

Caracterização Histológica das folhas de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman (Avicenniaceae)

(Histological Characterization of leaves of *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman (Avicenniaceae))

Maria Bernadete Gonçalves Martins¹, Veridiana Lisbôa Moreira²

¹UNESP/Campus do Litoral Paulista /São Vicente/SP
bernadete@csv.unesp.br

²G- UNESP/Campus do Litoral Paulista /São Vicente/SP
verilisboa@terra.com.br

Abstract. *The mangroves are characteristic coastal ecosystems of tropical and subtropical regions, where adult trees require adaptations special for a bigger resistance to the salinity, allowing its survival in this type of environment. With the objective to study the leaf anatomy, studies of optic microscopy and scanning electron microscopy had been carried through with *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman (Avicenniaceae), evidencing the salt glands. The preparation of the material for permanent histological blade methods constituted of usual processes, such as: fixing FAA 50% for 24h, dehydration in alcoholic series (ethyl), infiltration in synthetic resin, microtomy technique, spreading of the sections, coloration and mounting on permanent slides. It was used the clearing technique and coloration in blue toluidina. The used material for scanning electron microscopy was fixed in a solution of modified Karnovsky, dehydrated, dry to the critical point and metallized. The transversal cut of the leaf evidenced that the epidermis is composed for an only layer of cells, re-covered for cuticle thick, and followed of four the five layers of cells, that they constitute hypodermis. Palisade parenchyma is formed by two the three layers of cells and lacunary parenchyma is constituted of six the seven layers of small and uniform cells, with few intercellular spaces. The venation is brachidodromous, presenting abundant enlarged tracheid and characteristic intermarginal space. In the adaxial epidermis, spraying salt glands had been observed, in small depressions, being the abaxial epidermis total re-covered by these glands.*

Keywords: *anatomy; *Avicennia schaueriana*; salt gland; mangrove.*

Resumo. *Os manguezais são ecossistemas costeiros característicos de regiões tropicais e subtropicais, onde árvores adultas requerem adaptações especiais para uma maior resistência à salinidade, permitindo sua sobrevivência neste tipo de ambiente. Com o objetivo de estudar a anatomia foliar, foram realizados estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura com *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman (Avicenniaceae), evidenciando as glândulas de sal. O preparo do material para laminário histológico constituiu de processos usuais, tais como: fixação em FAA 50% por 24h, desidratação em série alcoólica (etílica), infiltração em resina sintética, emblocamento, seccionamento, coloração e montagem de lâminas permanentes. Utilizou-se a técnica de diafanização e o*

corante azul de toluidina. O material usado para microscopia eletrônica foi fixado em uma solução de Karnovsky modificada, desidratado com acetona, sendo posteriormente submetido à secagem até o ponto crítico, fixado a um suporte através de um adesivo condutor e metalizado. O corte transversal da folha evidenciou que a epiderme é composta por uma única camada de células, recoberta por cutícula espessa, seguida de quatro a cinco camadas de células, que constituem a hipoderme. O parênquima paliádico é formado por duas a três camadas de células e o parênquima lacunoso é constituído de seis a sete camadas de células pequenas e uniformes, com poucos espaços intercelulares. A venação é braquidódroma, apresentando abundantes traqueídeos enlarguecidos e espaço intermarginal característico. Na epiderme adaxial, foram observadas glândulas de sal esparsas, situadas em pequenas depressões, sendo a epiderme abaxial totalmente recoberta por estas glândulas.

Palavras-Chave. anatomia; *Avicennia schaueriana*; glândula de sal; mangue.

1. Introdução

Os manguezais são ecossistemas característicos de regiões tropicais e subtropicais estando representados em quatro continentes e seis regiões geográficas do planeta. As regiões de maior ocorrência são América Central e Caribe, Índia, Península da Indochina, Brasil e Austrália. São compostos por árvores e arbustos que crescem em zona costeira protegida, planícies e praias lodosas, desembocaduras de rios, pertencendo a famílias de espécies com grande tolerância a águas salgadas ou salobras (MATTOS-FONSECA & ROCHA, 2004).

Os manguezais são ecossistemas costeiros onde o ambiente terrestre se encontra em transição com o ambiente marinho e estão sujeitos ao regime das marés. Nestes ambientes, a velocidade das correntes é reduzida, resultando em uma intensa deposição de detritos orgânicos e sedimentos que são trazidos principalmente pelos rios; ocorre também a junção das águas doce e salgada, formando a água salobra. Desta maneira, partículas de argila e matéria orgânica se depositam sobre as margens, formando um solo lodoso, com baixos teores de oxigênio, ou seja, anaeróbico (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; BRUNO, 1999). As árvores adultas requerem adaptações, tais como mecanismos que oferecem uma maior resistência à salinidade, permitindo a sua sobrevivência neste tipo de ambiente (OSBORNE & BERJAK, 1997).

A flora dos manguezais é composta por uma intensa vegetação de halófitas, que são espécies próprias para ambientes salinos, com pouco oxigênio e freqüentemente inundado pelas marés. As principais espécies de mangue são plantas de porte arbóreo, dentre as quais se destacam: o mangue preto ou siriúba (*Avicennia schaueriana*), o mangue vermelho ou bravo (*Rhizophora mangle*), e o mangue branco ou tinteira (*Laguncularia racemosa*). Além de uma variedade de vegetais como bromélias, samambaias do mangue, gramíneas como a *Spartina*, liquens e algas.

O gênero *Avicennia* L., foi incluído inicialmente na família Verbenaceae, mas se difere desta em relação à anatomia foliar, placentação, viviparidade incipiente e morfologia da semente (TONLINSOM, 1986). Contudo, hoje sua segregação como uma família distinta (Família Avicenniaceae) é largamente aceita. Este gênero tem ocorrência restrita às áreas mais afastadas da influência das marés (menor energia), locais estes de topografia geralmente mais elevada, com sedimento mais seco e mais arenoso, conseqüentemente com menor freqüência de inundações. Os seus propágulos são pequenos, leves e sempre flutuam, necessitando de um período maior, livre da influência das oscilações das marés, para efetuar sua fixação ao substrato, podendo permanecer meses flutuando no mar. Isto permite que estes vegetais

percorram grandes distâncias e colonizem novos ambientes. As folhas apresentam coloração verde clara, são brilhantes e com ápice arredondado, as quais possuem glândulas que expelem sal (BRUNO, 1999; SOARES, 1995). Glândulas de sal, são tricomas presentes em folhas de plantas que ocupam ambiente salino. Tais estruturas evitam um nível nocivo de acúmulo de íons minerais nos tecidos de algumas espécies de halófitas, que se desenvolvem em manguezais, secretando o excesso de sal na forma de soluções salinas (CASTRO & MACHADO, 2003).

Segundo BALL (1988), SCHOLANDER *et al.* (1962) e MUNNS (1988), espécies de mangue que apresentam folhas com glândulas secretoras, transportam relativamente mais sal no xilema, sendo que a salinidade causa mudanças na composição dos fluídos. No entanto, SOBRADO & GREAVES (2000) mostraram que o gênero *Avicennia* está largamente adaptado para excluir íons de Sódio e Cloro através de suas glândulas de sal, ocupando áreas intertidais de média a alta, onde a salinidade é elevada e oscilante, oferecendo uma maior tolerância ao gênero à ocupação desses ambientes altamente salinos. Contudo, a excreção do sal não permite somente o desenvolvimento em habitats salinos, mas também fornece proteção contra herbivoria (MAUSETH, 2003).

As espécies *A. germinans* L. e *A. schaueriana* Stapf & Leechman (Avicenniaceae) são as duas únicas espécies do gênero *Avicennia* que ocorrem nos manguezais do Brasil.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização histológica foliar de *Avicennia schaueriana*, evidenciando as glândulas de sal, através de estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura.

2. Materiais e Métodos

Os exemplares da espécie *Avicennia schaueriana* foram coletadas, na região de Proteção Ambiental Iguape, Cananéia, Peruíbe (IBAMA/APA/CIP). Foi realizado o preparo de exsicatas, para se obter uma precisa identificação em herbário, confirmando desta maneira a espécie em estudo.

2.1 Microscopia Óptica

Venação: O estudo do sistema de venação de órgãos de plantas jovens e de folhas adultas tem sido executado usando-se não somente métodos anatômicos e citológicos, mas também técnicas de clarificação e coloração, tais como a diafanização.

Neste caso foram utilizadas apenas folhas adultas, sendo o processo da seguinte forma: as folhas inteiras foram colocadas no Hidróxido de Sódio (NaOH) a 5% até ficarem amareladas, logo foram lavadas com água e imersas no Hipoclorito de Sódio (NaClO) a 20% por aproximadamente 20 minutos para clarificarem, lavadas, e em seguida colocadas no Azul de Toluidina aquoso para coloração. (O'BRIEN *et al.*, 1964). Após todos estes procedimentos as folhas foram submetidas a uma desidratação alcoólica, passando pelos álcoois 30%, 50%, 60%, 70%, 80% e 96%, ficando aproximadamente 10 minutos em cada um deles, e finalizando com xilol, para montagem das lâminas permanentes (FELIPE & ALENCASTRO, 1966).

Laminário Histológico: Foram coletadas folhas adultas, sendo efetuados cortes transversais na região mediana da nervura central, mesófilo e bordo.

O preparo do material constituiu-se basicamente de processos usuais em microtomia, pelos quais se obteve um laminário histológico para a microscopia óptica. A metodologia foi realizada da seguinte forma: fixação do material em FAA 50% no vácuo durante 24 horas, desidratação em série alcoólica etílica, infiltração em resina sintética GMA (glicolmetacrilato), emblocamento, seccionamento por micrótomo, coloração com Azul de Toluidina (GERRITS, 1964), até a montagem das lâminas permanentes. As peças incluídas

em resina sintética foram seccionadas em micrótomo rotativo, obtendo-se secções transversais da folha com 4µm de espessura.

As imagens foram obtidas através de um microscópio Axiolab® Zeiss, interligado a um Sistema de Análise de Imagens por Computador (SAIC), utilizando o Programa KS-100® 3.0 Zeiss ou ligado a um estereomicroscópio Stemi® SV-6 (Zeiss), que permitiu o registro dos cortes histológicos.

2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

O material foi fixado em uma solução de Karnovsky modificado, composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5%, em tampão cacodilato de sódio, pH 7, 2, 0,1M e água destilada, por uma noite no vácuo. No dia seguinte foram feitas três lavagens com cacodilato 0,05M, com duração de 10 minutos cada e uma pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) overnight. Logo após, o material foi desidratado com acetona seguindo a série de concentrações: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. O material então foi levado à secagem até o ponto crítico, estando fixado a um suporte através de um adesivo condutor e em seguida metalizado com ouro (DANILATOS, 1988).

A análise foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura, localizado no NAP/MEPA, ESALQ – USP, Piracicaba/SP.

3. Resultados & Discussão

3.1 Microscopia Óptica

Morfologia e Venação Foliar: *Avicennia schaueriana* possui folhas opostas cruzadas, simétricas, obovadas, inteiras, unilobadas, com base cuneada, ápice retuso com ângulo obtuso e inserção de pecíolo marginal. A venação é braquidódroma, apresentando abundantes traqueídeos alargados e espaço intermarginal característico (FIGURA 1 – A, B).

Anatomia Foliar: O corte transversal da folha evidenciou que a epiderme é composta por uma única camada de células, recoberta por cutícula espessa, seguida de quatro a cinco camadas de células, que constituem a hipoderme. O parênquima clorofiliano é formado por duas a três camadas de células paliçádicas e o parênquima lacunoso é constituído de seis a sete camadas de células pequenas e uniformes, com poucos espaços intercelulares. A epiderme abaxial possui estômatos com pequenas câmaras sub-estomáticas. A nervura principal apresenta feixe vascular central compacto (FIGURA 2 – A, B).

Na epiderme adaxial, foram observadas glândulas de sal esparsas, situadas em pequenas depressões (FIGURA 2 B), sendo a epiderme abaxial totalmente recoberta por estas glândulas (FIGURA 3 A; FIGURA 5 C). A glândula de sal é formada por uma célula coletora (CC), onde se visualizam o núcleo e o nucléolo, uma célula peduncular (CP) e três células secretoras (CS), revestidas por cutícula (FIGURA 3 B).

SHIMONY *et al.* (1973), descreveram através de microscopia óptica a glândula de sal da *Avicennia marina* sendo constituída por duas a quatro células coletoras, uma célula peduncular e oito células secretoras.

FITZGERALD *et al.* (1992) evidenciaram a glândula de sal na epiderme abaxial em *Avicennia marina* através de raio-x, mostrando a célula coletora, a célula peduncular e as células secretoras.

Segundo DSCHIDA *et al.* (1992), as glândulas de sal de *Avicennia germinans* são microscópicas e ocorrem em depressões na superfície adaxial da folha. Cada glândula contém de 8 a 12 células secretoras, uma célula peduncular e duas a quatro células basais, sendo que a glândula está recoberta pela cutícula. Há evidências que estas glândulas de sal possuam processos metabólicos funcionais, pois estas células possuem elevado número de

mitocôndrias, ribossomos, e outras organelas (TOMLINSON, 1986). Segundo SOBRADO (1999), o sal que é excretado por estas glândulas, é acumulado por vacúolos e possivelmente retranslocado pelo floema.

Estas glândulas podem ser impedidas por inibidores metabólicos, implicando assim, em uma dependência por fontes de energia, como o ATP (DSCHIDA *et al.*, 1992).

BALSAMO & THOMSON (1993) em estudo com *Avicennia germinans* (Avicenniaceae), observaram que as glândulas de sal situadas na epiderme adaxial são constituídas por onze células, sendo duas células coletoras, uma célula peduncular e oito células secretoras.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Através de estudos de microscopia eletrônica de varredura, observaram-se inúmeras glândulas de sal na epiderme abaxial (FIGURA 5 A, B e C). A epiderme adaxial é constituída de glândulas de sal dispostas de maneira esparsa, observando-se a célula coletora, célula peduncular e a cutícula recobrimdo as células secretoras (FIGURA 4 A e B).

BALSAMO & THOMSON (1995), utilizaram a microscopia eletrônica por criofatura para investigar a densidade e distribuição de partículas intramembranas na membrana plasmática e tonoplasto de células secretoras e não secretoras de folhas de *Avicennia germinans* (L.) Stearn. Os resultados sustentam a hipótese de que a secreção esta relacionada com mudanças ultraestruturais na membrana, e a possibilidade para secreção de sal é um processo ativo dirigido por proteínas integrais da membrana tais como H⁺/ATPase. Assim, as células hipodérmicas da folha podem funcionar como reservas de estocagem para sal e para água, sugerindo uma função reguladora na secreção de sal.

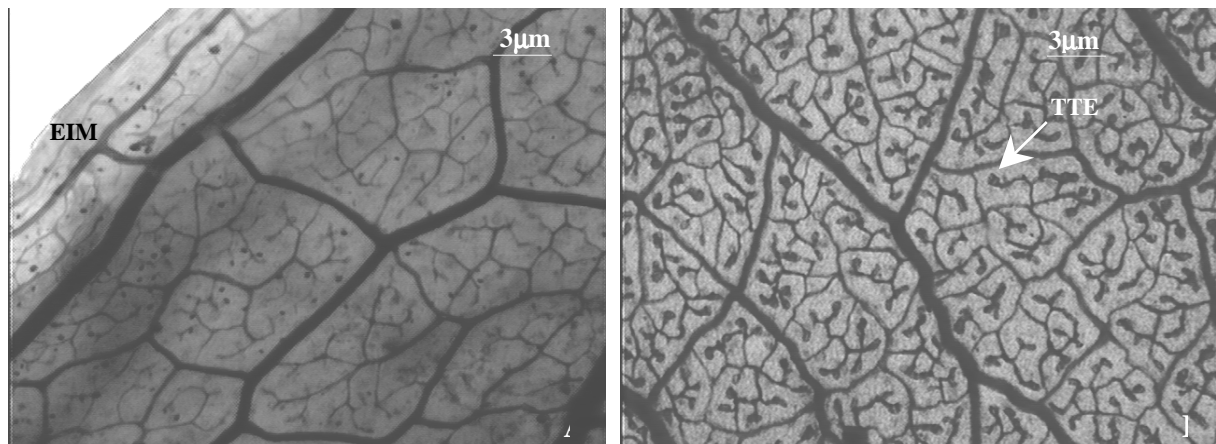


Figura 1: Diafanização. A e B – Venação da Folha de *Avicennia schaueriana*. EIM-Espaço Intermarginal; TTE - Traqueídeos Terminais Enlargecidos.

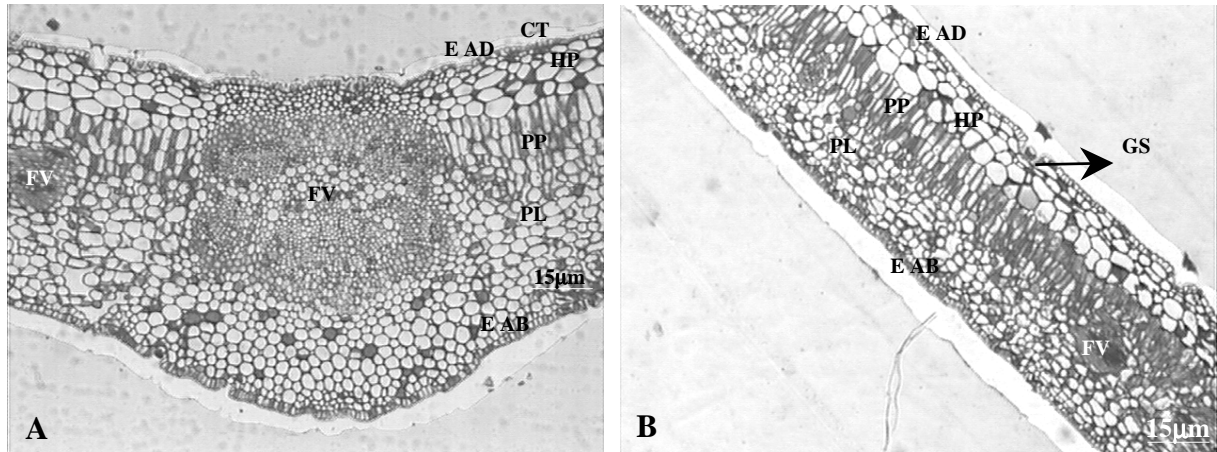


Figura 2: Microscopia óptica da folha de *Avicennia schaueriana*. A – Secção Transversal da Nervura Central; B – Secção Transversal do Mesófilo. CT = Cutícula; E AD = Epiderme adaxial; HP = Hipoderme; PP = Parênquima Paliçádico; PL = Parênquima Lacunoso; E AB = Epiderme abaxial; FV = Feixe Vascular; GS = Glândula de Sal.

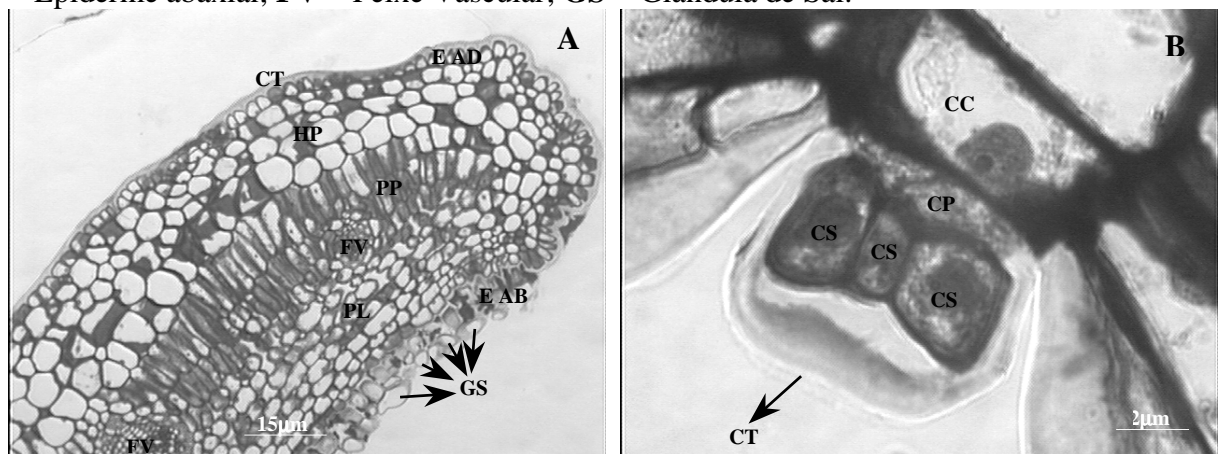


Figura 3: Microscopia óptica da folha de *Avicennia schaueriana*. A – Secção Transversal do Bordo; B – Glândula de Sal. CT = Cutícula; E AD = Epiderme adaxial; HP = Hipoderme; PP = Parênquima Paliçádico; PL = Parênquima Lacunoso; E AB = Epiderme abaxial; FV = Feixe Vascular; GS = Glândula de Sal; CS = Célula Secretora; CP = Célula Peduncular; CC = Célula Coletora.

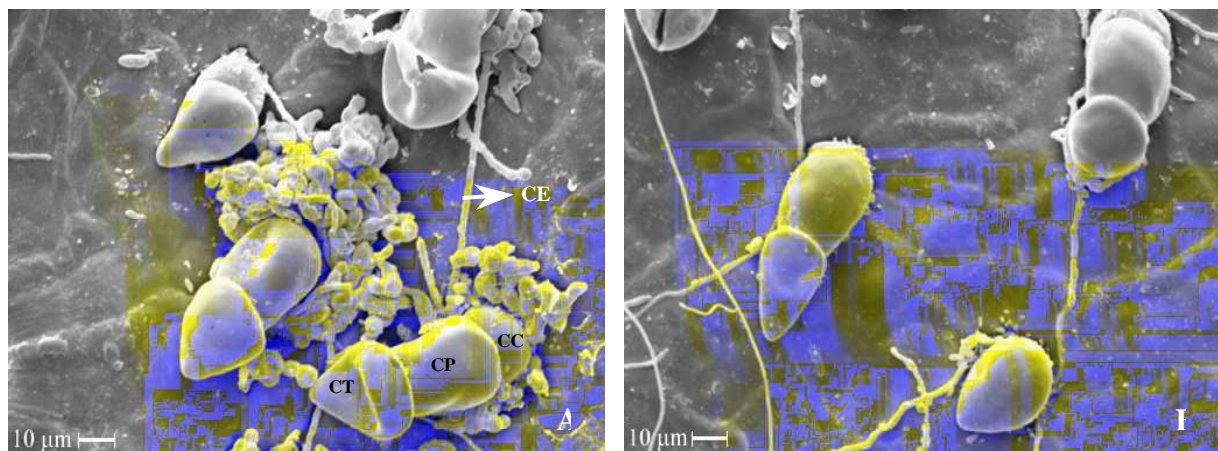


Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura de folhas adultas de *Avicennia schaueriana* na epiderme adaxial. A e B – Glândulas de sal. CE = Cera Epicuticular; CT = Cutícula; CP = Célula Peduncular ; CC = Célula Coletora.

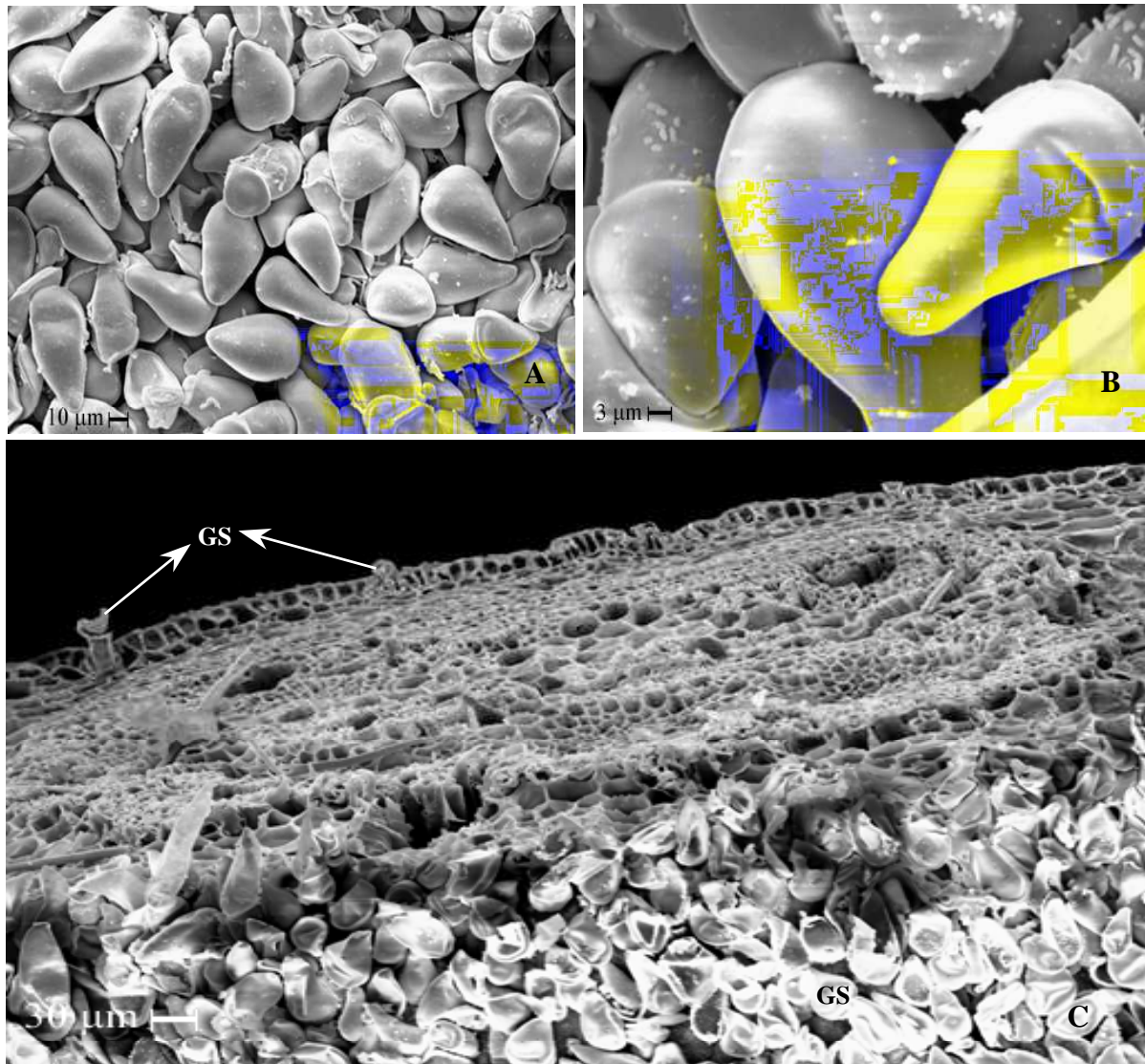


Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura de folhas adultas de *Avicennia schaueriana* na epiderme abaxial. A e B – Glândulas de sal; C – Detalhe da espessura do limbo, visualizando a epiderme abaxial recoberta com glândulas de sal. GS = Glândula de Sal.

5. Referências

- BALL, M.C. Salinity tolerance in the mangroves *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina*. I -Water use in relation to growth, carbon partitioning and salt balance. *Australian Journal of Plant Physiology*. v. 15, n. 3, p. 447-464, 1988.
- BALSAMO, R. A., THOMSON, W. W. Ultrastructural features associated with secretion in the salt glands of *Frankenia grandifolia* (Frankeniaceae) and *Avicennia germinans* (Avicenniaceae). *American Journal of Botany*, v. 80, n. 11, p. 1276-1283, 1993.
- BALSAMO, R. A., THOMSON, W. W. Salt effects on membranes of the hypodermis and mesophyll cells of *Avicennia germinans* (Avicenniaceae) - a freeze-fracture study. *American Journal of Botany*, v. 82, n. 4, p. 435-440, 1995.
- BRUNO, G. C. C. *Manguezais: da teoria à prática da preservação*. Praia Grande, SP: Prefeitura da Estância Balneária de Praia Grande, Não Paginado, 1999.
- CASTRO, M. M., MACHADO, S. R. Células e Tecidos Secretores. In: APEZZATO-da-GLÓRIA, B., CARMELLO-GUERREIRO, S. M. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Ed. UFV,

p.184, 2003.

COSTA, L. G. S. Adaptações. In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar*. São Paulo: Caribbean Ecological Research, p. 31-33, 1995.

DANILATOS, G. D. Foundations of environmental scanning electron-microscopy. *Advances in Electronics and Electron Physics*, v. 71, p. 109-250, 1988.

DSCHIDA, W.J., PLATT-AOLOIA K.A., THOMSON W.W. Epidermal peels of *Avicennia germinans* (L.) Stearn. A useful system to study the function of salt glands. *Annals of Botany*, v. 70, n. 6, p. 501-509, 1992.

FELIPE, G. M., ALENCASTRO, F.M. M.R. Contribuição ao estudo da nervação foliar das compostas do cerrados. I- Tribos Helinieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae e Senecioneae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 38, p. 125-158, 1966. Suplemento.

FITZGERALD, M. A.; ORLOVICH, D. A.; ALLAWAY, W. G. Evidence that Abaxial Leaf Glands are the Sites of Salt Secretion in Leaves of the Mangrove *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. *New Phytologist*, v. 120, n. 1, p. 1-7, 1992.

GERRITTS, P.O. *The application of glycol metacrylate in histotechnology: some fundamental principles*. Germany: Leica GmbH, 1964.

MATTOS-FONSECA, S., ROCHA, M. T. O M.D.L. e as Florestas de Manguezal. In: Seminários em Administração FEA - USP, 7, São Paulo. *Trabalho Científico Gestão Sócioambiental*, p. 1-13, 2004.

MAUSETH, J. D. Soils and mineral nutrition. In: _____ *Botany: an introduction to plant biology*. 3th ed. Boston: Jones and Bartlett, p. 373-398, 2003.

MUNNS R. Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within shoot of *Lupinus alba*. 1. Ions on xylem sap. *Plant Cell and Environment*, v. 11, n. 4, p. 283-289, 1988.

O'BRIEN, T. P., FEDER, N. McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OSBORNE, D. J.; BERJAK, P. The making of mangroves: the remarkable pioneering role played by seeds of *Avicennia marina* (mangrove forests). *Endeavour*, v. 21, n. 4, p. 143-147, 1997.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar*. São Paulo: Caribbean Ecological Research, p. 7, 1995.

SCHOLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., HEMMINGSEN, E.A., GAREY, W. Salt balance in mangroves. *Plant Physiology*, v. 37, n. 6, p. 722-729, 1962.

SHIMONY C., FAHN A., REINHOLD L. Ultrastructure and Ion Gradients in Salt-Glands Of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh. *New Phytologist*, v. 72, n. 1, p. 27-36, 1973.

SOARES, M. L. G. Zonação e as marés. In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar*. São Paulo: Caribbean Ecological Research, p.35-37, 1995.

SOBRADO, M. A. Leaf photosynthesis of the mangrove *Avicennia germinans* as affected by NaCl. *Photosynthetica*, v. 36, n. 4, p. 547-555, 1999.

SUGIYAMA, M. A flora do manguezal. In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar*. São Paulo: Caribbean Ecological Research, p. 7-21, 1995.

TOMLINSON, P. B. Family: Avicenniaceae. In: _____ *The Botany of Mangroves*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 186-207, 1986.