



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



Anatomia e histoquímica foliar em populações de cravo-vermelho-do-campo (*Trichocline macrocephala* Less. – Asteraceae)

Dissertação de Mestrado

Aline de Mello Zevieski



Porto Alegre

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



Anatomia e histoquímica foliar em populações de cravo-vermelho-do-campo (*Trichocline macrocephala* Less. – Asteraceae)

Aline de Mello Zevieski

Orientador: Prof^o. Dr^o Geraldo Luiz Gonçalves Soares

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Mara Rejane Ritter

Banca examinadora: Prof^a. Dr^a. Alice Pita Barbosa

Prof^a. Dr^a. Rosy Mary dos Santos Isaias

Prof^a. Dr^a. Tatiana Teixeira de Souza Chies

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Botânica.

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, meus pais Zelindra e Aloise e meu irmão Alan por todo suporte principalmente emocional durante essa caminhada. Ao Matheus, uma pessoa muito especial que sempre esteve ao meu lado contribuindo para que superasse os obstáculos e concretizasse esse grande sonho em me tornar mestre em Botânica.

Ao professor Geraldo e a professora Mara que me orientaram durante o mestrado compartilhando comigo grandes ensinamentos não somente acadêmicos mas também morais. A todos os colegas do PPG Botânica da UFRGS pela troca de conhecimento e pelos momentos de descontração.

Agradeço carinhosamente a professora Rosy Isaias, o professor Fernando Vale e todos os alunos do laboratório de Galhas da UFMG, pelo acolhimento e pela ajuda com o desenvolvimento das atividades de anatomia vegetal.

Aos funcionários da Fepagro/RS Gilson, Goretti e André que sempre nos receberam atenciosamente na unidade de Viamão e também na sede da instituição em Porto Alegre contribuindo inclusive com a análise e interpretação de solo dos locais estudados.

A administração do Autódromo Internacional de Tarumã que forneceu autorização para que pudéssemos acessar a área com objetivo de monitorar e coletar material vegetal para este estudo.

Agradeço também aos proprietários dos locais de coletas de Jaquina/RS com quem certamente criamos vínculos não somente acadêmico mas também afetivo em vista da calorosa recepção sempre que visitávamos os locais.

*"Todo mundo é um gênio. Mas se você julgar um peixe
pela sua habilidade de subir em árvores,
ele viverá o resto de sua vida acreditando que é um idiota"*

Albert Einstein

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | |
| 2.1 Local de coleta..... | 12 |
| 2.2 Coleta..... | 14 |
| 2.3 Análise micromorfológica foliar..... | 14 |
| 2.4 Análise histoquímica foliar..... | 15 |
| 2.5 Análise de solo..... | 16 |
| 3 RESULTADOS | |
| 3.1 Análise micromorfológica foliar..... | 18 |
| 3.2 Análise histoquímica foliar..... | 23 |
| 4 DISCUSSÃO | |
| 4.1 Análise micromorfológica foliar..... | 30 |
| 4.2 Análise histoquímica foliar..... | 32 |
| 4.3 Análise de solo..... | 34 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 35 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 35 |

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADRO

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Mapas da classificação Climática de Koeppen, temperatura média anual e precipitação anual para as áreas de Jaquirana e Viamão - RS. | 12 |
| Figura 2 - Locais de coleta. A-Autódromo B- Fepagro C- Firma Tainhas D- Faxinal dos Pelúcios..... | 14 |
| Figura 3 - Variação morfológica das folhas de <i>Trichocline macrocephala</i> da população do Autódromo..... | 18 |
| Figura 4 - Box-Plot das análises morfológicas para comprimento e largura foliar para as quatro populações de <i>Trichocline macrocephala</i> | 19 |
| Figura 5 - Dissociação epidérmica de folhas de <i>Trichocline macrocephala</i> com representantes das quatro populações estudadas..... | 20 |
| Figura 6 - Detalhe da face adaxial mostrando cutícula espessa formando flanges cuticulares | 21 |
| Figura 7 - Box-Plot das análises micromorfométricas para as quatro populações de <i>Trichocline macrocephala</i> | 22 |
| Figura 8 - Secções transversais do mesofilo para as quatro populações estudadas..... | 23 |
| Figura 9 - Secções transversais da lâmina foliar de <i>Trichocline macrocephala</i> submetidas a testes histoquímicos - População Autódromo..... | 26 |
| Figura 10 - Secções transversais da lâmina foliar de <i>Trichocline macrocephala</i> submetidas a testes histoquímicos - População Fepagro..... | 27 |
| Figura 11 - Secções transversais da lâmina foliar de <i>Trichocline macrocephala</i> submetidas a testes histoquímicos - População Faxinal dos Pelúcios..... | 28 |
| Figura 12 - Secções transversais da lâmina foliar de <i>Trichocline macrocephala</i> submetidas a testes histoquímicos - População Firma Tainhas..... | 29 |
| Tabela 1 - Análise básica do solo para os quatro locais de coleta da <i>Trichocline macrocephala</i> | 16 |
| Tabela 2 - Análise de micronutrientes do solo para os quatro locais de coleta da <i>Trichocline macrocephala</i> | 16 |
| Tabela 3 - Interpretação dos níveis de fertilidade do solo para os quatro locais de coleta da <i>Trichocline macrocephala</i> | 17 |
| Tabela 4 - Resultado da PERMANOVA indicando diferenças morfológicas foliares entre as populações de <i>Trichocline macrocephala</i> | 18 |
| Tabela 5 - Densidade estomática (mm ²) nas faces abaxial e adaxial encontradas nas folhas de <i>Trichocline macrocephala</i> nas populações estudadas..... | 19 |
| Tabela 6 - Resultado da PERMANOVA indicando diferenças foliares anatômicas entre as populações de <i>Trichocline macrocephala</i> do Autódromo em relação às populações de Jaquirana..... | 22 |
| Quadro 1 - Análises histoquímicas foliares de <i>Trichocline macrocephala</i> nas populações estudadas. + Reação positiva para o metabólito; - Reação negativa para o metabólito..... | 25 |

RESUMO

Trichocline macrocephala, o cravo-vermelho-do-campo, pertence à tribo Mutiseae, família Asteraceae, é utilizada popularmente como medicinal no sul do Brasil e está na Lista das Plantas Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul. Ocorre em campos limpos e sujos, rochosos ou arenosos, bordas de florestas e até mesmo em áreas antropizadas com solo exposto, em beiras de estradas. Não se conhece estudos morfológicos com esta espécie, até o momento. O objetivo deste trabalho foi estudar a micromorfologia e histoquímica foliar de quatro populações de *Trichocline macrocephala*, empregando técnicas usuais de anatomia vegetal. Foram coletadas folhas em duas populações localizadas no município de Jaquirana (Firma Tainhas e Faxinal dos Pelúcios), e em duas outras no município de Viamão (Autódromo e Fepagro), inseridos no Bioma Mata Atlântica e Pampa, respectivamente, ambos no Rio Grande do Sul. Foram medidas a espessura do mesófilo, da cutícula na face adaxial, da epiderme nas faces abaxial e adaxial, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso. Para a análise histoquímica, folhas de cinco indivíduos de cada população foram submetidas aos seguintes testes: azul de bromofenol para detecção de proteínas, reagente de Lugol para amido, cloreto férrico para derivados fenólicos, Sudan red B para derivados lipídicos, reagente de Dragendorff para alcalóides, alfa-naftolparafenileno diamina (NADI) para terpenóides, floroglucina em meio ácido para lignina e dimetilaminocinamaldeído (DMACA) para flavonóides. As análises morfológicas e anatômicas mostraram que não houve diferença estatística entre as duas populações localizadas no município de Jaquirana. Em relação à descrição anatômica, encontraram-se folhas anfiestomáticas, com estômatos do tipo anomocíticos na face adaxial, no mesmo nível das células epidérmicas, mesófilo dorsiventral, nervura central com feixe colateral e colênquima lamelar e lacunar. Diferenças estatísticas foram encontradas nas análises realizadas na espessura da cutícula, da epiderme adaxial, do parênquima esponjoso e também na largura e no comprimento foliar entre as populações de Jaquirana e Viamão. A análise histoquímica evidenciou que não houve diferença qualitativa entre as populações, entretanto, detectaram-se alcalóides no parênquima paliçádico e esponjoso em todas as populações. Este é um resultado inédito, uma vez que até o momento, não há registro na literatura sobre a ocorrência destes compostos para a tribo Mutisiae. As análises micromorfológicas permitiram detectar diferenças entre as populações e a análise histoquímica apontou a ocorrência de alcalóides nos exemplares das populações estudadas nos dois municípios.

Palavras-chave - Compositae - Mutisiae - micromorfometria - alcalóides - metabólitos secundários

ABSTRACT

Trichocline macrocephala, the "cravo-vermelho-do-campo", belongs to the Mutiseae tribe, family Asteraceae, is popularly used as a medicinal plant in southern Brazil and is on the Rio Grande do Sul List of Endangered Plants. It occurs in rocky or sandy grasslands with or without the presence of trees and shrubs, forest edges and even in anthropized areas with exposed soil at roadsides. There are no known morphological studies with this species so far. The aim of this research was to study the micromorphology and leaf histochemistry of four populations of *Trichocline macrocephala*, using usual techniques of plant anatomy. Leaves were collected from two populations located in the municipality of Jaquirana (Firma Tainhas and Faxinal dos Pelúcios), and in other two from the municipality of Viamão (Autódromo and Fepagro), inserted in the Mata Atlântica and Pampa Biomes, respectively, both in Rio Grande do Sul. The thickness of the mesophyll, the cuticle on the adaxial surface, the epidermis on the abaxial and adaxial surfaces, the palisade parenchyma and the spongy parenchyma were measured. For histochemical analysis, leaves from five individuals from each population were subjected to the following tests: bromophenol blue for protein detection, Lugol starch reagent, ferric chloride for phenolic derivatives, Sudan red B for lipid derivatives, Dragendorff alkaloid reagent, alpha-naphthol paraphenylenediamine (NADI) for terpenoids, phloroglucinol in acid medium for lignin and p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) for flavonoids. The morphological and anatomical analyses showed that there was no statistical difference between the two populations located in the city of Jaquirana. Regarding the anatomical description, amphistomatic leaves were found, with anomocytic stomata on the adaxial surface, at the same level as the epidermal cells, dorsiventral mesophyll, midrib with collateral vascular bundle and lamellar and lacunar collenchyma. Statistical differences were found in the analyses performed on cuticle thickness, adaxial epidermis, spongy parenchyma, and leaf width and length between Jaquirana and Viamão populations. Histochemical analysis showed that there was no qualitative difference between the populations, however, alkaloids were detected in the palisade and spongy parenchyma in all populations. This is an unprecedented result, as to date there is no record in the literature about the occurrence of these compounds for the Mutisiae tribe. The micromorphological analyses allowed to detect differences between the populations and the histochemical analysis showed the occurrence of alkaloids in the populations studied in both municipalities.

Keywords - Compositae - Mutisiae - micromorphometry - alkaloids - secondary metabolites

1. INTRODUÇÃO

Asteraceae possui cerca de 24.000 – 30.000 espécies descritas, distribuídas em 1.600-1.700 gêneros no mundo, exceto na Antártica. É reconhecida facilmente por apresentar inflorescências do tipo capítulo envolto por brácteas, pela fusão das anteras em torno do estilete formando um anel e pelo fruto do tipo cipsela, acompanhado de um conjunto de apêndices apicais denominado de pápus (Funk *et al.* 2009).

Segundo a Flora do Brasil 2020 em construção (2019) cerca de 592 espécies representam a família no estado do Rio Grande do Sul. Ainda de acordo com Boldrini (2009) Asteraceae é a família com maior diversidade onde cerca de 40 táxons estão classificados com algum grau de ameaça.

No estado do Rio Grande do Sul, é a família com maior diversidade possui cerca de 40 táxons classificados com algum grau de ameaça (Boldrini 2009) sendo representada atualmente por 592 espécies, segundo a Flora do Brasil 2020 em construção (2019).

A família possui grande importância econômica, sendo utilizada para os mais diversos fins como, por exemplo: alimento (*Lactuca sativa* L., *Cynara scolymus* L.), matéria prima para produção de vernizes, tintas e plásticos (*Helianthus tuberosus*), matéria prima para produção de adoçante dietético (*Taraxacum officinale* L.), matéria prima para medicamentos (*Artemisia annua* L.), matéria prima para inseticidas (*Tanacetum cinerariifolium* (Trev.) Sch. Bip), fonte alternativa de látex para fabricação de borracha (*Parthenium argentatum* A. Gray). Além disso, apresenta muitas espécies utilizadas como ornamentais (Simpson 2009). Muitas espécies da família também se destacam pelo potencial medicinal como por exemplo, *Jungia floribunda* Less. (Dujak, Lopez, Delmas & Araujo 2010), *Ophryosporus meyen* (Plos, Sancho & Iharlegui 2011), *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Duarte & Empinotti 2012), *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch.Bip. ex Walp. (Duarte & Silva 2013), *Calea serrata* Less, (Camilotti *et al.* 2014), *Baccharis pentaptera* (Budel *et al.* 2015) *Tanacetum vulgare* (L.) (Guerreiro *et al.* 2016), *Bidens pilosa* L. (Sáa , Silva & Randau 2017), *Solidago chilensis* Meyen (Souza *et al.* 2018) e *Trichocline macrocephala* (De Borba *et al.* 2019).

O gênero *Trichocline* está inserido na tribo Mutisieae, subtribo Mutisiinae e está representado por cerca de 22 espécies, com distribuição desde o sul do Peru até a Argentina central, Chile e oeste da Austrália. São características da tribo Mutisieae: hábito herbáceo acaulescente, a presença de inflorescência em escapos monocefálicos, flores do raio pistiladas com estaminódios, lobos do estilete curtos e papilosos, cipsela com ápice truncado, tricomas 2-4-seriados inflados no ápice e distribuídos em toda a extensão (Pasini & Ritter 2012).

Entre as seis espécies de *Trichocline* citadas por Pasini & Ritter (2012) para o Rio Grande do Sul, destaca-se *T. macrocephala* Less., denominada popularmente por cravo-vermelho-do-campo, que apresenta capítulos de grandes dimensões (1,5-3,5 cm de comprimento por 4-6 cm de diâmetro) sendo

facilmente reconhecida por possuir corolas das flores do raio vermelhas a alaranjadas e xilopódio. Habitam as mais diversas fisionomias vegetacionais como campos limpos e sujos, rochosos ou arenosos, bordas de florestas e até mesmo áreas antropizadas com solo exposto em beiras de estradas. Os indivíduos podem ocorrer isolados em meio à vegetação campestre, o que torna essa espécie rara em algumas localidades onde foi coletada. Ocorre na Argentina e no Brasil nas regiões Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). No estado do Rio Grande do Sul distribui-se nos Biomas Mata Atlântica e Pampa, nas regiões fisiográficas do Alto Uruguai, Campos de Cima da Serra, Depressão Central, Encosta do Sudeste, Encosta Inferior do Nordeste, Planalto Médio e Serra do Sudeste (Pasini & Ritter 2012).

A Lista das Espécies da Flora do Rio Grande do Sul, elaborada em 2002 e oficializada através do Decreto estadual nº 42.099, publicado em 1/01/2003 (Rio Grande do Sul 2003), apontou pela primeira vez que *Trichocline macrocephala* encontrava-se na categoria EN (em perigo). A espécie se manteve nesta categoria (EN - B2ab (iii)) na última lista elaborada em 2014, a qual foi publicada sob Decreto nº 52.109, de 10 de dezembro de 2014 (Rio Grande do Sul 2014).

Além de apresentar potencial ornamental, Cabrera & Klein (1973) e Zardini (1975) citam o uso das raízes de *Trichocline macrocephala* na medicina tradicional para problemas relacionados aos rins. Amorim (2010) afirma que é uma das espécies mais citadas na região da Coxilha Rica, SC, para afecções pulmonares, ou "pontadas". No Rio Grande do Sul, Borba (2017) realizou um trabalho etnobotânico na região dos Campos de Cima da Serra, confirmando a utilização do órgão subterrâneo (xilopódio) para problemas respiratórios pela população local. Citou ainda cumarinas como produtos principais presentes nos xilopódios da espécie, corroborando o uso medicinal que a comunidade faz.

Metabólitos secundários desempenham papéis ecológicos importantes atuando na proteção contra herbívoros (Wink 2018, Zaynab *et al.* 2018) e estresses abióticos (hídrico, luminoso, nutricional entre outros) (Yang *et al.* 2018, Takshak & Agrawal 2019); atrativos de animais para polinização e dispersão de semente (Song *et al.* 2018) e como agentes na competição interespecífica (Dias, Nozari & Santarém 2017). Dividem-se em três grupos: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados e podem ser encontrados em diversos órgãos vegetais, porém muitos são restritos a determinados grupos taxonômicos.

A produção de metabólitos secundários pelas plantas pode variar em virtude de alguns fatores ambientais como temperatura (Huang *et al.* 2012), disponibilidade hídrica (Yadav *et al.* 2014), radiação ultravioleta (Lavola *et al.* 2000), nutrientes (Lattanzio *et al.* 2009), altitude (Spitaler *et al.* 2006), poluição atmosférica (Stiling & Cornelissen 2007), indução por ações mecânicas ou de

patógenos (Jacobo-Velázquez, González-Aguero & Cisneros-Zevallos 2015), sazonalidade (Gomes *et al.* 2017) e ritmo circadiano (Kim *et al.* 2017).

A presença desses metabólitos secundários bem como sua localização nos tecidos vegetais, podem ser identificadas com análises histoquímicas (Ventrella *et al.* 2013). Esse tipo de análise é considerada uma ferramenta importante para a detecção de compostos que podem ser utilizados com potencial farmacológico (Costa & Proença da Cunha 2000; Figueiredo 2007; Silva & Porto 2014). Rodrigues das Dôres (2007) afirma que esse tipo de análise também contribui sob o ponto de vista ecológico e econômico, pois através do reconhecimento de compostos químicos existentes na planta (os quais podem ser alterados de acordo com variáveis ambientais) é possível selecionar áreas, substratos e condições de cultivo adequadas, agregando assim, maior qualidade ao produto ou subproduto para fins agro-farmacêuticos.

Os metabólitos secundários com maior ocorrência em Asteraceae em ordem decrescente são: flavonóides, poliacetileno, sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenos, cumarinas, triterpenos e benzofuranos (Funk 2009). Entretanto, segundo Hernández, Katinas & Arambarri (2015), a histoquímica é relativamente desconhecida para a família Asteraceae.

Adicionalmente a técnicas histoquímicas, análises micromorfométricas também podem indicar que diferenças encontradas em tecidos foliares sugerem adaptações ecológicas sofridas pela planta (Metcalfe & Chalk 1983). A folha é o órgão vegetal mais exposto ao ambiente e, conseqüentemente, o que mais se modifica para se aclimatar a diferentes condições ambientais (Fahn 1986; Dickison 2000; Elias *et al.* 2003).

Além disso, análises micromorfométricas podem contribuir para detectar diferenciação interespecífica como por exemplo, os realizados por Pacífico *et al.* (2019) que utilizou-se de análises anatômicas para comparar e identificar uma nova espécie de *Trembleya* e Cabral, Melo Junior & Matilde-Silva (2018) também afirmam que esse tipo de estudo contribui para resolução de problemas taxonômicos.

Diante da importância atribuída a essa espécie, tanto medicinal quanto ornamental, seu grau de ameaça e devido à ausência de estudos anatômicos e histoquímicos, uma análise micromorfométrica e histoquímica é de extrema relevância para contribuir com trabalhos futuros que visem sua preservação. Neste contexto, este estudo objetivou caracterizar a anatomia e a histoquímica foliar de populações de *Trichocline macrocephala* ocorrentes em dois municípios do Rio Grande do Sul.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de coleta

A coleta do material botânico foi realizada em quatro populações diferentes, sendo duas pertencentes ao município de Jaquirana (nos distritos de Faxinal dos Pelúcios e Firma Tainhas) e outras duas em Viamão (nas áreas do Autódromo Internacional de Tarumã e da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO), ambos municípios localizados no estado do Rio Grande do Sul (Figura 1).

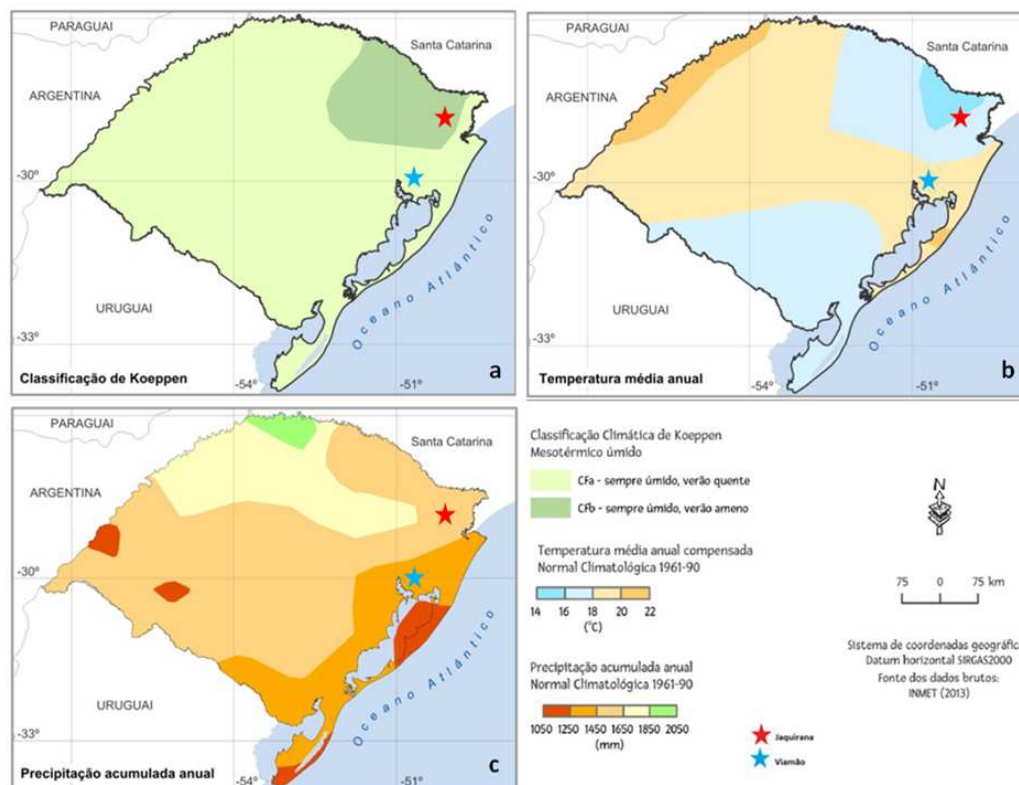


Figura 1 - Mapas da classificação Climática de Köppen, temperatura média anual e precipitação anual para as áreas de Jaquirana e Viamão - RS.

Disponível em: < <http://atlas.fee.tche.br/rio-grande-do-sul/socioambiental/clima/> >

As populações de *Tricholine macrocephala* existentes em Jaquirana já haviam sido identificadas no estudo anteriormente realizado por Borba (2017), e as populações de Viamão foram encontradas durante visita a Unidade da Fepagro para observação das espécies vegetais ali ocorrentes.

O Município de Jaquirana (Figura 1) está localizado no extremo Nordeste do RS, na região geomorfológica denominada “Campos de Cima da Serra”, com altitude média de 920m (Latitude 28°53'05"S Longitude: 50° 21' 28" W). Sua fisiografia se caracteriza por uma planície elevada, de relevo suave e com recortes profundos de origem erosiva fluvial. O substrato, de origem vulcânica, é de composição riodacítica a riolítica (Roisenberg & Viero 2000), originando solos imaturos. Pertence ao Bioma Mata Atlântica, o qual é caracterizado por grandes extensões de campos mesclados com mata de araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) e turfeiras. Alta precipitação pluviométrica, clima frio e altitudes elevadas são características marcantes da região a qual segundo a Classificação Climática de Koeppen é classificada como Cfb (sempre úmido, verão ameno) (Pessoa 2017) (Figura 1). A população de *Trichocline macrocephala* localiza-se no Distrito de Faxinal dos Pelúcios, com altitude média de 755m e distante cerca de 13,9km da sede do município (Figura 2). A população do Distrito de Firma Tainhas localiza-se em uma altitude média de 874m e distante cerca de 51,7km da sede do município (Figura 2).

Distante aproximadamente 260km de Jaquirana, o município de Viamão (Figura 1) comporta as outras duas populações deste estudo. Apresenta altitude média de 111m e localiza-se na região metropolitana de Porto Alegre (Latitude: 30° 04' 52" S Longitude: 51° 01' 24" W). As duas populações estão inseridas no Bioma Pampa, o qual segundo Boldrini (2009) apresenta ampla diversidade vegetal em virtude da pluralidade de fatores abióticos como clima, solo e manejo. Os campos desse Bioma são formados por solos rasos (basáltico e pedregoso) e associados ao estresse hídrico devido à baixa retenção de umidade, sendo classificado como CFa (sempre úmido e verão quente) (Pessoa 2017) (Figura 1). A primeira população está situada em área pertencente à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro) e a segunda encontra-se na área do Autódromo Internacional de Tarumã, ambas com altitude média de 50m (Figura 2). Importante ressaltar que, embora os locais apresentem cerca de 1km de distância, foram considerados como populações diferentes pelo fato de nas primeiras visitas, se observar diferenças morfológicas marcantes nos indivíduos, principalmente em relação ao tamanho dos espécimes.

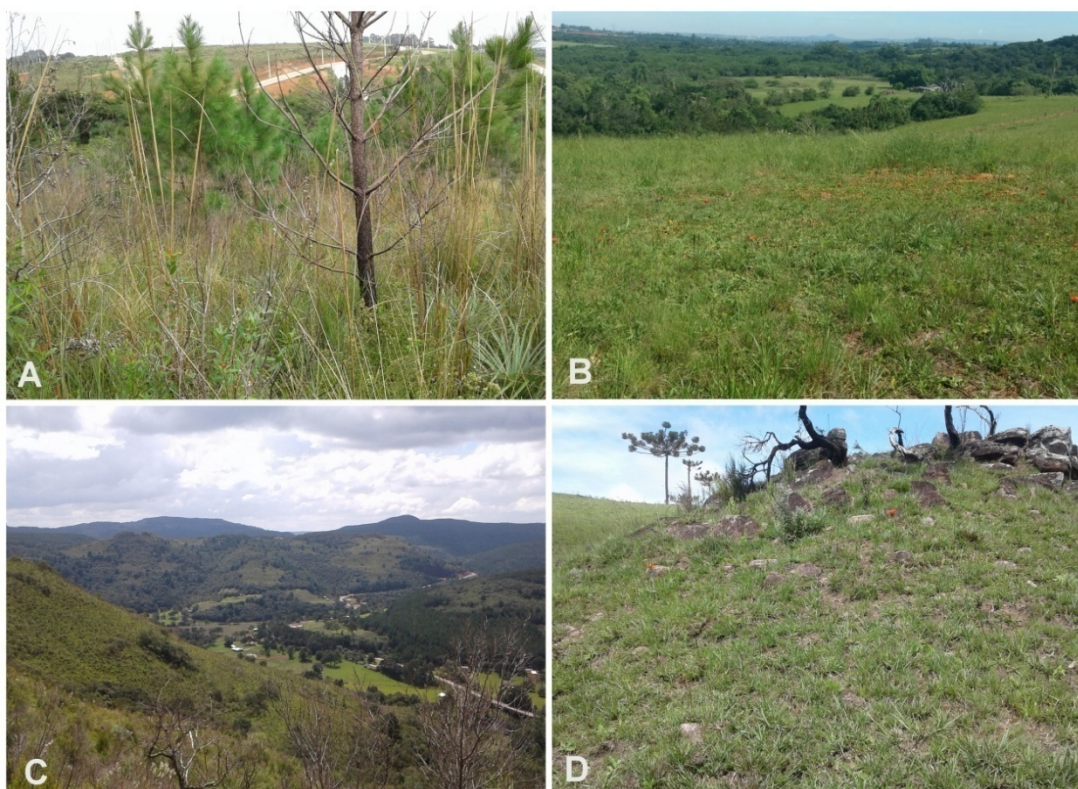


Figura 2 - Locais de coleta. A-Autódromo B- Fepagro C- Firma Tainhas D- Faxinal dos Pelúcios

2.2 Coleta

As autorizações de coleta nas regiões foram concedidas pelo SISBIO (n. 23071-8) e SEMA (ofício 156/2017-DUC).

Os materiais testemunho estão depositados no Herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob nº tomo: ICN 193043 (Faxinal dos Pelúcios, Jaquirana), ICN 193044 (Firma Tainhas, Jaquirana), ICN 197769 (Fepagro, Viamão) e ICN 197868 (Autódromo, Viamão).

2.3 Análise micromorfológica foliar

Devido à característica acaulescente deste gênero, foram escolhidas as folhas mais basais para realização tanto da análise micromorfológica quanto histoquímica.

Medidas de largura, comprimento e espessura das folhas foram feitas em campo com auxílio de um paquímetro (n = 170 folhas; 5 por indivíduo, total de 7 indivíduos por população).

Foram coletadas amostras apenas da região internervural na porção mediana de folhas saudas e completamente expandidas (n= 20 folhas; 1 por indivíduo, total de 5 indivíduos por população), cortadas em fragmentos de 2cm² e imediatamente fixadas em (Karnovsky 1965) por 48h. Posteriormente, transferiram-se as amostras para etanol 70% até o emblocamento (Johansen 1940).

As amostras foram desidratadas (etanol 96%, dois banhos de 60 minutos cada, etanol absoluto, 3 banhos de 60 min. cada), infiltradas (isoamilacetato, um banho de 45 minutos e dois banhos de 90 minutos), incluídas (Paraplast, três banhos de 12 horas) e montadas em blocos (adaptado de Álvarez, Encina & Pérez 2009). Tanto para inclusão quanto para montagem dos blocos utilizou-se Paraplast Plus (Sigma). Durante as etapas de desidratação até a inclusão, as amostras foram submetidas a ciclos de vácuo para retirada do ar. As amostras foram seccionadas em micrótomo Reichert-Jung (20µm), aderidas às lâminas com adesivo de Bissing, desparafinadas (Kraus & Arduin 1997), coradas com safranina e azul de astra (1:9, v/v) (Bukstch 1972, modificado para 0,5%) e montadas em verniz (Paiva *et al.* 2006). Os registros fotográficos foram feitos em microscópio Leica DM 2500 LED.

Foram selecionados dois cortes por indivíduo e, para cada corte, determinaram-se três quadrantes para realizar a medição das variáveis micromorfológicas, totalizando assim 30 medidas por indivíduo (150 por população). As medidas foram realizadas com o software AxioVision LE (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

Os seguintes parâmetros anatômicos foram avaliados: espessura do mesofilo, da cutícula na face adaxial, da epiderme nas faces abaxial e adaxial, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso. Para o cálculo da densidade estomática, fragmentos de cinco folhas de cinco indivíduos (n=25 folhas)(2 cm²) foram colocados em água sanitária (50%) por 24 horas ou até o desprendimento da epiderme. Os fragmentos foram corados com safranina e montados em lâminas. Para cada folha observou-se 10 campos aleatórios, sob aumento de 400 vezes (cada campo de visão com 3,14mm²), para determinar densidade estomática, totalizando 100 contagens (50 face abaxial e 50 face adaxial) para cada população e calculou-se a média.

Estatisticamente os dados foram transformados e comparados através de Análise PERMANOVA utilizando o Programa R.

2.4 Análise histoquímica foliar

Cinco folhas foram coletadas aleatoriamente por população (1 folha por indivíduo, total de 5 indivíduos) e acondicionadas em sacos plásticos (duplos) com uma pequena quantidade de água e levadas ao laboratório. Amostras da região mediana internervural dessas folhas sadias e completamente expandidas foram seccionadas transversalmente a mão livre com lâmina de aço e submetidas aos seguintes testes histoquímicos: azul de bromofenol para detecção de proteínas (Mazia *et al.* 1953), reagente de Lugol para amido (Berlyn & Miksche 1976), cloreto férrico para derivados fenólicos totais (Johansen 1940), floroglucina em meio ácido para lignina, dimetilaminocinamaldeído (DMACA) para flavonóides (Feucht 1983), Sudan red B para derivados

lipídicos totais (Pearse 1985), reagente de Dragendorff para alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976) e alfa-naftolparafenileno diamina (NADI) para terpenóides (David & Carde 1964). Os controles foram feitos com as secções sem qualquer tratamento e os resultados foram classificados como presentes (+) ou ausente (-).

Os resultados positivos foram fotografados em microscópio Leica DM 2500 LED.

2.5 Análise de solo

Para análise do solo foram escolhidos dez pontos aleatórios em cada local de ocorrência das populações de *Trichocline macrocephala*. Com ajuda de um trado foram coletadas amostras com cerca de 20 cm de profundidade. Após o término da coleta, as amostras de solo foram misturado em um balde e deste retirado aproximadamente 500 gramas para análise. O mesmo procedimento foi realizado para as quatro populações. O material foi analisado e interpretado pelo Laboratório de Química Agrícola da Fepagro (Porto Alegre/RS) de acordo com Comissão de Química e Fertilidade do Solo (CQFS) (2016).

| Análise básica | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|----------------------------------|---------|
| Amostra | P | K | Arg | MO | pH | SMP | Al | Ca | Mg | H + Al | -----CTC----- | |
| | | | | | | | | | | | pH 7 | Efetiva |
| | | | | | | | | | | | -----cmolc/dm ³ ----- | |
| | | | | | | | | | | | -----% | |
| Autódromo | 1,5 | 47,0 | 29,0 | 2,2 | 5,1 | 5,7 | 1,2 | 1,8 | 1,1 | 6,2 | 9,2 | 4,3 |
| Fepagro | 1,5 | 100,0 | 34,0 | 2,1 | 4,9 | 5,7 | 1,0 | 1,5 | 1,2 | 6,2 | 9,1 | 4,0 |
| Firma Tainhas | 7,8 | 208,0 | 31,0 | 3,7 | 5,0 | 5,0 | 2,1 | 5,3 | 2,8 | 13,7 | 22,4 | 10,8 |
| Faxinal dos Pelúcios | 3,1 | 167,0 | 36,0 | 4,2 | 4,7 | 4,7 | 3,2 | 2,4 | 1,4 | 19,4 | 23,7 | 7,4 |

Tabela 1 - Análise básica do solo para os quatro locais de coleta da *Trichocline macrocephala*. **CTC** - capacidade de troca de cátions; **SMP** - método utilizado na avaliação da acidez potencial do solo (Shoemaker *et al.*, 1961).

| Micronutrientes | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|------|------|-------------------------------|---------|--------|-------|----------|------|------|
| Amostra | B | Zn | Cu | Mn | Na | Fe | Sat CTC | | Bases | Relações | | |
| | | | | | | | efetiva | pH 7 | | Ca/Mg | Ca/K | Mg/K |
| | | | | | | -----% | | -----% | | | | |
| | | | | | | -----Mg/dm ³ ----- | | | | | | |
| Autódromo | 0,5 | 2,4 | 0,6 | 11,0 | 10,0 | 0,1 | 1,0 | 28,1 | 33,2 | 1,6 | 15,0 | 9,2 |
| Fepagro | 0,0 | 0,8 | 0,8 | 12,5 | 9,0 | 0,1 | 1,0 | 25,0 | 32,7 | 1,3 | 5,9 | 4,7 |
| Faxinal dos Pelúcios | 0,0 | 1,5 | 1,7 | 36,0 | 5,0 | 0,3 | 0,3 | 43,0 | 18,0 | 1,7 | 5,6 | 3,3 |
| Firma Tainhas | 0,0 | 1,8 | 1,1 | 69,0 | 5,0 | 0,3 | 0,2 | 19,5 | 38,5 | 1,9 | 10,0 | 5,3 |

Tabela 2 - Análise de micronutrientes do solo para os quatro locais de coleta da *Trichocline macrocephala*. **CTC** - capacidade de troca de cátions (Shoemaker *et al.*, 1961).

| | Autódromo | Fepagro | Faxinal dos Pelúcius | Firma Tainhas |
|-------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------------|
| Atributo | -----Nível do Atributo----- | | | |
| pH | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| Argila | Classe 3 | Classe 3 | Classe 3 | Classe 3 |
| MO | Baixa | Baixa | Média | Média |
| CTC pH 7 | Media | Média | Alta | Alta |
| Fósforo | Baixo | Baixo | Baixo | Médio |
| Potássio | Médio | Alto | Alto | Alto |
| Cálcio | Baixo | Baixo | Médio | Alto |
| Magnésio | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Saturação por Al | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Cobre | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Zinco | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Boro | Alto | Baixo | Baixo | Baixo |
| Manganês | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Ferro | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |

Tabela 3 - Interpretação dos níveis de fertilidade do solo para os quatro locais de coleta da *Trichocline macrocephala*.

3 RESULTADOS

3.1 Análise micromorfológica foliar

Observou-se uma grande variação morfológica foliar entre os espécimes da população de *T. macrocephala* encontrada no Autódromo em Viamão (Figura 3), o que não foi observado nas populações de Jaquirana.



Figura 3 - Variação morfológica das folhas de *Trichocline macrocephala* da população do Autódromo.

Análises estatísticas evidenciaram que há diferenças significativas entre as populações (Tabela 4) para os caracteres medidos (comprimento e largura foliar).

| Pairs | Df | SumsOfSqs | F. Model | R2 | p.value | p.adjusted | sig |
|----------|----|------------|-------------|-------------|---------|------------|-----|
| A vs F | 1 | 67.945675 | 71.5774964 | 0.512815448 | 0.001 | 0.006 | * |
| A vs FP | 1 | 152.841416 | 100.2097395 | 0.595742790 | 0.001 | 0.006 | * |
| A vs FT | 1 | 142.743132 | 65.1370011 | 0.485600547 | 0.001 | 0.006 | * |
| F vs FP | 1 | 18.967518 | 18.8435413 | 0.216982645 | 0.001 | 0.006 | * |
| F vs FT | 1 | 17.727724 | 10.5502712 | 0.132623950 | 0.001 | 0.006 | * |
| FP vs FT | 1 | 1.017591 | 0.456818 | 0.006517845 | 0.519 | 1.000 | |

Tabela 4 - Resultado da PERMANOVA indicando diferenças morfológicas foliares entre as populações de *Trichocline macrocephala*. Valores de *p* destacados (*) indicam variação significativa para $p < 0,05\%$.

Legenda: A- Autódromo F- Fepagro FP- Faxinal dos Pelúcios FT- Firma Tainhas

Resultado também demonstrado por análise de PERMANOVA (Figura 4), o qual aponta que as únicas populações que não apresentaram diferença nas medidas micromorfométricas foliares entre si foram as de Jaquirana.

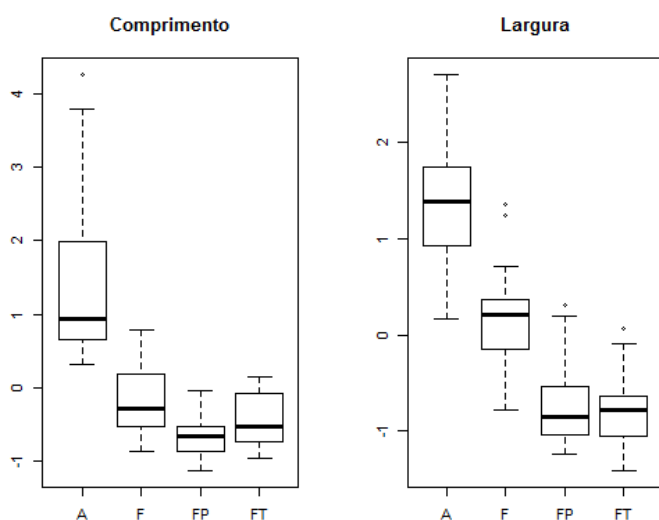


Figura 4 - Box-Plot das análises morfológicas para comprimento e largura foliar para as quatro populações de *Trichocline macrocephala*. Legenda: A- Autódromo F- Fepagro FP- Faxinal dos Pelúcios FT- Firma Tainhas

A folha de *Trichocline macrocephala* é anfiestomática, com estômatos superficiais do tipo anomocítico circundados por número variável de células (Figura 5).

A densidade estomática, tanto na face adaxial quanto abaxial, foi maior na população do Autódromo, seguida pela Fepagro, Faxinal dos Pelúcios e Firma Tainhas (Tabela 5).

| Populações | Face abaxial | Face adaxial |
|----------------------|--------------|--------------|
| Autódromo | 32,62 | 8,42 |
| Fepagro | 30,84 | 6,54 |
| Faxinal dos Pelúcios | 19,04 | 2,76 |
| Firma Tainhas | 19,36 | 4,12 |

Tabela 5 - Densidade estomática (mm^2) nas faces abaxial e adaxial encontradas nas folhas de *Trichocline macrocephala* nas populações estudadas.

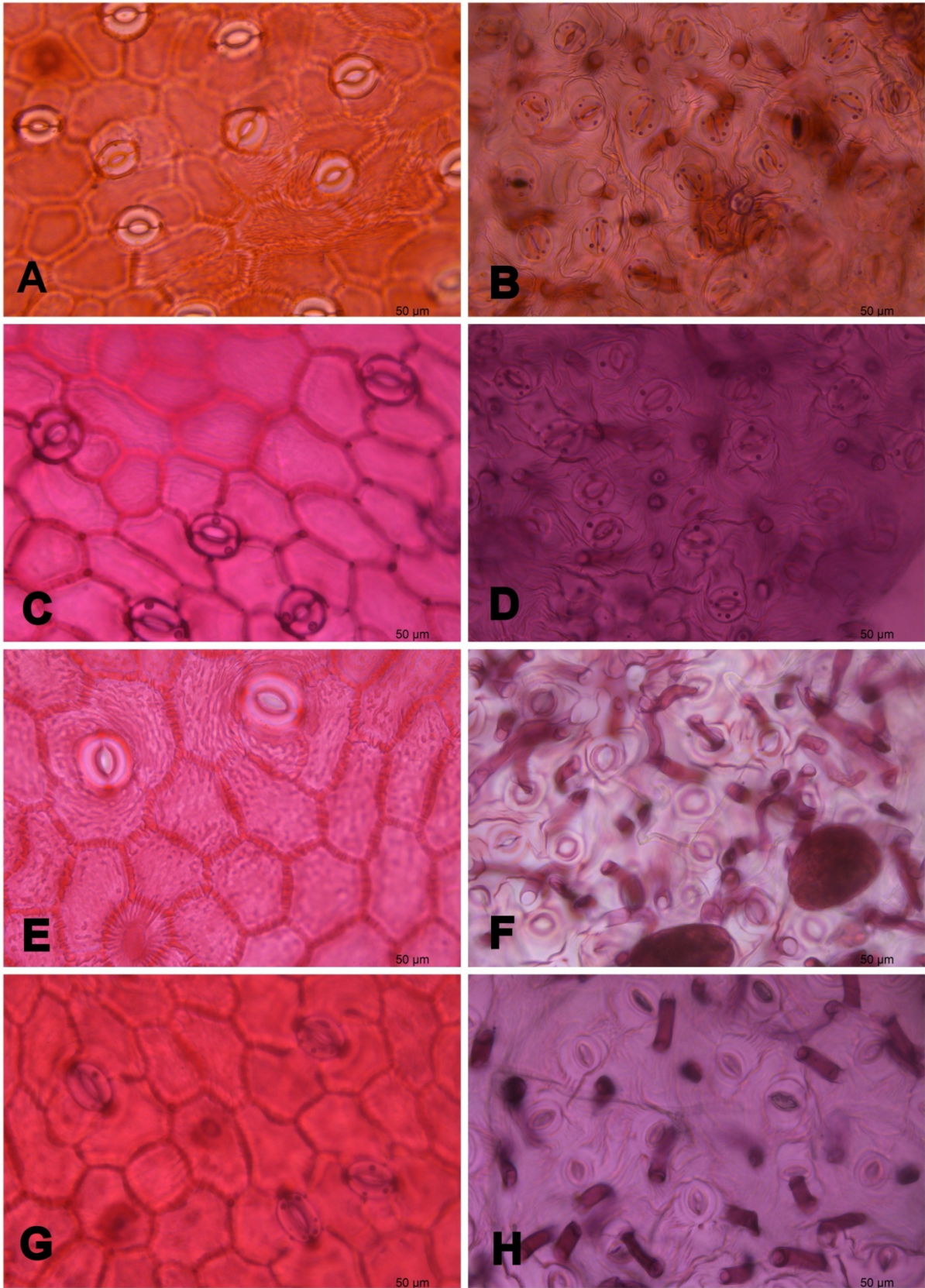


Figura 5 - Dissociação epidérmica de folhas de *Trichocline macrocephala* com representantes das quatro populações estudadas. A/B- Autódromo; C/D – Fepagro; E/F - Firma Tainhas; G/H - Faxinal dos Pelúcios. A coluna da esquerda representa estômatos da face adaxial e a da direita estômatos da face abaxial.

Uma cutícula mais espessa é observada na face adaxial em relação a face abaxial. Essa cutícula depositada nas paredes externas da epiderme adaxial forma flanges cuticulares (Figura 6).

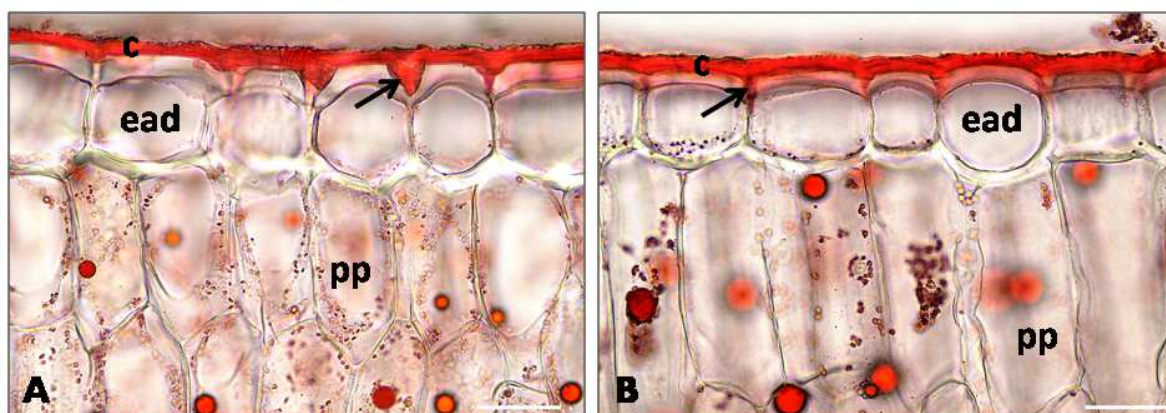


Figura 6 - Detalhe da face adaxial mostrando cutícula espessa formando flanges cuticulares (flechas). Barra: 40µm

A. População de Faxinal dos Pelúcios B. Firma Tainhas Legenda: c-cutícula ead-epiderme adaxial pp-parênquima paliçádico.

Em todas as populações é possível observar a presença de tricomas glandulares e tectores na face adaxial (Figuras 8- B/C/D, 9-C, 10- C/F, 11- C, 12- C/F)

As medidas dos parâmetros anatômicos avaliados apontaram que a população de *Trichocline macrocephala* encontrada no Autódromo novamente se destacou das demais principalmente se comparada com as populações de Jaquirana (Tabela 6).

| Pairs | Df | SumsOfSqs | F. Model | R2 | p.value | p.adjusted | sig |
|---------|----|-----------|-----------|------------|---------|------------|-----|
| FTvs FP | 1 | 3.665198 | 0.7662133 | 0.4082940 | 0.582 | 1.000 | |
| FTvs F | 1 | 11.908772 | 1.9672365 | 0.09852323 | 0.061 | 0.366 | |
| FTvsA | 1 | 20.814205 | 3.6979746 | 0.17042948 | 0.005 | 0.030 | * |
| FPvs F | 1 | 15.723787 | 3.3968255 | 0.15875371 | 0.011 | 0.066 | |
| FPvsA | 1 | 27.076135 | 6.4406360 | 0.26352162 | 0.001 | 0.006 | * |
| F vsA | 1 | 19.541646 | 3.5699123 | 0.16550426 | 0.013 | 0.078 | |

Tabela 6- Resultado da PERMANOVA indicando diferenças foliares anatômicas entre as populações de *Trichocline macrocephala* do Autódromo em relação às populações de Jaquirana. Valores de *p* destacados (*) indicam variação significativa para $p < 0,05\%$. A- Autódromo F- Fepagro FP- Faxinal dos Pelúcios FT- Firma Tainhas.

Os parâmetros anatômicos que apresentaram diferença significativa na espessura entre as populações foram a cutícula, epiderme adaxial e parênquima esponjoso (Figura 7).

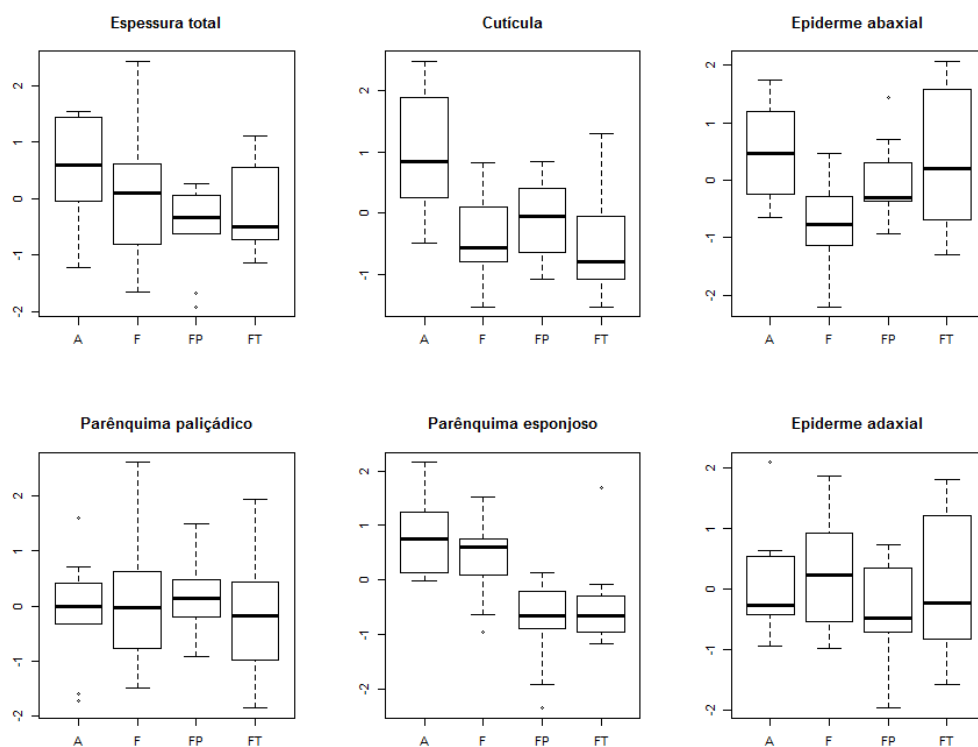


Figura 7- Box-Plot das análises micromorfométricas para as quatro populações de *Trichocline macrocephala*.

Legenda: A- Autódromo F- Fepagro FP- Faxinal dos Pelúcios FT- Firma Tainhas

O mesofilo é caracterizado como dorsiventral, onde o parênquima paliçádico possui de três a quatro camadas de células alongadas e compactas e o parênquima esponjoso apresenta células de tamanho irregular dispostas em média por cinco ou seis camadas celulares (Figura 8).

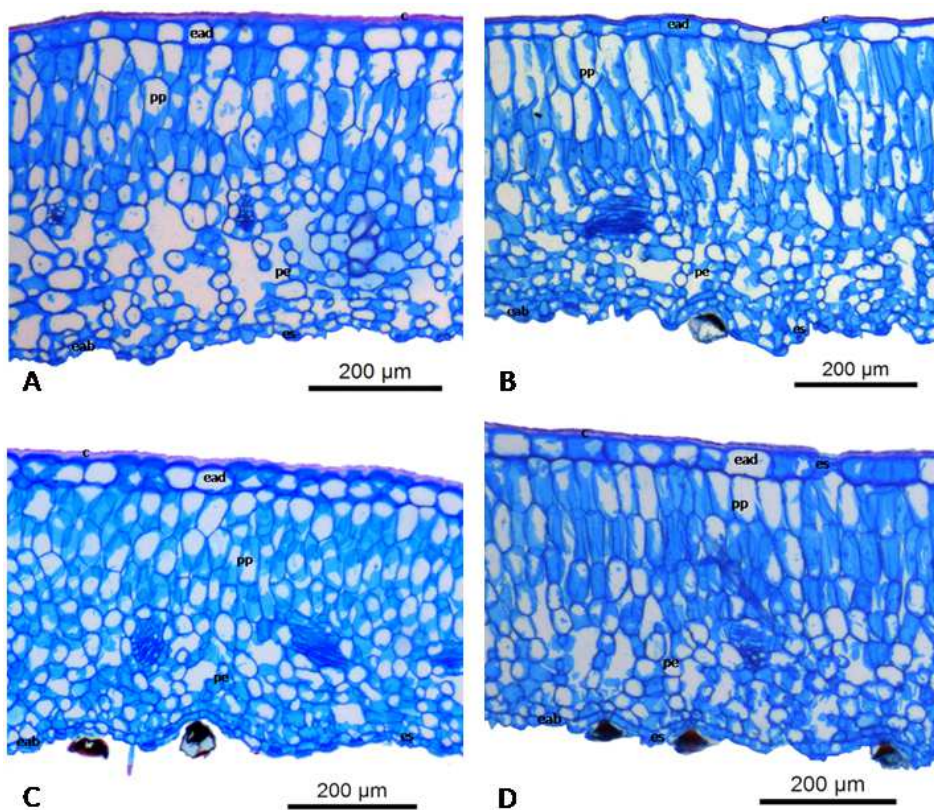


Figura 8 - Seções transversais do mesofilo para as quatro populações estudadas. A- Autódromo B – Fepagro C - Faxinal dos Pelúcios D - Firma Tainhas. Legenda: c– cutícula ead- epiderme adaxial pp- parênquima paliçádico pe- parênquima esponjoso eab- epiderme abaxial es- estômato.

A nervura central apresenta uma variação na quantidade de feixes entre as populações estudadas. Nas populações da área do Autódromo e da Fepagro variam de três a seis feixes, enquanto que para as populações localizadas em Faxinal dos Pelúcios e em Firma Tainhas variam de um a três feixes. Todos os feixes analisados são do tipo bicolateral.

3.2 Análise histoquímica foliar

Os resultados das análises histoquímicas estão representados no Quadro 1. O teste com Azul de Bromofenol apresentou resultados negativos para todas as populações analisadas. Fenólicos foram encontrados na cutícula, paredes celulares dos elementos traqueais e também no vacúolo de tricomas glandulares (Figuras 9- A/B/C, 10- A/B/C, 11- A/B/C e 12- A/B/C). Pequena quantidade de grãos de amido foi evidenciada apenas na endoderme (Figuras 9- D, 10- D, 11- D e 12- D). O teste para flavonóides (DMACA) foi positivo na cutícula, paredes celulares dos elementos traqueais e no vacúolo de tricomas glandulares (Figuras 9 E/F, 10 E/F e 11- E/F 12- E/F/G). Houve detecção de alcalóides no vacúolo do parênquima esponjoso e paliçádico (Figuras 9-G, 10-G/H, 11-H e 12-G/H). O teste com floroglucina evidenciou a presença de lignina nas paredes celulares dos elementos traqueais (Figuras 9-H, 10-H, 11-H e 12- I). Terpenos (óleos essenciais) foram encontrados no

vacúolo do parênquima paliçádico, esponjoso e tricomas glandulares e também no citoplasma (Figuras 9-I/J, 10-I/J, 11-I/J e 12- J). Lipídios foram identificados na cutícula, no vacúolo do parênquima paliçádico e esponjoso, no xilema e floema (Figuras 9- K/L, 10- K/L, 11- K/L e 12- K/L). Não houve diferença histoquímica qualitativa entre as quatro populações.

Quadro 1 - Análises histoquímicas foliares de *Trichocline macrocephala* nas populações estudadas. + Reação positiva para o metabólito; - Reação negativa para o metabólito.

Cutícula (C); Parênquima paliçádico (PP); Parênquima esponjoso (PL); Floema (F); Xilema (X); Endoderme (E).

| Reagente | Metabólito | Autódromo | | | | | | Faxinal dos Pelúcios | | | | | | Fepagro | | | | | | Firma Tainhas | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|-----------|----|----|---|---|---|----------------------|----|----|---|---|---|---------|----|----|---|---|---|---------------|----|----|---|---|---|
| | | C | PP | PL | F | X | E | C | PP | PL | F | X | E | C | PP | PL | F | X | E | C | PP | PL | F | X | E |
| Azul de Bromofenol | Proteína | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cloreto Férrico | Derivados fenólicos totais | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Floroglucina em meio ácido | Lignina | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - |
| DMACA | Flavonóides | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Dragendorff | Alcalóides | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Lugol | Amido | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| NADI | Terpenóides | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Sudan red B | Derivados lipídicos totais | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - |

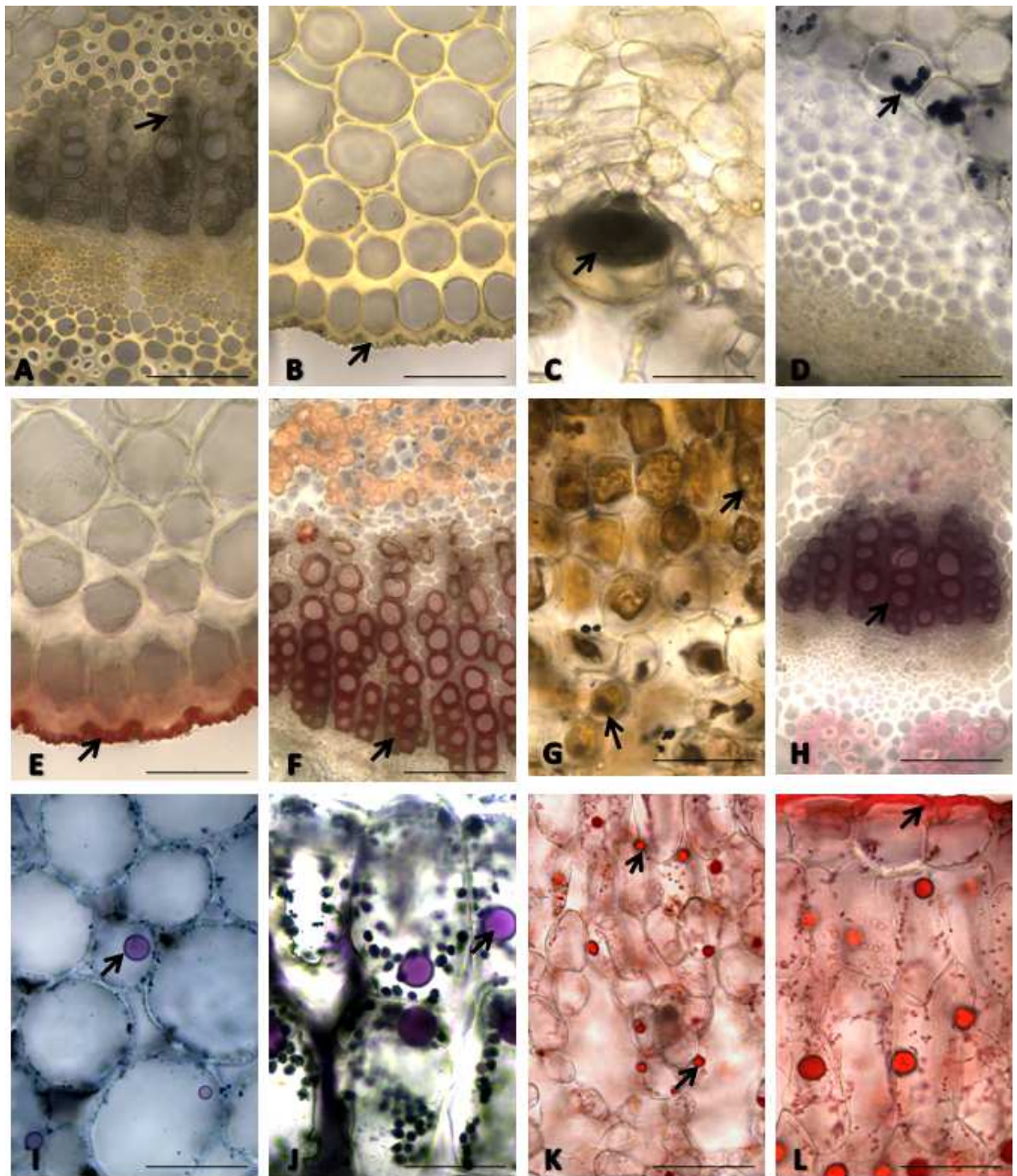


Figura 9 - Secções transversais da lâmina foliar de *Trichocline macrocephala* submetidas a testes histoquímicos - População Autódromo. A) derivados fenólicos nas paredes do xilema B) derivados fenólicos na cutícula C) derivados fenólicos em tricoma glandular D) grãos de amido na endoderme E) flavonóides na cutícula F) flavonóides nas paredes do xilema G) alcalóides no parênquima paliçádico e no parênquima esponjoso H) lignina nas paredes do xilema I) terpenos no parênquima medular J) terpenos no parênquima paliçádico K) gotículas lipídicas no parênquima esponjoso L) lipídios no parênquima paliçádico e na cutícula adaxial. Barra: 40µm

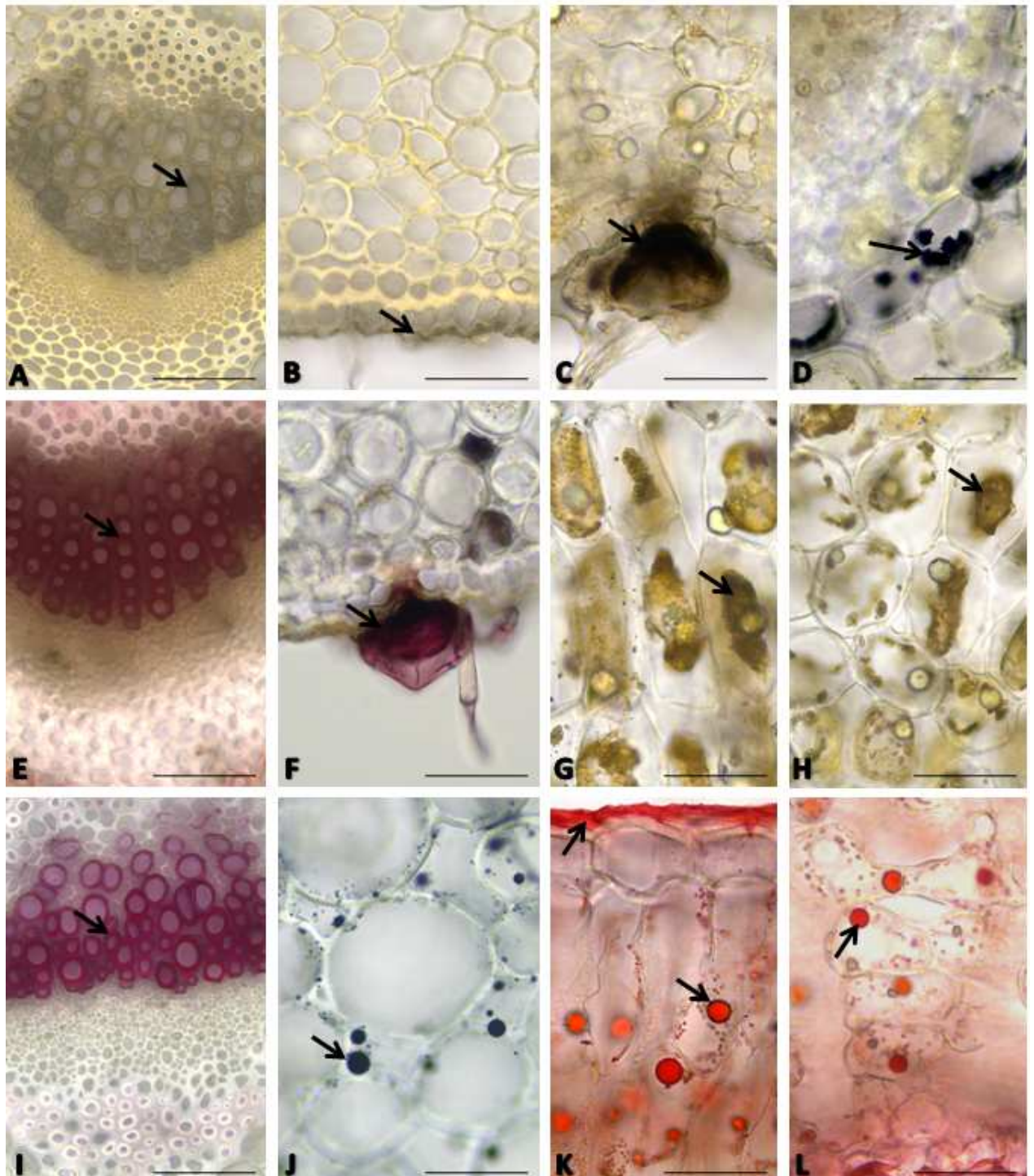


Figura 10 - Secções transversais da lâmina foliar de *Trichocline macrocephala* submetidas a testes histoquímicos - População Fepagro. A) derivados fenólicos nas paredes do xilema B) derivados fenólicos na cutícula C) derivados fenólicos em tricoma glandular D) grãos de amido na endoderme E) flavonoides nas paredes do xilema F) flavonoide no tricoma glandular (face adaxial) G) alcalóides no parênquima paliçádico H) alcaloides no parênquima esponjoso I) lignina nas paredes do xilema J) terpenos no parênquima medular K) gotículas lipídicas no parênquima paliçádico e na cutícula adaxial L) lipídios no parênquima esponjoso. Barra: 40µm

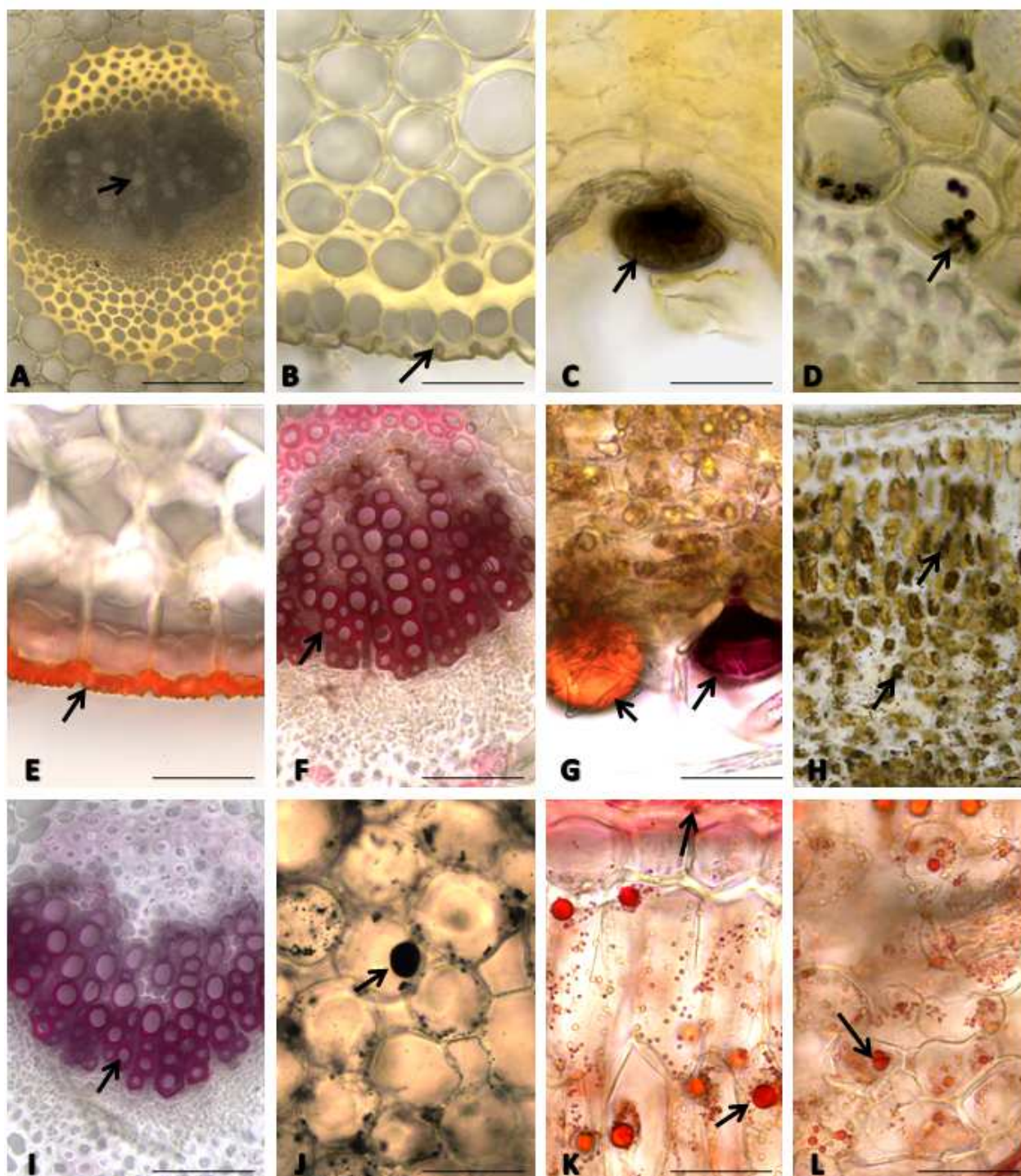


Figura 11 - Secções transversais da lâmina foliar de *Tricholine macrocephala* submetidas a testes histoquímicos - População Faxinal dos Pelúcios. A) derivados fenólicos nas paredes do xilema B) derivados fenólicos na cutícula C) derivados fenólicos em tricoma glandular D) grãos de amido na endoderme E) flavonoides na cutícula F) flavonoides nas paredes do xilema G) flavonoide no tricoma glandular (face adaxial) H) alcalóides no parênquima paliçádico e no parênquima esponjoso I) lignina nas paredes do xilema J) terpenos no parênquima medular K) gotículas lipídicas no parênquima paliçádico e na cutícula adaxial L) lipídios no parênquima esponjoso. Barra: 40µm Exceção letra H: Barra 10 µm

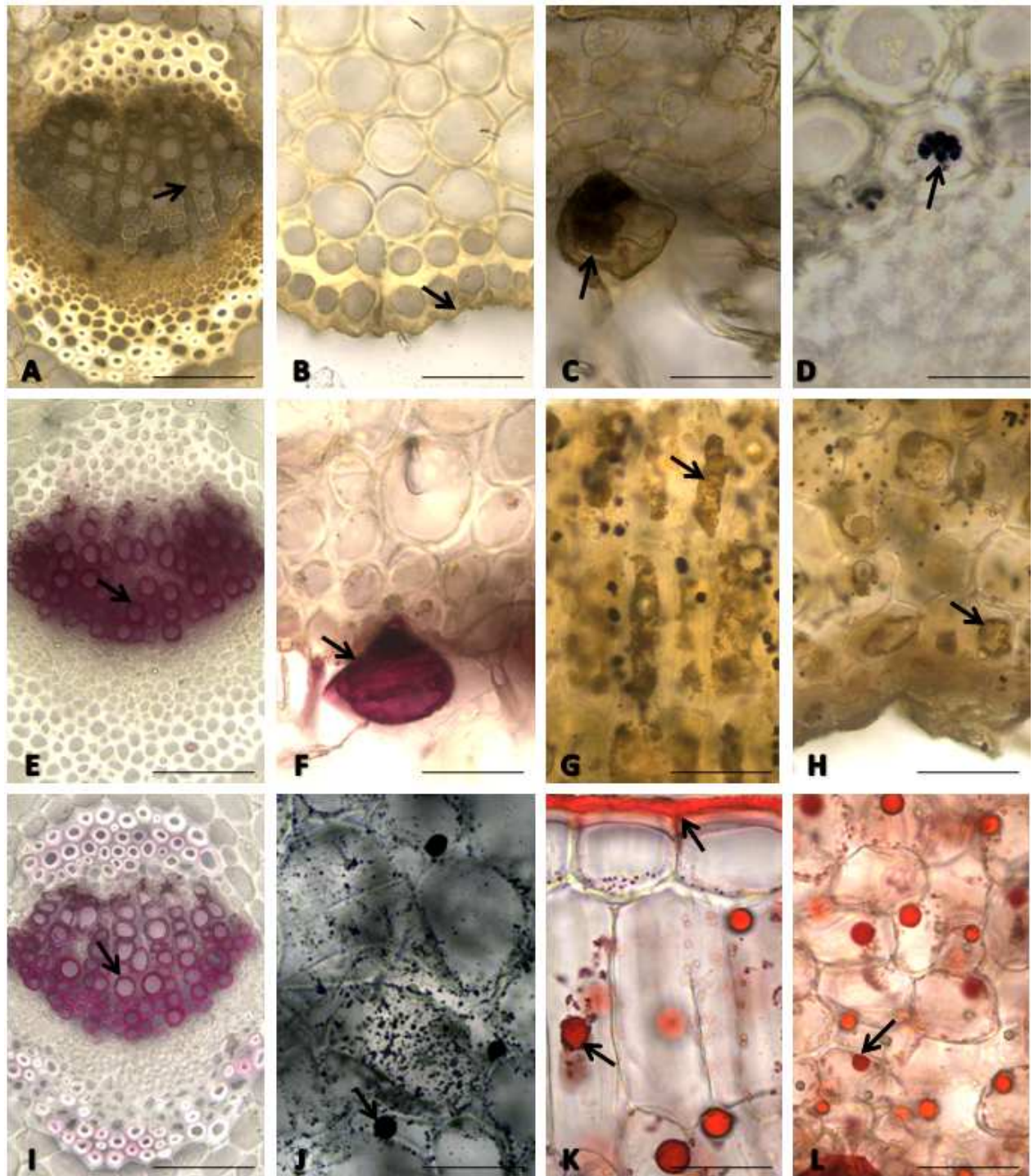


Figura 12 - Secções transversais da lâmina foliar de *Trichocline macrocephala* submetidas a testes histoquímicos - População Firma Tainhas. A) derivados fenólicos nas paredes do xilema B) derivados fenólicos na cutícula C) derivados fenólicos em tricoma glandular D) grãos de amido na endoderme E) flavonoides nas paredes do xilema F) flavonoide no tricoma glandular (face adaxial) G) alcalóides no parênquima paliçádico H) alcaloides no parênquima esponjoso I) lignina nas paredes do xilema J) terpenos no parênquima medular K) gotículas lipídicas no parênquima paliçádico e na cutícula adaxial L) lipídios no parênquima esponjoso. Barra: 40µm

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise micromorfológica foliar

Variações intraespecíficas na morfologia foliar são características geralmente associadas à história de vida, distribuição e disponibilidade de recursos ambientais (Metcalf & Chalk 1950, Eiten 1972, Bieras & Sajo 2009, Sakita & Kolb 2014). Briggs & Walters (1997) afirmam que a forma e tamanho das folhas podem mudar em virtude da disponibilidade de luz. Para as populações do Autódromo e Fepagro, onde a quantidade de indivíduos encontrada é maior, foi possível observar uma grande variabilidade na morfologia foliar, corroborando com a descrição para a espécie realizada por Pasini & Ritter (2012). Para as duas populações de Jaquirana, não foi possível constatar a ocorrência dessa diversidade devido ao menor número de espécimes no local.

A presença de tricomas glandulares na família Asteraceae é comum (Solereder 1908, Metcalfe & Chalk 1950) e podem ocorrer nos mais diversos órgãos (Apezato-da-Gloria et al. 2012). Segundo Robinson (2009) essa microcaracterística é importante para a sistemática da família. Tricomas nas folhas de *Trichocline macrocephala* provavelmente estejam associados a função de proteção contra perda de água. No caso dos tricomas glandulares, os quais secretam substâncias advindas do metabolismo das plantas podem atuar na defesa do vegetal contra patógenos e herbívoros (Trindade, Fernandes & Gonçalves, 2014).

Análises estatísticas mostraram que a população do Autódromo apresentou diferença para os caracteres morfológicos foliares de comprimento e largura em relação às demais populações. As análises de solo e dados de temperatura e pluviosidade dos locais parecem não explicar essas diferenças, uma vez que a população de *Trichocline macrocephala* encontrada na Fepagro está praticamente sob as mesmas características climatológicas e apresentou medidas dos caracteres semelhantes às populações coletadas em Jaquirana/RS. Uma hipótese para as diferenças encontradas na população do Autódromo poderia ser o contato com gases liberados por carros da pista de corrida nas proximidades dos espécimes. Sabe-se que os principais poluentes liberados no ar pela queima de combustíveis são: Dióxido de enxofre (SO₂), Monóxido de carbono (CO), Ozônio (O₃) (óxidos de nitrogênio (NO_x) e hidrocarbonetos), Óxidos de nitrogênio (NO_x) (Braga et al. 2001). O Autódromo Internacional de Tarumã existe há praticamente 50 anos e pelo fato de até o momento não existir estudos que indiquem de que forma a idade de um xilopódio possa ser estimada, torna-se difícil saber a idade dos exemplares da população de *Trichocline macrocephala* existente no local e conseqüentemente a quanto tempo essas plantas poderiam estar expostas à poluição. Diversos estudos mostram que plantas expostas a poluição estão sujeitas a alterações tanto em espaços intercelulares quanto nos tecidos que compõem o mesófilo (Bobrov 1955, Evans & Miller 1972, Evans et al. 1996, Alves et al. 2001, Gerosa et al. 2003, Gravano et al. 2003, Reig-Armiñana et al. 2004). No

entanto, ao contrário do observado neste estudo Jahan & Iqbal (1992) mostram que folhas das espécies de *Ficus bengalensis*, *Guaiacum officinale*, *Eucalyptus sp.*, coletadas em beira de estrada com acentuado tráfego de veículos e expostas a poluentes como monóxido de carbono, óxidos de azoto e enxofre, partículas em suspensão e chumbo no Paquistão, apresentaram redução do crescimento foliar (largura e comprimento). Outros autores também encontram resultados semelhantes para outras espécies como por exemplo, Preeti (2000) para *Thevetia nerifolia* e *Cassia siamea*; Dimitrova & Yurukova (2005) para *Plantago lanceolata*; Shafiq *et al.* (2009) para *Cassia siamea* e *Peltophorum pterocarpum*; Seyyednejad, Niknejad & Koochak (2011) para *Callistemon citrinus*; Leghari & Zaidi (2013) para *Vitis vinifera*, *Ficus carica* e *Pistacia vera*.

Diferenças no tamanho dos caracteres anatômicos medidos (epiderme adaxial, parênquima esponjoso e cutícula), também podem estar relacionados com a poluição. Um trabalho realizado por Ferdinand *et al.* (2000) com folhas de *Prunus serotina* que apresentam genótipo sensível para O₃, o parênquima esponjoso era maior em relação ao paliçádico corroborando com o resultado encontrado neste trabalho. No entanto, é notável que há uma vasta bibliografia mostrando que o parênquima esponjoso foi reduzido em folhas expostas a poluição. Dineva (2006) e Khosropour *et al.* (2018) afirmam que o parênquima esponjoso é mais vulnerável aos danos causados por poluentes. Essa sensibilidade do parênquima esponjoso se deve ao fato de apresentar maior espaço intercelular permitindo maior difusão dos poluentes gasosos (Nikolaevski 1963). Em contato com ozônio, por exemplo, os cloroplastos são os principais alvos de seu efeito fitotóxico (Sutinen *et al.* 1990) e provavelmente serão os primeiros sujeitos à degradação (Kangasjärvi *et al.* 1994).

A redução no parênquima esponjoso em espécies expostas a poluentes foi constatada por Alves *et al.* (2001) em *Tradescantia*; Gravano *et al.* (2003) em *Ailanthus altissima*; Alves, Tresmondi & Longui (2008) em *Eugenia uniflora* (Myrtaceae); Gostin (2009) em *Trifolium montanum* e *Trifolium pretense*; Pourkhabaz *et al.* (2010) em *Platanus orientalis*; Rashidi *et al.* (2012) em *Robinia pseudoacacia*; Ekpemerechi *et al.* (2017) em *Alchornea laxiflora*, *Alchornea cordifolia*, *Euphorbia heterophylla*, *Euphorbia hyssopifolia*, *Euphorbia hirta*, *Croton lobatus*, *Flueggea virosa*, *Manihot esculenta*, *Phyllanthus amarus* e *Acalypha ornata* e Dineva (2017) em *Acer campestre*.

Tendo em vista que a população de *Trichocline macrocephala* do Autódromo está em um local onde não há qualquer tipo de manejo, a quantidade de luz que chega aos espécimes é reduzida em virtude da alta vegetação do local. Segundo Vogelmann, Nishio & Smith (1996) o parênquima esponjoso pode maximizar a absorção de luz, espalhando e refletindo a luz que não foi absorvida pelo parênquima paliçádico, permitindo que haja maior aproveitamento dos fótons a serem utilizados na fotossíntese. Sendo assim, a baixa disponibilidade de luz poderia ser uma segunda hipótese para explicar o maior tamanho do parênquima esponjoso em relação ao paliçádico.

Segundo Metcalfe & Chalk (1950) estômatos do tipo anomocítico são comuns para a família Asteraceae. Estudos mostram que a característica anfistomática está relacionada com a grande disponibilidade de luz e condições de seca (mudanças constantes na quantidade de água disponível no solo), principalmente em plantas que apresentam crescimento rápido como as herbáceas (Jordan *et al.* 2014; Muir 2015). O resultado obtido neste trabalho corrobora com os apontamentos acima, pois os espécimes de *Trichocline macrocephala* ocorrem geralmente em ambientes abertos com grande disponibilidade de luz e que não estão sujeitos a precipitações constantes.

Normalmente, a cutícula grossa é uma adaptação foliar para ambientes xeromórficos. No entanto, em plantas submetidas a estresse da poluição essa característica é vista como mecanismo de adaptação (Ilykun 1970, Ninova 1970, Bonte *et al.* 1976) e proteção contra danos causados pelos poluentes (Ferdinand *et al.* 2000, Rashidi *et al.* 2012). Segundo Rashidi *et al.* (2012) a cutícula mais espessa foi observada em folhas de *Robinia pseudoacacia* expostas a poluentes atmosféricos, assim como Dineva (2017) para *Acer campestre* e Khosropour *et al.* (2018) para *Platanus orientalis*. Sendo assim, a cutícula mais espessa além de desempenhar o papel de proteção também ajuda no suporte mecânico, como por exemplo, evitando a quebra da folha (Onoda, Richards & Westoby 2012). Muitos autores afirmam que a espessura cuticular pode variar entre populações diferentes da mesma espécie que estejam em locais distintos sob condições ambientais diferentes (Bieras & Sajo 2009; Rossatto & Kolb 2010; Ariano & Silva 2016).

Em relação ao tamanho das células da epiderme, parece não haver um padrão. Gostin (2009) observou que as células da epiderme adaxial eram maiores nas folhas de plantas expostas a poluição. No entanto, resultado oposto foi observado por Stevovic, Vesna e Dusica (2010) em folhas de *Tanacetum vulgare* e Dineva (2017) em *Acer campestre*, Ekpemerechi *et al.* (2017) ao estudar dez espécies de Euphorbiaceae de três locais com níveis de poluição diferente (área urbana, sub-urbana e rural) constataram que a redução da epiderme adaxial aumentava de acordo com o nível de poluição do local, ou seja, os valores maiores observados foram na área urbana.

Em relação a variação na quantidade de feixes vasculares na nervura central não foram encontrados na literatura relatos que pudessem explicar esta característica. Essa variação é relatada apenas para indivíduos de espécies diferentes para o mesmo gênero, como relatado por Gogosz *et al.* (2012), que encontraram diferenças na quantidade de feixes na nervura central em espécies do gênero *Piper* (Piperaceae).

4.2 Análise histoquímica foliar

Derivados fenólicos foram detectados na cutícula, nas paredes do xilema e nos tricomas glandulares. A ocorrência destes derivados na cutícula está associado à fotoproteção em resposta à

radiação solar elevada, combatendo o excesso de estresse oxidativo (Agati *et al.* 2013, Barnes *et al.* 2015, Csepregi & Hideg 2018) ou atuando como antimicrobiano (Schenke *et al.* 2018). A presença de derivados fenólicos na família Asteraceae é comum sendo encontrado nos mais diversos gêneros, como por exemplo em *Achillea*, *Anthemis*, *Artemisia*, *Glebionis*, *Matricaria*, *Tanacetum* e *Tripleurospermum* (Cokak *et al.* 2017), *Lychnophora* (Pavarini *et al.* 2018) e *Moquiniastrum* (Gonçalves, Silveira & Oliveira 2019). A coloração do xilema pode ser devido à presença de taninos condensados, os quais atuam na defesa dos vegetais contra herbívoros (Ashok & Upadhyaya 2012, Taiz & Zeiger 2013) ou a de lignina (floroglucina) a qual desempenha função de resistência mecânica, impermeabilidade à água e resistência a patógenos (Serk 2015). Normalmente a presença de flavonóides identificada pelo reagente DMACA é a coloração azul, como observado por Silva Lopes *et al.* (2009) em glândulas secretoras foliares de *Polygonum hydropiperoides*, Sá & De Oliveira Santana (2016) em células epidérmicas e no floema de folhas de *Eugenia uniflora* e Royo *et al.* (2015) na região internerval foliar de *Anacardium humile* e *A. occidentale*. No entanto, a coloração magenta obtida neste trabalho, também é considerada como resultado positivo para flavonóides, segundo Ferreira *et al.* (2017).

Alcalóides foram detectados no vacúolo do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. A função dos alcalóides não está completamente elucidada, no entanto, acredita-se que esses compostos atuem na defesa do vegetal contra herbívoros (Taiz & Zeiger 2013). Cabe ressaltar que não foi encontrada na literatura, até o momento, qualquer citação da presença de alcalóides na tribo Mutisieae, Asteraceae.

Através do reagente de lugol, uma pequena quantidade de grãos de amido foi detectada apenas na endoderme (ao redor dos feixes vasculares). Além de atuar como reserva, o amido pode também ser uma estratégia adaptativa para espécies em condições ambientais adversas (Oliveira & Marquis 2002, Taiz & Zeiger 2013).

O reagente NADI confirmou a presença de terpenos (óleos essenciais) no parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e medular. A principal função conhecida para essa classe de metabólitos é atribuída à defesa vegetal (Taiz & Zeiger 2013, Pichersky & Raguso 2016).

Lipídios foram identificados na cutícula, parênquima paliçádico e esponjoso. A presença da cutícula tem por finalidade proteger a folha contra dessecação e ataque de patógenos (Yeats & Rose 2013). No entanto, a ocorrência de gotículas lipídicas em ambos os parênquimas é relativamente comum e já foi citada por outros autores como por exemplo, Kitajima & Landin (1968) que evidenciam a presença de gotículas lipídicas refringentes em tecidos foliares (parênquima paliçádico e lacunoso) de espécies de *Coffea* (Rubiaceae). Segundo os autores, essas gotículas não possuem qualquer semelhança com cromoplastos ou elaioplastos. Budel *et al.* (2018) citam a presença de

"corpos de óleo" no parênquima paliádico e esponjoso de algumas espécies de *Baccharis* (Asteraceae). Em um estudo de caracterização morfoanatômica foliar de *Peumus boldus* (Lamiaceae) realizado por Ribeiro *et al.* (2017), teste com Sudan IV, confirmou a presença de gotículas de lipídios em todo mesofilo foliar. Gotículas também foram reveladas por Sudan IV no parênquima paliádico de *Diodellateres* (Rubiaceae). Apesar da citação por diferentes autores, a função dessas gotículas ainda é desconhecida. No entanto, McNair (1945) ressalta que condições ambientais são extremamente influenciáveis na formação de lipídios em folhas. Tuttle (1919) após examinar diversas espécies de arbustos e herbáceas, concluiu que em folhas de *Linnaea* o amido forma-se em temperaturas elevadas e converte-se em óleo com a redução da temperatura. Karunen & Liijenberg (1981) constataram que a quantidade de lipídios em folhas de *Dicranun elongatum* é alterada de acordo com a estação do ano. Alteração na quantidade de lipídios no mesofilo foliar em virtude de mudanças sazonais para *Diapensia lapponica* (Diapensiaceae) também foi relatada por Pihakaski *et al.* (1987). Lersten *et al.* (2006) sugerem duas possíveis funções para os corpos oleosos: produtos intermediários da fotossíntese e adaptação a baixas temperaturas. Alguns estudos também indicam que gotículas lipídicas podem estar associadas a mecanismos de defesa contra patógenos. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, elas podem desempenhar função antifúngica produzindo reação do tipo fitoalexínica. Nesse caso, esses lipídios seriam armazenados em folhas senescentes combatendo a proliferação de fungos a partir destas para tecidos jovens e saudáveis (Shimada *et al.* 2014, Shimada & Hara-Nishimura 2015). Entretanto, é possível que essas substâncias contribuam para a resistência a estresses abióticos (Da Conceição & Aoyama 2015).

Não houve diferença histoquímica qualitativa entre as quatro populações.

4.3 Análise de solo

O solo é um dos fatores abióticos que mais influencia na biossíntese de compostos secundários nas plantas variando ou alterando sua quantidade. De Souza *et al.* (2018) mostraram que o teor de quercitrina (flavonoide) em *Solidago chilensis* foi superior em solos com maior disponibilidade de cálcio e baixos teores de alumínio no solo. Ao contrário, Teixeira *et al.* (2016) concluíram que baixos teores de cálcio, magnésio, fósforo e potássio influenciaram de forma positiva nos teores de flavonoides em *Morinda citrifolia*. Segundo Jacobson *et al.* (2005) níveis mais elevados de fenois totais e taninos em *Stryphnodendron polyphyllum* estão associados a baixa fertilidade química do solo. Seixas *et al.* (2012) mostrou a composição e o teor de óleo essencial de *Cymbopogon nardus* são alterados de acordo com a dosagem de adubo mineral utilizado no solo. Santos (2019) mostra que altos teores de taninos, antocianinas, fenois totais e pedunculagina estão presentes em frutos de *Myrciaria cauliflora* cultivada em solos com baixos níveis de nutrientes, além

disso, observou também que solos com maior pH e níveis elevados de P possuem teores elevados de ácido elágico, vescalagina e castalagina nas sementes. Tendo em vista que o solo analisado dos municípios de Jaquirana e Viamão possuem origem diferente esperava-se que a histoquímica das populações analisadas pudessem apresentar alguma diferença, uma vez que, a nutrição mineral influencia na fitoquímica vegetal. No entanto, observou-se que não houve diferença qualitativa entre as populações e o solo apresentou praticamente as mesmas características químicas. De acordo com a tabela Interpretação de Níveis de Fertilidade pode-se concluir que apenas potássio e boro apresentaram níveis diferentes para a população de *T. macrocephala* encontrada no Autódromo se comparada às demais populações. De acordo com Taiz *et al.* (2017) o pH do solo pode influenciar na absorção de minerais pela planta e estudos mostram que há relação positiva entre o aumento do pH e a adsorção de boro no solo (Yamada 2000; Soares, Casagrande & Ferracciú Alleoni 2008). Sugere-se então que embora o solo coletado no Autódromo tenha apresentado nível alto desses elementos, a disponibilidade para a absorção pelas plantas torna-se limitado em virtude do pH baixo encontrado no local, ou seja, este atributo não pode ser utilizado para explicar as diferenças anatômicas encontradas para essa população.

5 CONCLUSÕES

As análises micromorfológicas e de medidas de caracteres morfológicos da folha permitiram detectar diferenças entre as populações. A histoquímica se mostrou uma ferramenta eficiente para detecção e histolocalização de metabólitos presentes na folha, detectando inclusive presença de alcalóides, substância ainda não havia sido relatada para este grupo até o momento.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho e os já existentes na literatura conclui-se que não há um padrão. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

6 REFERÊNCIAS

- Agati G, Brunetti C, Ferdinando MDi, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M (2013) **Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past.** Plant Physiol. Biochem., **72**, 35–45.
- Ariano APR, Silva IV (2016) **Leaf anatomy of *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) in three phytophysiognomies of the Mato Grosso State, Brazil.** Acta Bot. Bras., 45 , pp. 337-346
- Ashok PK & Upadhyaya K (2012). **Tannins are astringent.** Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 1(3), 45-50.
- Barnes PW, Flint SD, Ryel RJ, Tobler MA, Barkley AE & Wargent JJ (2015). **Rediscovering leaf optical properties: New insights into plant acclimation to solar UV radiation.** Plant Physiology and Biochemistry, 93, 94-100.
- Bencke GA. Biodiversidade. In: Chomenko L, Bencke GA. (2016). **Nosso Pampa Desconhecido.** Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul , p. 61.
- Berlyn GP, Miksche JP (1976) **Botanical microtechnique and cytochemistry.** The Iowa State University Press, Arnes. 326p. ill.
- Bieras AC, Sajo MG (2009) **Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants** Trees, 23, pp. 451-471
- Boldrini I (2009) A flora dos campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar VP *et al.*. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade.** Brasília: MMA, cap. 04, p. 66.
- Boldrini I, Overbeck G, Trevisan R (2015). Biodiversidade de plantas. In: Pillar Vp, Lange O. **Os campos do Sul.** Porto Alegre: Rede dos Campos Sulinos - UFRGS, .cap. 5, p. 51.
- Bosabalidis AM, Kofidis G (2002) **Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars.** *Plant Science* **163** , 375– 379.
- Brodribb TJ, Jordan GJ, Carpenter RJ (2013) **Unified changes in cell size permit coordinated leaf evolution.** *New Phytol* 199:559–570.
- Briggs D, Walters SM (1997) **Plant variation and evolution.** Cambridge University Press, New York, NY (USA) Cambridge, pp 512. In: Barbosa, J. M., dos Santos, C. F., Mendonça, A. H., Cerezini, M. T., & Silva, S. C. (2009). **Filtros ecológicos e competição: influência no padrão morfológico foliar.** Livro do curso de campo “Ecologia da Mata Atlântica”(G. Machado)
- Buckley TN, John GP, Scoffoni C, Sack L (2015) **How does leaf anatomy influence water transport outside the xylem?** *Plant Physiol* 168: 1616–1635.

Cabral Rdc, Melo Junior Jcf De, Matilde-Silva M (2018) **Plasticidade morfoanatômica foliar em Smilaxcampestris (Smilacaceae) em gradiente ambiental de restinga, SC, Brasil.** Hoehnea, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 173-183.

Cabrera AL, Klein RM (1973) **Compostas. Tribo: Mutisieae.** Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.

Calabria LM, Emerenciano VP, Scotti MT, Mabry TJ (2009). **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae.** International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, 73-88.

Colak N, Inceer H, Gruz J, Strnad M, Hayirlioglu-Ayaz S, Aksu Kalmuk N & Ayaz FA (2017). **Antioxidant capacity of phenolics in some representatives of the tribe Anthemideae (Asteraceae) from Turkey.** Int J Pharm Sci Res, 8(8), 3265-3277.

Comissão de Química e Fertilidade do Solo (CQFS) (2016). **Manual de Calagem e Adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** SBCS, NRS-[s.l.]. 376p.

Csepregi K & Hideg É (2018). **Phenolic compound diversity explored in the context of photo-oxidative stress protection.** Phytochemical analysis, 29(2), 129-136.

David R, Carde JP (1964) **Coloration differentielle des inclusions lipidiqueetterpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactifNadi.**Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, v.258, p.1338-1340.

de Borba ICG, Bridi H, Soares KD, Apel MA, Von Poser GL & Ritter MR (2019). **New natural coumarins from Trichocline macrocephala (Asteraceae).** Phytochemistry Letters, 32, 129-133.

Delucia EH, Nelson K, Vogelmann T C, Smith Wk (1996). **Contribution of intercellular reflectance to photosynthesis in shade leaves.** Plant, Cell and Environment. 19(2), 159–170.

Dickison WC (2000) **Integrative plant anatomy.** New York: Academic Press. 533p.

de Moraes Gonçalves V, Da Silveira M & de Oliveira PD (2019). **Genus Moquiniastrum (Asteraceae): Overview of Chemical and Bioactivity Studies.** Current Bioactive Compounds, 15(4), 377-398.

de Souza BADA, Gomes EN, Francisco F, Ferriani AP, do Amaral W & Deschamps C (2018). **Teores de quercitrina em acessos de Solidago chilensis Meyen (Asteraceae) e sua correlação com atributos químicos do solo.** Scientia Agraria, 19(2), 65-70.

Dôres RGR **Morphologic analysis and phytochemistry of fava d'anta (DimorphandramollisBenth).**2007. 396f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

Eiten G (1972) **The Cerrado vegetation of Brazil.** Botanical Review 38: 201-341.

Elias SRM, Assis RM, Stacciarini-Seraphin E, Rezende MH (2003) **Leaf anatomy in young plants of *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae).** J. Bot., 26: 169-174.

Fahn A (1986) **Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves.** Annals of Botany 57:631-637.

Fahn A, Cutler DF (1992) **Xerophytes** Encyclopedia of Plant Taxonomy, GebrüderBorntraeger, Berlin.

Ferreira BG, Falcioni R, Guedes LM, Avritzer SC, Antunes WC, Souza LA, Isaias RMS (2017) **Preventing false negatives for histochemical detection of phenolics and lignins in PEG-embedded plant tissues.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry 65, 105– 116.

Feucht W, Schid PPS (1983) **Selektiver histochemischer nachweis von flavanen (catechinen) mit p-dimethylaminozimtaldehyd in sprossen einiger obstgehölzi.** Gartenbauwissenschaft, v. 48, , p. 119-124.

Fontquer, P. 1982. **Dicionário de botânica.** Barcelona, Editorial Labor S.A.

Funk, V.A. et al. **Systematics, Evolution and Biogeographics of Compositae.** Vienna: IAPT. 2009, 965p.

Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN (2004) **Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities.** Current Pharmaceutical Design, v. 10, n. 30, p. 3813-3833.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. (2007). **Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Quimica Nova, v. 30, n. 2, p. 374–381.

Gogosz AM, Boeger MRT, Negrelle RRB, Bergo C (2012) **Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae).** Rodriguésia 63, 405-417.

Gomes AF, Almeida MP, Leite MF, Schwaiger S, Stuppner H, Halabalaki M, Amaral JG, David JM (2017) **Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*.** Food Chemistry.

Hernández MP, Katinas L, Arambarri AM (2015). **Taxonomic value of histochemical features of the style in early lineages of Asteraceae.** Acta Botanica Brasilica, 29(4), 575-585.

Heywood VH, Harborne JB, Turner B L (1977). **Biology and Chemistry of the Compositae.** Academic Press.

Huang ZA, Zhao T, Fan HJ, Wang N, Zheng SS, Ling HQ (2012) **The up-regulation of ntn2 expression at low temperature is required for anthocyanin accumulation in juvenile leaves of l- transgenic tobacco (*Nicotianatabacum* L.) J.Genet. Genomics. 20, p. 149-156.**

Jacobo-Velázquez DA, González-Agüero M, Cisneros-Zevallos L (2015) **Cross-talk between signaling pathways: the link between plant secondary metabolite production and wounding stress response.** Scientific reports, 5, 8608.

Jacobson TKB, Garcia J, da Costa Santos S, Duarte JB, Farias JG & Kliemann HJ (2005). **Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.).** Pesquisa Agropecuária Tropical, 35(3), 163-169.

Johansen DA (1940) **Plant microtechnique.** McGraw-Hill Company Inc, New York.

Jordan GJ, Carpenter RJ, Brodribb TJ (2014) **Using fossil leaves as evidence for open vegetation.** PalaeogeogrPalaeoclimatolPalaeoecol 395:168–175.

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

Kim JA, Kim HS, Choi SH, Jang JY, Jeong MJ, Lee SI (2017) **The Importance of the Circadian Clock in Regulating Plant Metabolism.** Int. J. Mol. Sci. , 18, 2680.

Kraus JE, Arduin M (1997) **Manual Básico de métodos em morfologia vegetal.** EDUR, Seropédica.

Lattanzio V, Cardinali A, Ruta C, Fortunato Im, Lattanzio V, LinsalataVI, Cicco N (2009) **Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress.** Environ. Exp. Bot. 65, 54-62.

Lavola A, Julkunen-Tiitto R, Rosa Tm De La, Lehto T, AphaloPj (2000) **Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure.** Physiol. Plantarum, 109, pp. 260-267.

Li Yang, Kui-Shan Wen, Xiao Ruan, Ying-Xian Zhao, Feng Wei & Qiang Wang (2018) **Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors** Molecules, 23(4), 762.

Lima AL (2010) 155p.. **O papel ecológico da neblina e a absorção foliar de água em três espécies lenhosas de matas nebulares, SP-Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, 2010.

Lopes DES, Oliveira VDC, Macedo JF, Oliveira AB & Jácome RLRPaiva (2009). **Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Polygonum hydropiperoides* Michx., Polygonaceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(3), 677-685.

Mazia D, Brewer PA, Alfert M (1953) **The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue.** Biological Bulletin 104: 57-67.

Metcalf CR, Chalk L (1950) **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses.** Oxford: Clarendon Press, v. 2.

Metcalfe Cr, Chalk L (1983) **Anatomy of the dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction**. New York: Oxford University, v. 2, 330p.

Mott K A, Gibson, AC, O'LEARY J W (1982). **The adaptive significance of amphistomatic leaves**. *Plant, Cell & Environment*. 5(6), 455–460.

Muir CD, Hangarter RP, Moyle LC, Davis PA (2014) **Morphological and anatomical determinants of mesophyll conductance in wild relatives of tomato (Solanum sect. Lycopersicon, sect. Lycopersicoides; Solanaceae)**. *Plant, Cell and Environment* 37, 1415– 1426.

Muir CD (2015) **Making pore choices: repeated regime shifts in stomatal ratio**. *Proc BiolSci* 282:20151498.

Muniz LF, Bombo AB, Filartiga AL, Appezzato-da-Glória B (2018) **Can climate and soil conditions change the morpho-anatomy among individuals from different localities? A case study in Aldama grandiflora (Asteraceae)**. *Brazilian Journal of Biology*, 78(4).

Oliveira PS, Marquis RJ (2002) **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna**. Columbia University Press, New York .

Onoda Y, Richards L, Westoby M (2012) **The importance of leaf cuticle for carbon economy and mechanical strength**. *New Phytologist*, 196(2), 441–447.

Pacifico R, Almeda F, Do Carmo AA & Fidanza K (2019). **A new species of Trembleya (Melastomataceae: Microlicieae) with notes on leaf anatomy and generic circumscription**. *Phytotaxa*, 391(5), 289.

Paiva JGA, Fank-De-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D (2006) **Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável**. *Acta Botanica Brasilica*, 20, 257– 264.

Parkhurst DF (1994) **Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves**. *New Phytol* 126:449–479.

Pasini E, RitterMr (2012) **O gênero Trichocline Cass. (Asteraceae, Mutisieae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. *Revista Brasileira de Biociências*, v.10, n.4, p. 490–506.

Pavarini DP, Bauermeister A, Semir J, Monge M, Lopes JLC & Lopes NP (2018). **Phenolic Compounds from the Brazilian Genus Lychnophora Mart. (Asteraceae)**. *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*, 21–46.

Pearse AG (1985) *Histochemistry. Theoretical and applied, analytical technology*. 4th Ed. New York, Churchill Livingstone.

Pichersky E, Raguso RAC (2016). **Why do plants produce so many terpenoid compounds?** New Phytologist.

Plos A, Sancho G & Iharlegui L (2011). **Secretory structures of leaves of Ophryosporus Meyen (Asteraceae, Eupatorieae), a genus with medicinal properties.** The Journal of the Torrey Botanical Society, 138(4), 391-400.

Rossatto DR, Kolb RM (2010) **Gochnatia polymorpha (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions.** Acta Bot. Bras., 24 pp. 605-612

Rio Grande Do Sul (2003) Decreto nº Decreto Estadual n 42.099, de 01 de janeiro de 2003. Espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre.

Rio Grande Do Sul (2014) Decreto nº 52.109, de 19 de dezembro de 2014. Espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre.

Robinson H 2009. An introduction to micro-characters of Compositae. In: **Systematics, evolution and biogeography of Compositae** (V.A. Funk, A. Susanna, T.F. Stuessy & R.J. Bayer, eds.). International Association for Plant Taxonomy, Vienna, p. 89-99.

Roisenberg A, Viero AP (2000) O vulcanismo Mesozóico da Bacia do Paraná no Rio Grande do Sul. In: Holz M, De Ros L F (Org.). **Geologia do Rio Grande do Sul.**2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal Rio Grande do Sul, v.1. p.355-374.

Royo VDA, Mercadante-Simões MO, Ribeiro LM, de Oliveira DA, Aguiar MMR, Costa ER & Ferreira PRB (2015). **Anatomy, histochemistry, and antifungal activity of Anacardium humile (Anacardiaceae) leaf.** *Microscopy and Microanalysis*, 21(6), 1549-1561.

Sá RD, de Oliveira Santana A SC & Randau KP (2016). **Caracterização anatômica e histoquímica das folhas de Eugenia uniflora L.** Journal of Environmental Analysis and Progress, 1(1), 96-105.

Sakita HY, Kolb RM (2014) **Por dentro das folhas de plantas do cerrado.** Aprendendo Ciênc., 3, pp. 6-9.

Santos GA (2019). **Influência do solo de cultivo nos metabólitos das cascas e sementes dos frutos das jabuticabeiras.** Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2019.

Scatena V L & Scremin-Dias E. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. Capítulo 4, pagina 109 - 119. In: Appezzato-Da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (Eds.) **Anatomia vegetal.** 2a ed. Viçosa: Editora UFV, 2006.

Schenke D, Utami HP, Zhou Z, Gallegos MT & Cai D (2018). **Suppression of UV-B stress induced flavonoids by biotic stress: Is there reciprocal crosstalk?** Plant Physiology and Biochemistry.

Seixas PTL, de Castro HG, Cardoso DP, Júnior AFC, do Nascimento IR, & de Almeida Barbosa LC (2013). **Efeito da adubação mineral na produção de biomassa e no teor e composição do óleo essencial do capim-citronela.** Bioscience Journal, 29(4).

Serk, Henrik (2015). **Cellular aspects of lignin biosynthesis in xylem vessels of Zinnia and Arabidopsis.** Tese de Doutorado. Umeå universitet.

Shoemaker HE, Mc Lean EO, Pratt PF (1961) **Buffer methods for determining lime requirement of soil with appreciable amounts of extractable aluminium.** Soil Science Society of America Proceedings, Madison, v.25, p.274-277,.

Silva NS. (2016) 67 p.. **Crescimento e desenvolvimento de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hormen em diferentes condições de luminosidade.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, 2016.

Spitaler R, Schlorhauser PD, Ellmerer EP, Merfort I, Bortenschlager S, Stuppner H, Zidorn C (2006). **Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO.** Phytochemistry, 67(4), 409–417.

Stiling P, Cornelissen T (2007) **How does elevated carbon dioxide (CO²) affect plant–herbivore interactions? A field experiment and meta-analysis of CO²-mediated changes on plant chemistry and herbivore performance.** Glob. Change Biol., 13, pp. 1823-1842

Soares MR, Casagrande JC & Ferracciú Alleoni LR (2008). **Adsorção de boro em solos ácidos em função da variação do pH.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 32(1).

Solereider H 1908. **Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied botany.** Clarendon Press, Oxford. 1182p.

Song C, Härtl K, McGraphery K, Hoffmann T, & Schwab W (2018). **Attractive but toxic: Emerging roles of glycosidically bound volatiles and glycosyltransferases involved in their formation.** Molecular Plant.

Taiz L, Zeiger E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: _____. **Fisiologia Vegetal.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 13, p. 369 - 400.

Teixeira RA, de Sousa Brandão AD, Souza ES, Fernandes AR & do Amarante CB (2016). **Teores de flavonoides e nutrientes em plantas de noni cultivadas em solos com atributos químicos contrastantes.** Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 59(2), 196-202.

Trindade LMP, Fernandes YS & de Almeida Gonçalves L (2014). **Diversidade e desenvolvimento dos tricomas glandulares de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae-Eupatorieae)-uma planta endêmica do Cerrado de Goiás.** Iheringia. Série Botânica., 69(2), 235-243.

Ventrella MC, Nery L, Almeida AL, Coelho VPM (2013). **Métodos histoquímicos aplicados às sementes.** 1ed. Viçosa: UFV, 40p.

Yadav RK, Sangwan RS, Sabir F, Srivastava AK, Sangwan NS (2014) **Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L.** Plant Physiol. Biochem., 74, pp. 70-83.

Yamada T (2000). **Boro: será que estamos aplicando a dose suficiente para o adequado desenvolvimento das plantas.** Informações Agronômicas, 90, 1-5.

Yeats TH, Rose JK (2013) **The formation and function of plant cuticles.** Plant Physiol., 163 , pp. 5-20.

Yoder LR, Mahlberg PG (1976) **Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae).** American Journal of Botany 63:1167-1173.

Wink M (2018). **Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction?**Frontiers in Physiology, 9.

Zardini EM (1975) **Revision del genero *Trichocline* (Compositae).** Darwiniana 19:618-733.