma Mata Atlântica e, de acordo com a classificação da vegetação brasileira de Veloso et al. (1991), apresenta como formação principal a Floresta Ombrófila Montana e Alto-Montana, associadas a outros tipos de vegetação, como a Rupestre, Mata Estacional de Altitude, Mata Ciliar e tratos antrópicos (IDAF, 2004). O clima do PEPAZ é caracterizado como é Cwb, ou seja, clima temperado (subtropical) com chuvas bem distribuídas e verões brandos (Köppen, 1931).

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) é o terceiro parque mais antigo do Brasil. É uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, localizada no Bioma Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, sob as coordenadas geográficas 22°29'35"S, 43°04'24"O, com altitudes entre 200 a 2.275 metros. O PARNASO está situado nos municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim com uma área de 20.024 ha. (ICMBio, 2008). Sua vegetação é caracterizada como Floresta Ombrófila Densa e campos de altitude, assim a cobertura vegetal apresenta quatro fisionomias vegetais distintas, de acordo com a altitude: floresta submontana, floresta montana, floresta altomontana e campos de altitude (ICMBio, 2008). De acordo com a classificação de Köppen, o clima regional do PARNASO é do tipo Cwb - tropical de altitude, com uma curta estação seca (Köppen, 1931).

3.2.2 Espécies selecionadas e áreas de ocorrência - As três espécies selecionadas *Prepusa connata*, *Prepusa hookeriana* e *Prepusa viridiflora* (Fig. 1) são herbáceas; heliófitas; rupícolas ou saxícolas, com endemismo local, ocorrendo em campos de

altitude, em áreas de afloramentos rochosos associados à Mata Atlântica (Flora do Brasil, 2020; Calió 2008, 2009).

Prepusa connata possui endemismo restrito às áreas montanhosas da Serra dos Órgãos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil em altitudes que variam de 1.500 a 1.800 metros (Flora do Brasil, 2020; Calió et al., 2008) (Fig. 2). Segundo o Livro Vermelho da Flora do Brasil *P. connata* é uma espécie ameaçada sendo categorizadas como Criticamente Ameaçada (Martinelli et al., 2018). Os indivíduos de *P. connata* foram coletados sobre rochas a 1.990 m de altitude.

Prepusa hookeriana é endêmica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil e ocorre exclusivamente em áreas de campos de altitude. Populações foram registradas apenas para o Parque Estadual da Serra do Desengano, Parque Nacional do Itatiaia e Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Flora do Brasil, 2020; Calió et al., 2008) (Fig. 2). *P. hookeriana* ocorre em altitudes que variam de 850 a 2.700 metros (Calió et al., 2008) sendo categorizada como Em Perigo, segundo o Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli et. al 2018). Os indivíduos de *P. hookeriana* foram coletados a 2.100 m de altitude, em áreas com formações campestres.

Prepusa viridiflora, por sua vez, é endêmica das áreas montanhosas no Espírito Santo, Brasil (Flora do Brasil, 2020; Calió et al., 2008) em altitudes que variam de 1.000 a 1.200 metros (Calió et al., 2008). Apresenta populações reduzidas a três áreas, incluindo o Parque Estadual da Pedra Azul, Parque Estadual do Forno Grande e Caveira D'anta (Flora do Brasil, 2020; Calió et al., 2008; Fraga et al., 2014) sob o Bioma da Mata Atlântica (Fig. 2). Os indivíduos de *P. viridiflora* foram coletados a 1.400 m de altitude, em área íngreme, sobre rocha, com pouco solo disponível, entremeados a bromélias e musgos.

Para cada espécie foram coletadas as regiões basais de folhas jovens, folhas completamente expandidas e senescentes de três indivíduos. Ramos férteis foram coletados, herborizados e as exsiccatas depositadas no herbário Rio Verde (*P. hookeriana*, IFRV1217; *P. connata*, IFRV 1218 e *P. viridiflora*, IFRV 1259).

3.2.3 Estudos anatômicos - Amostras foliares dos três estágios de desenvolvimento foram fixadas em campo em FAA (formalina, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, v/v) (Johansen, 1940), sendo posteriormente estocadas em álcool etílico 70%. As amostras foram desidratadas em série etílica, incluídas em resina do tipo metacrilato (Historesin, Leica) e seccionadas nos planos transversal e longitudinal em micrótomo

rotativo (Modelo 1508R Logen Scientific) a 5 µm de espessura. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina pH 4,7 (O'Brien & McCully, 1981) e as lâminas montadas em Permount.

Os testes histoquímicos foram realizados em amostras fixadas em FAA, incluídas em resina e seccionadas conforme descrito anteriormente. Utilizou-se Reagente de Schiff/Ácido periódico (PAS) para a detecção de polissacarídeos totais (McManus, 1948); vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para pectinas; cloreto férrico (Johansen, 1940) para compostos fenólicos gerais; teste Xylidine Ponceau (O'Brien & McCully, 1981) para proteínas e reagente de Wagner e Dicromato de Potássio (Furr & Mahlberg, 1981) para alcaloides. Apenas para a detecção de lipídeos, utilizando Sudan III (Pearse, 1985), foram realizados cortes a mão livre. 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.

3.2.4 Estudos micromorfológicos - Amostras de bases foliares foram fixadas em glutaraldeído em Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M, por 48 horas e estocadas em etanol 70%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série acetônica, levadas para secagem ao ponto crítico (Bozzola & Russel, 1992) utilizando equipamento CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein. As amostras, então, foram montadas em suportes e submetidas à deposição metálica com ouro (Bozzola & Russel, 1992), utilizando-se equipamento Desk V, Denton Vacuum, Moorestown, USA. A investigação e documentação do material foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS).

3.2.5 Análises estatísticas - Utilizou-se imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura e o software de imagens ImageJ (National Institutes of Health) (Easlon & Bloon, 2014) para avaliar a diferença entre as espécies quanto ao tamanho dos coléteres. Foram amostradas folhas de três indivíduos por espécie e nelas foram realizadas oito medições. Os dados foram analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk para testar se eles apresentavam distribuição normal e depois por meio do teste de Levene para testar a homogeneidade das variâncias. Após a constatação da normalidade e da homogeneidade das variâncias dos dados, foi rodado o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Para avaliar correlação entre tamanho do coléter e altitude e correlação entre presença de lipídios ao longo do desenvolvimento do coléter e altitude, foram rodados testes de

correlação de Spearman, após se comprovar a distribuição não paramétrica dos dados. Para avaliar a existência de *trade-off* entre produção de lipídios no secretado do coléter e tamanho dos coléteres, foi usado também o teste de correlação de Spearman já que os dados não tinham distribuição normal. As análises foram feitas no pacote estatístico PAST, considerando 5% o índice de significância 5.

3.3 Resultados

3.3.1 *Localização dos coléteres e características micromorfológicas*

Coléteres ocorrem na base foliar, na região de inserção da folha com o caule, nas três espécies de *Prepusa* estudadas (Fig. 3). Estão concentrados na porção central da folha (Fig. 3A) e permanecem desde as folhas jovens até as folhas senescentes. Apresentam um pedúnculo curto e uma porção apical com formato alongado/digitiforme (Fig. 3B). Embora raros, coléteres bifurcados e trifurcados também foram observados. Nas folhas jovens, os coléteres apresentam superfície cuticular lisa (Fig. 3C). Os coléteres são numerosos e circundam o meristema apical e os primórdios foliares (Fig. 3D, E) com secreção abundante (Fig. 3D). Rupturas da cutícula foram observadas (Fig. 3F). Os coléteres presentes nas folhas completamente expandidas geralmente apresentam uma contorção na porção apical (Fig. 3G) com um nítido enrugamento da superfície (Fig. 3H). Essas características são acentuadas nos coléteres das folhas senescentes, os quais apresentam-se murchos (Fig. 3 I, J). Não foi observada abscisão dos coléteres.

3.3.2 *Desenvolvimento e caracterização anatômica dos coléteres*

O desenvolvimento dos coléteres é assíncrono (Fig. 4A), sendo observado nas folhas jovens, recobrimo os meristemas e primórdios foliares (Fig. 4A, B), coléteres em formação, coléteres ativos e coléteres em fase final de secreção/em senescência (Fig. 4A). Os coléteres ativos são avascularizados e apresentam um pedúnculo curto e uma porção secretora multicelular com células homogêneas (Fig. 4C). As células do pedúnculo apresentam conteúdo hialino e as células da porção secretora conteúdo denso (Fig. 4C). Espaços intercelulares formados pelo deslocamento das células centrais, via rompimento da lamela média, são comuns (Fig. 4D), assim como espaços intercelulares com acúmulo de secreção (Fig. 4E-F). As células que revestem os coléteres se mantêm unidas pela cutícula (Fig. 4D-F), no entanto em alguns locais é possível observar o afastamento destas

(Fig. 4G) e consequente diminuição da secreção acumulada tanto nos espaços intercelulares como no citoplasma das células (Fig. 4G).

Na maioria dos coléteres das folhas expandidas pode-se observar uma diminuição na quantidade de secreção das células secretoras e retração do citoplasma (Fig. 4H). No entanto, ainda há acúmulo de secreção nos espaços intercelulares e no meio extracelular (Fig. 4I). Por fim, os coléteres apresentam colapso das células centrais e periféricas (Fig. 4J), coincidindo com a senescência das folhas.

3.3.3 *Histoquímica*

Para todas as espécies foi observada a composição da secreção acumulada nos espaços intercelulares e/ou a secreção extravasada, para os diferentes estágios de desenvolvimento foliar. Ressaltando que há predomínio de coléteres ativos nas folhas jovens; tanto coléteres em fase secretora como senescentes nas folhas adultas e predomínio de coléteres senescentes nas folhas senescentes. Os resultados dos testes histoquímicos encontram-se compilados na Figura 5.

Nas três espécies, a natureza polissacarídica da secreção foi confirmada pelo teste com PAS (Fig. 6A-C) e vermelho de rutênio (Fig. 6D-F). Acúmulo desses compostos foram observados na secreção extravasada (Fig. 6A e D), no citoplasma das células periféricas e centrais e, especialmente, nos espaços intercelulares (Fig. 6 B, C, E, F). O maior acúmulo de secreção foi evidenciado nos coléteres presentes nas folhas jovens (Fig. 5), que recobrem os primórdios foliares e meristemas. No entanto, polissacarídeos também foram encontrados nos espaços intercelulares, na secreção extravasada e em menor quantidade nas células secretoras na maioria dos coléteres presentes nas folhas adultas (Fig. 5). Nos coléteres em senescência (Fig. 5) foram revelados resquícios de secreção que permanecem na secreção extravasada.

Proteínas foram encontradas nas células dos coléteres das três espécies, em ambos os estágios de desenvolvimento (Fig. 6G-I), com maior acúmulo nos coléteres presentes nas folhas jovens (Fig. 6G). Proteínas também foram observadas na secreção extravasada (Fig. 6H) e na secreção acumulada nos espaços intercelulares (Fig. 6I).

Gotas de lipídeos foram detectadas por todo o limbo foliar, na região onde os coléteres estão inseridos, de *P. connata* (Fig. 6J) e *P. hookeriana*. Lipídios também foram encontrados nos coléteres, das duas espécies, em todos os estágios de desenvolvimento foliar como pode ser observado em *P. hookeriana* (Fig. 6 K-L). Para *P. viridiflora* os resultados foram negativos (Fig. 5).

A presença de alcaloides também foi evidenciada para os coléteres presentes nas folhas expandidas e senescentes de *P. hookeriana* e apenas nas folhas senescentes de *P. viridiflora* (Fig. 5). Por outro lado, compostos fenólicos foram observados nos estágios de senescência para as três espécies (Fig. 5).

3.3.4 Análises estatísticas

Em relação ao tamanho dos coléteres há uma clara plasticidade fenotípica, pois as espécies congênicas coletadas no mesmo local (*P. connata* e *P. hookeriana*) são mais parecidas entre si do que com *P. viridiflora*, espécie coletada em hábitat diferente (Tabela 1). Ademais, *P. connata* e *P. hookeriana* formaram um único grupo distinto de *P. viridiflora*, como observada pela análise de cluster (Fig. 7). Cabe ressaltar que as duas espécies do PARNASO foram coletadas em maiores altitudes quando comparada com a espécie coletada no PEPAZ.

Foi constatada uma variação na composição da secreção e no tamanho dos coléteres ao longo do gradiente altitudinal (Tabela 1, Fig. 8). Em *P. viridiflora* os coléteres são maiores que em *P. connata* ($F = 4,744$; $p < 0,05$). Já *P. hookeriana* apresenta coléteres de tamanhos intermediários, não diferenciando-se estatisticamente dos coléteres encontrados em *P. connata* e *P. viridiflora*.

Há uma correlação positiva e significativa entre altitude e presença de lipídios ao longo de todo o desenvolvimento do coléter ($\rho = 0,866$; $p < 0,05$) e uma correlação negativa e significativa, entre altitude e tamanho dos coléteres ($\rho = -0,428$; $p < 0,05$). Há uma correlação negativa e significativa entre presença de lipídios ao longo de todo o desenvolvimento do coléter e tamanho dos coléteres ($\rho = -0,485$; $p < 0,05$), isto significa que coléteres maiores não possuem lipídio na secreção.

3.4 Discussão

Os coléteres das três espécies de *Prepusa* estudadas encontram-se na base das folhas, na região de inserção com o caule. Coléteres foliares são comumente descritos em trabalhos taxonômicos para espécies das tribos Helieae (Delgado et al., 2011; Dalvi et al., 2014b), Saccifolieae (Dalvi et al., 2014a) e Gentianeae (Renobales et al., 2001). Nas folhas, a posição dos coléteres parece ser uma constante dentro de Gentianeae diferentemente do que ocorre em famílias correlatas como Rubiaceae (Klein et al., 2004; Pinheiro et al., 2019) e Apocynaceae (Thomas, 1991; Capelli et al., 2017). Nesses dois

grupos coléteres foliares ocorrem tanto em regiões intrapeciolares (Sennblad et al., 1998; Rio et al., 2002; Martins et al., 2010) como em regiões interpeciolares (Sennblad et al., 1998; Capelli et al., 2017; Martins, 2012; Canaveze & Machado, 2015) sendo a posição dos coléteres um parâmetro taxonômico.

Os coléteres encontrados nas três espécies de *Prepusa* fogem aos padrões descritos por Lersten (1974) e Thomas (1991) pois apresentam uma porção secretora composta por células homogêneas. Coléteres homogêneos têm sido relatados em muitas famílias não relacionadas filogeneticamente, como para Caryocaraceae (Paiva & Machado, 2006), Leguminosae (Silva et al., 2017) e Myrtaceae (Costa et al., 2020), dentre outros táxons (Pimentel et al., 2014; Macêdo et al., 2016; Silva et al., 2017) incluindo Gentianaceae (Renobales et al., 2001; Delgado 2008; Delgado et al., 2011; Dalvi et al., 2014a, 2014b, 2020; Gonçalves et al., 2021). Por outro lado, esses coléteres diferem do tipo padrão registrado para *Macrocarpaea obtusifolia* (Dalvi et al., 2014b) espécie incluída na mesma tribo de *Prepusa*. Estudos incluindo mais espécies dentro dessa tribo poderiam subsidiar estudos filogenéticos e taxonômicos em Gentianaceae conforme proposto por Gonçalves et al. (2021).

A ausência de vascularização, evidenciado aqui, também foi mencionada para todas as outras espécies de Gentianaceae (Renobales et al., 2001; Delgado et al., 2011; Dalvi et al., 2014a, 2014b, 2020) sendo uma constante para a família. Alguns autores correlacionam a ausência de vascularização com o tamanho dos coléteres (Carlquist, 1969) porém em *Prepusa* e em Gentianaceae essas correlações não procedem.

Os coléteres de *Prepusa* apresentaram desenvolvimento assíncrono, apresentando vários estágios de desenvolvimento dos coléteres no mesmo estágio foliar, assim como relatado para *Odontadenia lutea* (Apocynaceae) (Martins, 2012), *Macrocarpaea obtusifolia* (Gentianaceae) (Dalvi et al., 2014b), *Prepusa montana* (Gentianaceae) (Gonçalves et al., 2021) e espécies de *Chamaecrista* (Leguminosae) (Coutinho et al., 2015) e de *Crotoneae* (Euphorbiaceae) (Vitarelli et al., 2015). No entanto, sua atividade secretora começa nos estágios iniciais de desenvolvimento foliar configurando um caráter adaptativo, pois a mucilagem liberada sobre os primórdios foliares os protegem da dessecação (Tresmondi et al., 2015) que é intensificada em locais de alta altitude, baixas temperaturas, alta radiação solar e, algumas vezes com geada (Scarano, 2002). Além disso, as folhas em início de expansão são mais tenras e com maior conteúdo de água do que as folhas completamente maduras (Azeredo et al., 2017). Logo, elas devem estar mais propensas aos danos causados pelas baixas temperaturas e pelas geadas do que as folhas

maduras, podendo sofrer queimaduras e até mesmo lesões por congelamento (Crawford, 1989)

A secreção dos coléteres de *Prepusa* é acumulada no espaço periplasmático, com separação gradual das suas células e subsequente liberação via rompimento da cutícula. O rompimento da lamela média e o acúmulo de secreção nos espaços intercelulares foi observado em *Prepusa montana* (Gonçalves et al., 2021). A ruptura da cutícula é uma característica comum no mecanismo de liberação da secreção (Fahn, 1990), inclusive para Gentianaceae. Para Gentianaceae, a ruptura da cutícula como via de eliminação de secretado já foi reportado para coléteres de *Macrocarpara obtusifolia* (Dalvi et al., 2014b), *Curtia* e *Hockinia* (Dalvi et al., 2014a) e *Prepusa montana* (Gonçalves et al., 2021). Em contrapartida, mecanismos de liberação da secreção sem ruptura da cutícula, como por poros, já foram mostrados para coléteres de diferentes espécies e grupos taxonômicos, como para espécies de *Simira* (Klein et al., 2004), *Bathysa nicholsonii* (Castro Miguel et al., 2006), *Temnadenia violaceae* (Martins et al., 2010) e *Tabernaemontana catharinensis* (Canaveze & Machado, 2015).

Em relação ao comprimento dos coléteres de *Prepusa*, houve variação entre as espécies ocorrentes no PARNASO e entre a espécie ocorrente do PEPAZ, sendo a de maior comprimento ocorrente no PEPAZ. Em Rhizophoraceae, o tamanho dos coléteres foi maior em espécies de manguezais em comparação com habitats florestais (Sheue et al., 2013). Os coléteres de *Copaifera langsdorffii* variaram de 400 a 800 µm de comprimento, sem relação observada entre o tamanho dos coléteres e o volume da secreção (Paiva, 2009). Em contraste, em Rubiaceae não foram notadas diferenças no comprimento dos coléteres ao se comparar gêneros da floresta e do Cerrado (Tresmondi et al., 2015).

Encontramos diferenças na composição da secreção nas três espécies de *Prepusa* estudadas. A secreção polissacarídica abundante nas folhas jovens das três espécies de *Prepusa* corroboram os dados da literatura sobre os principais compostos produzidos pelos coléteres os quais atuam evitando a desidratação e protegendo as gemas em início do desenvolvimento (Fahn, 1979; Thomas, 1991). Como as espécies ocorrem em altitudes elevadas, especialmente *P. hookeriana* e *P. connata*, onde as condições ambientais tornam o ambiente xérico, a presença de mucilagem seria essencial para evitar a desidratação desses órgãos em desenvolvimento. Fatores como a altitude e aumento da exposição ao vento ou diminuição da temperatura, limita o crescimento da planta e requer adaptações ecológicas específicas para a persistência da planta em ambientes

montanhosos (Kraft et al., 2015). É sabido também que temperaturas entre 6 e 10 °C podem causar lesões nas plantas devido o frio e temperaturas abaixo de zero podem resultar em lesões nas folhas por congelamento (Crawford, 1989).

Por outro lado, os lipídios foram encontrados apenas nas duas espécies do PARNASO (*P. hookeriana* e *P. connata*) as quais foram coletadas em maiores altitudes. A correlação positiva entre altitude e presença de lipídios e a correlação negativa entre presença de lipídios e tamanho dos coléteres poderia representar um *trade-off* entre produção de lipídios e incremento no crescimento do coléter. Isso significa que *P. viridiflora* investe mais em crescimento de coléter enquanto as outras duas espécies investem mais em produção de lipídios. Nas duas situações, a proteção das gemas e meristemas continua sendo eficiente, pois coléteres menores, apesar de produzirem menos mucilagem, apresentam lipídios em suas secreções enquanto coléteres maiores produzem mais mucilagem, porém não possuem lipídios no secretado. Os lipídeos poderiam conferir ainda uma certa vantagem competitiva para as espécies em maiores altitudes. No entanto, estudos sobre variações na composição da secreção dessa espécie ao longo do gradiente altitudinal poderiam corroborar ou não essa hipótese.

As secreções lipofílicas, contendo como principal composto lipídeos, podem conferir proteção aos ápices vegetativos contra a dessecação causados por períodos de seca acentuados e contra as altas taxas de radiação solar (Barreiro & Machado, 2007; Tresmondi et al., 2015). Os processos de estresse hídrico e dessecação também podem ser desencadeados nos primórdios foliares pela elevada exposição aos ventos e às variações mais extremas de temperatura que são observados nestes ambientes montanos de afloramentos rochosos. Os derivados de lipídios, liberados pelos coléteres, também podem atuar na inibição de patógenos de plantas, tais como fungos (Barnes et al., 1997; Ribeiro et al., 2017). Tresmondi et al. (2017) comparando a secreção de coléteres em ambientes contrastantes (cerrado e floresta) constataram predomínio de secreção hidrofílica nas espécies de floresta e secreção lipofílica ou mista nas espécies de cerrado. Em estudo com espécies de Rubiaceae, considerando a fenologia, Tresmondi et al. (2015) verificaram que as espécies de cerrado, sob maior radiação, apresentaram predomínio de secreção lipofílica e tiveram os brotos menos predados em detrimento das espécies de floresta, sob menor radiação, as quais não apresentaram lipídeos na secreção e forma mais predadas. Por outro lado, em espécies de *Casearia* coletadas no cerrado e em floresta os autores não observaram diferenças na composição da secreção dos coléteres (Santos de Faria et al., 2019). Uma maior diversidade de compostos químicos, incluindo lipídeos,

foram encontrados nos coléteres de *Myrcia splendens* coletados na estação seca em detrimento da estação chuvosa (Costa et al., 2020). Sabe-se que uma das funções dos lipídeos na secreção dos coléter é lubrificar e proteger os meristemas, evitando a perda de água (Thomas & Dave, 1989; Mayer et al., 2013).

Proteínas foram encontradas na secreção das três espécies de *Prepusa* estudadas. Proteínas são comumente encontradas em coléteres (Castro Miguel et al., 2006; Gonzalez & Tarragó, 2009; Dalvi et al., 2014b; Almeida & Paiva, 2019; Pinheiro, 2019) e estão envolvidas com as estratégias de defesa das plantas, protegendo os órgãos das plantas de patógenos como fungos (Castro Miguel et al., 2006).

Compostos fenólicos foram encontrados em todos os coléteres avaliados durante a sua senescência. Os compostos fenólicos estão relacionados com o processo de senescência dos coléteres, conforme reportado na literatura (Castro & Demarco, 2008; Paiva, 2009; Souza, 2014) e podem atuar ainda como agentes antimicrobianos (Scalbert, 1991; Nohynek et al., 2006).

Alcaloides estão presentes nos coléteres de *P. hookeriana* e de *P. viridiflora*. Muitos alcaloides são descritos como tóxicos, agindo contra herbívoros e parasitas, além de apresentarem efeito alelopático (Robinson, 1974). Os alcaloides assim como laticíferos e cristais, relatados para coléteres de outros grupos como em Apocynaceae (Yoder & Mahlberg, 1976; Leite, 2012), poderiam representar apenas um contínuo das características estruturais e químicas.

Percebe-se que *P. hookeriana* apresenta uma maior gama de substâncias químicas no secretado, quando comparada com *P. connata* e *P. viridiflora*. Tal fato pode conferir uma maior vantagem adaptativa a *P. hookeriana* uma vez que suas folhas novas estão protegidas da ação danosa de uma maior variedade de tipos de organismos. Assim, há maior probabilidade das folhas de *P. hookeriana* completarem seu processo de expansão foliar em condições saudáveis, alcançando a maturidade foliar sem maiores danos no limbo foliar. Tal consequência é essencial para a planta alcançar maior *fitness*, uma vez que as folhas completamente expandidas apresentam taxa fotossintética máxima enquanto as folhas em início de expansão têm taxa fotossintética baixa (Nii et al., 1995; Paula et al., 2005).

Cabe ressaltar que nos afloramentos rochosos em campos de altitude predominam solos rasos e pouco férteis (Vasconcelos, 2014) ou ausente (Scarano, 2002), podendo as plantas estarem sujeitas a menor disponibilidade de nutrientes minerais. Por isso, evitar ataques de patógenos, principalmente de herbívoros folívoros, possibilita que o sequestro

de nutrientes minerais móveis das folhas senescentes para as folhas em expansão seja mais eficiente, algo que a planta não conseguiria fazer a contento caso ela perdesse tecido foliar para herbívoros. Ademais, percebe-se que em *P. hookeriana* a função do coléter muda ao longo da ontogenia foliar, pois seu secretado evita dessecação em folhas jovens que são mais tenras e possuem mais água; evita ataque de patógenos e herbívoros em folhas maduras, favorecendo a proteção do órgão na sua fase mais fotossinteticamente ativa; e evita ataques de patógenos e principalmente de herbívoros, folívoros, favorecendo o sequestro de nutrientes minerais móveis nas folhas senescentes. Por fim, a maior capacidade de defesa contra dessecação e defesa contra ataques de patógenos e herbívoros fornecida pelo secretado dos coléteres de *P. hookeriana* pode ser uma possível explicação a sua maior distribuição geográfica, já que tal espécie é encontrada ocupando um maior gradiente altitudinal, variando de 850 a 2.700 metros (Calió et al., 2008).

Em suma, reportamos a similaridade na posição e na estrutura dos coléteres das três espécies de *Prepusa* os quais se assemelham as coléteres reportados para demais espécies da família. No entanto, estes divergem, por apresentarem porção secretora apenas com células homogêneas, da maioria dos coléteres descritos para outros grupos inclusive de grupos correlatos como Rubiaceae e Apocynaceae o que poderiam indicar uma possível linha filogenética dentro da ordem Gentianales. Por outro lado, os dados contrapõem nossa hipótese pois variações na composição da secreção foram observadas. Os compostos majoritários da secreção são os comumente relatados para coléteres assim como os compostos químicos envolvidos com a senescência da estrutura. No entanto, os lipídeos poderiam conferir uma proteção as altitudes elevadas onde *P. hookeriana* e *P. connata* foram coletadas. Esses compostos poderiam ainda conferir uma certa vantagem competitiva para *P. hookeriana* o que poderia explicar a maior distribuição dessa espécie. Nossos estudos evidenciam alterações na composição da secreção de acordo com o gradiente altitudinal alcançado pelas espécies de *Prepusa*.

Agradecimentos

À CAPES pela bolsa de Mestrado concedida. Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, pela assistência técnica. Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde por toda a assistência no desenvolvimento do trabalho. As fotos cedidas por: Evandro Pianissola Machado, Herval Vieira Pinto Júnior e Jailma Rodrigues Gonçalves.

3.5 Referências

Almeida, L.A., Paiva, E.A.S., 2019. Colleters in *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): Anatomy and biology of the secretory process. *Flora* 258: 151-439.

Appezato-da-Glória, B., Estelita, M.E.M., 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira Botânica*, 23:113-120.

Assis, A.M. de, Magnago, L.F.S., Fernandes, H.Q.B., 2007. Floresta estacional semidecidual de terras baixas, submontana e montana, in: Simonelli, M., Fraga, C.N. de (Eds.), *Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo*. Ipema., Vitória, pp. 51-54.

Barreiro, D.P., Machado, S.R., 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 30, n.3, p.387-399.

Barnes, B.J., Nornan, H.A., Brooker, N.L., 1997. Inhibition of three soybean fungal plant pathogens by lipid derivatives and natural compounds. In 'Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Plant Lipids'. (Eds JP Williams, MU Khan, NW Lem) pp. 236–238.

Benites, V. M.; Schaefer, C. E. G. R.; Simas, F. N. B.; Santos, H. G., 2007. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 569-577.

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

Calió, M.F., Pirani, J.R., Struwe L., 2008. Morphology-based phylogeny and revision of *Prepusa* and *Senaea* (Gentianaceae: Helieae) - rare endemics from eastern Brazil. *Kew Bulletin* 63 (2):169-191.

Calió, M.F.A., 2009. Sistemática de Helieae Gilg (Gentianaceae). Ph.D. Dissertation, University of São Paulo, Brazil.

Carlquist, S., 1969 Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. *Phytomorphology* 19:332–362.

Castro Miguel E., 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.

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

Canaveze, Y., Machado, S.R., 2015. Leaf colleters in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis, and cellular secretion. *Botany* 93:287–296.

Capelli, N.V., Rodrigues, B.A., Demarco, D., 2017. Stipules in Apocynaceae: an ontogenetic perspective. *AoB plants* 9: plw083.

Celedon, J.M., Whitehill, J.G.A., Madilao, L.L., Bohlmann, J., 2020 Gymnosperm glandular trichomes: expanded dimensions of the conifer terpenoid defense system. *Sci Rep* 10, 12464.

Costa, I. S. C., Lucena, E.M.P., Bonilla, O.H., Guesdon, I.R., Coutinho, I.A.C., 2020. Seasonal variation in colleter exudates in *Myrcia splendens* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 68: 403-412.

Coutinho, I.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.

Crawford, R.M.M., 1989. *Studies in plant survival*. Oxford: Blackwell.

Dalvi, V.C., Meira, R.M.S.A., Francino, D.M.T., Silva, L.C., Azevedo, A.A. 2014a. Anatomical characteristics as taxonomic tools for the species of *Curtia* and *Hockinia* (Saccifolieae-Gentianaceae Juss.). *Pl Sys Evol* 300(1):99–112.

Dalvi, V.C, Cardinelli, L.S., Meira, R.M.S.A., Azevedo, A.A., 2014b. Foliar colleters in *Macrocarpaea obtusifolia* (Gentianaceae): anatomy, ontogeny, and secretion. *Botany* 92: 59–67.

Dalvi, V.C., Faria, G.S., Azevedo, A, A., 2020. Calycinal secretory structures in *Calolisianthus pedunculatus* (Cham. & Schltld) Gilg (Gentianaceae): anatomy, histochemistry, and functional aspects. *Protoplasma*. 257(1):275-284.

Delgado, M., Azevedo, 2008. Morphoanatomical characterization of Gentianaceae s species from cerrado and campo rupestre in Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Botânica estrutural; Ecologia e Sistemática) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Delgado, M., Azevedo, A.A, Silva, L.C., Valente, G.E., Kasuya, M.C.M., 2011. Comparative anatomy of *Calolisianthus species* (Gentianaceae – Helieae) from Brazil: taxonomic aspects. *Edinb. J. Bot.* 68(1): 139–155.

Díaz, S., Cabido, M & Casanoves F., 1998. Plant funcional traits and environmental filters at the regional scale. *Journal of Vegetation Science* 9: 113-122.

Easlon, H. M., Bloom, A.J., 2014. Easy Leaf Area: Automated Digital Image Analysis for Rapid and Accurate Measurement of Leaf Area. *Applications in Plant Sciences* 2: 1400-033.

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

Fahn, A., 1990. *Plant anatomy*. 4th ed. Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd.

Fernandes, H.Q.B., Assis, A.M. de, Magnago, L.F.S., 2007. Refúgio ecológico, in: Simonelli, M., Fraga, C.N. de (Eds.), Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo. Ipema., Vitória, pp. 55-58.

Flora do Brasil – *Prepusa* in Flora do Brasil, 2020. Maria Fernanda Calió. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7775>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

Fraga, C.N., André, A.P., Kollmann, L.J.C., 2014. A new species of *Prepusa* (Helieae, Gentianaceae) from the Brazilian Atlantic Forest, with an emended key for the genus. *Phytotaxa*. *Phytotaxa* 163 (5): 287–294.

França, F., Melo, E.; Santos, C. C., 1997. Flora de inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil: caracterização da vegetação e lista de espécies de dois inselbergs. *Sitientibus*, Série Ciências Biológicas 17(1): 163-184.

Furr, M., Mahlberg, P.G., 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.

Gonçalves J.R., Rocha, D.I., dos Santos, L.S., Dalvi, V.C., 2021. The short but useful life of *Prepusa montana* Mart. (Gentianaceae Juss.) leaf colleters-anatomical, micromorphological, and ultrastructural aspects. *Protoplasma*.

Gonzalez, A.M., Tarragó, J.R., 2009. Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America. *Bot. J. Linn. Soc.* 160: 197–210.

Hamilton, L.S., Juvik, J.O., Scatena, F.N., 1995. The Puerto Rico tropical cloud forest symposium: introduction and workshop synthesis. In *Tropical montane cloud forests* (L.S. Hamilton, J.O. Juvik & F.N. Scatena, eds). Springer Verlag, New York, p. 1-23.

Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo - IDAF. Plano de manejo do Parque Estadual da Pedra Azul. Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento – PNUD, Projeto Corredor Central da Mata Atlântica 595p. 2004.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2008. Parque Nacional Serra dos Órgãos. <https://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/>. (Acessado em 12 de junho de 2021).

Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo - IDAF. Plano de manejo do Parque Estadual da Pedra Azul. Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento – PNUD, Projeto Corredor Central da Mata Atlântica 595p. 2004.

Johansen, D.A., 1940. Plant Microtechnique. Mc Grawhill, New York.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellog, E.A., Stevens, P.F., 2009. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3^a ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Judkevich, M.D., Salas, R.M., Gonzalez, A.M., 2017. Int Colleters in American Spermaceae genera (Rubiaceae): Morphoanatomical and evolutionary aspects. J. Plant Sci. 178(5):378–397.

Keddy, P. A. 1992. Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. Journal of Vegetation Science 3: 157-164.

Klein, D.S., 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.

Kraft, N.J.B., Adler, P.B., Godoy, O., James, E.C., Fuller, S. and Levine, J.M., 2015, Community assembly, coexistence and the environmental filtering metaphor. Funct Ecol, 29: 592-599.

Köppen, W., 1931. Grundrissder Klimakunde: Outline of climate science. Berlin: Walter de Gruyter, 388p.

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). Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília, Brasília, DF, 106f.

Lersten, N.R., 1974. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 69:125–136.

Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20:1223-1280.

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

Magnago, L.F.S., Assis, A.M. de, Fernandes, H.Q.B., 2007. Floresta ombrófila densa submontana, montana e alto-montana, in: Simonelli, M., Fraga, C.N. de (Eds.), *Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo*. Ipema., Vitória, pp. 45-50.

Martins, F.M.; Kinoshita, L.S., Castro, M.M., 2010. Coléteres foliares e calicinais de *Temnadenia violácea* (Apocynaceae, Apocynoideae): estrutura e distribuição. *Revista Brasileira de Botânica* 33(3): 489-500.

Martins, F.M., 2012. Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Braz. J. Bot.* 35(1): 59–69.

McManus, J.F.A., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.

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

Meirelles, S. T.; Pivello, V. R.; Joly, C. A., 1999. The Vegetation of Granite Rock Outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the Need for its Protection. *Environmental Conservation*, v. 26, n. 1, p. 10-20.

Metzger, J. P., 2009. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Conservation* 142: 1138–1140.

Miguel, E.D.C., Pireda, S., Barros, C.F., Zottich, U., Gomes, V.M., Miguens, F.C., Cunha, M.D., 2017. Outer cell wall structure and the secretion mechanism of colleter cells of *Bathysa nicholsonii* K. Schum.(Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 31: 411-219.

Mittermeier, R. A., P. R. Gil, M. Hoffmann, J. Pilgrim, J. Brooks, C. G. Mittermeier, J. Lamouroux & G. A. B. Fonseca., 2004. Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Cemex, Washington, DC.

Mocochinski, A.Y. & Scheer, M.B. 2008. Campos de altitude na serra do mar paranaense: aspectos florísticos. *Revista Floresta* 38(4): 625-640.

Morellato, L.P.C., Haddad, C.F.B., 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic forest. *Biotropica* 32(4b): 786-792.

Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca & J. Kent., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Murdy, W.H. *et al.*, 1970 Competitive Replacement of *Talinum mengesii* by *T. teretifolium* in Granite Outcrop Communities of Georgia. *Bot. Gaz., Chicago*, v.131, n.3., p.186-192.

Nemomissa, S., 1997. Floral character states of the Northeast and Tropical East African *Swertia species* (Gentianaceae). *Nordic Journal of Botany* 17(2): 145-156.

Nii, N., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Nishimura, M., 1995. Changes of anatomical features, photosynthesis and ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase content of mango leaves. *Annals of Botany*, v. 76, n. 6, p. 649-656.

Nohynek, L.J., Alakomi, H.N., Kahkonen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.M., Puupponen-Pimia, R.H., 2006. Berry Phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, v. 54, n. 1, p. 18-32.

O'Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. *The study of structure principles and selected methods*. Melbourne, Termarcaphi Pty. LTD.

Oliveira Filho A.T. & Fontes, M.A.L., 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.

Oliveira, L. F. A., 2017. *Flora Vascular dos Campos Rupestres: Composição Florística, Esforço Amostral e Riqueza de Espécies*. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 187f.

Paiva, É.A.S, Machado, S.R., 2006. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). Ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* 66: 301–308.

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

Paula, S.M., Naves, E.R., Franco, I.M., Padua, K.J., Silva, K.R., Fernandes, W.P, Oliveira, D.C., Lemos-Filho, J. R, Moreira, A.S.F.R., 2015. Desempenho fotossintético de folhas jovens e maduras de *Vochysia cinnamomea* (Vochysiaceae) em áreas de cerrado rupestre intactas e pós-queimada, *Bioscience Journal*, v. 31, n. 2, p. 591-600.

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. S. Afr. J. Bot. 121: 26–33.

Pimentel, R.R., Barreira, N.P., Spala, D.P., Cardim, N.B., Souza, M.C., Sá-Haiad, B., Machado, S.R., Rocha, J.F., Santiago-Fernandes, L.D.R., 2014. Development and evolution of the gynoecium in Myrteae (Myrtaceae). Australian Journal of Botany 62: 335–346.

Porembski, S. & Barthlott, W. 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of desiccation-tolerant vascular plants. Plant Ecology 151: 19 - 28.

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.

Rizzini, C.T., 1979. Tratado de Fitogeografia do Brasil. Vol. 2. São Paulo: Edusp.

Renobales, G., Diego, E., Urcelay, B., López-Quintana, A., 2001. Secretary hairs in *Gentiana* and allied genera (Gentianaceae, subtribe Gentianinae) from the Iberian Peninsula. Bot. J. Linn. Soc. 136(1): 119–129.

Robinson, T. 1974. Metabolism and function of alkaloids in plants. Science, 184: 430-435.

Safford, H.D., 1999a. Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. Journal of Biogeography 26: 693- 712.

Safford, H.D., 1999b. Brazilian Paramos II. Macro- and mesoclimate of the campos de altitude and affinities with high mountain climates of the tropical Andes and Costa Rica. *Journal of Biogeography* 26: 713-737.

Santos de Faria, D.N., Fernandes, V.F., Marquete, R., Meira, R.M.S.A., 2019. Morphology, anatomy, and exudates of stipular colleters in *Casearia* Jacq. (Salicaceae) across two tropical plant communities. *International Journal of Plant Sciences* 180: 141 – 152.

Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, Chichester, v.30, n.12, p. 3875-3883.

Scarano, F.R., 2009. Plant communities at the periphery of the Atlantic rain forest: rare-species bias and its risks for conservation. *Biological Conservation* 142:1201–1208.

Scarano, F.R., 2002. Structure, Function and Floristic Relationships of Plant Communities in Stressful Habitats Marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany* 90: 517-524.

Sennblad, B., Endress, M.E., Bremer, B., 1998. Morphology and molecular data in phylogenetic fraternity: the tribe Wrightieae (Apocynaceae) revisited. *American Journal of Botany* 85(8): 1143-1158.

Silva, M.D.S., Coutinho, Í.A.C., Araújo, M.N., Meira, R.M.S., 2017. Colleters in *Chamaecrista* (L.) Moench sect. *Chamaecrista* e seita. *Caliciopsis* (Leguminosae-Caesalpinioideae): implicações de anatomia e taxonomia. *Acta Botanica Brasilica*.

Simões, A.O., Castro, M., Kinoshita, L.S., 2006. Calycine colleters of seven species of Apocynaceae (Apocynoideae) from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:387-398.

Sheue, C.R., Chesson, P., Chen, Y.J., Wu, S.Y., Wu, Y.H., Yong, J.W.H., Guu, T.Y., Lim, C.L., Randrianasolo, R.M.A., Razanajatovo, M.H., Yang, Y.P., 2013. Comparative systematic study of colleters and stipules of Rhizophoraceae with implications for

adaptation to challenging environments. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 449–464.

Souza, L.M., 2014. Estruturas secretoras em espécies de leguminosas da subtribo Cassiinae (*Fabaceae*, *Caesalpinioideae*, *Cassieae*). PhD diss. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

Thomas, V., Dave, Y, Menon, A,R,S., 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* Wall. (*Apocynaceae*). *Nordic Journal of Botany* 8: 493-496.

Tresmondi, F., Nogueira, A., Guimarães, E., Machado, S.R., 2015. Morphology, secretion composition, and ecological aspects of stipular colleters in *Rubiaceae* species from tropical forest and savanna. *Sci Nat* 102(11–12):1–15.

Tresmondi, F., Canaveze, Y., Guimarães, E., Machado, S, R., 2017. Colleters in *Rubiaceae* from forest and savanna: the link between secretion and environment. *Sci Nat* 104(3–4):1–12.

Vasconcelos, V.V., 2014. Campos de altitude, campos rupestres e aplicação da lei da mata atlântica: estudo prospectivo para o estado de Minas Gerais. *Boletim de Geografia*, v. 32, n. 2, p. 110-133.

Veloso, H. P.; Rangel-Filho A. L. R.; Lima, J. C. A., 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, 124 p.

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

Wilson, J.B., 1999. Assembly rules in plant communities. In: Weiher, E. & Keddy, P. A. (eds). Ecological assembly rules: perspectives, advances, retreats, p. 130-164. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Yoder, L.R. and Mahlberg, P.G., 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (apocynaceae). American Journal of Botany, 63: 1167-1173.

Zanotti, A., 2018. Estruturas secretoras em *Calolisianthus speciosus* (Cham. & Schltdl.) Gilg. (Gentianaceae): ontogenia e biologia da secreção. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 62f.

Lista de figuras

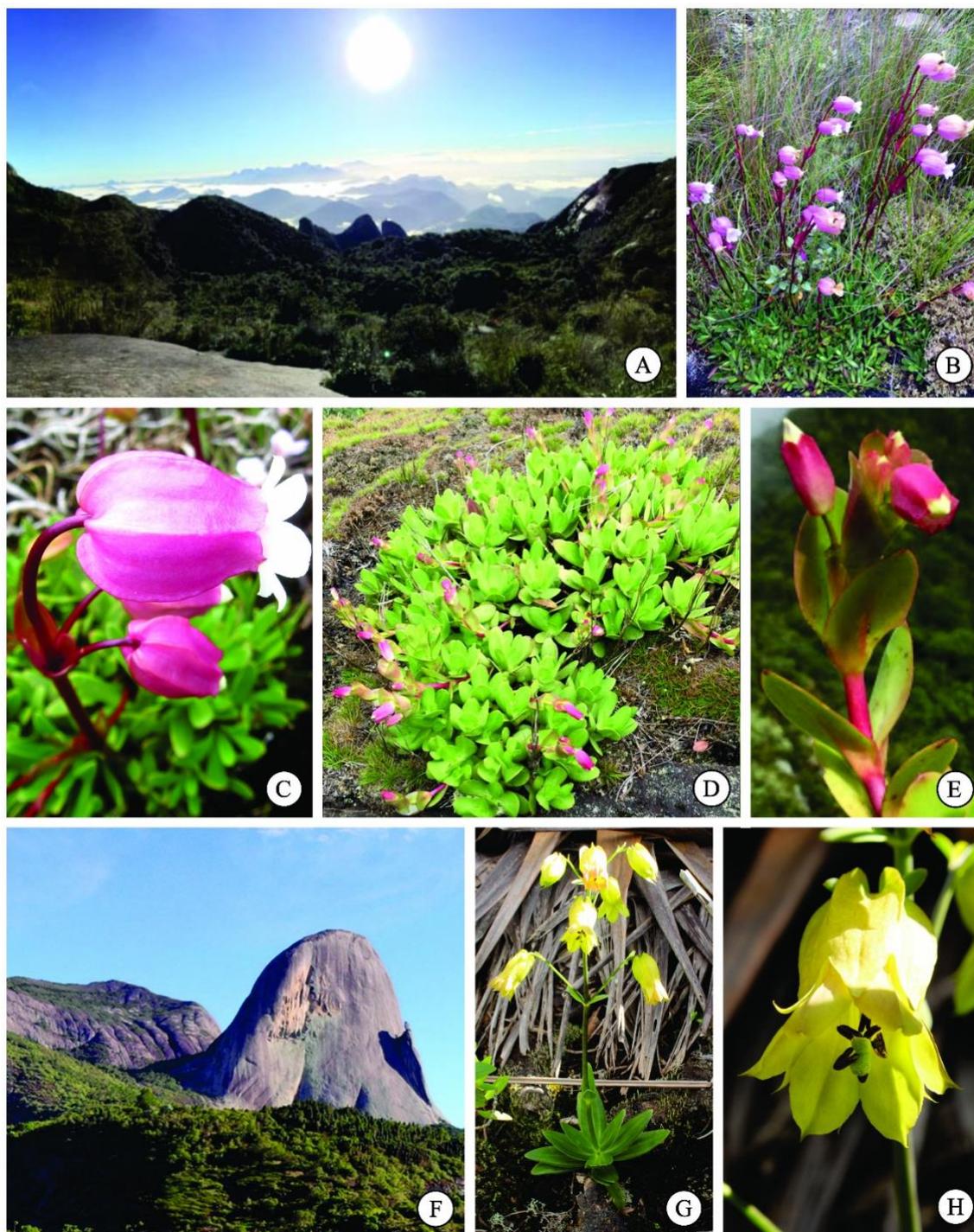


Fig. 1: Habitat e aspectos morfológicos das três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae). Visão geral do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), no estado do Rio de Janeiro, Brasil (A). Detalhes de *Prepusa hookeriana* (B – C). Detalhes de *Prepusa connata* (D – E). Visão geral do Parque Estadual da Pedra Azul, no Espírito Santo, Brasil (F). Detalhes de *Prepusa viridiflora* (G – H).



Fig. 2: Mapa de distribuição geográfica evidenciando o endemismo das três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae).

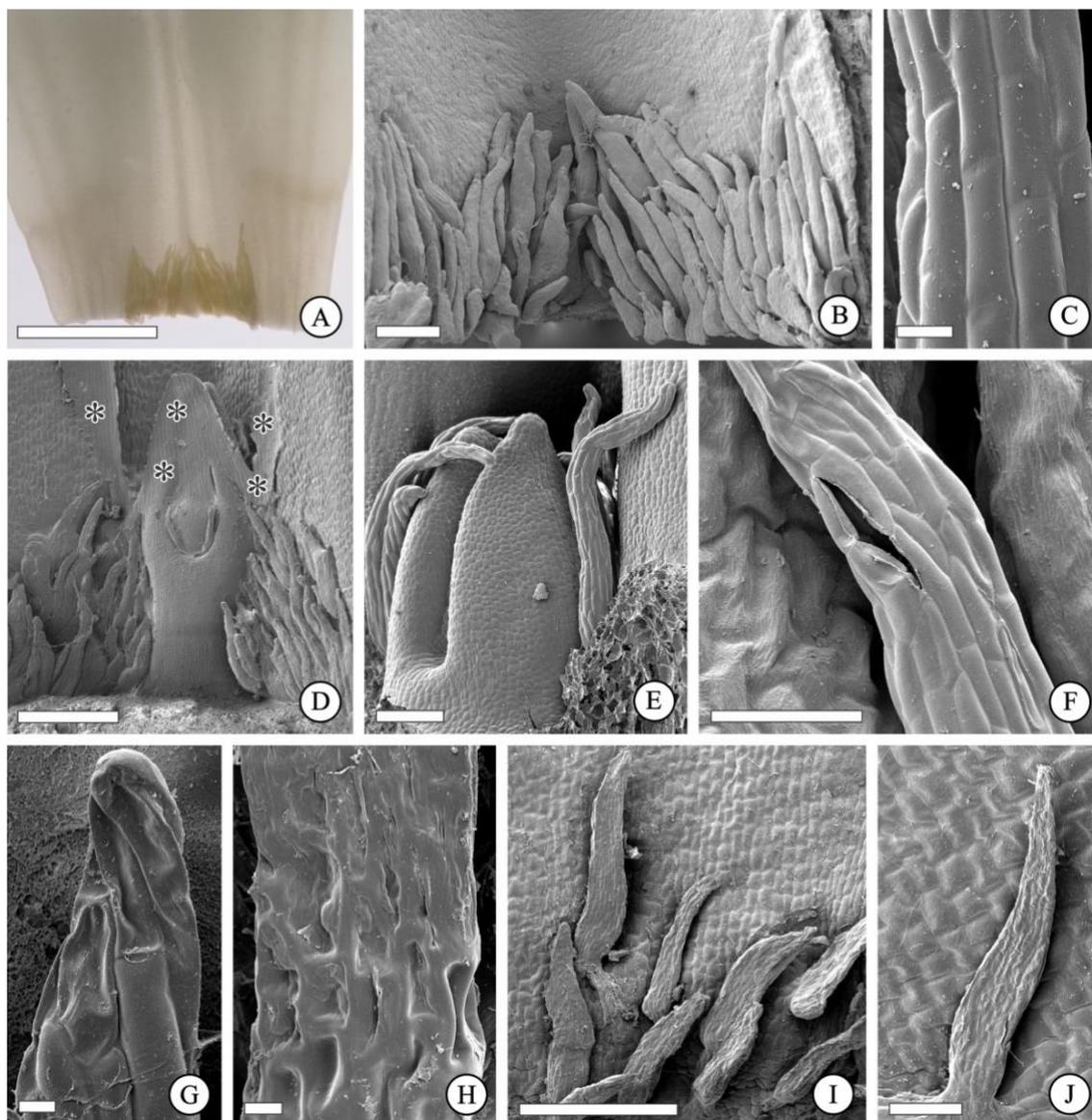


Fig. 3: Coléteres foliares em três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae) observados em estereomicroscópio e em microscopia eletrônica de varredura. Coléteres de *P. viridiflora* inseridos na região central na face adaxial da lâmina foliar (A-B). Superfície lisa do coléter de *P. connata* (C). Coléteres de *P. viridiflora* e *P. connata*, folhas jovens e coléter recobrindo dois primórdios foliares (D-E). Ruptura de cutícula (F). Coléteres em folhas completamente desenvolvidas com enrugamento do seu ápice e contorção na porção apical (G). *P. hookeriana* apresentando o enrugamento da superfície do coléter (H). *P. viridiflora* em estágio de folha completamente expandida e senescência (J-K). Abreviações: *secreção. Barras de escala: 2 mm em (a); 200 μ m em (b, i); 10 μ m em (c, g, h); 500 μ m em (d); 100 μ m em (e, j) e 50 μ m em (f).

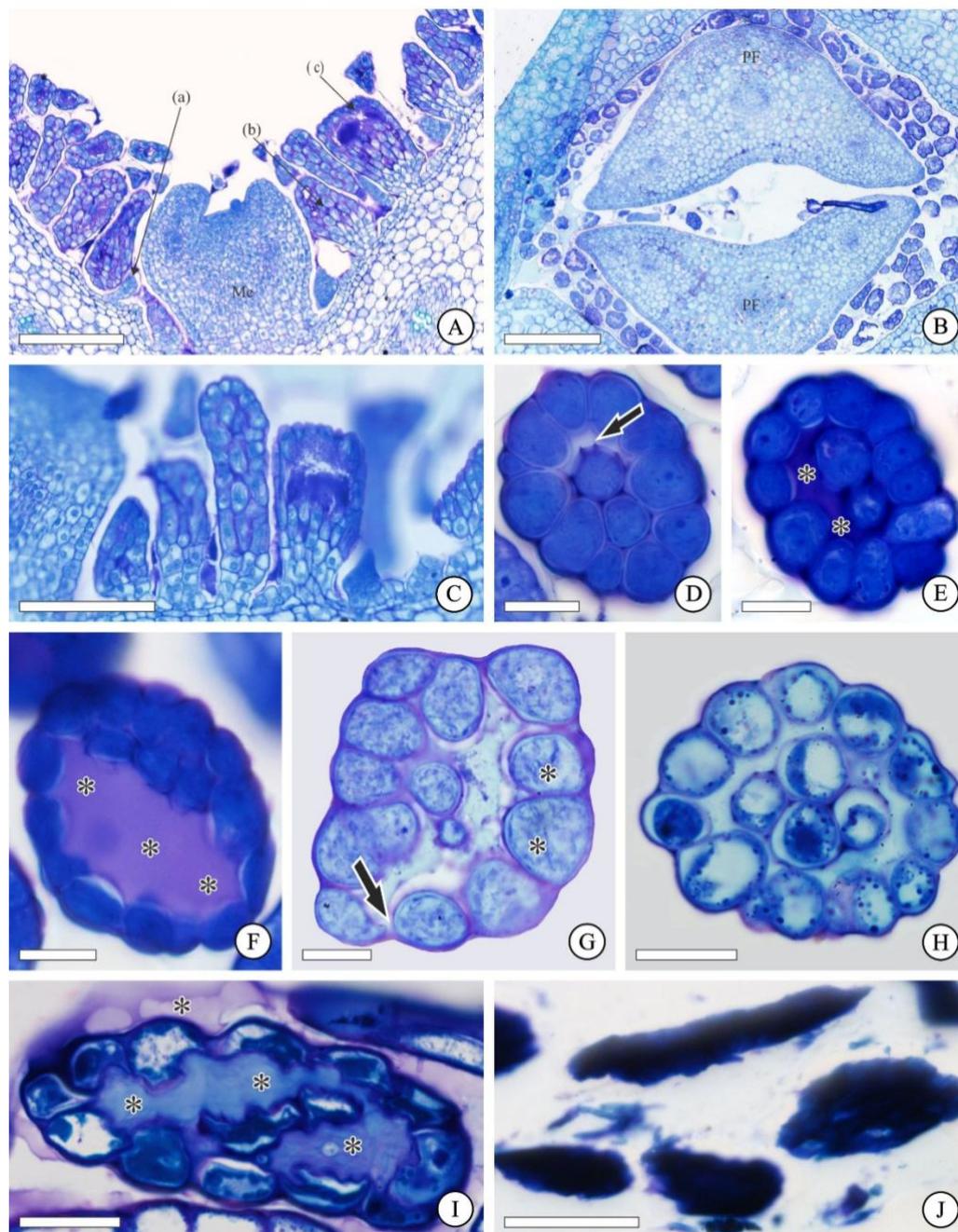


Fig. 4: Caracterização anatômica dos coléteres foliares de três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae). Coléteres presentes na região do meristema de *P. viridiflora*, (seta a) coléter em formação, (seta b) afastamento celular e (seta c) secreção no espaço periplasmático (A). Coléteres presentes na região do ápice caulinar com primórdios foliares de *P. hookeriana* (B). Células do pedúnculo de *P. viridiflora* (C). Deslocamento das células centrais (seta) (D). Acúmulo de secreção nos espaços intercelulares (E). Espaços intercelulares com grande quantidade de secreção (F). Provável espaçamento intercelular onde a secreção será extravasada (G). Coléter em folhas completamente expandidas de *P. hookeriana* com diminuição da secreção das células secretoras (H). Coléteres de *P. connata* em folhas em senescência evidenciando a presença de secreção dentro e fora das células (I). Coléteres senescentes evidenciando o total colapso celular em *P. hookeriana* (J). Abreviações: *=secreção; →=deslocamento das células dos coléteres; M= meristema; Pf=primórdios foliares. Barras de escala: 500 µm em (a, b); 200 µm em (c); 20 µm em (d, e, g, h, i); 50 µm em (f, j).

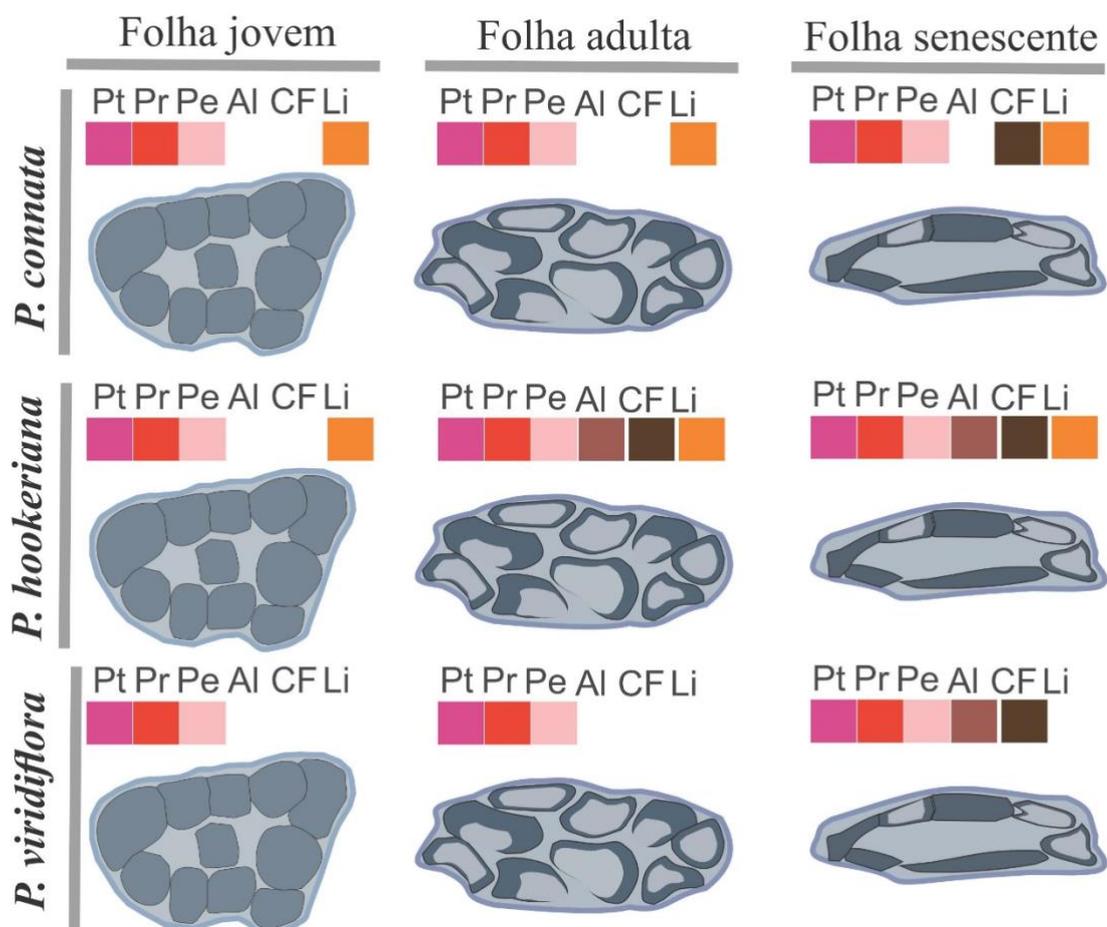


Fig. 5: Esquema ilustrativo representando a composição da secreção dos coléteres foliares de três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae) nos diferentes estágios de desenvolvimento. Abreviações: Pt Polissacarídeos totais; Pr- Proteínas; Pe- Pectinas; Al- Alcaloides; CF- Compostos fenólicos; Li- Lipídios. Resultados positivos foram representados por quadrados coloridos abaixo das abreviações. Resultados negativos por ausência de cor.

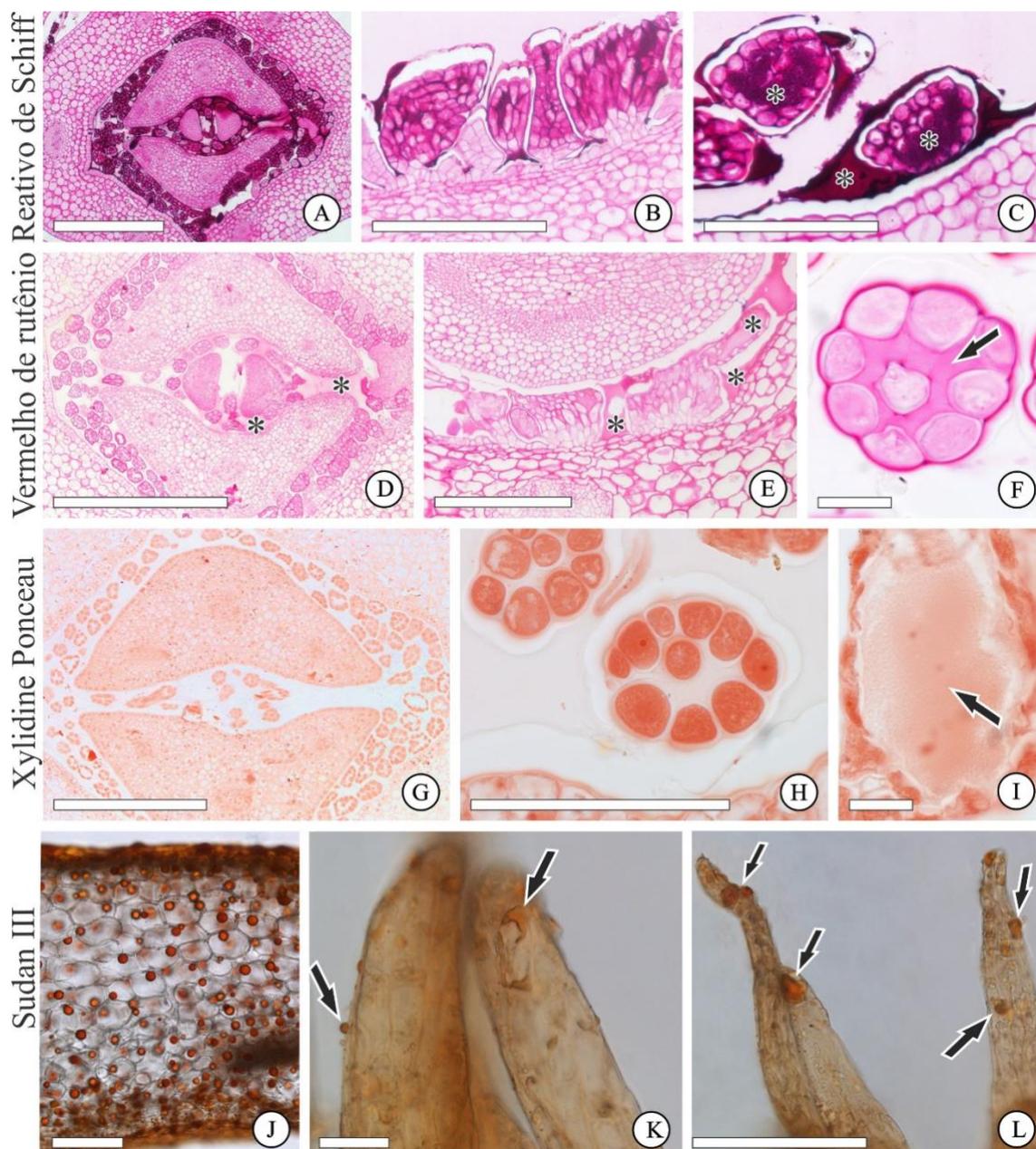


Fig. 6: Testes histoquímicos evidenciando a composição da secreção dos coléteres foliares de três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae) (A-L). Reagente de Schiff/Ácido periódico detectando polissacarídeos totais em folhas jovens recobrimdo o meristema de *P. hookeriana* (A). Reação detectando polissacarídeos no citoplasma das células da cabeça secretora *P. viridiflora* (B) e polissacarídeos nas células, espaços intercelulares e no meio externo (C). Vermelho de Rutênio evidenciando pectinas/mucilagens nos espaços intercelulares, nas células e na secreção extravasada de *P. hookeriana* (D), *P. viridiflora* (E) e *P. connata* (F). Xilidine Ponceau detectando proteínas na secreção intercelular e na secreção extravasada no estágio de folhas jovens de *P. hookeriana* (G), *P. connata* (H) e *P. viridiflora* (I). Teste de Sudan III para detecção de lipídeos (J-L), gotas lipídicas nas células da cutícula (K) e a cutícula corada (L). Abreviações: *=secreção; →=secreção intercelular. Barras de escala: 500 μm em (a, d, g); 200 μm em (b, e); 100 μm em (c); 50 μm em (f, h, j, l); 20 μm em (i, k).

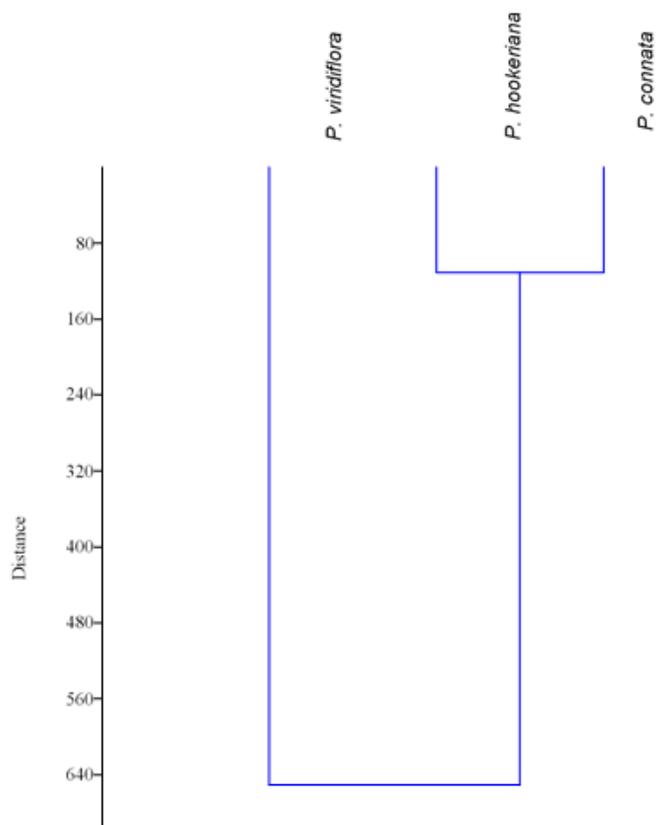


Fig. 7: Análise de cluster, comparando o tamanho dos coléteres nas três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae).

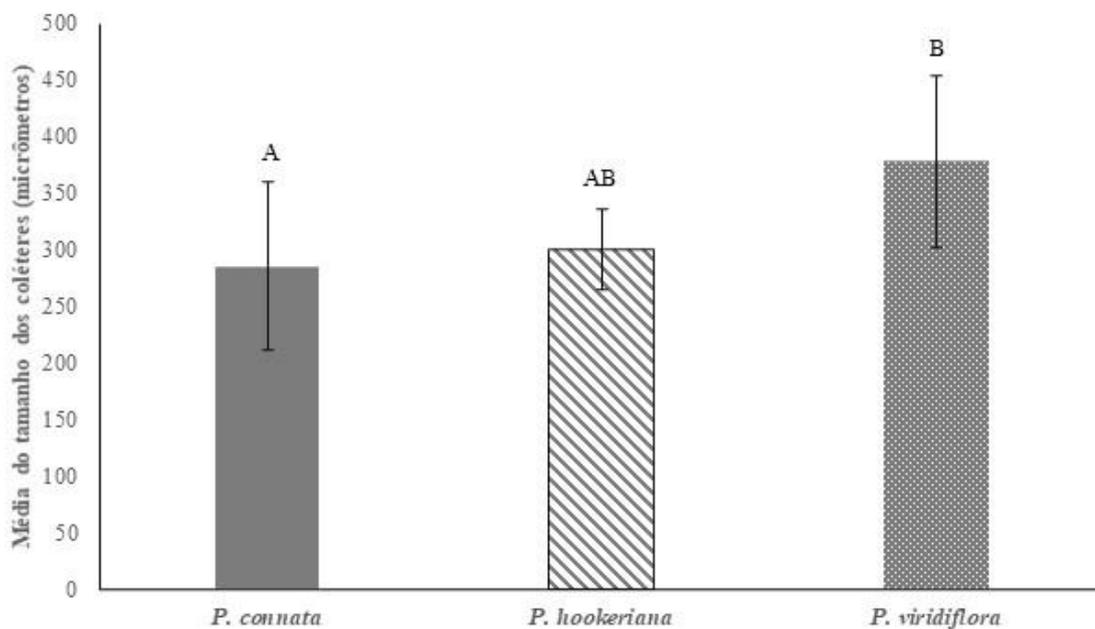


Fig. 8: Tamanho dos coléteres foliares das três espécies de *Prepusa* (Gentianaceae).

Tabela 1:

Coléter	Tamanho (μm)	Lipídios	Acalbides	Fenólicos	Altitude (m)
<i>P. connata</i>	285,627 \pm 74,705	3	0	1	1990
<i>P. hookeriana</i>	300,146 \pm 35,275	3	2	2	2100
<i>P. veridiflora</i>	378,175 \pm 75,559	0	1	1	1400